

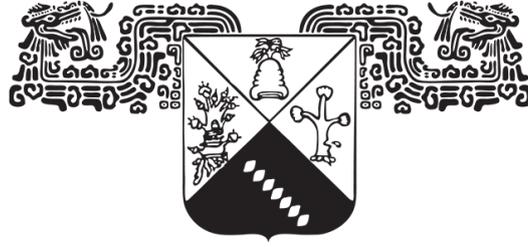
Análisis de las Propiedades Dinámicas de los Reservorios Celulares del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

DOCTORADO EN CIENCIAS

M. en C. Antonio José Bensussen Salazar



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular

Análisis de las Propiedades Dinámicas de los Reservorios Celulares del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. Antonio José Bensussen Salazar

Director de Tesis:

Dr. José Díaz Escudero

Mayo 2019

Resumen

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es uno de los problemas de salud pública más relevantes en la actualidad, debido a su falta de cura y alto costo de tratamiento. Históricamente la terapia antirretroviral ha empleado fármacos capaces de restringir el ciclo de vida del virus, con la intención de erradicarlo del organismo. Sin embargo, este enfoque terapéutico no ha podido eliminar al virus porque éste es capaz de formar reservorios en células auto-replicables de larga vida, como las células T CD₄⁺ de memoria. Considerando esta problemática, en la década pasada se propuso que el uso de fármacos capaces de estimular la transcripción del provirus podría curar la infección, erradicando los reservorios de larga vida del VIH-1. Este tipo de compuestos, conocidos como “*agentes reversores de la latencia*” (LRAs), han dado muy buenos resultados para reactivar a los provirus latentes *in vitro*. Sin embargo, esto no ha ocurrido en observaciones *in vivo* y no se entiende el porqué. Se ha propuesto que existen mecanismos post-traduccionales implicados en el pobre desempeño de los LRAs pero hasta ahora no se ha podido determinar cuáles son estos mecanismos.

En este trabajo de tesis doctoral se buscó comprender cuáles son las causas detrás de la falta de efectividad *in vivo* de los LRAs. Para ello, se representó en una red las principales interacciones a nivel molecular que regulan la latencia y la expresión génica del provirus en el interior de sus reservorios. A continuación se crearon dos modelos matemáticos, uno discreto basado en reglas lógicas y uno continuo basado en ecuaciones diferenciales ordinarias no-lineales. Ambos modelos predijeron que los LRAs más usados a nivel clínico y cuya función es inhibir a las histona deacetilasas (HDACs), promueven altos niveles de transcripción proviral y al mismo tiempo inducen la síntesis de RNAs virales no codificantes, mismos que funcionan como reguladores negativos de la traducción de proteínas virales. Este resultado explica la baja eficiencia de los LRAs observada *in vivo* a pesar de presentar altos niveles de síntesis de RNAs viral *in vitro*, marcador por excelencia de la reactivación viral.

Adicionalmente, los modelos matemáticos desarrollados a partir de la red de expresión génica del provirus también se utilizaron para determinar si existen otras formas de estimular la reactivación del VIH usando LRAs disponibles a nivel clínico. Para esto se realizó un análisis de perturbaciones de la red con el cual se encontró que el uso de nuevos LRAs como los inhibidores de las histona metiltransferasas (HMTs) aplicados en tratamiento conjunto con los compuestos liberadores de P-TEFb son capaces de maximizar la reactivación de los reservorios virales. Por último el análisis de perturbación mostró que es más fácil silenciar permanentemente a la red genética del provirus antes que reactivarla, resultado que propone reconsiderar los fundamentos y la viabilidad de la estrategia de reversión de la latencia como enfoque terapéutico para curar la infección por VIH.

Abstract

The human immunodeficiency virus (HIV) infection is currently one of the most relevant problems of public health, due to its lack of cure and the high treatment-associated costs. Historically, the antiretroviral therapy has used drugs capable to restrict the life cycle of the virus, with the aim of eradicating it. However, this therapeutic approach has not been able to eliminate the virus because of HIV establishes cell-reservoirs in long-live auto-replicative cells, such as memory CD₄⁺ T-cells. Considering this problem, in the last decade it was proposed that drugs able to stimulate provirus transcription could cure the infection by eradicating HIV-1 reservoirs. This type of compounds are known as "latency reversing agents" (LRAs), and they have a notable good performance *in vitro*. Nevertheless, this has not occurred *in vivo* and there is not clear why. In order to explain the poor performance of LRAs *in vivo*, it has been proposed that many post-translational mechanisms are implicated, but it still remains unclear which are those mechanisms.

In this doctoral thesis the causes of the poor performance of LRAs observed *in vivo* has been investigated. To this end, the main molecular interactions that control latency and gene expression of provirus inside its reservoirs has been represented into a network. After that we created two mathematical models, a discrete one based on logic rules and a continuous one based on non-linear differential equations. Both models predicted that the most clinically used LRAs, which function consists in inhibiting the histone-deacetylases (HDACs), promotes high levels of proviral transcription and at the same time induce the synthesis of non-coding viral RNAs, which are negative regulators of provirus' translation. This result explains the low performance of LRAs reported *in vivo* despite the high levels of proviral transcription observed *in vitro*, which is a well-known marker of reactivation.

Furthermore, the models developed from the gene expression network of the provirus were also used to determine whether exist other forms to stimulate HIV reactivation with LRAs clinically available. In order to achieve this goal, we performed a perturbation analysis of the network, which revealed that the use of new LRAs, such as histone-methyltransferases (HMTs) inhibitors, together with releasers of P-TEFb are able to maximize reactivation of viral reservoirs. Finally, perturbation analysis showed that it is easier to silence permanently the provirus gene expression than to reactivate it, result that proposes to reconsider the fundamentals and the viability of the latency reversion strategy as a therapeutic approach to cure HIV infection.

Para mi madre (Laura Salazar), la persona que ha estado conmigo en las horas más oscuras de mi vida, con todo mi cariño, admiración y gratitud eterna. En recuerdo de mi abuelo (Hazmonai Bensussen) y de mi tía (Rebecca Bensussen).

Por siempre suyo,

A handwritten signature in black ink, reading "Antonio Bensussen." The signature is written in a cursive, flowing style with a prominent loop at the end of the last name.

Agradecimientos

Quiero agradecer al [Dr. José Díaz Escudero](#) (CIDC-UAEM), por haberme permitido tener el honor de ser su estudiante. También quiero agradecer a los miembros del jurado evaluador de mi tesis doctoral:

[Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay](#) (IBT-UNAM)
[Dra. Lorena Díaz González](#) (CINC-UAEM)
[Dra. Masuma Atakishiyeva Kyazim Zade](#) (CINC-UAEM)
[Dra. María Angélica Santana Calderón](#) (CIDC-UAEM)
[Dr. Fernando Esquivel Guadarrama](#) (FM-UAEM)
[Dr. Ramón Gonzalez García-Conde](#) (CIDC-UAEM)

por su apoyo, comentarios y sugerencias enriquecedoras. Además, quiero agradecer de forma especial al [Dr. Maximino Aldana](#) (ICF-UNAM), por sus comentarios y sugerencias acerca de mi artículo; y a la [C.P. Mayumi Sotelo Rivera](#), por su invaluable ayuda administrativa. Finalmente quiero agradecer al [Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología \(CONACyT\)](#) por haberme otorgado la beca número: [276667](#).

¡Muchas gracias por todo!

Contenidos

Capítulo 1. Relevancia de la infección por VIH en la actualidad	1
1.1. Problemática actual de la infección por VIH	2
1.2. Origen del VIH y epidemiología de la infección	2
1.3. La infección por VIH-1 como un problema de salud pública	4
1.4. Nuevos enfoques terapéuticos contra el VIH-1	5
1.4.1. Biofármacos para terapia celular	5
1.4.2. Medicación temprana con antirretrovirales	6
1.4.3. Terapia de reversión de la latencia	7
1.5. Perspectiva y presentación de la tesis	7
Capítulo 2. Biología molecular del virus de inmunodeficiencia humana	9
2.1. Estructura y componentes del genoma viral	10
2.2. Inicio de la infección y establecimiento de los reservorios	12
2.3. Fase crónica de la infección y mantenimiento de los reservorios	17
2.4. Reactivación de la latencia	18
2.5. Etapa terminal y aparición del SIDA	20
Capítulo 3 Manipulación farmacológica de los reservorios virales	21
3.1. Terapia antirretroviral	22
3.1.1. Limitaciones y efectos secundarios	22
3.2. Terapia de reversión de la latencia	23
3.2.1. Inhibidores de las HDACs	23
3.2.2. Inhibidores de las HMTs	25
3.2.3. Agonistas de PKC	25
3.2.4. Liberadores de P-TEFb	25
3.2.5. Inhibidores de la familia BET	25
3.2.6. Agonistas de los TLRs	25
3.3. Limitaciones de la estrategia de reversión de la latencia	26
Capítulo 4. Modelos matemáticos de los reservorios del VIH-1	27
4.1. Estado del arte de la modelación matemática aplicada al VIH-1	28
4.1.1. Enfoque epidemiológico.....	28
4.1.2. Enfoque intracelular.....	28
4.2. Modelos enfocados en la reversión de la latencia	29
4.3. Limitaciones y perspectiva	30
Capítulo 5. Presentación del trabajo de tesis	31
5.1. Justificación	32
5.2. Hipótesis	32
5.3. Objetivo general	32
5.4. Objetivos particulares	32

Capítulo 6. Metodología	33
6.1. Construcción de la red genética del VIH-1	34
6.1.1. Descripción de la red genética del VIH-1	34
6.2. Modelo discreto	36
6.2.1. Derivación del modelo discreto	36
6.2.2. Dinámica del modelo discreto	40
6.2.3. Cálculo de las cuencas de atracción	45
6.2.4. Estabilidad del modelo discreto: prueba del mapa de Derrida	43
6.2.5. Probabilidad de activación viral	47
6.3. Modelo continuo	47
6.3.1. Derivación del modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias	47
6.3.2. Análisis de estabilidad	57
6.3.3. Análisis de bifurcación	58
6.3.4. Análisis de sensibilidad global	58
6.3.5. Simulación de mutantes y tratamientos	58
6.4. Validación de los modelos	59
Capítulo 7. Resultados	61
7.1. Validación de los modelos	62
7.2. La activación de las células T no basta para inducir la expresión del provirus	63
7.3. Los vncRNAs son esenciales para regular la latencia	65
7.4. La dinámica del provirus es resistente a fármacos y perturbaciones intracelulares	65
7.5. La arquitectura de la red genética del VIH-1 favorece la persistencia	66
7.6. La activación de la red se debe a los circuitos de Tat, Nef y Vpr	70
7.7. El silenciamiento de la red es más probable que su reactivación	70
7.8. Inhibir las HMTs y sobre-estimular a P-TEFb es la clave para reactivar al provirus	73
7.9. El rendimiento de los LRAs es obstaculizado por los vncRNAs	73
7.10. La inhibición de los vncRNAs no es suficiente para reactivar al provirus	76
Capítulo 8. Discusión y conclusiones	77
8.1. Semblanza de la tesis	78
8.2. ¿Cuál es la función de los vncRNAs en la dinámica de expresión génica del provirus?	78
8.3. ¿Cómo regulan Tat y los vncRNAs la latencia?	78
8.4. ¿Cómo se relacionan los vncRNAs con el bajo desempeño de los LRAs <i>in vivo</i> ?	80
8.5. ¿Cómo mejorar el rendimiento de los LRAs?	80
8.6. ¿Hay otra manera de controlar al VIH-1?	80
8.7. Conclusiones y perspectiva	81
Apéndice A	82
Referencias	83

Lista de figuras

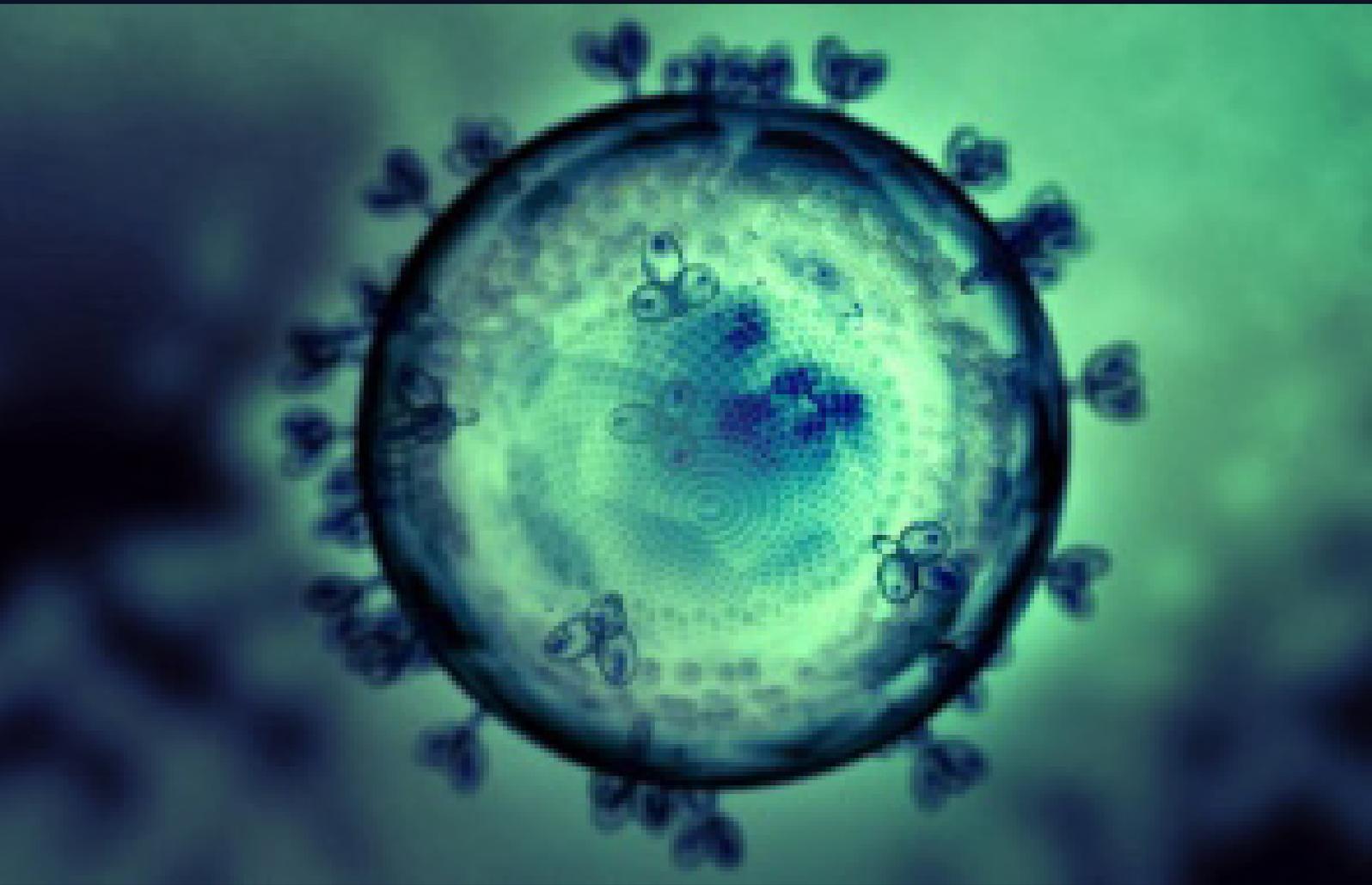
Figura 1.1. Terapia celular contra el VIH-1	6
Figura 1.2. Terapia antirretroviral contra el VIH-1	7
Figura 1.3. Terapia de reversión de la latencia	8
Figura 2.1. Estructura del virión de VIH-1	10
Figura 2.2. Genoma completo del VIH	11
Figura 2.3. Establecimiento de la infección	15
Figura 2.4. Mecanismos de manutención de la latencia viral	17
Figura 2.5. Reactivación de la latencia del provirus	19
Figura 3.1. Estrategia de reversión de la latencia	23
Figura 3.2. Mecanismos terapéuticos conocidos de los LRAs	24
Figura 6.1. Diagrama de flujo de la metodología	35
Figura 6.2. Red de regulación de la expresión génica del provirus	36
Figura 6.3. Esquemas de actualización del modelo discreto	41
Figura 7.1. Validación de los modelos matemáticos de la red del VIH-1	62
Figura 7.2. La expresión del provirus es inhibida por los vncRNAs y reactivada por Tat	64
Figura 7.3. Las asas de realimentación positiva de Tat, Nef y Vpr promueven la reincidencia	67
Figura 7.4. Terapia de reversión de la latencia	68
Figura 7.5. Análisis de perturbaciones permanentes de la red del provirus	71
Figura 7.6. Características dinámicas de las perturbaciones sobresalientes con LRAs	74
Figura 7.7. Los HDACis promueven la síntesis de los vncRNAs	75
Figura 7.8. Efecto de la inhibición de los vncRNAs en provirus defectuosos	76
Figura 8.1. Mecanismos moleculares de la autorregulación viral de la latencia	79
Figura 8.2. Resumen gráfico de la tesis.....	81

Lista de tablas y cuadros

Tabla 2.1. Proteínas derivadas del genoma del VIH	12
Tabla 2.2. Vías de contagio del VIH	13
Tabla 3.1. Fármacos antirretrovirales	22
Tabla 6.1. Esquema de actualización asíncrono.....	43
Tabla 6.2. Esquema de actualización semi-síncrono.....	46
Tabla 6.3. Parámetros del modelo continuo.....	54
Tabla 7.1. Atractores del modelo discreto	63
Tabla 7.2. Puntos de equilibrio del modelo continuo	66
Tabla 7.3. Identificación de parámetros críticos del modelo continuo	69
Tabla 7.4. Perturbaciones farmacológicamente factibles	72
Cuadro 1. Origen e importancia global del VIH.....	3
Cuadro 2: Reservorios celulares del VIH.....	14
Cuadro 3: Progresión de la infección por VIH.....	16
Cuadro 4: Modelos booleanos.....	37
Cuadro 5: Análisis de modelos booleanos.....	42
Cuadro 6: Modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias.....	48
Cuadro 7: Análisis de ecuaciones diferenciales ordinarias.....	56

Capítulo 1

Relevancia de la infección por VIH en la actualidad



Relevancia de la infección por VIH en la actualidad

1.1. Problemática actual de la infección por VIH

En 1959 un mariner británico falleció a causa de una rara enfermedad caracterizada por presentar un deterioro severo del sistema inmunológico aunado a la aparición de varias infecciones oportunistas como la del citomegalovirus (Williams et al. 1960). Dos décadas más tarde, en 1981 se reportaron varios casos similares alrededor del mundo. A este padecimiento de origen etiológico desconocido se le denominó como *Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida* (SIDA) (Gottlieb et al. 1981; Masur et al. 1981). En los años subsiguientes a 1981, tres laboratorios independientes identificaron a un retrovirus como el agente etiológico del SIDA (Barré-Sinoussi et al. 1983; Gallo et al. 1984; Levy et al. 1984). Este retrovirus fue originalmente denominado como *virus linfotrófico humano III* (HTLV-III) (Gallo et al. 1984) y posteriormente fue conocido a nivel internacional como *virus de inmunodeficiencia humana* (VIH) (Rabson & Martin 1985).

Tras la identificación del VIH como el agente causal del SIDA, el 20 de Marzo de 1987 la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó en Estados Unidos el uso de la *azidotimidina* (AZT) como el primer fármaco antirretroviral para tratar a los pacientes con SIDA. Con el paso del tiempo surgieron nuevos fármacos antirretrovirales más eficientes para interferir con el ciclo de vida del VIH (Shafer & Schapiro 2008). Gracias a la terapia antirretroviral combinada es decir, al uso simultáneo de varios fármacos antirretrovirales, ha sido posible mejorar la calidad de vida de los pacientes con VIH, a tal grado que en ellos se ha logrado eliminar el deterioro del sistema inmunológico característico del padecimiento. Los pacientes *seropositivos*, es decir, personas infectadas con VIH que no tienen SIDA, logran tener una vida relativamente normal si siguen adecuadamente el tratamiento antirretroviral. Sin embargo, los fármacos antirretrovirales no han logrado curar la infección por VIH, ya que este virus es capaz de formar reservorios celulares de larga vida en el organismo de los pacientes (Siliciano & Greene 2011; Siliciano et al. 2003). Además, el uso de antirretrovirales a largo plazo produce efectos secundarios indeseables tales como dolor crónico, hepatotoxicidad, hiperlipidemia, diabetes, osteoporosis, neuropatías, lipodistrofia, problemas cardíacos y renales (Shafer & Schapiro 2008).

1.2. Origen del VIH y epidemiología de la infección

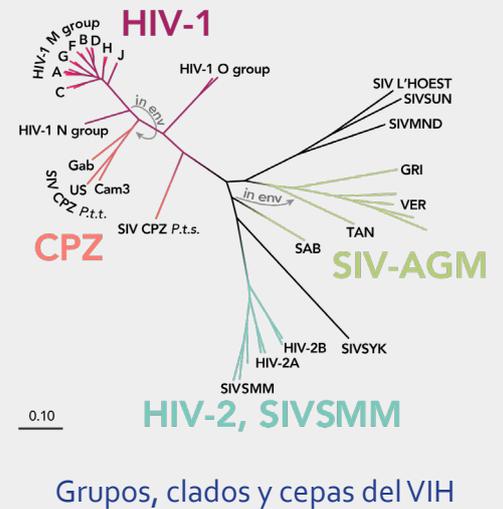
Actualmente se sabe que todas las variantes del VIH (tipo 1 y 2) evolucionaron de los *virus simianos de inmunodeficiencia* (SIVs) y estos fueron introducidos en África a la población humana en varias ocasiones a lo largo del siglo XX (Rambaut et al. 2004; Heeney et al. 2006; Ariën et al. 2007). Concretamente se ha identificado al SIVcpz de los chimpancés comunes (*Pan troglodytes troglodytes*) como el ancestro evolutivo directo del VIH-1. Se piensa que el VIH-1 saltó a los seres humanos mediante transmisiones zoonóticas que ocurrieron en el centro-oeste de África, muy cerca del Golfo de Guinea (Cuadro 1) (Rambaut et al. 2004; Keele et al. 2006). Estas transmisiones originaron en 1920 la aparición de los grupos de VIH-1 M (*mayoritario*) y O (*aislado*), y posteriormente en 1960 se originó al grupo N (*nuevo*) (Mourez et al. 2013; Locatelli & Peeters 2012). El grupo M del VIH-1 está dividido en los subgrupos A, B, C, D, H, F, G y múltiples formas recombinantes (Rambaut et al. 2004). Siendo el subgrupo C el más importante de todos, ya que es el responsable del 56% de las infecciones en el mundo. A nivel geográfico, éste

Cuadro 1 | Origen e importancia global del VIH

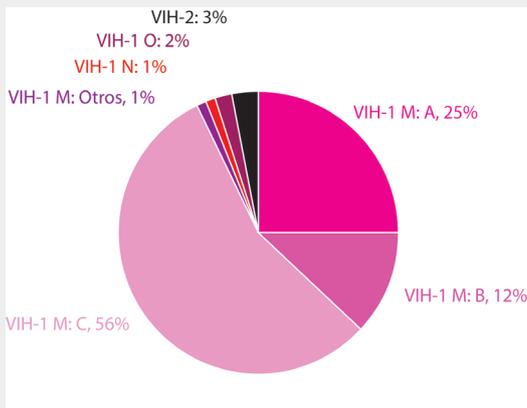
El *virus de inmunodeficiencia humana* (VIH) se originó en la región de África Subsahariana. Concretamente hablando, la zona de origen del VIH-1 se encuentra en la parte sur del Golfo de Guinea, Camerún y la región central del antiguo Congo Belga. Por su parte el VIH-2 se originó en la parte norte del Golfo de Guinea, muy cerca de Guinea Bissau. El VIH-1 tiene muchos grupos, siendo el M el más importante de todos. Se estima que este es el responsable del 56% de las infecciones en el mundo.



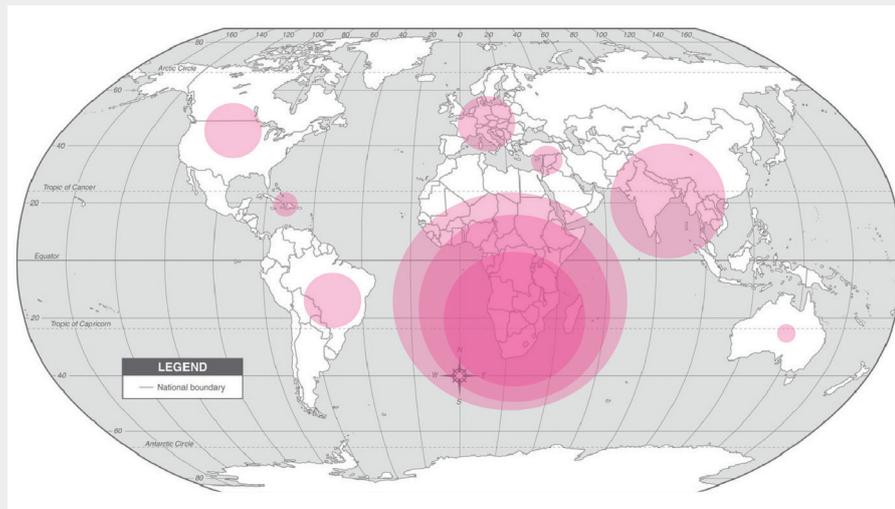
Origen geográfico del VIH



Grupos, clados y cepas del VIH



Prevalencia de los grupos del VIH



Distribución geográfica de la infección por VIH

Se estima que hay más de 40 millones de personas infectadas con VIH en el mundo, siendo África subsahariana la región con mayor prevalencia. Se estima que en esta región se concentra casi el 67% de los casos.

subgrupo se concentra en las regiones de África subsahariana donde la incidencia de los casos de VIH supera al 20% de la población así como en regiones densamente pobladas de India y China (Cuadro 1). Los siguientes subgrupos más importantes del VIH-1 son el A y el B, siendo responsables del 25 y 12% de las infecciones en el mundo, respectivamente. El resto de subgrupos no supera el 1% de infecciones (Rambaut et al. 2004). Actualmente se piensa que el VIH-1 fue exportado hacia Haití en 1966 y llegó a América del Norte dos años después (Faria et al. 2014; Robbins et al. 2003). A partir de 1981 los diferentes subgrupos del VIH-1 M se expandieron por el mundo causando una pandemia.

Por otra parte, el VIH-2 evolucionó del *virus simiano de inmunodeficiencia del mangabeye gris* (SIVsm) y no del SIVcpz como lo hizo el VIH-1 (Cuadro 1). Se cree que el VIH-2 saltó a los seres humanos en dos ocasiones en Guinea Bissau, originando así a sus subgrupos A y B (Rowland-Jones 2003; Rambaut et al. 2004; Campbell-Yesufu & Gandhi 2011). El VIH-2 es menos infeccioso que el VIH-1 y por años permaneció confinado en África occidental. Se cree que el VIH-2 fue llevado a Portugal y Francia a mediados de la década de 1960, favoreciendo su lenta difusión por Europa, América del Sur y Asia (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup "Assessment of Pathogens Transmissible by Blood" & Blood' 2016). Una característica destacable de la infección por VIH-2 es que su progresión es muy lenta en comparación con la infección por VIH-1, lo cual permite a los pacientes vivir sin medicación por mucho tiempo. No obstante cuando esta infección se reactiva, su mortalidad asociada es superior a la del VIH-1 porque los fármacos antirretrovirales no son capaces de controlarla (Campbell-Yesufu & Gandhi 2011). Para explicar estas particularidades se ha propuesto que el VIH-2 al igual que los SIVs son menos infecciosos porque presentan una menor tasa de mutaciones sinónimas, lo cual se ha asociado a la capacidad infectiva del VIH-1 (Lemey et al. 2007).

De acuerdo con la ONUSIDA, se estima que hay más de 40 millones de personas infectadas con VIH-1 en el mundo (Cuadro 1). Se sabe que desde el año 1999 la cantidad de personas que se infectan con VIH-1 se ha mantenido con una tendencia decreciente, en donde el 67% de ellos corresponde a residentes de África subsahariana (Cuadro 1). En América Latina se estima que hay entre 1.3 y 1.9 millones de personas infectadas con VIH-1, siendo Belice, Guayana y Surinam los países con mayor prevalencia entre su población (aproximadamente el 1% de la población) (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup "Assessment of Pathogens Transmissible by Blood" & Blood' 2016). Por otra parte, Brasil es el país con más infectados de VIH-1 en toda la región, presentando incluso nuevas formas recombinantes del grupo M (Bello et al. 2012). De acuerdo con la ONUSIDA, en México hay aproximadamente 220,000 personas infectadas con VIH-1, de los cuales el 60% tiene acceso a la terapia antirretroviral. La ONUSIDA también estima que a nivel mundial el 50% de los infectados ha logrado suprimir la carga viral y también se estima que la tasa de contagio ha disminuido un 22%, lo cual se traduce en 12,000 infecciones nuevas por año y aproximadamente 4,200 muertes por SIDA anualmente.

1.3. La infección por VIH-1 como un problema de salud pública

A pesar de la disminución gradual del número de contagios por VIH-1 en el mundo, la falta de cura de la infección representa un problema económico para muchas personas alrededor del mundo, ya que los costos del tratamiento antirretroviral son muy elevados (Kimaro et al. 2017). En algunos países como México la terapia antirretroviral es gratuita para los pacientes. Sin embargo, la carga económica que asume el estado por la manutención de los tratamientos antirretrovirales a largo plazo es considerablemente alta, ya que es necesario tratar a todas las enfermedades asociadas que aparecen durante la progresión de la infección por VIH-1 (Kimaro et al. 2017). Además, factores socio-culturales como la falta de higiene, la negligencia para seguir el tratamiento antirretroviral y las prácticas sexuales de alto riesgo pueden originar la aparición de nuevas variantes del VIH-1 más virulentas y resistentes a los antirretrovirales (Rambaut et al. 2004). Situación que a su vez vulnera la capacidad del estado para proporcionar el tratamiento adecuado a sus ciudadanos, especialmente en los países de la región de África subsahariana, en donde se concentra la mayor cantidad de enfermos de VIH-1 en el mundo (Cuadro 1).

1.4. Nuevos enfoques terapéuticos contra el VIH-1

Hasta el momento, la terapia antirretroviral ha sido el único tratamiento capaz de mantener crónicamente controlada a la infección por VIH-1 (Dinoso et al. 2009). Desafortunadamente ni siquiera la intensificación de la terapia es capaz de erradicar a la infección (Dinoso et al. 2009), situación que ha puesto en duda la existencia de una cura. La única evidencia que sugiere que la infección por VIH-1 es curable fue aportada por un caso clínico reportado en el año 2007. El paciente en cuestión, Timothy Ray Brown, fue un enfermo de VIH-1 que también padecía una leucemia asociada a la infección. Los médicos que trataron al Sr. Brown originalmente buscaban curar su leucemia y para ello le practicaron un trasplante de células madre hematopoyéticas. Sorpresivamente la carga viral del Sr. Brown disminuyó a niveles indetectables incluso sin antirretrovirales (Allers et al. 2011), hecho que se ha mantenido hasta el día de hoy (Lederman & Pike 2017), razón por la cual se piensa que este es el primer caso en la historia de un paciente curado de la infección por VIH-1 (Allers et al. 2011). El equipo médico que atendió al Sr. Brown descubrió que accidentalmente le habían trasplantado células madre con una delección en el receptor para quimiocinas CCR5, el cual es indispensable para que el VIH-1 infecte una célula (Allers et al. 2011). Este caso sentó un precedente histórico, ya que demostró que es posible mantener crónicamente controlada la infección sin la necesidad de antirretrovirales. Inspirados en el caso del Sr. Brown, en el año 2013 un grupo de investigación en Estados Unidos realizó un trasplante de células madre hematopoyéticas genéticamente modificadas para poseer la mutación Δ CCR5 a dos pacientes con VIH-1 (Henrich et al. 2014). De primera instancia estos pacientes mostraron una reducción dramática de la carga viral incluso sin tratamiento antirretroviral, lamentablemente después de unos meses los pacientes volvieron a presentar altos niveles de VIH-1 en sangre (Henrich et al. 2014).

1.4.1. Biofármacos para terapia celular

Los resultados obtenidos con los trasplantes de células madre hematopoyéticas sugieren que es posible curar la infección por VIH-1, no obstante estos resultados también han dejado en claro que la estrategia para erradicar a la infección no debe basarse exclusivamente en modificar a las células para que no sean infectadas por el virus. Pensando en una forma de potenciar este enfoque, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de diseñar nuevos biofármacos para ser utilizado en la terapia celular contra el VIH-1 (Figura 1.1). Algunos biofármacos se han concentrado en evitar la internalización del virus en las células del sistema inmunológico, por ejemplo las modificaciones en los receptores CCR5 (Dong et al. 2007; Anderson & Akkina 2007) y CXCR4 (Wilen et al. 2011). Otros biofármacos se han centrado en evitar la reactivación viral, usando transgenes de RNAs de interferencia diseñados para silenciar la expresión génica del VIH-1 (Banerjee et al. 2003; Levine et al. 2006; DiGiusto et al. 2010). También se han creado biofármacos capaces de proporcionar genes a las células del sistema inmunológico para que éstas eliminen al genoma del VIH-1 (Macpherson et al. 2005; Chono et al. 2011) (Figura 1.1). Siguiendo por esta misma línea, nuevos biofármacos más radicales inclusive se han enfocado en expulsar al provirus de las células infectadas usando el sistema de edición génica CRISPR (del inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Ophinni et al. 2018) (Figura 1.1).

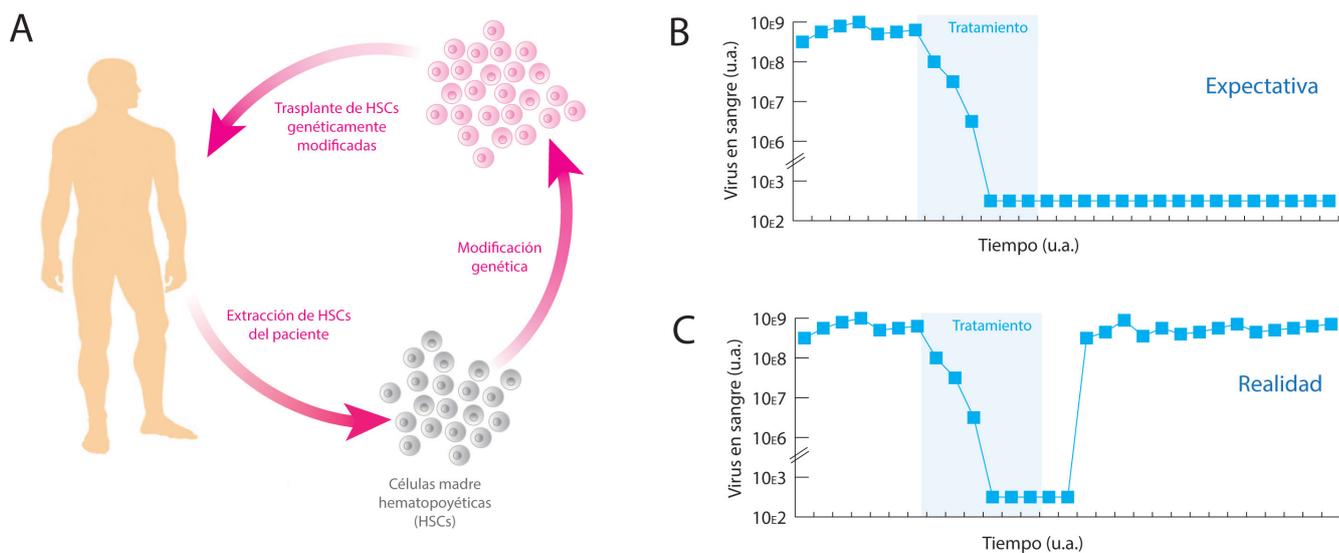


Figura 1.1 | Terapia celular contra el VIH-1

A) Representación esquemática del procedimiento general para proporcionar terapia celular contra el VIH. Todo inicia extrayendo células madre hematopoyéticas de los pacientes infectados, a las cuales se les inserta un transgen (biofármaco) con propiedades terapéuticas (e.g. Δ CCR5), para ser posteriormente regresadas al paciente. **B)** Idealmente se espera que la viremia en sangre disminuya. **C)** Sin embargo, se ha visto que esto no ocurre en la práctica clínica.

También existen otros biofármacos que están enfocados en proporcionar a las células la capacidad de suicidarse en caso de ser infectadas por el VIH-1, con la finalidad de evitar la propagación del virus en el organismo. Estos biofármacos acoplan el gen de una toxina con el sistema de control génico que usa el VIH-1 para regular la expresión de sus genes, permitiendo que la toxina sea expresada únicamente en células infectadas (Wu et al. 2007; Young et al. 2008) (Figura 1). Respecto a la efectividad de estas nuevas estrategias terapéuticas, se ha observado que el silenciamiento producido por RNAs de interferencia dura en promedio un año (Hoxie & June 2012). Por otra parte, las estrategias de eliminación selectiva de células infectadas con VIH-1 no ha progresado significativamente, debido a los peligros de bioseguridad inherentes al uso de toxinas acopladas a sistemas basados en lentivirus (Fischer & Cavazzana-Calvo 2005).

1.4.2. Medicación temprana con antirretrovirales

El caso del Sr. Brown no es el único indicio que señala que es posible lograr la curación de la infección por VIH-1. Un grupo de pacientes franceses, conocidos colectivamente como la cohorte de VISCONTI, mostró que si se recibe una medicación antirretroviral en las primeras etapas de la infección, es posible lograr que los pacientes controlen espontáneamente la infección sin la necesidad de recibir más antirretrovirales por tiempos prolongados (Sáez-Cirión et al. 2013). De hecho, se va observado que si los pacientes reciben tratamiento antirretroviral por dos años en las primeras semanas del contagio adquieren mayores probabilidades de alcanzar una cura funcional, es decir: aún siguen infectados con VIH-1 pero la carga viral es indetectable sin ayuda de medicación antirretroviral (Figura 1.2) (Sáez-Cirión et al. 2013; Herout et al. 2016). Todavía no está claro el mecanismo molecular detrás de estas observaciones, sin embargo estos resultados han mostrado que los reservorios del VIH-1 sí pueden manipularse con la terapia antirretroviral. No obstante, estos hallazgos también muestran que el uso de los fármacos antirretrovirales no es el único factor necesario para controlar los reservorios del VIH-1 ya que el control espontáneo de la infección puede deberse a un simple retraso en la aparición de la viremia (Martin et al. 2017) (Figura 1.2).

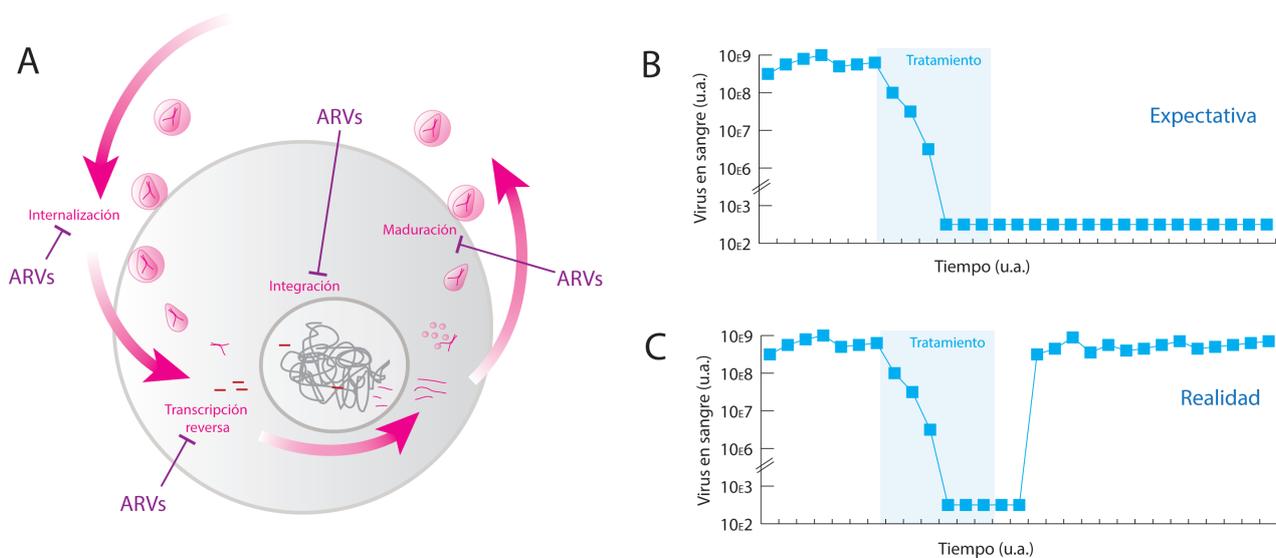


Figura 1.2 | Terapia antirretroviral contra el VIH-1

A) Representación gráfica de los principales blancos del ciclo de vida del VIH que son atacados por la terapia antirretroviral. Siendo la internalización, la transcripción reversa del genoma viral, la integración y la maduración, los blancos por excelencia. B) Se ha propuesto que la medicación antirretroviral temprana puede ser la clave para curar la infección, o al menos sería capaz de inducir una cura funcional. C) No obstante, este enfoque no es eficiente para eliminar la infección.

1.4.3. Terapia de reversión de la latencia

Pensando en una forma de mejorar el desempeño de los fármacos antirretrovirales, a principios de la década del 2000 se propuso acoplar la terapia antirretroviral clásica con nuevos compuestos capaces de revertir la latencia del provirus. Idealmente, los *agentes reversores de la latencia* (LRAs por sus siglas en inglés: *Latency Reversing Agents*) reactivarían a los provirus latentes, favoreciendo que las células infectadas mueran ya sea como resultado de la progresión de la infección o bien por reconocimiento directo del sistema inmunológico. A la par de esto, los antirretrovirales evitarían que los nuevos viriones infectaran más células a su alrededor (Deeks 2012) (Figura 1.3). Este enfoque ha tenido una serie de altibajos, ya que las pruebas *in vitro* apuntan a que es una idea prometedora (Deeks 2012), pero los resultados en clínica no son concluyentes (Bullen et al. 2014). Un estudio reciente de modelación matemática mostró que el bajo rendimiento de los LRAs se debe a su incapacidad de reducir el tamaño de los reservorios del VIH-1 (Hill et al. 2014). Este mismo estudio señaló que para evitar la restitución de la carga viral, los LRAs debían reducir 10,000 veces el tamaño de los reservorios (Hill et al. 2014), situación que no es posible con los LRAs actuales (Cillo et al. 2014) (Figura 1.3).

1.5. Perspectiva y presentación de la tesis

Por el momento sigue sin haber una cura definitiva contra la infección por VIH-1, sin embargo hay evidencias que sugieren que en un futuro no muy lejano podría alcanzarse una cura funcional para la enfermedad. De los enfoques terapéuticos anteriormente discutidos, la terapia celular se perfila como el campo más prometedor para erradicar la infección por VIH-1, sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer antes de implementarla a gran escala. El primer reto que este enfoque tiene es demostrar que el caso del Sr. Brown no fue un simple golpe de suerte y que puede ser replicado si las condiciones son las mismas. El segundo reto es probar la inocuidad de los transgenes enviados a los pacientes.

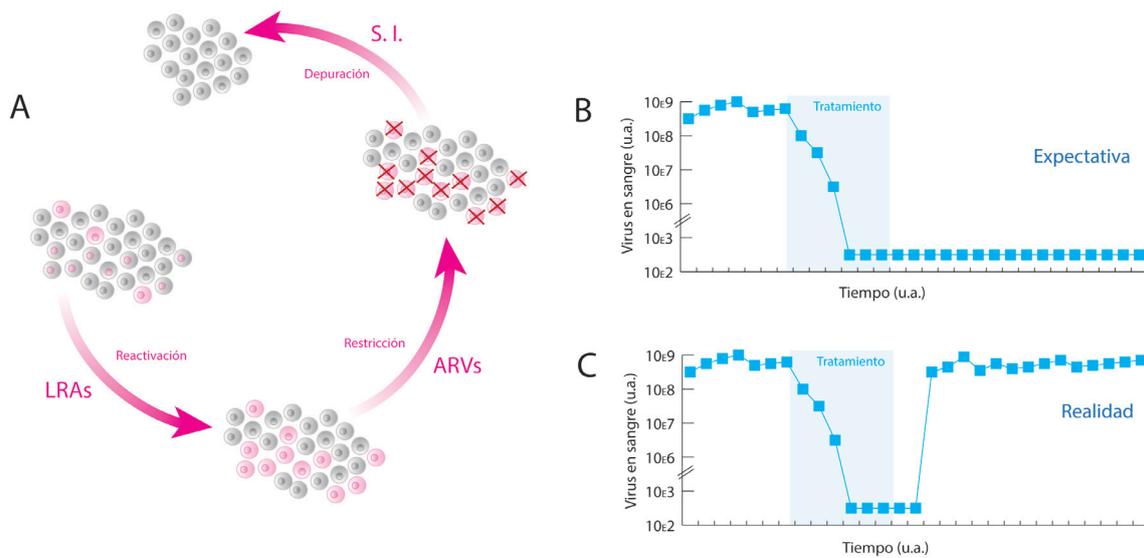


Figura 1.3 | Terapia de reversión de la latencia

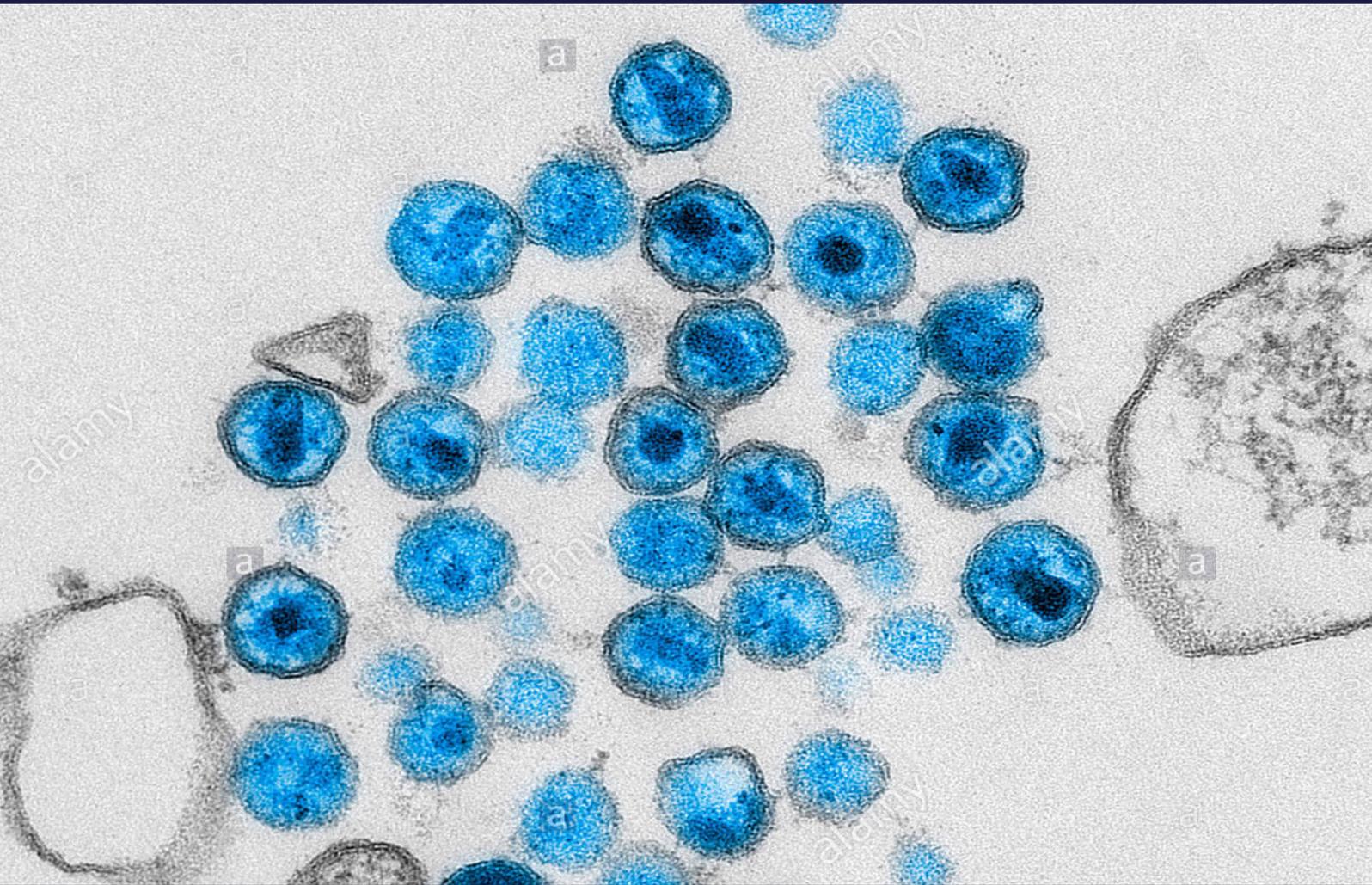
A) Los reservorios virales (representados por células con citoplasma gris y núcleo rosa) son indetectables para el sistema inmunológico (S.I.). Se ha propuesto que usando LRAs, éstos pueden ser reactivados (células rosas) y con la ayuda de los antirretrovirales (ARVs) es posible evitar que produzcan partículas virales para infectar células sanas (células grises). De esta forma, por el avance de la infección o por el S.I., estos reservorios podrían ser eliminados paulatinamente. **B)** Pese a las grandes expectativas por los resultados *in vitro* a su favor. **C)** En clínica no han demostrado tener efectividad para eliminar la infección.

No menos importante es lograr reducir los costos del procedimiento quirúrgico, que ronda los 300,000 dólares estadounidenses (> 6,000,000 de pesos mexicanos) a fin de que pueda ser una opción asequible para los pacientes infectados con VIH-1 (Broder et al. 2017) (Figura 1.1). Por su parte, el uso temprano de antirretrovirales tiene el reto de lograr una detección oportuna, cosa que no siempre es posible ya que la mayoría de pacientes no saben que se han infectado además de que se debe mostrar que el control espontáneo de la infección no se trata de un simple retraso (Martin et al. 2017) (Figura 1.2). En lo concerniente a la terapia de reversión de la latencia, se deben identificar las causas del bajo rendimiento de los LRAs para encontrar formas más efectivas de reactivar a los reservorios virales (Bullen et al. 2014) (Figura 1.3).

En este sentido, el presente trabajo de tesis doctoral busca identificar mediante el uso de modelos matemáticos, cuáles son las causas de la baja eficiencia de los LRAs, y también determinar si existen combinaciones de LRAs que pudieran tener una mejor capacidad de reactivación para evaluarse en clínica. Esta tesis fue organizada en ocho capítulos, y cuenta con un anexo en el que se incluye un glosario de términos biológicos y la publicación aceptada de este trabajo. En el Capítulo 2 se habla de la biología molecular del VIH-1, de su ciclo de vida y se aborda *in extenso* el proceso de formación de los reservorios en el organismo. En el Capítulo 3 se aborda a profundidad, los resultados clínicos de la terapia de reversión de la latencia. En el Capítulo 4 se habla de los modelos matemáticos enfocados a entender la dinámica de la infección por VIH-1, y se hace hincapié en aquellos modelos que estudian los reservorios virales al igual que la terapia de reversión de la latencia. En el Capítulo 5 se presentan los objetivos de este trabajo de tesis, y en el Capítulo 6 se muestran los métodos empleados para realizar este trabajo de investigación. En el Capítulo 7 se presentan los resultados de la investigación y finalmente éstos se discuten en el Capítulo 8.

Capítulo 2

Biología molecular del virus de inmunodeficiencia humana



Biología molecular del virus de inmunodeficiencia humana

2.1. Estructura y componentes del genoma viral

El virus de inmunodeficiencia humana es un virus de RNA de cadena sencilla, perteneciente a la familia *Retroviridae* y al género *Lentivirus*, su partícula mide aproximadamente 100 nm de diámetro y está recubierta por una membrana lipídica externa (Figura 2.1). En el interior de la cápside se encuentran dos copias del genoma viral de RNA junto con la transcriptasa reversa (RT/RNasa H), la integrasa (IN), así como dos copias del tRNA^{Lys3}, necesarios para iniciar la transcripción reversa. Junto al genoma también viajan otras proteínas accesorias como Nef, Vif y la proteasa p10 (PR), mismas que son necesarias para la maduración viral (Tabla 2.1) (Acheson 2011). En lo concerniente a su genoma, el VIH-1 contiene los genes estructurales de *gag*, *pol* y *env*, y los genes regulatorios de *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vif* y *vpv* (Figura 2.2A). El genoma viral se encuentra flanqueado por dos regiones LTR, la región perteneciente al extremo 5' contiene un promotor en el cual hay varios sitios de unión a factores transcripcionales de los cuales destacan dos sitios de unión a NF-κB y tres para Sp1 (Colin & Van Lint 2009), mismos que son indispensables para la transcripción viral (Figura 2.2B). Por otra parte, en el extremo 3'LTR también se encuentran los mismos sitios de unión para factores transcripcionales y además existe un promotor anti-sentido, el cual regula la transcripción de un RNA largo anti-sentido (Saayman et al. 2014). El VIH-2 posee básicamente los mismos genes con excepción de *vpv*, en su lugar contiene el gen de *vpx* (Acheson 2011) (Figura 2.2C), además no se sabe si existe el promotor anti-sentido de la región 3'LTR (Figura 2.2D). Después de la transcripción del genoma viral, se forman varias estructuras en el RNA genómico, dentro de las cuales hay dos estructuras notables, la primera es una horquilla que se forma antes del codón +1 en el extremo 5'. Dicha estructura de RNA se conoce como *elemento responsivo de transactivación*, TAR (del inglés: *trans-activating response element*).

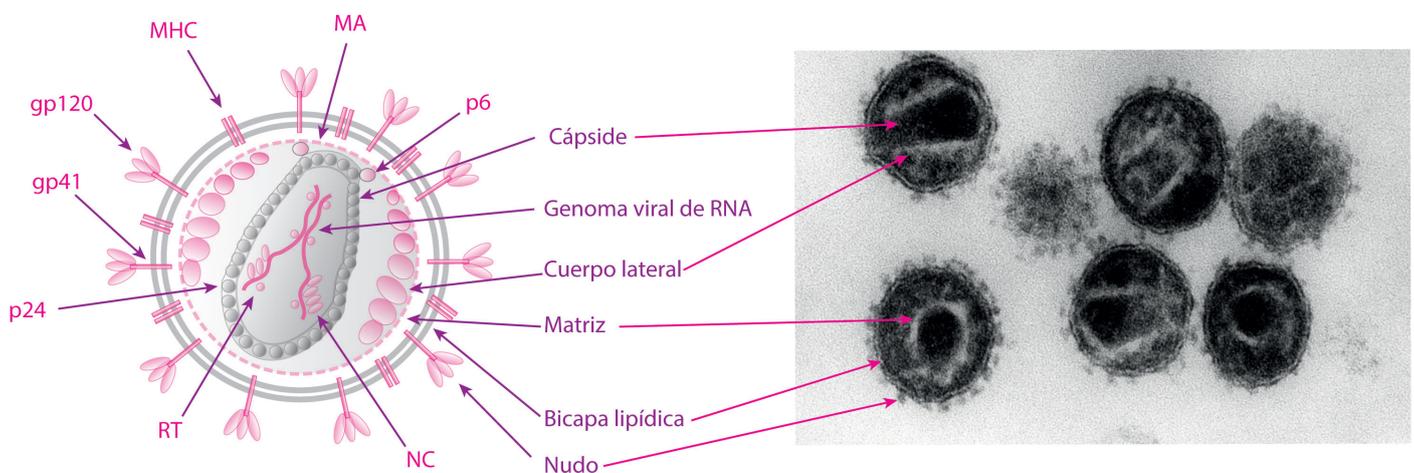


Figura 2.1 | Estructura del virión de VIH-1

En esta figura se muestra un esquema de los componentes estructurales del virión de VIH-1 que protegen su genoma de RNA.

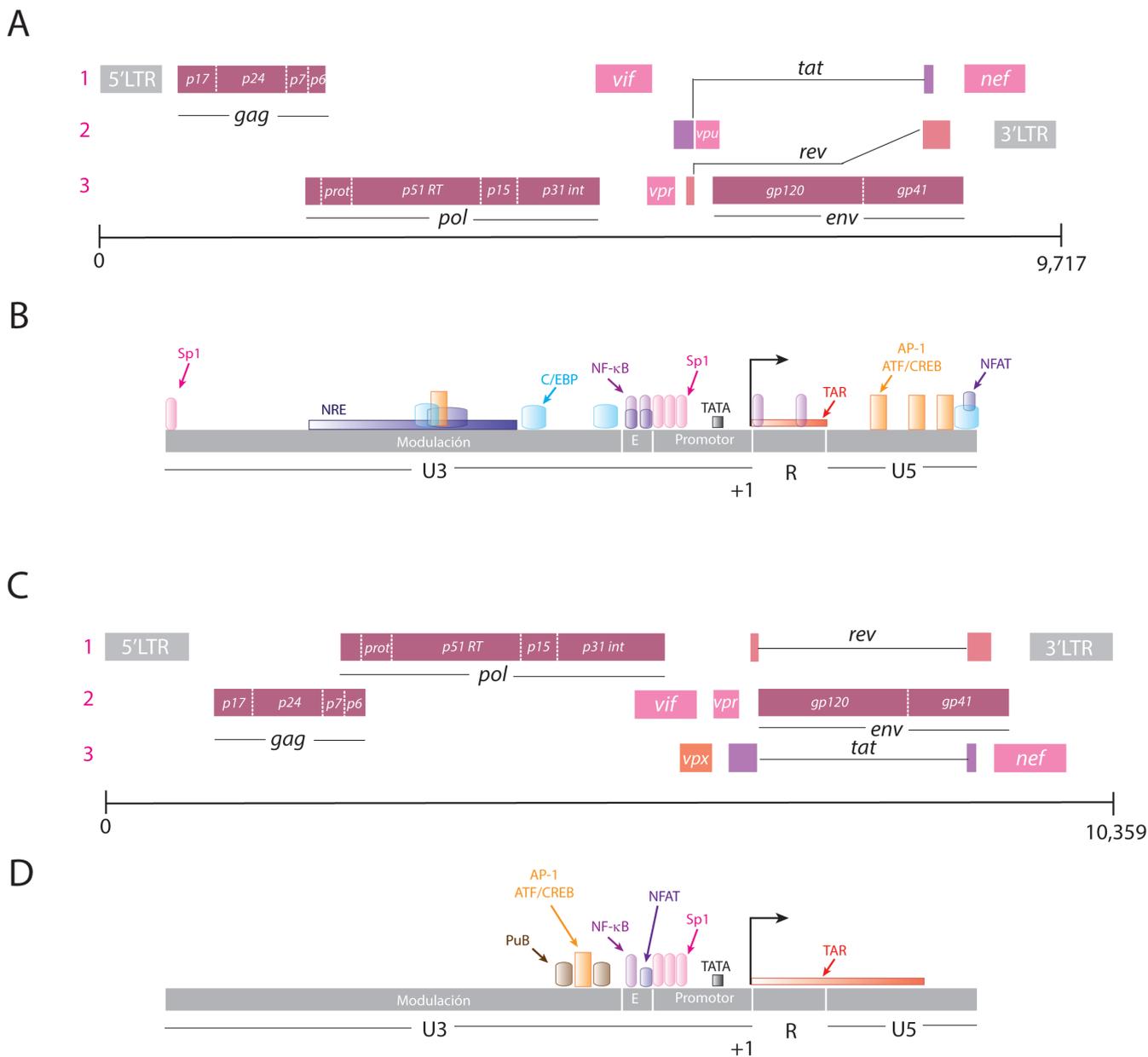


Figura 2.2 | Genoma completo del VIH

A) Diagrama del genoma del VIH-1, los números rosas representan los tres marcos abiertos de lectura que posee este genoma. B) Región 5'LTR del genoma del VIH-1. En este diagrama se muestran los sitios de unión para todos los factores transcripcionales conocidos. El elemento TAR se representa con una barra longitudinal roja. C) Diagrama del genoma del VIH-2. D) Región 5'LTR del genoma del VIH-2.

La segunda estructura está en la parte distal del genoma, hacia el extremo 3'. Esta estructura es conocida como *elemento responsivo de Rev*, RRE (del inglés: *Rev responsive element*). Ambas estructuras de RNA están altamente conservadas, mostrando una frecuencia de mutación inferior a 0.1 (Watts et al. 2009). Lo cual indica su importancia para la replicación viral.

2.2. Inicio de la infección y establecimiento de los reservorios

El VIH puede ser adquirido por varias vías (Tabla 2.2), aunque la más común es a través de las microabrasiones en las mucosas producidas durante la cópula. Si la dosis de exposición es de 500 a 1,000 partículas virales, entonces el contagio estará asegurado. Después del contagio, el virus se vale de sus glucoproteínas para anclarse en la membrana de las células epiteliales. Posteriormente, con ayuda de la interacción entre gp41 y DC-SING, el virión infecta a las células de Langerhans, siendo transportado por ellas hacia los ganglios linfáticos (Wu & KewalRamani 2006; Ogawa et al. 2013). Una vez en los ganglios linfáticos, los viriones usan a gp120 para interactuar con el coestimulador CD4 y con los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 a fin de infectar la mayor cantidad posible de macrófagos, células dendríticas y linfocitos T CD4+ (Wu & Kewal-Ramani 2006). Cabe señalar que el VIH puede prescindir de estos receptores y coestimuladores, ya que es capaz de infectar células CD4- aprovechándose de la unión de las proteínas del complemento a la partícula viral, para ser internalizado en las células con ayuda del receptor de complemento C3 (Lambris et al. 2008) y al ácido siálico en neuronas y células de la microglía (Acheson 2011).

Tabla 2.1 | Proteínas derivadas del genoma del VIH

Gen	Tamaño	Nombre	Función
<i>gag</i>	p24 p17 p7 p6	Pr55Gag capsid protein (CA) matrix protein (MA) nucleoprotein (NC)	Precursor proteico de proteínas estructurales Formador de la cápside Proteína miristilada, forma la parte interna de la membrana Formador del complejo RNA-Nucleoproteína Involucrada en la liberación de viriones
<i>pol</i>	p10 p51 p15(66) p32	Pr160GagPol protease (PR) reverse transcriptase (RT) RNase H integrase (IN)	Precursor de las enzimas virales Realiza cortes proteolíticos en Pr55Gag y en Pr160GagPol para liberar a las proteínas estructurales del virión A cargo de la transcripción reversa del genoma de RNA Degrada el RNA viral del complejo RNA viral /DNA Integra el cDNA del provirus en el genoma del hospedero
<i>env</i>	gp120 gp41	PrGp160 surface glycoprotein (SU) transmembrane protein (TM)	Precursor proteico que es procesado por el hospedero Fija al virus a su célula blanco Ancla a gp120 al virión
<i>tat</i>	p14	transactivator protein	Transactiva la transcripción del RNA viral
<i>rev</i>	p19	RNA splicing regulator	Facilita la exportación de RNAs sin empalmar y parcialmente editados
<i>nef</i>	p27	negative regulating factor	Protege a la célula infectada de la respuesta inmunológica
<i>vif</i>	p23	viral infectivity protein	Necesaria para producir viriones infectivos <i>in vivo</i>
<i>vpr</i>	p15	virus protein r	Regula el ciclo celular del hospedero, componente estructural
<i>vpu</i>	p16	virus protein unique	Modulador de la señalización, facilita la liberación
<i>vpx</i>	p15	virus protein x	Controla los primeros pasos de la replicación del VIH-2
<i>tev</i>	p26	tat/rev protein	Proteína de fusión de Tat-Rev, regula a ambas proteínas en el núcleo

Información tomada de (Acheson 2011).

Tabla 2.2 | Vías de contagio del VIH

Sitio de contagio	Medio de transmisión	Probabilidad de contagio	Importancia epidemiológica
Vagina	Semen	1/200 - 1/2000	~12.6 millones de casos
Interior del pene	Descamaciones y fluidos	1/700 - 1/3000	~10.6 millones de casos
Recto	Semen	1/20 - 1/300	~3.6 millones de casos
Tracto gastrointestinal	Semen	1/2500	~ 1.5 millones de casos
	Sangre materna	1/5 - 1/10	~960,000 casos
	Leche materna	1/5 - 1/10	~960,000 casos
Placenta	Sangre materna	1/10 - 1/20	~480,000 casos
Torrente sanguíneo	Transfusión e inyectables	95/100	~2.6 millones de casos

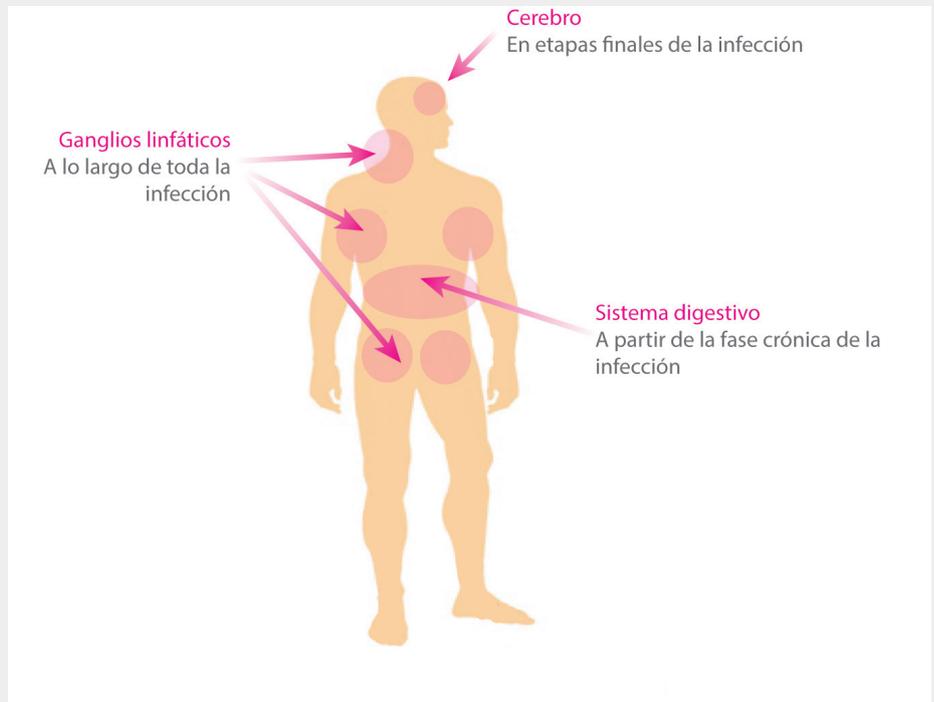
Información tomada de ONUSIDA.

De esta forma, el VIH es capaz de infectar a una gran variedad de células del sistema inmunológico con distintos tiempos de vida (Cuadro 2), dentro de las cuales destacan los linfocitos T CD₄⁺ activados cuya vida media es de 24 h, macrófagos con 14 días de vida media, células T CD₄⁺ vírgenes (fase G₁) cuya vida media está entre 1 y 8 años (Farber et al. 2014), células dendríticas con 6 meses de vida media, linfocitos T CD₄⁺ de memoria (quiescentes, G₀) con aproximadamente 44 meses de vida media (Stevenson 2003). Inclusive se ha visto que el VIH puede infectar a células madre hematopoyéticas, las cuales tienen una vida media muy larga (Carter et al. 2010).

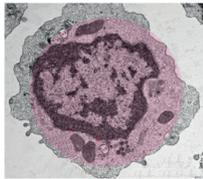
En todos los casos, después de que el virión se adhiere al hospedero, se produce un cambio conformacional que permite que la membrana lipídica externa se fusione con la membrana celular del hospedero, lo que produce la internalización de la cápside (Figura 2.3). Cuando esto ocurre se produce un cambio de pH en el endosoma, que permite la liberación del RNA genómico junto con las proteínas virales en el citoplasma (Archin et al. 2014). Posteriormente se activa la transcripción reversa para sintetizar el cDNA del provirus, y en paralelo las cadenas del RNA genómico son degradadas por la RNasa H (Figura 2.3). Durante la síntesis del cDNA, la transcriptasa reversa produce una mutación por cada 10⁴ nucleótidos durante un ciclo de replicación, situación que favorece la aparición de cuasi-especies a lo largo del tiempo de vida del paciente, mismas que eventualmente no son afectadas por los anticuerpos anti-VIH (Parren et al. 1999; Levy 2011). Es importante señalar que la mayoría de las mutaciones que se presentan en el genoma viral son sinónimas, pero no es infrecuente que, por la alta tasa de mutación, aparezcan variantes deficientes del virus (Herbein et al. 1998; Zhang et al. 1997). Además, se ha visto que el provirus puede mutar casi todo su genoma excepto regiones que codifican para estructuras de RNA indispensables para la replicación, tales como el elemento TAR y el REE, así como las regiones LTR, los sitios de splicing y los genes de las proteínas de control como Tat y Rev (Watts et al. 2009). Seis horas después de la síntesis del cDNA de doble cadena, éste se cicla y es transportado hacia el núcleo en un complejo con la integrasa (Sloan & Wainberg 2011) (Figura 2.3). En este punto, el provirus recién sintetizado permanece en el citoplasma aproximadamente 6 horas más hasta que la vía de NF-κB es activada en respuesta a la invasión viral (Sloan & Wainberg 2011). Cuando esto ocurre, el provirus es transportado al núcleo donde la integrasa cataliza la inserción del provirus al genoma del hospedero, preferentemente en lugares con alta actividad transcripcional (Sloan & Wainberg 2011) (Figura 2.3). Sobre la eficiencia de este proceso se sabe que por cada 100,000 millones de viriones producidos en un día, sólo se integra el 1% (Acheson 2011). A partir de aquí, en todas las células infectadas sólo pueden ocurrir dos eventos: 1) que el provirus active su transcripción directamente o 2) que el provirus entre en latencia por tiempo indefinido (Figura 2.3).

Cuadro 2 | Reservorios celulares del VIH

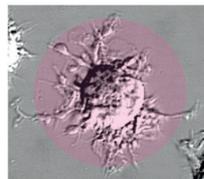
El proceso de infección inicia en las mucosas, típicamente del aparato reproductor, siendo las células dendríticas foliculares los primeros blancos del VIH. El virus usa a estas células como "caballos de Troya", para ser transportado hacia los ganglios linfáticos y poder infectar a otras células, como los macrófagos, los linfocitos (activados y vírgenes), así como a las células de memoria T CD4+. A medida de que progresa la infección, el virus establece otros reservorios en la membrana intestinal, lo que favorece la entrada de antígenos bacterianos como el LPS, situación que promueve un estado crónico de inflamación. En etapas avanzadas de la infección, el



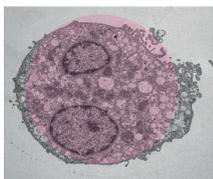
Ubicación anatómica de los reservorios del VIH



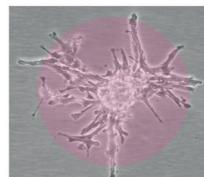
Linfocitos T CD4+ activados
Vida media estimada en ~ 24 horas



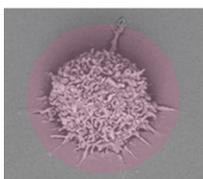
Células dendríticas
Vida media estimada en ~ 6 meses



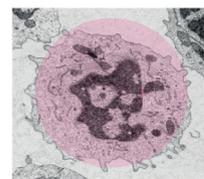
Macrófagos
Vida media estimada en ~ 14 días



Células dendríticas foliculares
Vida media estimada en ~ 44 meses



Linfocitos T CD4+ en reposo (G1)
Vida media estimada entre 1 y 8 años



Linfocitos T CD4+ de memoria (G0)
Vida media estimada en ~ 44 meses

Principales tipos celulares del sistema inmunológico infectados por el VIH

El virus es capaz de infectar al sistema nervioso central, específicamente a células de la microglia y a las propias neuronas. Lo cual favorece la aparición de enfermedades mentales en pacientes con SIDA.

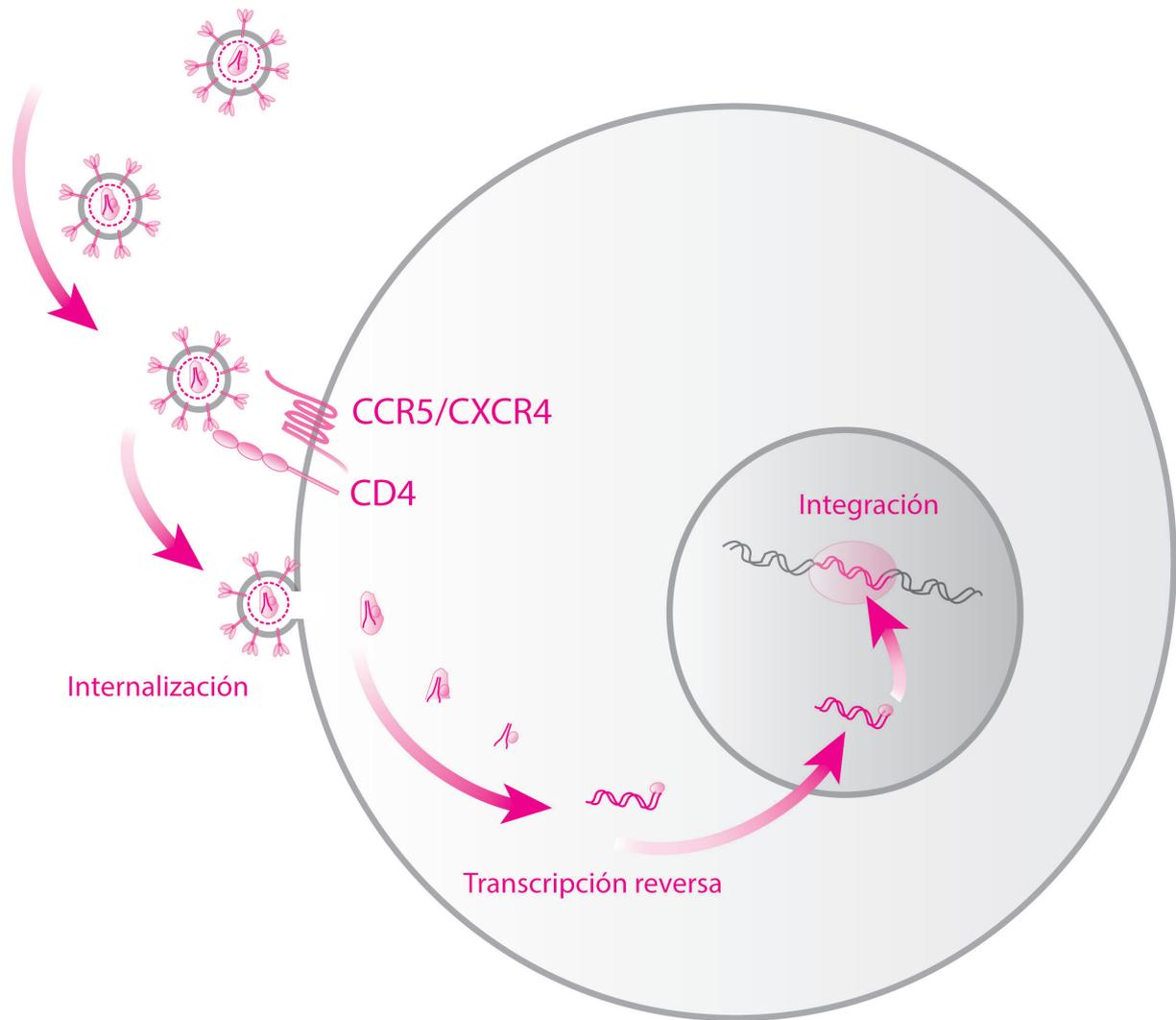


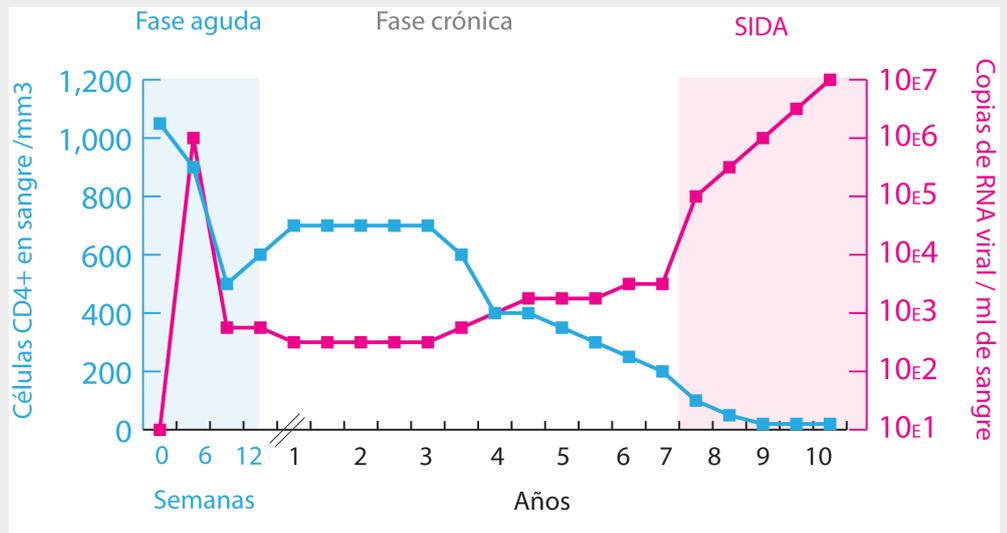
Figura 2.3 | Establecimiento de la infección

Cuando un virión libre tiene contacto con alguna célula CD4+, éste interactúa con los receptores de quimiocinas CCR5 y/o CXCR4 junto con el coestimulador CD4 para fusionarse con la célula y liberar la cápside en su interior. Después del proceso de internalización, inicia la transcripción reversa y el provirus recién sintetizado es transportado al núcleo, donde es insertado en el genoma del hospedero por acción de la integrasa viral. Una vez en el genoma, el provirus puede activarse o permanecer en latencia.

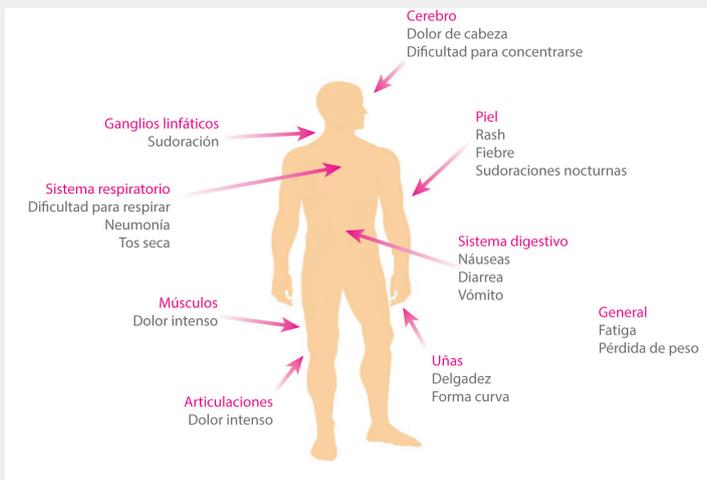
En caso de que las células recientemente infectadas por el VIH entren en latencia, éstas serán consideradas como reservorios virales, y es durante las primeras 3 a 6 semanas post-contagio (Maher et al. 2005) en las cuales los reservorios alcanzan un valor crítico que permite mantener al paciente infectado de por vida. Desde un punto de vista clínico, a este periodo de tiempo se le denomina como fase aguda de la infección (Cuadro 3) y se caracteriza porque en ella los pacientes presentan síntomas muy parecidos a los de una gripa muy intensa. Los síntomas pueden incluir fiebre, engrosamiento de los ganglios linfáticos, fatiga, rash y problemas gastrointestinales. Los síntomas persisten de 2 a 6 semanas (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup "Assessment of Pathogens Transmissible by Blood" & Blood' 2016). Esto se debe a la activación del sistema inmunológico en respuesta a la diseminación del VIH en el cuerpo. Paradójicamente es esta respuesta inmunológica el factor que le permite al virus establecerse en el organismo de forma permanente.

Cuadro 3 | Progresión de la infección por VIH

La infección por VIH inicia con una fase aguda, en la cual el virus comienza una expansión rápida en el organismo para formar sus reservorios. Esta fase puede durar cerca de 12 semanas. A partir de esta fase se lleva a cabo la seroconversión, es decir: aparecen anticuerpos anti-VIH en la sangre. Cuando esto sucede, inicia la fase crónica, en donde el organismo es capaz de mantener controlada la infección. Esta fase es asintomática y puede durar años. Cuando los niveles de las células T CD4+ baja, los títulos virales en sangre se disparan e inicia el SIDA.



Progresión en el tiempo de la infección por VIH



Síntomas del SIDA



Estadísticas relevantes

El SIDA es un padecimiento que aparece cuando el sistema inmunológico está severamente agotado. Como resultado de esto, aparecen muchas enfermedades oportunistas como la infección por citomegalovirus y varias neoplasias.

Después de un tiempo se genera una respuesta inmunológica humoral que disminuye drásticamente los títulos virales en sangre, haciendo que el organismo controle temporalmente la infección. Al momento en el que un paciente infectado con VIH comienza a secretar anticuerpos dirigidos contra el virus se le denomina como *seroconversión* (Acheson 2011). Después de esto aparece una fase asintomática que puede durar años.

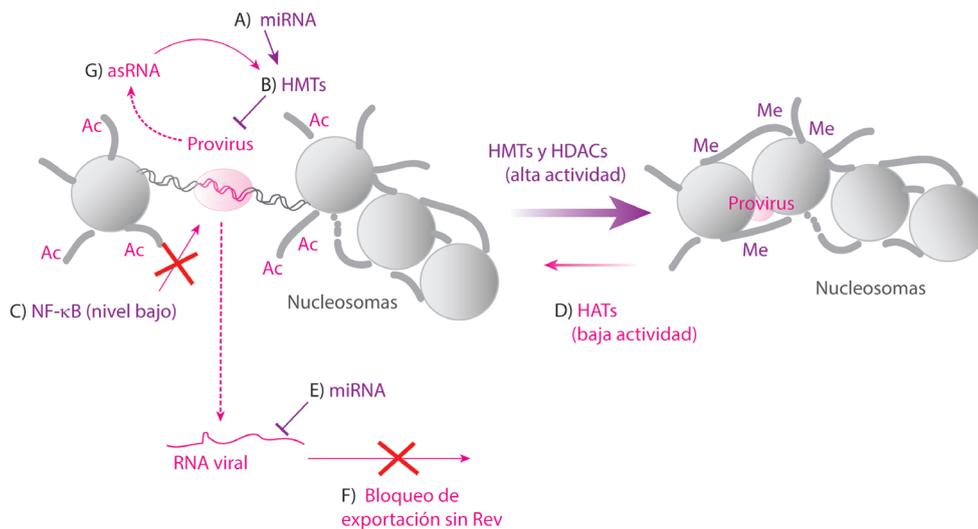


Figura 2.4 | Mecanismos de manutención de la latencia viral

A) El hospedero puede sintetizar miRNAs dirigidos contra el promotor 5'LTR del provirus para silenciarlo, **B)** este silenciamiento emplea a las HMTs para inducir la compactación de los nucleosomas vía metilación. **C)** Otro factor de restricción a considerar es la falta de los factores transcripcionales NF-κB o NFAT, que se encargan de estimular la transcripción del promotor viral. **D)** Por otro lado, la falta de acetilación de los nucleosomas también es capaz de restringir la activación del provirus. **E)** La poca actividad transcripcional del provirus se ve afectada por los mecanismos de silenciamiento celulares como los miRNAs, **F)** así como la falta de transporte de los RNAs virales sin editar al citoplasma por la ausencia de Rev. **G)** Finalmente, el propio provirus es capaz de producir un RNA antisentido, que es capaz de inducir su silenciamiento vía HMTs.

2.3. Fase crónica de la infección y mantenimiento de los reservorios

La fase asintomática, también es conocida como fase crónica de la infección, y ésta puede durar de 3 a 20 años, dependiendo del paciente (Cuadro 3) (Acheson 2011). Durante esta fase, el virus continúa expandiendo sus reservorios en el cuerpo, mostrando preferencia por las células auto-replicables como las células T CD4+ de memoria. Esto se logra gracias al contagio vía interacción célula-célula que se da en los ganglios linfáticos (Hladik & McElrath 2008). Los reservorios virales pueden expandirse pasivamente por la división celular de los linfocitos T CD4+ infectados (Simonetti et al. 2016), sin embargo esto no es garantía de que los reservorios sean totalmente funcionales. De hecho, se ha reportado que los reservorios que se expanden por acción de la proliferación celular, pueden hacer esto porque el provirus que los infecta está defectuoso (Cohn et al. 2015). Por consiguiente, es indispensable para la supervivencia del virus mantener una buena regulación de su latencia.

A nivel molecular hay varias formas por las cuales el provirus puede mantener su latencia. La primera consiste en el silenciamiento del promotor 5'LTR por miRNAs celulares (Suzuki et al. 2015; Bennasser et al. 2005) (Figura 2.3A), en la segunda las *histona-metil transferasas* (HMTs) metilan al promotor 5'LTR ya sea para disminuir la afinidad de los factores transcripcionales (Blazkova et al. 2009), o bien para inducir la condensación de la cromatina del nucleosoma del provirus (Williams & Greene 2007) (Figura 2.3B). Siguiendo por esta misma línea, la falta de acetilación de la cromatina también es un factor que contribuye a mantener al provirus en latencia (Colin & Van Lint 2009) (Figura 2.3C). La falta de niveles suficientes de los factores transcripcionales activadores del promotor 5'LTR (NF-κB o NF-AT) también contribuye al mantenimiento de la latencia viral (Managlia et al. 2006; Williams et al. 2006) (Figura 2.3D). De igual forma puede ocurrir que el RNA genómico no se sintetice completamente, debido a su gran tamaño (~10 kb), lo cual favorece la síntesis de RNAs de interferencia por parte del hospedero dirigidos contra el provirus (Acheson 2011) (Figura 2.3E).

Además, en caso de que uno de los RNAs genómicos lograra ser sintetizado, éste no podría abandonar el núcleo sin la presencia de Rev (Cullen 2003) (Figura 2.3F). Por último, a recientes fechas se ha encontrado que el virus tiene sus propios mecanismos de auto-regulación negativa. Concretamente se ha visto que en la región *nef*-3'LTR existe un promotor anti-sentido que controla la expresión de un RNA largo anti-sentido (Saayman et al. 2014). La función de este RNA consiste en posicionar a las HMTs en el promotor 5'LTR para inducir el silenciamiento del provirus (Saayman et al. 2014) (Figura 2.3G).

2.4. Reactivación de la latencia

Como se mencionó anteriormente, en una célula infectada con VIH que se encuentra en latencia ocurre una síntesis esporádica de RNAs genómicos completos. La incapacidad de estos RNAs para abandonar el núcleo sin Rev favorece su corte y empalme, produciéndose formas parcialmente editadas de 4 kb y formas totalmente editadas de 2 kb (Figura 2.4) (Siliciano & Greene 2011; Jacquenet et al. 2005). Cuando esto sucede, los RNAs de 2 kb pueden salir del núcleo libremente e inducen la expresión de Tat, Rev, Nef y Vpr (Jacquenet et al. 2005; Robert-Guroff et al. 1990). Si la latencia prevalece, los niveles de estas proteínas tempranas permanecerán casi indetectables hasta que la célula es activada inmunológicamente. Después de esto, los niveles de Nef comienzan a elevarse para manipular la vía de activación del TCR (Abraham & Fackler 2012). Además, Nef induce el secuestro y la degradación del MHC clase I y de CD4 (Abraham & Fackler 2012), bloquea los receptores de muerte (Fauci et al. 2005) e induce la expresión del ligando Fas y otras señales de muerte para matar a las células que rodean al hospedero (Acheson 2011). Nef también evita la expresión de NTB-A y otros ligandos activadores de las células NK y de las NKT (Fauci et al. 2005). Estas acciones ejecutadas por Nef están encaminadas a proteger las primeras etapas de la replicación viral de los linfocitos T CD8+. Respaldando las acciones de Nef, Tat (Fiume et al. 2012) y Vpr (Varin et al. 2005) activan por su cuenta a la vía de NF- κ B. De igual forma Tat (Agbottah et al. 2006) y Vpr (Felzien et al. 1998) también promueven la acetilación del promotor 5'LTR para facilitar el acceso de NF- κ B a sus sitios de unión.

Con los niveles de NF- κ B óptimos, Tat secuestra a P-TEFb y a otros factores celulares para posicionarlos en el elemento TAR (Colin & Van Lint 2009; Raha et al. 2005), lo cual ocasiona que P-TEFb incremente hasta 100 veces la efectividad de la RNA polimerasa II para sintetizar al genoma viral (Figura 2.4) (Ramakrishnan et al. 2012). Como dato interesante se ha visto que el elemento TAR del VIH-2 es menos eficiente para producir la transactivación del provirus a diferencia del elemento TAR del VIH-1, siendo esta una de las causas del comportamiento tan diferente de ambos virus (Soto-Rifo et al. 2012). Otra función importante de Tat consiste en bloquear la síntesis de RNAs de interferencia (Bennasser et al. 2005; D'Orso et al. 2012) con la finalidad de proteger la síntesis de los RNAs genómicos. Por otra parte, Rev facilita la exportación de los RNAs genómicos y de los RNAs parcialmente editados de 4 kb hacia el citoplasma gracias a su interacción con el RRE (Figura 2.4) (Felber et al. 1990). Una vez que estos RNAs logran salir al citoplasma, Rev incrementa hasta 100 veces la síntesis de las proteínas virales tardías derivadas de estos RNAs en los cuales se encuentran los genes *gag*, *pol* y *env*. Gracias a los RNAs de 4 kb también se sintetizan más proteínas regulatorias como Vif y Vpu, y se incrementa la concentración de Tat y Vpr (Jacquenet et al. 2005). En el caso del VIH-2 no se sintetiza Vpu, en su lugar lo hace Vpx (Acheson 2011; Watts et al. 2009). Una vez que Vpr, Vif y Vpu alcanzan sus niveles críticos, Vpr se encarga de secuestrar a p53 para arrestar el ciclo celular, de esta forma se asegura un entorno propicio para la síntesis de las proteínas virales y se impide al hospedero activar la vía intrínseca de la apoptosis (Kim et al. 2012).

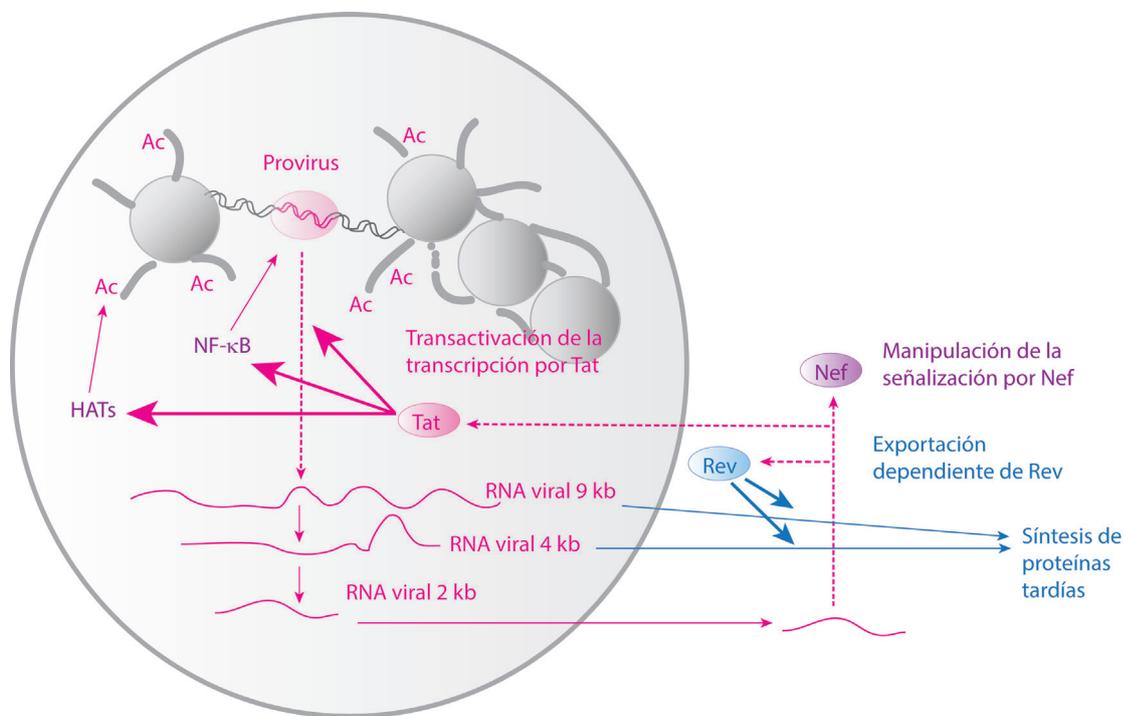


Figura 2.5 | Reactivación de la latencia del provirus

Los RNAs genómicos del provirus pesan aproximadamente 9 kb, mismos que en ausencia de Rev no pueden abandonar el núcleo. Cuando uno de estos RNAs es retenido en el núcleo, inicia un complicado proceso de corte y empalme del cual surgen variedades parcialmente editadas de 4 kb, y formas totalmente editadas de 2 kb. Estas últimas sí son capaces de salir del núcleo sin Rev, y en el citoplasma inducen la expresión de las proteínas virales tempranas: Tat, Rev, Nef y Vpr. Cuando esto sucede, Nef se encarga de manipular la señalización celular para favorecer la replicación viral, mientras que Tat se encarga de incrementar los niveles de NF-κB, así como la acetilación de los nucleosomas del provirus e inducir la transactivación de la transcripción viral. Los RNAs virales parcialmente editados y sin editar son exportados al citoplasma por Rev, y la síntesis de las proteínas tardías también se potencia por Rev. A partir de aquí se comienzan a sintetizar todos los elementos que formarán nuevos viriones.

Por otro lado Vif se encarga de inducir la ubiquitinación de APOBEC3G, para evitar que esta cause hipermutaciones en el RNA genómico y lo dañe (Stanley et al. 2008). Por último Vpu se encarga de inducir la degradación del MHC-I y de CD4 (Acheson 2011). A la par de esto, Vpu también se encarga de disminuir los niveles de activación de la vía de activación de NF-κB (Sauter et al. 2015) y de favorecer la liberación de los viriones (Acheson 2011). Nef también obstaculiza la función del MHC-II, impidiendo la activación de los linfocitos T cooperadores, también junto con Vpu reducen el procesamiento de antígenos de Env, evitando que el hospedero pueda iniciar una respuesta inmunológica normal (Sugden et al. 2016).

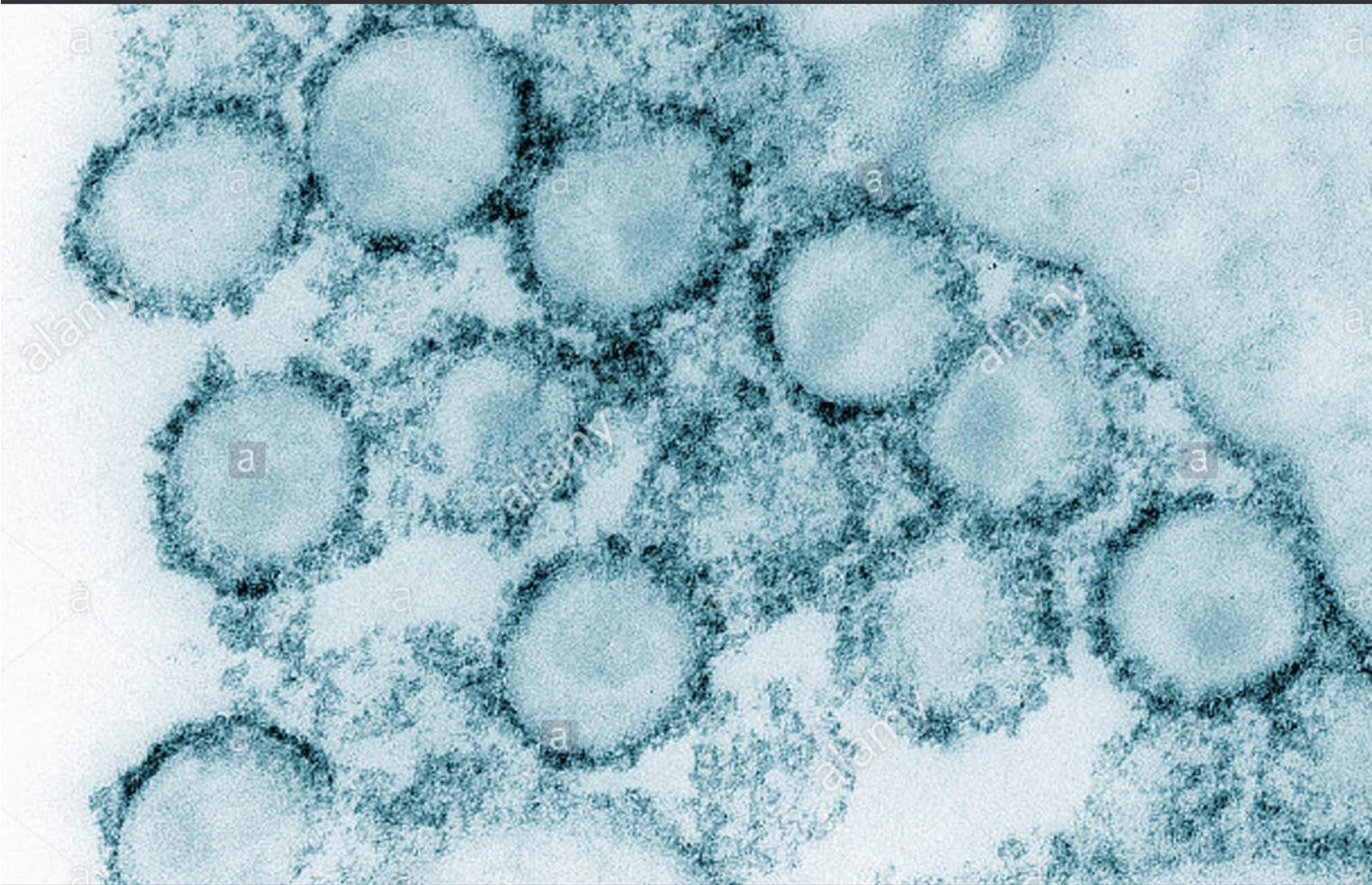
Por otro lado, del gen de gag se sintetizan por escisión de un precursor poli-proteico las proteínas de la cápside (CA), la nucleocápside (NC), las proteínas de la matriz (MA), y el péptido p6. Por su parte el gen de pol origina a la transcriptasa reversa (RT/RNasa H) y a la proteasa (PR). Finalmente el gen de env se obtienen las glucoproteínas gp120 y gp41 (Acheson 2011). Cuando esto sucede las proteínas de la nucleocápside se unen al genoma de RNA, mientras éstos se empaquetan en la cápside junto con la integrasa y la transcriptasa reversa. Finalmente todos los componentes de los provirus son empacados y liberados (Acheson 2011). Después de la reactivación, el proceso de producción de progenie viral tarda aproximadamente 12 horas, y se ha visto que por cada célula infectada se producen de 10^8 - 10^9 partículas virales antes de que ésta se destruya (Moudgil & Daar 1993; Perelson et al. 1996; Zeng et al. 2012).

2.5. Etapa terminal y aparición del SIDA

Cuando las partículas virales son liberadas, también lo hacen las proteínas virales en formas solubles. En el caso de Tat y Nef, ellas se encargan de obstaculizar la maduración de los linfocitos T CD4+ vírgenes, causando una descompensación grave en el sistema inmunológico (Levy 2011; Zeng et al. 2012). Además, las formas solubles de Tat, Nef, Vpr y gp120 se encargan de activar a los provirus latentes en sus reservorios celulares, y obstaculizan la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas (Herbein et al. 2010). Ante esta respuesta del VIH el organismo mantiene un estado de activación generalizada para poder contrarrestar su avance, de hecho se ha visto que los linfocitos T CD4+ infectados con VIH son eliminados de 2 a 4 días por los linfocitos T citotóxicos (Herbein et al. 1998; Zhang et al. 1997). Sin embargo, la pérdida continua de linfocitos T CD4+ y el agotamiento del sistema inmunológico debido al estado de inflamación crónica produce inmunodeficiencia. Cuando el número de linfocitos T CD4+ es inferior a ~ 300 células/ μ L aparece el SIDA, padecimiento caracterizado por la aparición de episodios de diarrea, fatiga, pérdida de peso, ataques de enfermedad oportunistas y el desarrollo de neoplasias (Lindbäck et al. 2000; Iwuji et al. 2013) (Cuadro 3). Los patógenos oportunistas más comunes incluyen a *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spec.*, *pneumococci*, citomegalovirus (CMV) y el virus herpes simplex. Las neoplasias más frecuentes son el sarcoma de Kaposi, los linfomas y carcinomas producidos por el herpes. También es posible que aparezca dermatitis seborreica, lesiones en las mucosas y leucoplaquia en la lengua (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup "Assessment of Pathogens Transmissible by Blood" & Blood' 2016). En esta fase de la infección, el VIH forma un reservorio importante en las células del epitelio gastrointestinal, lo cual favorece el mantenimiento de un estado de inflamación crónica necesario para que el virus pueda seguir expandiéndose por el organismo (Liu et al. 2013). Esto ocurre porque el avance de la infección favorece la entrada de productos de bacterias gastrointestinales como el LPS (*lipopolisacárido*) que provocan la estimulación constitutiva del sistema inmunológico (Brenchley et al. 2006). A partir de aquí si la infección no logra ser controlada, el paciente muere (Cuadro 3).

Capítulo 3

Manipulación farmacológica de los reservorios virales



Manipulación farmacológica de los reservorios virales

3.1. Terapia antirretroviral

La terapia antirretroviral fue propuesta como una posible cura para la infección por VIH-1 a finales de la década de los ochentas. Este enfoque consiste en inhibir uno o varios pasos del ciclo de vida del virus en la célula, tales como la internalización, la transcripción reversa, la integración y la maduración de las partículas virales (Figura 1.2). Con el tiempo y la experiencia se ha visto que los mejores resultados para controlar la infección por VIH-1 se obtienen cuando se combinan varios tipos de fármacos antirretrovirales, a este tratamiento se le conoce como *terapia antirretroviral combinada* (en inglés: *combined antiretroviral therapy*, cART). Durante la cART se emplean inhibidores de la transcriptasa reversa como los nucleósidos (NRTIs), los nucleótidos (NtRTIs), y los análogos no-nucleósidos (NNRTIs), junto con inhibidores de la proteasa y/o inhibidores de la integrasa (Wei et al. 2002). En la Tabla 3.1 se muestran los principales antirretrovirales usados actualmente así como la fecha en la que salieron al mercado.

3.1.1. Limitaciones y efectos secundarios

El uso de antirretrovirales ha sido la forma más efectiva de mantener controlada la infección por VIH-1. Sin embargo, con esta terapia sólo se puede tratar al grupo M del VIH-1. Por el contrario, los antirretrovirales no son capaces de combatir al VIH-2, ni al grupo O del VIH-1 ni tampoco a las variantes resistentes a antirretrovirales del grupo M del VIH-1 (Menéndez-Arias 2013; Charpentier et al. 2013). Además, el uso crónico de estos medicamentos reduce sustancialmente la calidad de vida de los pacientes. Esto se debe a que algunos antirretrovirales interfieren con la efectividad de otros medicamentos a través del citocromo P450. Algunos de los efectos secundarios más notables de los inhibidores de la proteasa y de la integrasa son la lipodistrofia en el rostro, las extremidades, la nuca y el área del ombligo. En general, se ha visto que el uso crónico de los antirretrovirales puede producir diarrea, insomnio, falta de concentración, pérdida de peso, diabetes, anemia, y desórdenes neurológicos (Levy 2011).

Tabla 3.1 | Fármacos antirretrovirales

NRTI	NNRTI	Inhibidores de la proteasa	Inhibidores de la integrasa	Inhibidores de la entrada
Azidotimidina (1987)	Nevirapina (1996)	Saquinavir (1995)	Raltegravir (2007)	Enfuvirtida (T20) (2003)
Didanosina (1991)	Efavirenz (1998)	Indinavir (1996)	Elvitegravir (2013)	Maraviroc (2007)
Zalcitabina (1992)	Delavirdina (2007)	Ritonavir (1996)	Dolutegravir (2013)	
Estavudina (1994)	Etravirina (2008)	Nelfinavir (1997)		
Lamivudina (1995)	Rilpivirina (2011)	Lopinavir + Ritonavir (2000)		
Abacavir (1998)		Atazanavir (2003)		
Tenofovir (2001)		Fosamprenavir (2003)		
Emtricitabina (2003)		Tripanavir (2005)		
		Darunavir (2006)		

Información tomada de (German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup "Assessment of Pathogens Transmissible by Blood" & Blood' 2016).

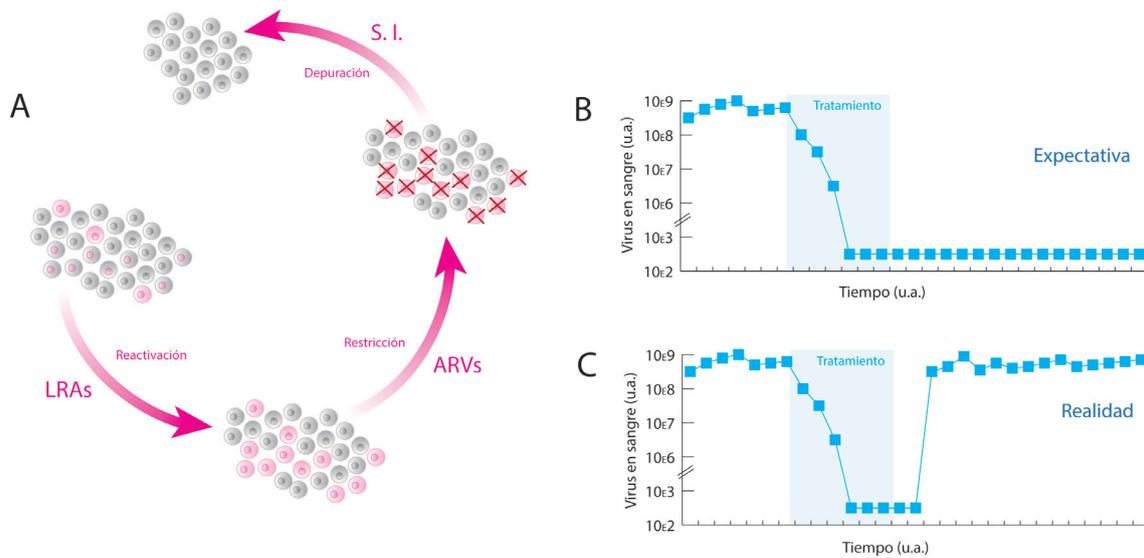


Figura 3.1 | Estrategia de reversión de la latencia

A) Los reservorios virales (representados por células con citoplasma gris y núcleo rosa) son indetectables para el sistema inmunológico (S.I.). Se ha propuesto que usando LRAs, éstos pueden ser reactivados (células rosas) y con la ayuda de los antirretrovirales (ARVs) es posible evitar que produzcan partículas virales para infectar células sanas (células grises). De esta forma, por el avance de la infección o por el S.I., estos reservorios podrían ser eliminados paulatinamente. **B)** Pese a las grandes expectativas por los resultados *in vitro* a su favor. **C)** En clínica no han demostrado tener efectividad para eliminar la infección.

3.2. Terapia de reversión de la latencia

Los fármacos antirretrovirales no pueden eliminar a los reservorios virales porque el VIH-1 infecta principalmente a las células de memoria, cuya vida media se estima entre 40 y 44 meses (Siliciano et al. 2003). Además, los reservorios no son reconocidos por el sistema inmunológico, ya que los provirus latentes casi no producen antígenos que permitan su identificación. Para lidiar con este problema, en el año 2004 Dean Hamer propuso que el uso de compuestos capaces de estimular las vías que el provirus utiliza para salir de su latencia, facilitarían la producción de antígenos que podrían ser procesados y servirían para identificar y eliminar a los reservorios virales. Además, en presencia de antirretrovirales se impediría la formación de nuevos reservorios. A esta hipótesis se le denominó como estrategia "Shock and Kill" o "estrategia de reversión de la latencia", y fue inicialmente explorada con agonistas de la familia PKC, enfocados en activar la vía de NF- κ B en las células T CD₄⁺ (Hamer 2004) (Figura 3.1). En los siguientes apartados se mencionaran los principales agentes reversores de la latencia (LRAs) conocidos actualmente, así como todo lo que se sabe sobre su desempeño clínico.

3.2.1. Agonistas de la familia PKC

La primera estrategia de manipulación farmacológica de los reservorios consistió en usar pequeñas moléculas capaces de alterar el metabolismo de las células T CD₄⁺ para revertir la latencia (Hamer 2004). Para esto se utilizan fármacos que induzcan la activación de NF- κ B o NFAT (Nabel & Baltimore 1987; Kinoshita et al. 1997), los cuales son agonistas de las proteínas cinasas C (PKC) tales como la briostatina (Mehla et al. 2010). La activación de las PKC es un paso fundamental en la vía de NF- κ B, ya que su actividad promueve el incremento de la concentración de NF- κ B disponible, gracias a la degradación de I κ B (Figura 3.1). Hasta ahora, varios estudios confirman su efectividad *in vitro*, sin embargo el único estudio realizado con humanos tuvo que ser cancelado por la falta de efectividad de la briostatina *in vivo* (Gutiérrez et al. 2016).

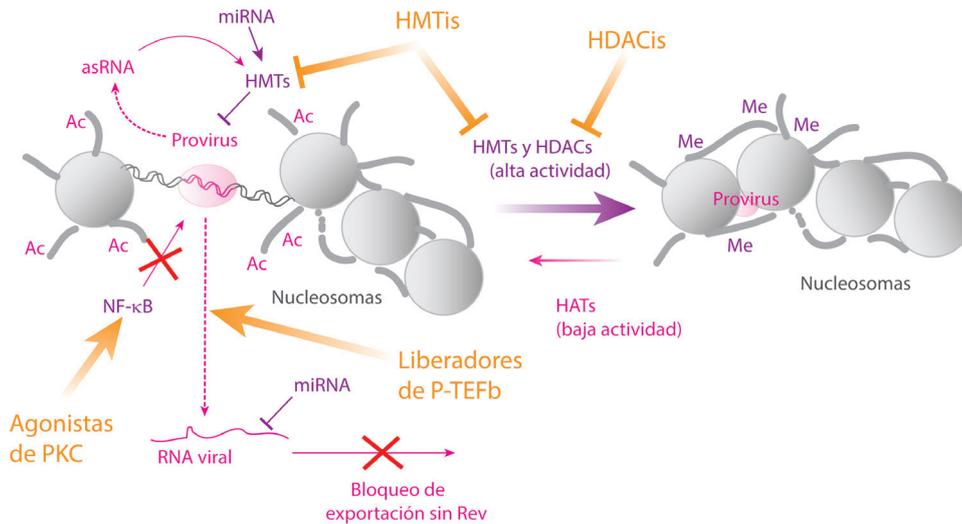


Figura 3.2 | Mecanismos terapéuticos conocidos de los LRA

Los LRA son capaces de interferir con los principales mecanismos represores transcripcionales del provirus, y de igual manera pueden promover activamente el incremento en la transcripción viral. Los Agonistas de **PKC** tienen como objetivo modificar la señalización celular para incrementar los niveles de **NF-κB**. Por su parte, los inhibidores de las **HDACs** (**HDACis**) tienen la función de evitar la desacetilación de los nucleosomas virales, para prevenir la compactación de la cromatina. De forma análoga, los inhibidores de las **HMTs** (**HMTis**) también tienen la función de evitar la metilación de las histonas, para prevenir la compactación de los nucleosomas virales. Finalmente, los liberadores de **P-TEFb** se encargan de incrementar la tasa de transcripción del provirus.

3.2.2. Inhibidores de las HDACs

En varios estudios se ha reportado que las histona-deacetilasas (HDACs) son muy importantes para estabilizar la latencia viral mediante la compactación del DNA por falta de acetilación (McManamy et al. 2014). Algunos compuestos como la tricostatina A y el ácido valproico tienen la capacidad de inhibir la actividad de las HDACs, y se ha visto en estudios *in vitro* que poseen la capacidad de reactivar células infectadas con provirus latentes (Van Lint et al. 2004; Ylisastigui et al. 2004). Estos fármacos se han denominado como *inhibidores de las HDACs*, y por ser usados en la quimioterapia contra el cáncer, se sabe que son medicamentos seguros a nivel clínico (Van Lint et al. 2004). Por tal razón, los inhibidores de las HDACs se han usado extensamente para intentar revertir la latencia del virus. El compuesto más sobresaliente de todos es el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), mismo que se encarga de favorecer la acetilación de la cromatina y favorecer la actividad del promotor 5'LTR del provirus (Van Lint et al. 2004) (Figura 3.2). Observaciones *in vitro* demuestran que el SAHA, al igual que el panobinostat y la romidepsina, son efectivos para reactivar la transcripción del provirus (Archin et al. 2012; Elliott et al. 2014; Rasmussen et al. 2014; Søgaard et al. 2015). De acuerdo con el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, hay cuatro estudios clínicos en fase II distribuidos en Tailandia (NCT02475915), Reino Unido (NCT02336074), Australia (NCT01365065) y Estados Unidos (NCT01319383) en donde se ha reportado un buen desempeño del SAHA, no obstante, también se han reportado la aparición de efectos secundarios menores en la mayoría de los casos, tales como diarrea y vómitos. Existe una controversia actual sobre la efectividad del SAHA para revertir la latencia, ya que se ha observado que sólo reactiva la transcripción del provirus pero no favorece la síntesis de proteínas virales (Mohammadi et al. 2014). Se cree que esto puede deberse a la existencia de mecanismos post-transcripcionales no identificados que se encargan de silenciar la expresión del provirus (Mohammadi et al. 2014).

3.2.3. Inhibidores de las HMTs

Además de las HDACs, otros controladores epigenéticos importantes son las *histona metil-transferasas* (HMTs), cuya función consiste en metilar las histonas del nucleosoma viral para favorecer su compactación. Algunos autores han señalado que este es un proceso no relevante para mantener la latencia viral (Blazkova et al. 2012), sin embargo recientes investigaciones han refutado este resultado (Saayman et al. 2014). Independientemente de lo anterior, el uso de inhibidores de las HMTs como la caetocina (Bouchat et al. 2012), ha cobrado popularidad en esta década, y su eficacia ha sido demostrada en pruebas *in vitro* en presencia y ausencia de inhibidores de las HDACs (Blazkova et al. 2009; Kauder et al. 2009). Estos estudios también mostraron que la inhibición de las HMTs no es la causa de la reactivación *per se*, interesantemente se observó que la ausencia de metilación de los nucleosomas virales en la región 5'LTR sensibilizaba al provirus para ser reactivado por otros LRAs como los inhibidores de las HDACs (Blazkova et al. 2009; Kauder et al. 2009) (Figura 3.2). Sobre estos medicamento todavía no se sabe exactamente cómo funcionan ni tampoco se entiende bien si realmente pueden crear una sinergia con LRAs como los inhibidores de las HDACs *in vivo*.

3.2.4. Liberadores de P-TEFb

Por su parte los fármacos liberadores de P-TEFb son una nueva clase de LRAs que promueve la liberación de P-TEFb del complejo regulatorio formado por el 7SK snRNP, HEXIM1 y 2, LARP7 y MEPCE (Figura 3.2). Este tipo de fármacos potencian la actividad de Tat, favoreciendo la transcripción del provirus (Li et al. 2013). En este grupo pueden entrar inhibidores de la familia BET (Li et al. 2013) al igual que inhibidores de las HDACs (Bartholomeeusen et al. 2013). No hay estudios realizados en clínica, pero algunas observaciones *in vitro* (Bartholomeeusen et al. 2013) y *ex vivo* (Bullen et al. 2014) no son concluyentes sobre si son eficaces o no.

3.2.5. Inhibidores de la familia BET

Los inhibidores de la familia de proteínas del *bromodominio y el dominio extraterminal* (BET) pueden inducir la transcripción viral de varias maneras. En primer lugar, pueden bloquear la habilidad de las proteínas BET para reclutar complejos mutiproteicos necesarios para inducir la expresión génica del hospedero y del provirus. Los inhibidores BET promueven la reorganización de la cromatina mediante la inducción de la expresión de las *histona-acetil-transferasas* (HATs), las HDACs, y las *histona-desmetilasas*, al tiempo que suprimen a las HMTs (Kinoshita et al. 1997; Tough et al. 2015). Estos inhibidores también estimulan la actividad de Tat (Darcis et al. 2015). Por el momento sólo se han conducido estudios en animales y no hay reportes sobre la efectividad real de estos medicamentos.

3.2.6. Agonistas de los TLRs

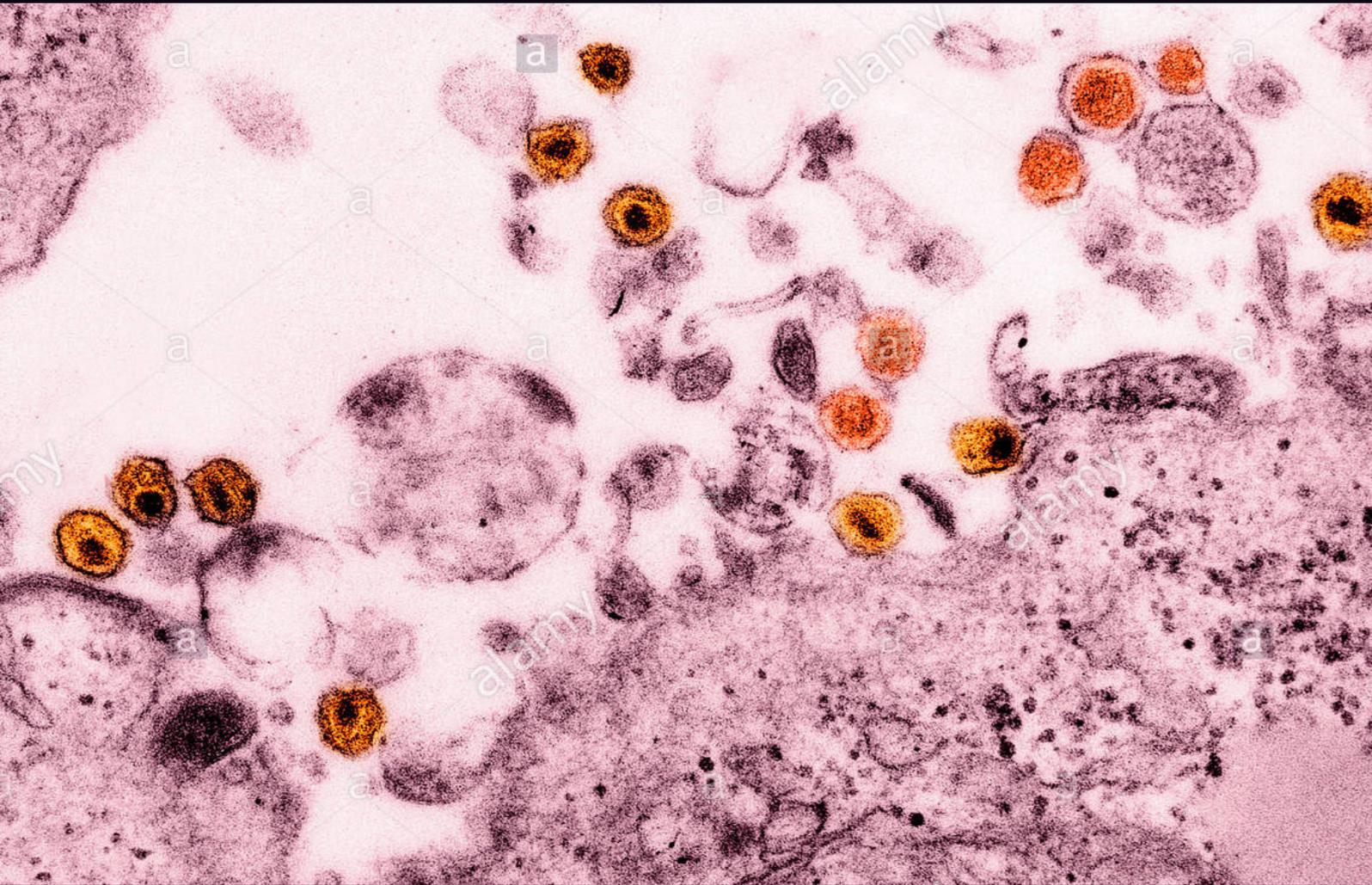
Por último está un nuevo tipo de LRAs desarrollado recientemente, estos son los agonistas de los *receptores tipo Toll* (TLRs) (Novis et al. 2013). A pesar de que no se conoce su mecanismo de acción, se cree que este tipo de LRAs puede activar la señalización propia de NF- κ B, con lo cual se induciría la reactivación del provirus. Sin embargo, no hay estudios con clínicos que avalen su efectividad como LRAs.

3.3. Limitaciones de la estrategia de reversión de la latencia

Uno de los principales puntos de conflicto entre los defensores de la estrategia de reversión de la latencia y sus detractores es la forma de determinar la eficacia de los tratamientos. Esto se debe a que no hay criterios suficientemente robustos como para saber si los reservorios virales están disminuyendo o no. Inicialmente se pensaba que el DNA del provirus era el marcador ideal para cuantificar el tamaño de los reservorios del VIH-1 en el organismo. Sin embargo, se ha demostrado que sólo el 11% de los provirus integrados poseen su genoma intacto y funcional (Ho et al. 2013). También se ha observado que los provirus deficientes pueden replicarse con el hospedero durante la mitosis, con lo cual la naturaleza genética de los reservorios es muy diversa (Cohn et al. 2015; Kok et al. 2018). Por consiguiente el tamaño real de los reservorios es difícil de estimar y cuantificar, lo cual dificulta el poder determinar el impacto de los LRAs sobre los reservorios. Además, no se conocen a detalle los mecanismos de acción de los LRAs ni se sabe cuáles serán los efectos secundarios que éstos generaran a largo plazo.

Capítulo 4

Modelos matemáticos de los reservorios del VIH-1



Modelos matemáticos de los reservorios del VIH-1

4.1. Estado del arte de la modelación matemática aplicada al VIH-1

Desde la década de 1990 varios laboratorios en el mundo han usado modelos matemáticos para analizar la infección por VIH-1, con la finalidad de encontrar información útil para encontrar una cura. Partiendo de esta premisa, a lo largo de estas décadas se han creado dos líneas principales de investigación. En la primera, se estudia al VIH-1 con modelos clásicos de epidemiología (Cassels et al. 2008; Perelson & Ribeiro 2013). Por su parte, la segunda se estudia al virus desde un punto de vista intracelular con la finalidad de entender más detalles sobre su funcionamiento en el hospedero. A continuación se describen algunos de los más notables trabajos realizados en ambas líneas de investigación.

4.1.1. Enfoque epidemiológico

En 1996, Perelson y colegas fueron los primeros en usar un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias para describir cuantitativamente la dinámica de expresión de antígenos virales en un cultivo de células de pacientes infectados con VIH-1 (Perelson et al. 1996). Las simulaciones que ellos obtuvieron fueron tan buenas, que no sólo lograron cuantificar la producción de p24, sino que además pudieron determinar cuánto se iba a reducir la producción de esta proteína viral en presencia de altas dosis de AZT (Perelson et al. 1996). Este trabajo, aunque fue revolucionario en su tiempo, sólo se limitó a describir al virus desde un punto de vista fenomenológico, y por ende se obviaron muchos aspectos importantes acerca de la regulación de la expresión génica del provirus. En 2014, Rivadeneira y colaboradores utilizaron un modelo de ecuaciones diferenciales basado en los trabajos de Perelson, con el cual diseñaron un esquema de tratamiento que mejoró significativamente el desempeño de los antirretrovirales en pacientes infectados con VIH-1 (Rivadeneira et al. 2014). Para lograr esto, primero se resolvió el modelo de ecuaciones diferenciales y posteriormente se optimizaron sus parámetros a fin de encontrar la dosis de antirretrovirales que pudiera disminuir con mayor eficacia la producción de partículas virales *in vivo* (Rivadeneira et al. 2014). Los ensayos de Rivadeneira et al. fueron los primeros en utilizar modelos matemáticos para diseñar esquemas farmacológicos precisos y efectivos contra el VIH-1, sin embargo heredaron el problema de ignorar los eventos intracelulares del VIH-1, lo cual limita su aplicabilidad a otras estrategias terapéuticas contra el virus.

4.1.2. Enfoque intracelular

En 1999, Reddy y Yin fueron los primeros en hacer un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias para describir minuciosamente todos los pasos del ciclo de vida del VIH-1 en el interior de la célula (Reddy & Yin 1999). Sin embargo, el modelo de Reddy y Yin no era capaz de capturar la complejidad de todos los procesos que regulan la expresión génica del provirus, situación que se vio reflejada en los pobres resultados de su modelo. Años más tarde, Weinberger y colegas lograron describir por primera vez la dinámica de expresión de Tat, la cual presentaba la particularidad de tener un pico de alta actividad, seguida de un decaimiento gradual (Weinberger et al. 2005). Esta dinámica “*transciente*” que tiende a la latencia dio origen a muchos trabajos posteriores, uno

de los más importantes fue el realizado por Althaus y De Boer, en el cual encontraron que la dinámica de Tat era capaz de inducir la latencia del provirus por sí misma, independientemente de los factores intracelulares y extracelulares presentes (Althaus & De Boer 2010). Siguiendo por esta misma línea, Razooky y colegas usaron modelos estocásticos para investigar el grado de importancia de la dinámica transiente de Tat en el establecimiento de la latencia del provirus, y encontraron que esta dinámica es capaz de inducir naturalmente la latencia (Razooky et al. 2015). Este hallazgo les hizo afirmar que, dado que el VIH-1 no tenía inhibidores codificados por sí mismo, la latencia era una cualidad “programada” naturalmente en su genoma en vez de ser el resultado de la regulación celular *per se* (Razooky et al. 2015). Los trabajos de Weinberger también sirvieron para intentar responder a las preguntas de por qué los agentes reversores de la latencia (LRAs) tienen un bajo desempeño *in vivo*, y cómo mejorar su desempeño. Sobre estos puntos, Dar y colegas propusieron que el desempeño de los LRAs se entorpece porque no son suficientemente buenos para abrir el nucleosoma viral, y para solucionar esta situación, se propuso usar pequeños compuestos capaces de incrementar la frecuencia de apertura de los nucleosomas (Dar et al. 2014). Estos compuestos fueron denominados como “potenciadores del ruido transcripcional” (*Transcriptional Noise Enhancers*, TNEs). Dar y su equipo usó una serie de modelos estocásticos para calcular las dosis de PRTs para incrementar la frecuencia y la amplitud de los picos de expresión de proteínas virales, lo cual mejoró ligeramente el desempeño de los LRAs (Dar et al. 2014). No obstante, todos los trabajos de Weinberger tienen tres errores en común: 1) suponen que no existe un regulador negativo del VIH-1 codificado en su genoma, 2) suponen que las otras interacciones regulatorias de Nef, Vpr y Rev no son importantes y 3) usan un modelo experimental que no tiene los componentes regulatorios completos del VIH-1. Acerca del primer error, desde el año 2014 se sabe que el VIH-1 produce una serie de RNAs virales no codificantes (vncRNAs) que regulan negativamente su expresión génica (Saayman et al. 2014; Zapata et al. 2017), y en lo concerniente a los demás errores, se sabe que Nef, Vpr y Rev son fundamentales para la progresión de la infección en el organismo y no deben ser ignorados (Felzien et al. 1998; Kim et al. 2012; Liu et al. 2014; Rümer et al. 2004; Varin et al. 2005; Fauci et al. 2005). Los trabajos de Weinberger proponen que los LRAs no son buenos para abrir los nucleosomas donde se encuentra el provirus, y atribuyen la latencia a una dinámica en la que el propio virus tiende a dejar de expresar sus proteínas con el tiempo, sin embargo esta dinámica no justifica el cierre específico de los nucleosomas virales, lo cual deja sin respuesta a la pregunta de por qué los LRAs tienen un bajo desempeño *in vivo*.

4.2. Modelos enfocados en la reversión de la latencia

Hill y colegas propusieron un modelo matemático basado en un proceso de dos ramificaciones, asumiendo sólo cuatro tipos de eventos: una célula infectada con un provirus en latencia puede activarse o morir, una célula infectada con un provirus activo puede morir o producir nuevos viriones que infecten a otras células (Hill et al. 2014). Este modelo reveló que no se necesita eliminar completamente al reservorio viral para lograr una cura funcional de la infección, es decir que los pacientes puedan estar años sin tratamientos antirretrovirales manteniendo niveles indetectables de viremia (Hill et al. 2014). Para conseguir una cura funcional, los reservorios deberían disminuir ~100,000 veces su tamaño. Con una reducción de 2,000 veces el tamaño de los reservorios, un paciente podría vivir sin antirretrovirales por un año (Hill et al. 2014). No obstante, este modelo ha sido cuestionado ya que se ha visto con análisis de bancos de pacientes con VIH-1 que para lograr mantener silenciada la viremia por un año sin antirretrovirales sería necesario reducir entre 50 y 70 veces el tamaño de los reservorios en lugar de 2,000 (Pinkevych et al. 2015). Además, se sabe que los LRAs tienen dificultades serias para reactivar a los reservorios *in vivo* (Bullen et al. 2014).

En un intento por profundizar en las causas que están detrás del bajo desempeño de los LRAs en la clínica, Ke y colegas estudiaron a 20 pacientes infectados con VIH-1 que se encontraban en un régimen de terapia antirretroviral, a los cuales se les suministró una dosis de 400 mg de vorinostat (SAHA) por 14 días (Ke et al. 2015). Estos pacientes fueron monitoreados durante 70 días después del tratamiento, y se midió periódicamente la cantidad de RNAs virales sin editar (*unspliced RNAs*). Posteriormente se realizaron tres modelos basados en ecuaciones diferenciales para entender cómo responden dinámicamente las células infectadas al vorinostat. En el primer modelo se propuso que la reactivación del provirus podía ocurrir directamente, en el segundo se propuso que había una activación temporal antes de que las células se activaran totalmente y produjeran partículas virales, y por último en el tercer modelo se supuso que habían muchos pasos intermedios antes de lograr la activación total de las células infectadas (Ke et al. 2015). Del ajuste de los datos obtenidos con los pacientes se encontró que el mejor modelo que describía el comportamiento del virus era el tercero, es decir que el provirus debía superar varios pasos para inducir la producción de viriones (Ke et al. 2015). En este estudio también se encontró que el vorinostat no es suficientemente potente como para inducir la reactivación, y se observó que su efecto neto es incrementar un poco los niveles basales de transcripción del provirus (Ke et al. 2015). Siguiendo con este enfoque, otro estudio realizado con romidepsina evaluado con un modelo de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) se encontró que este LRA sí podía reactivar al reservorio viral de su latencia (Policicchio et al. 2016). De hecho se observó que si se detenía la terapia antirretroviral 7 días antes de la administración de romidepsina, a los 3 días de la medicación se observaba un rebrote masivo de la viremia. Situación que ocurre normalmente a las 8 semanas de la interrupción de la terapia antirretroviral, lo cual demostró que la romidepsina sí incrementa la reactivación de los reservorios (Policicchio et al. 2016). Sin embargo, a pesar de estos buenos resultados la romidepsina no logró reducir significativamente el tamaño de los reservorios (Policicchio et al. 2016). Se intentó explicar este fenómeno a la vida media tan corta de la romidepsina (~2 días), pero aun así el modelo no logró clarificar la falta de efectividad de este inhibidor de las HDACs para reducir el tamaño del reservorio (Policicchio et al. 2016).

4.3. Limitaciones y perspectiva

Actualmente existen muy pocos trabajos enfocados específicamente en estudiar la reversión de la latencia usando LRAs, mismos que no son capaces de identificar las causas del bajo desempeño de los LRAs como la romidepsina y el vorinostat. Se piensa que una de las principales limitaciones de los modelos matemáticos aplicados a entender la dinámica de los reservorios es la sobre-simplificación de la complejidad biológica que regula la latencia del VIH-1 (Hernandez-Vargas 2017). Se ha propuesto que incluir en el modelo factores de regulación intracelular y la respuesta inmunológica del organismo podría ser una forma posible de mejorar la calidad los modelos matemáticos orientados a estudiar la dinámica de los reservorios del VIH-1 (Hernandez-Vargas 2017), esto con la finalidad de encontrar información clave que permita diseñar mejores esquemas de medicación para erradicar los reservorios virales.

Capítulo 5

Presentación del trabajo de tesis



Presentación del trabajo de tesis

5.1. Justificación

En la actualidad, la infección por VIH-1 es uno de los problemas más importantes de salud pública en el mundo, tanto por la ausencia de una cura como por la enorme carga económica que se origina por el uso de fármacos antirretrovirales. Una alternativa prometedora para curar esta infección es la estrategia de reversión de la latencia, misma que consiste en emplear *agentes reversores de la latencia* (LRAs) para reactivar los reservorios virales e inducir su eliminación. Desafortunadamente, el desempeño de estos agentes terapéuticos ha dejado mucho que desear, y no se entiende exactamente el porqué. En un intento por comprender la causa del bajo rendimiento de los LRAs, algunos grupos se han dedicado a usar modelos matemáticos para visualizar los efectos de estos fármacos a largo plazo con la finalidad de determinar cuáles son las condiciones que se requieren para que realmente puedan ser efectivos contra el VIH-1. Sin embargo, hasta ahora ninguno de los intentos previos no han sido suficientes para determinar las causas a nivel molecular del bajo rendimiento de los LRAs, en parte por la sobre-simplificación de los modelos así como por desconocimiento de la complejidad de los procesos moleculares que gobiernan el mantenimiento y la reversión de la latencia. Por ello, en el presente trabajo de tesis doctoral se busca entender cómo funcionan todos los circuitos virales de regulación de la latencia en el interior de los reservorios, con la finalidad de encontrar una explicación al bajo rendimiento presentado por los agentes reversores de la latencia.

5.2. Hipótesis

Existen mecanismos moleculares propios del provirus que regulan de forma autónoma la latencia e interfieren con el mecanismo de acción de los LRAs.

5.3. Objetivo general

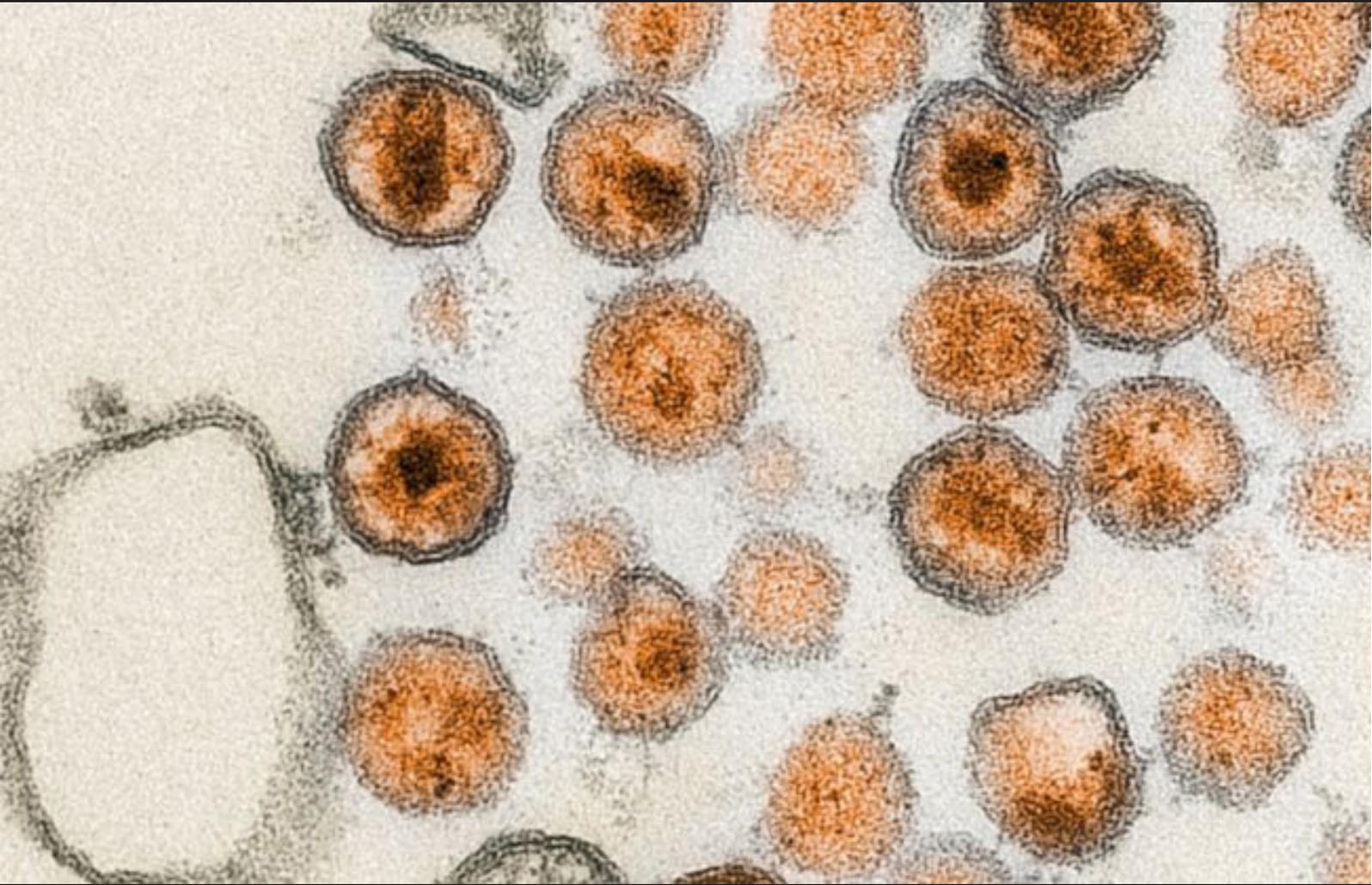
Analizar la dinámica de la red de regulación de la expresión génica del provirus en el interior de una célula T CD4+ de memoria para determinar las causas del bajo rendimiento de los LRAs.

5.4. Objetivos particulares

1. Utilizar un modelo matemático basado en reglas lógicas para obtener información general sobre la complejidad de la dinámica de la red de regulación génica del provirus sin tener que caracterizar el espacio de fase de un modelo continuo.
2. Utilizar un modelo matemático basado en ecuaciones diferenciales ordinarias no-lineales para obtener información específica sobre la transición de estados y los umbrales de activación presentes en la dinámica de la red de regulación génica del provirus.
3. Identificar puntos sensibles de la red para potenciar la reversión de la latencia.

Capítulo 6

Metodología



6.1. Construcción de la red genética del VIH-1

La red de regulación genética fue construida compilando información sobre los mecanismos moleculares que regulan la latencia del VIH-1 en el interior de las células T CD4+ quiescentes. En los siguientes párrafos se describen las interacciones y suposiciones que se tomaron en cuenta para ensamblar la red de regulación genética del provirus, así como los procedimientos que se realizaron para analizar la dinámica de la red (Figura 6.1).

6.1.1. Descripción de la red genética del VIH-1

Después de la integración del VIH en el genoma del hospedero, su expresión es regulada por los factores de remodelación de la cromatina como las HATs, HMTs y las HDACs. Estas enzimas modulan la exposición del promotor viral ubicado en la región 5'LTR a factores transcripcionales como Sp1, NF-AT y NF-κB ya sea por relajación o condensación de los nucleosomas virales (Groen & Morris 2013). En ausencia de estimulación inmunológica, el promotor 5'LTR produce RNAs genómicos de 9 kb completos (RNA_{9kbN}) y truncos (Siliciano & Greene 2011; Jacquenet et al. 2005). Después de su síntesis, los RNAs genómicos generan RNAs parcialmente editados de 4 kb (RNA_{4kbN}) y RNAs totalmente editados de 2 kb (RNA_{2kbN}) (Siliciano & Greene 2011; Jacquenet et al. 2005). Simultáneamente los RNAs virales intactos son procesados para generar pequeños RNAs virales activadores (vsaRNA) (Zhang et al. 2014) así como pequeños RNAs virales de interferencia (vsiRNA) (Suzuki et al. 2015b; Bennasser et al. 2005) que regulan la expresión del provirus.

Los RNAs totalmente editados de 2 kb son exportados al citoplasma directamente, donde son traducidos en las proteínas virales tempranas Tat, Rev, Nef y Vpr (Jacquenet et al. 2005; Robert-Guroff et al. 1990). Tat transactiva al promotor 5'LTR reclutando a P-TEFb y evitando la represión mediada por los vsiRNA (Bennasser et al. 2005; D'Orso et al. 2012). Rev facilita la exportación de los RNAs genómicos de 9 kb y de los RNAs parcialmente editados al citoplasma (Felber et al. 1990) y por su parte, Nef modifica el entorno intracelular para proteger al hospedero del sistema inmunológico (Swingler et al. 2003). Tat (Agbottah et al. 2006) y Vpr (Felzien et al. 1998) interactúan con las HATs para hacer más accesible el promotor 5'LTR a los factores de transcripción. Por otro lado, Tat, Vpr y Nef activan la vía de NF-κB (Fiume et al. 2012; Varin et al. 2003; Varin et al. 2005) con la finalidad de inducir la expresión de los genes del provirus. Paralelamente a esto, en la región nef-3'LTR existe un promotor anti-sentido que controla la transcripción de un RNA viral anti-sentido largo y no codificante (asRNA) (Saayman et al. 2014). Este asRNA recluta a las HMTs sobre el promotor 5'LTR con la finalidad de bloquear la transcripción del provirus (Saayman et al. 2014). Recientemente se ha descrito que los RNAs pequeños que activan la transcripción de algún promotor, interactuando con los RNAs no codificantes largos y anti-sentido (lncRNAs) para inducir su degradación (Gagnon & Corey 2012; Schwartz et al. 2008). De esta forma, es posible que los factores de remodelación de la cromatina modifiquen el nucleosoma del promotor para favorecer la expresión génica (Gagnon & Corey 2012; Schwartz et al. 2008).

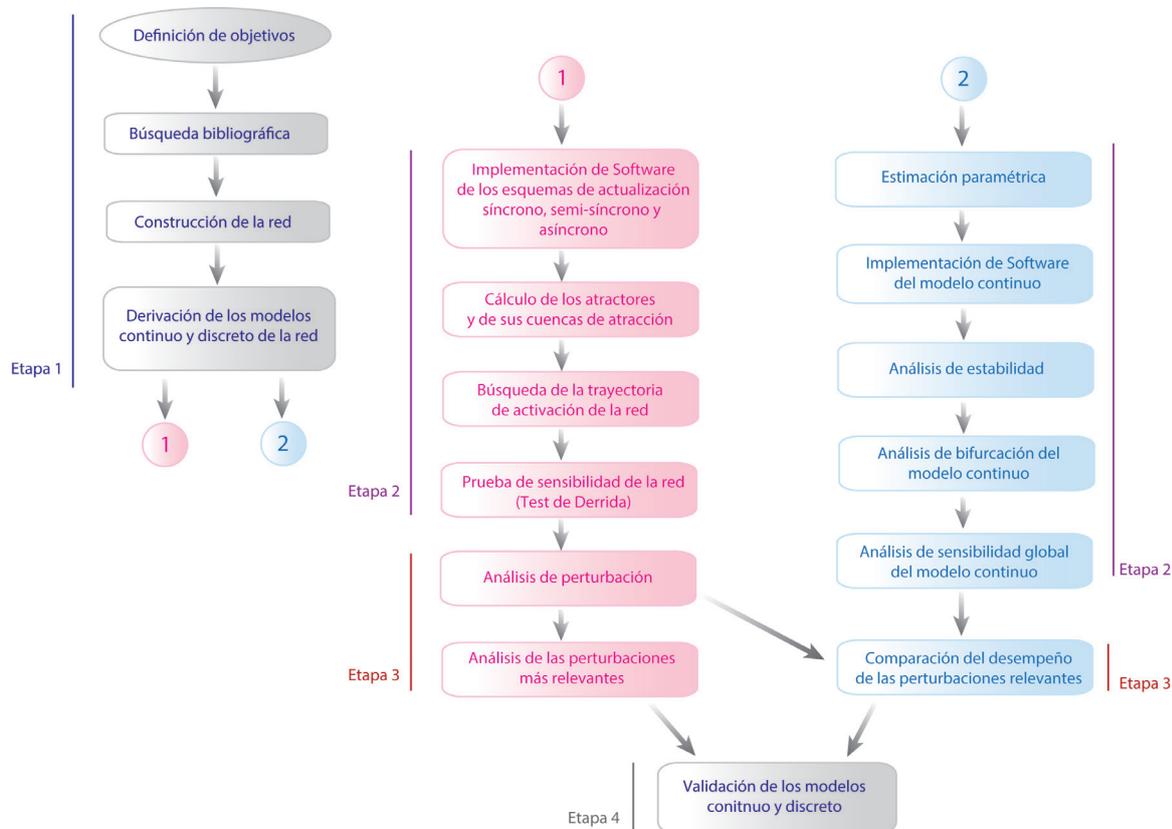


Figura 6.1 | Diagrama de flujo de la metodología

Este trabajo fue ejecutado en cuatro etapas: 1) Definición de la red y sus modelos, 2) Análisis matemáticos de los modelos, 3) Análisis de perturbación de los modelos y finalmente 4) Validación. En esta figura la línea azul denota los pasos que se siguieron para completar la primera etapa, la línea púrpura denota lo mismo pero para la etapa 2, la línea roja es para la etapa 3 y la línea gris es para la etapa 4. El color rosa es usado para representar los procedimientos usados exclusivamente para el modelo discreto, el color azul denota lo mismo pero para el modelo continuo.

En el caso particular del VIH-1 se encontraron los elementos necesarios para sustentar este mecanismo, los cuales son el asRNA (Saayman et al. 2014) y el vsaRNA (Zhang et al. 2014), razón por lo cual se propone que en VIH-1 aparece este mecanismo de regulación a nivel de RNA. Cuando el equilibrio entre las interacciones activadoras y represoras se rompe e inicia la replicación del provirus, los RNAs de 4 kb y los RNAs genómicos son exportados al citoplasma por Rev para expresar otras proteínas regulatorias como Vpr, Tat, Vpu, Vif al igual que las poliproteínas Gag-Pol, Gag y Env (Jacquet et al. 2005). Finalmente, por escisión de las poliproteínas se liberan los componentes estructurales del virus, como p24Gag, la transcriptasa reversa (RT), la integrasa (INT), la glucoproteína 120 (gp120) entre otras (Hammar skjöld et al. 1989; Fun et al. 2012). Lo cual favorece la formación de nuevas partículas virales. En la Figura 6.2 se muestra la red de expresión génica del provirus construida a partir de toda esta información.

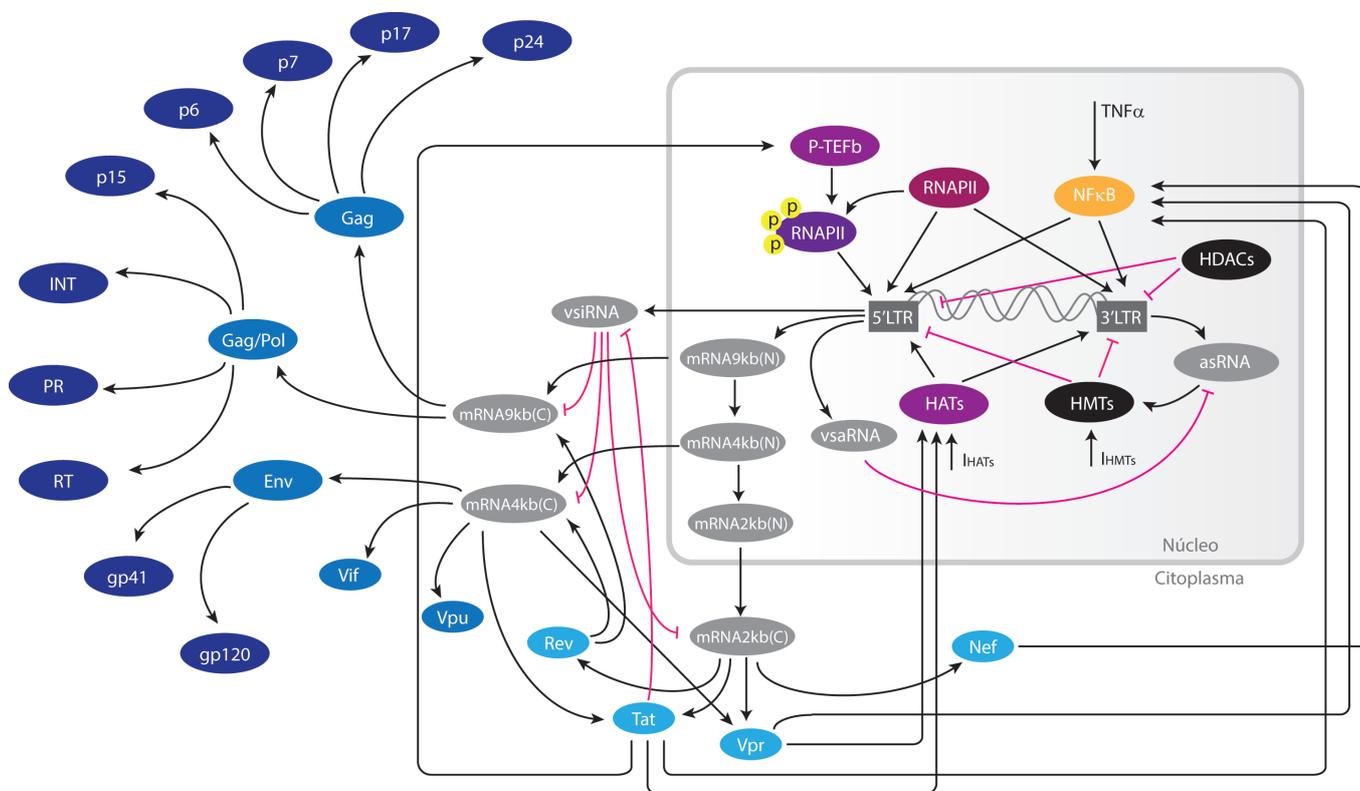


Figura 6.2 | Red de regulación de la expresión génica del provirus

En el interior de las células T CD4+ infectadas, los provirus pueden ser activados por factores transcripcionales y por factores de remodelación de la cromatina del hospedero durante la activación inmunológica. Cuando esto ocurre, el provirus transcribe una gran variedad de RNAs como por ejemplo los mRNAs virales sin editar, los RNAs virales no codificantes vsRNAs (*viral small interfering RNAs*) y los asRNA (*long anti-sense RNA*). Los RNAs no codificantes junto con las proteínas tempranas Tat, Rev, Nef y Vpr tienen funciones regulatorias sobre el provirus ya sea para inducir su expresión o para reprimirla. Una vez que las condiciones intracelulares son favorables para la proliferación viral, se producen las proteínas tardías como gp41, p24Gag y otras proteínas estructurales. En esta figura se representan las interacciones represivas con una línea T rosa, las interacciones activadoras se representan con flechas negras. Las proteínas tempranas están pintadas en azul claro mientras que las proteínas tardías del virus están en azul oscuro. Los componentes del hospedero se muestran en color púrpura, amarillo y negro.

6.2. Modelo discreto

6.2.1. Derivación del modelo discreto

El proceso general para convertir la información disponible de las interacciones de la red genética de regulación del provirus en reglas lógicas consistió en dos pasos: 1) determinar las entradas de cada nodo y 2) determinar las condiciones en las que cada nodo se activa por sus entradas (Cuadro 4). Aplicando este procedimiento a NF-κB, sus entradas son: TNF, Tat, Vpr, y Nef. NF-κB puede ser activado de forma independiente por TNF (Zhou et al. 2003), Tat (Fiume et al. 2012), Vpr (Varin et al. 2005) o Nef (Varin et al. 2003). Considerando estos datos, la red lógica correspondiente al nodo de NF-κB es:

Cuadro 4 | Modelos booleanos

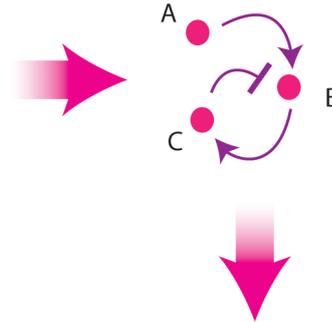
Los modelos booleanos son representaciones matemáticas de eventos que tienen dos estados operativos: "activo" e "inactivo" {0, 1}. Si se delimitan las condiciones por las cuales todas las variables de un sistema pueden cambiar su estado en el tiempo, entonces es posible establecer una ecuación que describa la transición de estado que hace una variable (nodo) en un momento determinado. Esta ecuación se conoce como: "regla lógica". Conocer estas ecuaciones permite predecir la evolución en el tiempo de una red. Por ejemplo: si se parte de unas condiciones iniciales dadas, al cabo de varios pasos de tiempo, el sistema tenderá a llegar a un estado

Reglas lógicas

Representaciones abstracta de una sucesión de eventos.

Eventos

A activa a B
B activa a C
C inhibe a B



Representación gráfica o grafo de una red

Regla lógica de B:

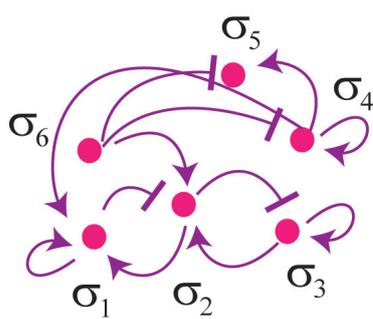
"para que se active B debe estar A y no debe estar C".

En otras palabras:

$$B(t+1) = A(t) \text{ AND } (\text{NOT } C(t))$$

Modelación de una red booleana

Evolución temporal de una red



Grafo de una red

Condición inicial

	σ_1	σ_2	σ_3	σ_4	σ_5	σ_6	
	█	█	█	█	█	█	t
	█	█	█	█	█	█	$t+1$
	█	█	█	█	█	█	$t+2$
	█	█	█	█	█	█	$t+3$
	█	█	█	█	█	█	\vdots
	█	█	█	█	█	█	$t+n-3$
	█	█	█	█	█	█	$t+n-2$
	█	█	█	█	█	█	$t+n-1$
	█	█	█	█	█	█	$t+n$

Atractor

Estado fijo al que converge una trayectoria después de n pasos de tiempo.

Representación gráfica de la convergencia de una trayectoria en un atractor

invariante en el tiempo, mismo que se conoce como atractor. Los atractores representan modos de funcionamiento de una red que, en caso de tratarse de un sistema biológico, equivalen a algún fenotipo.

$$NF\kappa B = (TNF)OR(Tat)OR(Vpr)OR(Nef) \quad (6.1)$$

Las HMTs tienen dos entradas: las señales intracelulares de activación de las HMTs (IHMTs) y los asRNAs. Las IHMTs son una representación de todos los eventos independientes intracelulares que pueden activar a las HMTs. Esta entrada al igual que los asRNA (Saayman et al. 2014) son capaces de activar a las HMTs de forma independiente. Por consiguiente, la regla lógica para las HMTs está dada por:

$$HMTs = (I_{HMTs})OR(asRNA) \quad (6.2)$$

La actividad del promotor 5'LTR depende de las HMTs, HATs, NF-κB y Tat. Este promotor se activa totalmente cuando están presentes NF-κB, las HATs y Tat (Westendorp et al. 1995), sin embargo puede funcionar exclusivamente con NF-κB y en todos los casos obligatoriamente se requiere de la ausencia de las HMTs para evitar su silenciamiento (Jordan et al. 2003), por consiguiente: La regla lógica es:

$$p5LTR = (NF\kappa B)AND \ NOT(HMTs) \quad (6.3)$$

Por otra parte, la actividad del promotor 3'LTR depende de NF-κB, las HATs y de la ausencia de las HMTs. No obstante, al igual que el promotor 5'LTR éste puede funcionar si obligatoriamente se reprime a las HMTs y se cuenta con niveles altos de NF-κB (Saayman et al. 2014), por consiguiente:

$$p3LTR = (NF\kappa B)AND \ NOT(HMTs) \quad (6.4)$$

La síntesis de los RNAs nucleares de 9 kb depende de la trans-activación de Tat y de la actividad del promotor 5'LTR, sin embargo es posible producir RNAs genómicos aún en ausencia de Tat (Jacquet et al. 2005), por consiguiente la regla lógica para estos RNAs es:

$$RNA9kbN = (p5LTR) \quad (6.5)$$

La síntesis de los vsiRNA depende de la actividad del promotor 5'LTR (Yeung et al. 2009) y de la ausencia de Tat (Bennasser et al. 2005), por consiguiente:

$$vsiRNA = (p5LTR)AND \ NOT(Tat) \quad (6.6)$$

La síntesis de los vsaRNA depende exclusivamente de la actividad del promotor 5'LTR (Zhang et al. 2014), y por ende:

$$vsaRNA = (p5LTR) \quad (6.7)$$

La síntesis de los RNAs parcialmente editados de 4 kb depende exclusivamente de la presencia de los RNAs genómicos de 9 kb (Jacquet et al. 2005), es decir:

$$RNA4kbN = (RNA9kbN) \quad (6.8)$$

De igual forma, la síntesis de los RNAs totalmente editados de 2 kb depende de sus precursores de 4 kb (Jacquet et al. 2005), por consiguiente:

$$RNA2kbN = (RNA4kbN) \quad (6.9)$$

La reserva citoplasmática de los RNAs totalmente editados depende de su transporte del núcleo al citoplasma (Jacquet et al. 2005), además se requiere que no existan factores inhibitorios como los vsiRNA (Bennasser et al. 2005), entonces:

$$RNA2kbC = (RNA2kbN) AND NOT(vsiRNA) \quad (6.10)$$

La reserva citoplasmática de los RNAs genómicos depende de la actividad de Rev para facilitar su transporte del núcleo al citoplasma (Felber et al. 1990), además también requiere de la ausencia de los vsiRNA (Bennasser et al. 2005), por lo tanto:

$$RNA4kbC = (RNA4kbN) AND (Rev) AND NOT(vsiRNA) \quad (6.11)$$

Ocurre lo mismo con la reserva citoplasmática de los RNAs genómicos de 9 kb:

$$RNA9kbC = (RNA9kbN) AND (Rev) AND NOT(vsiRNA) \quad (6.12)$$

La síntesis de los asRNA ocurre cuando el promotor anti-sentido 3'LTR es activado por NF-κB (Saayman et al. 2014) y no hay factores que inhibitorios como los vsaRNA (Schwartz et al. 2008; Zhang et al. 2014), por consiguiente:

$$asRNA = (p3LTR) AND NOT(vsaRNA) \quad (6.13)$$

La síntesis de Tat requiere de la presencia de los RNAs totalmente editados o de los RNAs parcialmente editados (Jacquet et al. 2005):

$$Tat = (RNA2kbC) OR (RNA4kbC) \quad (6.14)$$

La síntesis de Rev depende solamente de la presencia de los RNAs completamente editados de 2 kb (Jacquet et al. 2005):

$$Rev = (RNA2kbC) \quad (6.15)$$

La síntesis de Nef es análoga a la de Nef:

$$Nef = (RNA2kbC) \quad (6.16)$$

La síntesis de Vpr es análoga a la de Vpr:

$$Vpr = (RNA2kbC) OR (RNA4kbC) \quad (6.17)$$

Finalmente, la expresión de p24Gag depende exclusivamente de la concentración citoplasmática de los RNAs genómicos (Jacquenot et al. 2005):

$$p24Gag = (RNA9kbC) \quad (6.18)$$

Las entradas de la red son: TNF and IHMTs.

6.2.2. Dinámica del modelo discreto

La dinámica del modelo discreto se estudió mediante la implementación del modelo de Kauffman, en el cual los nodos descritos por las reglas lógicas son representados como un conjunto de variables binarias $\Sigma = \{\sigma_1, \dots, \sigma_n\}$, cuyos estados son: cero para inactivación y uno para activación. El valor de cada variable (i.e. nodo) σ_n está determinado por el valor de sus k_n reguladores, denotados por $\{\sigma_{n_1}, \dots, \sigma_{n_{k_n}}\}$ a través de la ecuación:

$$\sigma_n(t + \Delta t) = f_n(\sigma_{n_1}(t'), \sigma_{n_2}(t'), \dots, \sigma_{n_{k_n}}(t')) \quad (6.19)$$

Donde f_n es la regla lógica correspondiente al nodo σ_n que depende de los k_n argumentos. El tiempo discreto t avanza en pasos enteros; el tiempo t' en el cual el estado de los reguladores es evaluado como $t \leq t' < t + \Delta t$ donde Δt es el tiempo que toma a σ_n para responder a un cambio en sus reguladores. La ecuación 6.19 ha sido históricamente implementada de manera síncrona, es decir: todos los nodos se actualizan al mismo tiempo ($t' = t$ y $\Delta t = 1$) (Figura 6.3A). Sin embargo, en este trabajo la ecuación 6.19 también se implementó considerando otros dos esquemas de actualización, el asíncrono y el semi-síncrono.

Para el esquema asíncrono, el orden de actualización fue establecido en base al conocimiento biológico disponible que se tiene de la red $\{\sigma_1, \dots, \sigma_n\}$ (Tabla 6.1). Este orden fue visto como una permutación con repetición de elementos $P = \{\sigma_{p_1}, \sigma_{p_2}, \dots, \sigma_{p_L}\}$, en donde hay una cantidad de pasos L que se requieren para actualizar completamente todos los nodos de la red, además este parámetro puede ser mayor o igual al número de elementos que tiene la red, i.e. $L \geq N$ (Figura 6.3B). Para cada paso de tiempo t los nodos de la red se actualizan uno a uno siguiendo el orden de esta permutación, es decir: primero σ_{p_1} al tiempo $t' = t + 1/L$, después σ_{p_2} al tiempo $t' = t + 2/L$, y así sucesivamente hasta que σ_{p_L} es actualizado al tiempo $t' = t + 1$. Se aplica la ecuación 4.19 para actualizar cada nodo haciendo los siguientes cambios: $\Delta t = i/L$ y con $t' = t + (i - 1)/L$. Después de que todos los nodos de la red son actualizados, el tiempo t avanza una unidad y el proceso vuelve a repetirse hasta encontrar un atractor (Figura 6.3B).

En la red del VIH-1 hay algunos procesos biológicos que pueden darse simultáneamente, como por ejemplo la unión de NF- κ B a los promotores 5'LTR o 3'LTR. Pensando en un escenario en el cual varios procesos biológicos ocurrieran al mismo tiempo, se propuso un esquema de actualización semi-síncrono (Figura 6.3C). En este esquema el conjunto de nodos de la red $\Sigma = \{\sigma_1, \dots, \sigma_n\}$ fue

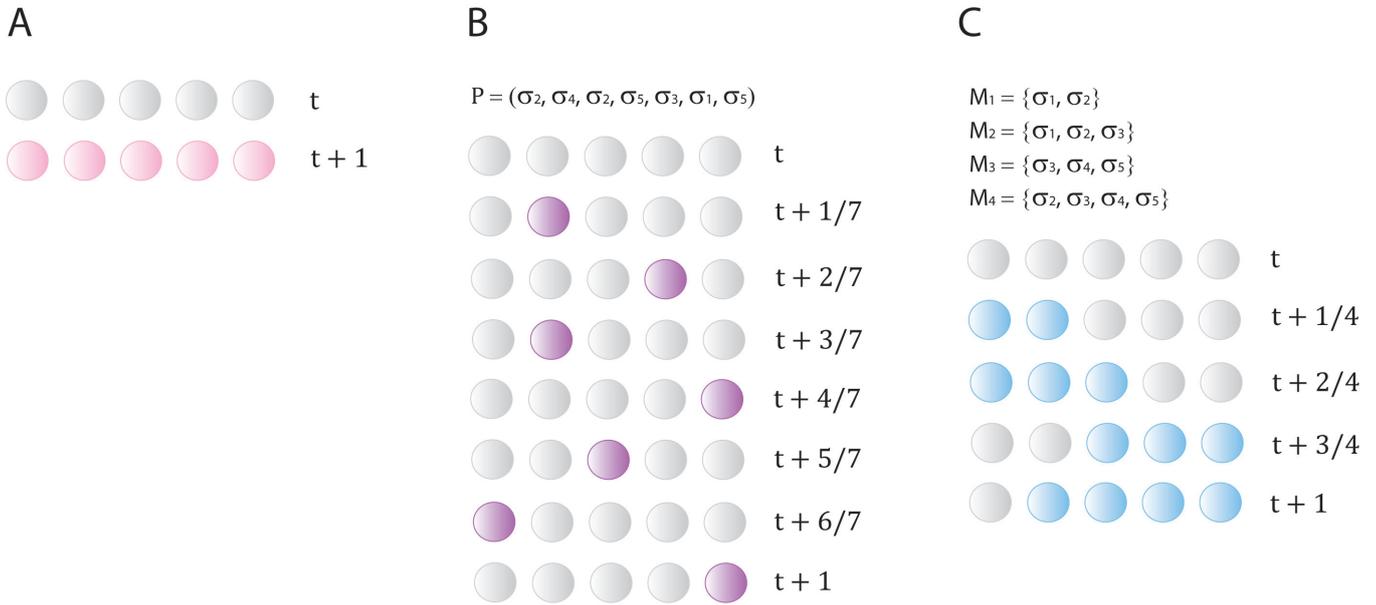


Figura 6.3 | Esquemas de actualización del modelo discreto

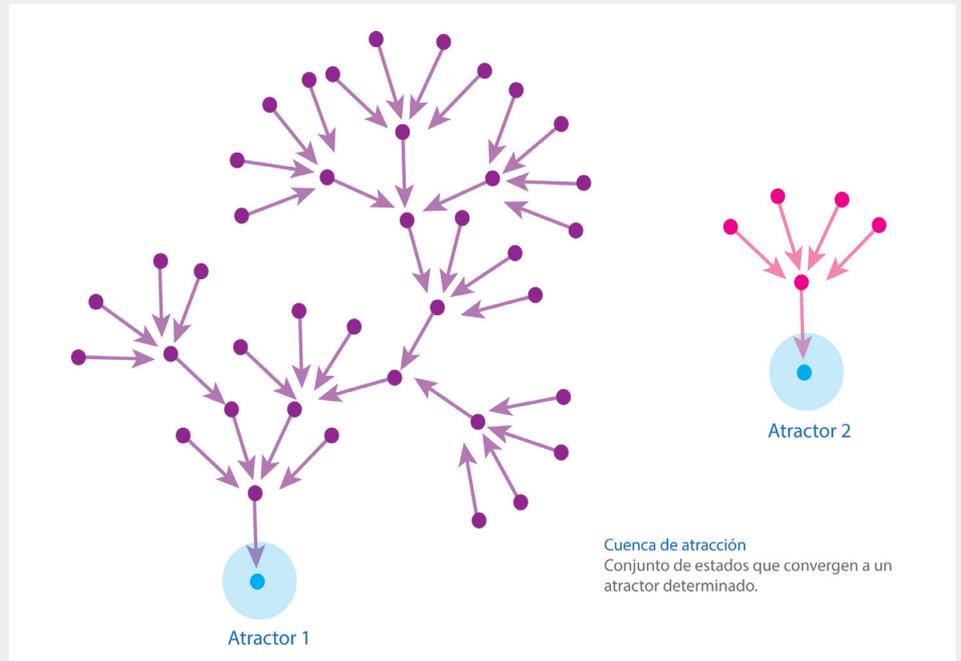
En esta figura cada círculo representa un nodo de una red abstracta. A lo largo del tiempo, cada nodo puede tener dos estados con valores numéricos asociados: uno para "encendido" (color rosa, violeta o azul) y cero para "apagado". **A)** En este panel se muestra una representación gráfica del esquema de actualización síncrono, en el cual los nodos de la red se actualizan al mismo tiempo ($t + 1$). **B)** En este panel se representa al esquema de actualización asíncrono, en el cual P representa al conjunto de nodos que será actualizado en diferentes tiempos hasta llegar a un paso de actualización $t + 1$. **C)** Finalmente, en este panel se representa el esquema de actualización semi-síncrono. Aquí, todos los nodos pertenecientes a los conjuntos M_1, \dots, M_4 se van actualizando al mismo tiempo hasta llegar a $t + 1$.

particionado en S subconjuntos $\{M_1, \dots, M_S\}$ tales que $\bigcup_{j=1}^S M_j = \Sigma$. Todos los nodos contenidos en cada subconjunto M_j son actualizados de manera síncrona, para emular aquellos procesos que pueden ocurrir al mismo tiempo (Tabla 6.2). Sin embargo las particiones $\{M_1, \dots, M_S\}$ son actualizadas de forma asíncrona en el siguiente orden: Los nodos de M_1 se actualizan al tiempo $t' = t + 1/S$, los nodos de M_2 se actualizan al tiempo $t' = t + 2/S$, y así sucesivamente hasta que M_S es actualizada al tiempo $t' = t + 1$. Para actualizar cada nodo se utiliza la ecuación 4.19 haciendo que $\Delta t = i/S$ y $t' = t + (i - 1)/S$. De esta forma, para que un paso de tiempo t avance a $t + 1$ todos los subconjuntos $\{M_1, \dots, M_S\}$ serán actualizados uno por uno (Figura 6.3C). En la Tabla 6.2 se muestran los subconjuntos de actualización del esquema semi-síncrono. Los tres esquemas de actualización se usaron hasta para encontrar los atractores o puntos fijos de la red, es decir los estados de la red p tales que $f_n(t) = p, \forall t$ (Cuadro 4).

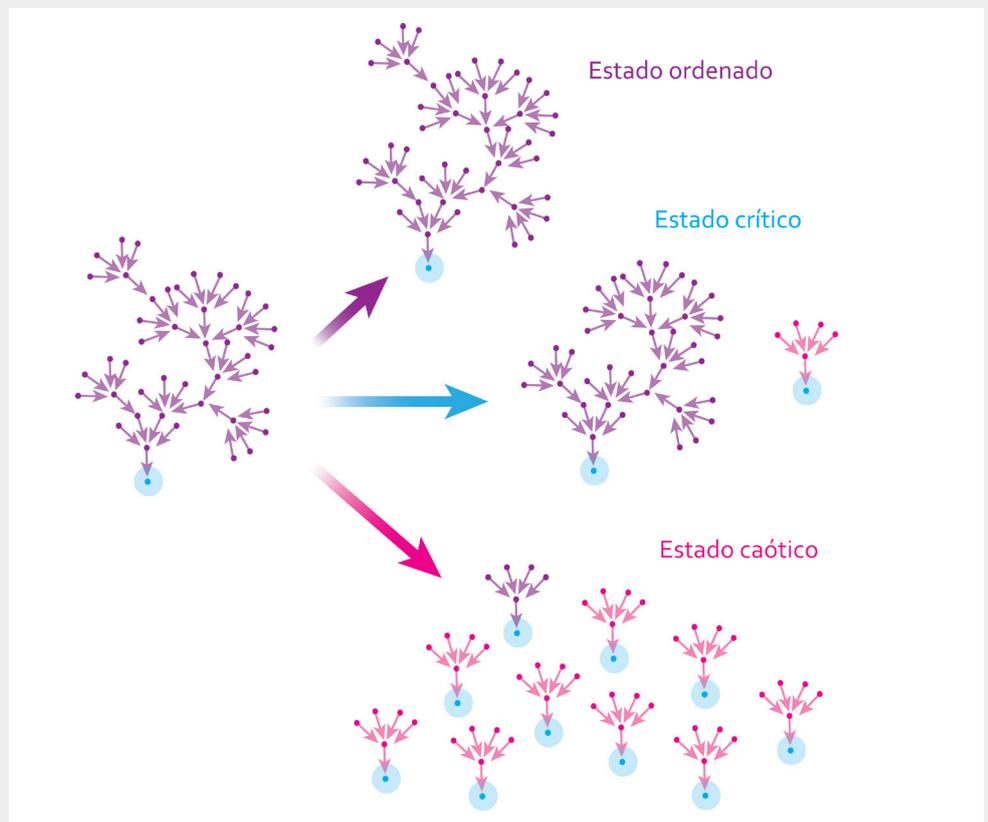
Cuadro 5 | Análisis de modelos booleanos

Si partimos de una condición inicial v_1 , a lo largo de varios pasos de llegaremos a un atractor α_1 . Sin embargo, existe un conjunto de condiciones iniciales que eventualmente conducen al atractor α_1 , a este conjunto de estados se le conoce como "cuenca de atracción". Es importante mencionar que cada atractor posee su propia cuenca de atracción, y los elementos contenidos en ella son únicos. Las cuencas de atracción pueden contener muchos elementos o bien pueden no tener casi elementos, sin embargo son características de cada uno de los atractores de la red.

Para evaluar la sensibilidad de la red, ésta se perturba nodo por nodo y se determina el efecto de dichas perturbaciones sobre la dinámica de la red. Si una red opera en estado ordenado, entonces las perturbaciones no causarán ningún efecto en la estructura de la red, dígame: atractores y cuencas de atracción. Si la red opera en estado crítico, las perturbaciones lograrán que la red "se adapte", manteniendo su funcionamiento general pero favoreciendo la aparición de nuevas características (atractores). Si por el contrario la red opera en estado caótico, las perturbaciones destruirán la estructura de la red, haciendo que se formen nuevos atractores y que las cuencas cambien.



Representación gráfica de las cuencas de atracción



Efectos de las perturbaciones en la estructura de una red

6.2.3. Cálculo de las cuencas de atracción

Para cada atractor p_i existe un conjunto C de estados que después de algunos pasos de tiempo conducen a al atractor p_i , a este conjunto de elementos se le conoce como cuenca de atracción del atractor p_i . Se ha reportado que el tamaño de las cuencas de atracción puede modificarse dependiendo del esquema de actualización que se use (Gershenson 2002) (Cuadro 5). Desde un punto de vista biológico, esto equivale al ruido transcripcional que se observa en la expresión de los genes originado por los cambios en el entorno intracelular. También se ha observado que existen ciertos estados que siempre están contenidos en alguna cuenca de atracción, independientemente del esquema de actualización usado. En este trabajo de tesis se propone que los estados que siempre aparecen asociados a una cuenca de atracción son relevantes desde un punto de vista biológico, ya que representarían estados obligatorios que la expresión del provirus debe seguir con la finalidad de activarse o entrar en latencia. Estos estados invariantes se calcularon intersectando las cuencas de atracción calculadas con los tres esquemas de actualización, con la finalidad de determinar la trayectoria de activación del provirus.

6.2.4. Estabilidad del modelo discreto: prueba del mapa de Derrida

Para analizar las propiedades de las redes booleanas se han incorporado conceptos propios de otras áreas como la química, en la cual se homóloga una red con la estructura del agua. De esta forma, las redes pueden presentar dinámicas equivalentes a los tres estados del agua, es decir: sólido, líquido y gaseoso. En lo equivalente al estado sólido, cuando una red booleana recibe una avalancha de perturbaciones estocásticas causadas por el ruido transcripcional, la sobreexpresión o delección de genes, la dinámica de la red no se ve afectada sin importar la gravedad de las perturbaciones. A este comportamiento se le conoce como *régimen ordenado* (Aldana 2003). Por otra parte, en el comportamiento equivalente al estado gaseoso se observa que una pequeña cantidad de perturbaciones es suficiente para modificar drásticamente la dinámica de la red. Este comportamiento es conocido como *régimen caótico* (Aldana 2003) (Cuadro 5).

Tabla 6.1 | Esquema de actualización asíncrono

Paso de actualización	Nodos a actualizar	Criterio biológico de elección de los nodos
$t = 1/65$	TNF	Señal de inflamación por excelencia (Fiume et al. 2012).
$t = 2/65$	IHMTS	Entrada de la red.
$t = 3/65$	NF- κ B	NF- κ B es activado por la vía de TNF (Sun et al. 2000).
$t = 4/65$	HMTs	HMTs son activadas por IHMTS
$t = 5/65$	p5LTR	Este promotor es más activo que el p3LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 6/65$	p3LTR	Este promotor es menos activo que el p5LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 7/65$	RNAsgkbN	Este es el primer producto del p5LTR (Jacquenet et al. 2005).
$t = 8/65$	vsRNA	El RNA viral contiene varios siRNAs (Bennasser et al. 2005).
$t = 9/65$	vsRNA	En el gen de <i>gag</i> hay un RNA activador (Zhang et al. 2014).

Tabla 6.1 | Esquema de actualización asíncrono (continuación)

Paso de actualización	Nodos a actualizar	Criterio biológico de elección de los nodos
$t = 10/65$	asRNA	Este es el producto del promotor 3'LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 11/65$	HMTs	Estas enzimas se activan por el asRNA (Saayman et al. 2014).
$t = 12/65$	RNAs ₄ kbN	Primero producto de splicing del RNAgkbN (Jacquet et al. 2005).
$t = 13/65$	RNAs ₄ kbC, RNAs ₉ kbC	Rev puede transportarlos al mismo tiempo (Jacquet et al. 2005).
$t = 14/65$	asRNA	Este es el producto del promotor 3'LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 15/65$	HMTs	Estas enzimas se activan por el asRNA (Saayman et al. 2014).
$t = 16/65$	p5LTR, p3LTR	Ambos promotores son inhibidos por las HMTs (Saayman et al. 2014).
$t = 17/65$	RNAs ₂ kbN	Antes de la activación, es el RNA más abundante (Jacquet et al. 2005).
$t = 18/65$	RNAs ₄ kbC	Este RNA permanece en el citoplasma por un tiempo largo (Groen 2013).
$t = 19/65$	Nef	Nef es la primera proteína en ser detectada (van 't Wout et al. 2003).
$t = 20/65$	Rev	Rev is the second early protein to be detected (van 't Wout et al. 2003).
$t = 21/65$	Tat, Vpr	Tat y Vpr son las proteínas menos abundantes (van 't Wout et al. 2003).
$t = 22/65$	p24Gag	Las proteínas tardías aparecen después (van 't Wout et al. 2003).
$t = 23/65$	NF-κB	Activado por Tat, Vpr y Nef (Liu et al. 2014; Fiume et al. 2012; Varin et al. 2003).
$t = 24/65$	p5LTR	Este promotor es más activo que el p3LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 25/65$	p3LTR	Este promotor es menos activo que el p5LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 26/65$	RNAs ₉ kbN	Este es el primer producto del p5LTR (Jacquet et al. 2005).
$t = 27/65$	vsRNA	El RNA viral contiene varios siRNAs (Bennasser et al. 2005).
$t = 28/65$	vsRNA	En el gen de <i>gag</i> hay un RNA activador (Zhang et al. 2014).
$t = 29/65$	RNAs ₄ kbN	Primero producto de splicing del RNAgkbN (Jacquet et al. 2005).
$t = 30/65$	RNAs ₂ kbC	No requiere de Rev para ser exportado (Jacquet et al. 2005).
$t = 31/65$	RNAs ₄ kbC	Este RNA permanece en el citoplasma por un tiempo largo (Groen 2013).
$t = 32/65$	RNAs ₉ kbC	Este RNA permanece en el citoplasma por un tiempo largo (Groen 2013).
$t = 33/65$	asRNA	Este es el producto del promotor 3'LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 34/65$	Tat, Vpr	Tat y Vpr son las proteínas menos abundantes (van 't Wout et al. 2003).
$t = 35/65$	NF-κB	Activado por Tat, Vpr y Nef (Liu et al. 2014; Fiume et al. 2012; Varin et al. 2003).
$t = 36/65$	HMTs	Estas enzimas se activan por el asRNA (Saayman et al. 2014).
$t = 37/65$	p5LTR	Este promotor es más activo que el p3LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 38/65$	p3LTR	Este promotor es menos activo que el p5LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 39/65$	RNAs ₉ kbN	Este es el primer producto del p5LTR (Jacquet et al. 2005).
$t = 40/65$	vsRNA	El RNA viral contiene varios siRNAs (Bennasser et al. 2005).
$t = 41/65$	vsRNA	En el gen de <i>gag</i> hay un RNA activador (Zhang et al. 2014).
$t = 42/65$	RNAs ₄ kbN	Primero producto de splicing del RNAgkbN (Jacquet et al. 2005).
$t = 43/65$	RNAs ₂ kbC	No requiere de Rev para ser exportado (Jacquet et al. 2005).
$t = 45/65$	RNAs ₄ kbC, RNAs ₉ kbC	Rev puede transportarlos al mismo tiempo (Jacquet et al. 2005).
$t = 46/65$	asRNA	Este es el producto del promotor 3'LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 47/65$	Nef	Nef es la primera proteína en ser detectada (van 't Wout et al. 2003).

Tabla 6.1 | Esquema de actualización asíncrono (continuación)

Paso de actualización	Nodos a actualizar	Criterio biológico de elección de los nodos
$t = 48/65$	Rev	Rev is the second early protein to be detected (van 't Wout et al. 2003).
$t = 49/65$	Tat, Vpr	Tat y Vpr son las proteínas menos abundantes (van 't Wout et al. 2003).
$t = 50/65$	p24Gag	Las proteínas tardías aparecen después (van 't Wout et al. 2003).
$t = 51/65$	NF- κ B	Activado por Tat, Vpr y Nef (Liu et al. 2014; Fiume et al. 2012; Varin et al. 2003).
$t = 52/65$	HMTs	Estas enzimas se activan por el asRNA (Saayman et al. 2014).
$t = 53/65$	p5LTR	Este promotor es más activo que el p3LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 54/65$	p3LTR	Este promotor es menos activo que el p5LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 55/65$	RNA ₅ gkbN	Este es el primer producto del p5LTR (Jacquenet et al. 2005).
$t = 56/65$	vsRNA	El RNA viral contiene varios siRNAs (Bennasser et al. 2005).
$t = 57/65$	vsRNA	En el gen de <i>gag</i> hay un RNA activador (Zhang et al. 2014).
$t = 58/65$	RNA ₄ kbN	Primero producto de splicing del RNA ₅ gkbN (Jacquenet et al. 2005).
$t = 59/65$	RNA ₂ kbC	No requiere de Rev para ser exportado (Jacquenet et al. 2005).
$t = 60/65$	RNA ₄ kbC, RNA ₅ gkbC	Rev puede transportarlos al mismo tiempo (Jacquenet et al. 2005).
$t = 61/65$	asRNA	Este es el producto del promotor 3'LTR (Saayman et al. 2014).
$t = 62/65$	Nef	Nef es la primera proteína en ser detectada (van 't Wout et al. 2003).
$t = 63/65$	Rev	Rev is the second early protein to be detected (van 't Wout et al. 2003).
$t = 64/65$	Tat, Vpr	Tat y Vpr son las proteínas menos abundantes (van 't Wout et al. 2003).
$t = 1$	p24Gag	Las proteínas tardías aparecen después (van 't Wout et al. 2003).

Desde un punto de vista evolutivo tanto el régimen ordenado como el régimen caótico no son convenientes para la supervivencia de una especie, porque uno equivaldría a tener organismos incapaces de adaptarse a nuevos entornos y el otro equivaldría a tener organismos con fenotipos inestables que podrían desaparecer a la menor provocación. En medio de estos dos regímenes dinámicos se encuentra lo equivalente al estado líquido, un estado en el que se mantiene cierto grado de robustez como en el régimen ordenado que coexiste con un buen nivel de flexibilidad, propio del estado caótico. Este régimen dinámico se conoce como *punto crítico* (Aldana 2003).

Siguiendo con la lógica de los estados del agua, cada uno de ellos se define por la distancia que hay entre sus moléculas. De esta forma, en el estado gaseoso existe una distancia muy grande entre las moléculas, en el estado sólido se forma una red cristalina en donde la distancia entre las moléculas de agua es muy pequeña y en el estado líquido se tiene una distancia un poco más mayor que en el estado sólido pero sin llegar a ser tan grande como en el estado gaseoso. Por consiguiente, para determinar el régimen dinámico de las redes booleanas es necesario determinar una medida equivalente a la distancia que hay entre todas las moléculas de agua en cada estado. Extrapolando esta idea al análisis de las redes, cada estado de la red se considerará como si se tratara de una molécula de agua y para determinar la distancia que hay entre todas las configuraciones se utilizará la *distancia normalizada de Hamming* $h(t)$ al tiempo t entre dos estados de la red definida como:

$$h(t) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N |\sigma_n(t) - \tilde{\sigma}_n(t)| \quad (4.20)$$

Donde $\sigma_n(t)$ es el estado del n -ésimo nodo de la red al tiempo t en una trayectoria que inicia con una condición inicial dada, y $\tilde{\sigma}_n(t)$ es el estado del mismo nodo en una trayectoria diferente generada de una condición inicial diferente. La ecuación 6.20 es considerada como el tamaño normalizado de la avalancha de perturbaciones generadas por las diferencias de las dos condiciones iniciales. El mapa de Derrida $h(t+1) = M(h(t))$ (Derrida & Pomeau 1986) relaciona el tamaño de la avalancha en dos pasos de tiempo consecutivos. Se puede demostrar que $M(h)$ es una función monótona creciente con la propiedad de $M(0) = 0$. La pendiente S en el origen de $M(h)$ es el parámetro que caracteriza el valor asintótico de la distancia de Hamming, mismo que determina la dinámica de la red ante perturbaciones. Al parámetro S se denomina como el valor promedio de la sensibilidad de la red. Cuando $S < 1$ la red opera en el régimen ordenado, cuando $S > 1$ entonces la red opera en el régimen caótico, finalmente si $S=1$ entonces la red opera en el punto crítico. Desde un punto de vista biológico, S equivale a la fracción de genes que cambian su estado al tiempo $t+1$ cuando un solo gen es perturbado al tiempo t (Krawitz & Shmulevich 2007).

Esta forma de calcular S corresponde a determinar la estabilidad de la red ante perturbaciones temporales. No obstante, también es posible determinar la estabilidad de la red en presencia de perturbaciones permanentes tales como la sobre-estimulación de un gen o su delección. Para esto el valor de un nodo de la red σ_j , se fijó en $\sigma_j = 0$ para representar su inactivación permanente y $\sigma_j = 1$ en para representar su sobre-activación permanente durante todo el tiempo, sin importar el estado de sus reguladores. Definiendo S_j como la sensibilidad promedio cuando un nodo σ_j es permanentemente perturbado (ya sea por represión o sobre-estimulación), y a S_0 como la sensibilidad promedio de la red sin perturbar. La diferencia entre ambas sensibilidades ΔS se define como:

$$\Delta S = S_j - S_0 \quad (6.21)$$

Tabla 6.2 | Esquema de actualización semi-síncrono

Paso de actualización	Actualización de nodos
$t = 1/9$	{TNF, I _{HMTs} }
$t = 2/9$	{NF-κB, HMTs}
$t = 3/9$	{p5LTR, p3LTR}
$t = 4/9$	{RNAs9kbN, vsiRNA, vsaRNA, asRNA}
$t = 5/9$	{HMTs, RNAs4kbN, RNAs2kbC, RNAs4kbC, RNAs9kbC, asRNA}
$t = 6/9$	{HMTs, p5LTR, p3LTR, RNAs2kbN, RNAs4kbC, Tat, Rev, Nef, Vpr, p24Gag}
$t = 7/9$	{NF-κB, p5LTR, p3LTR, RNAs9kbN, vsiRNA, vsaRNA, RNAs2kbC, RNAs4kbC, RNAs9kbC, asRNA, Tat, Vpr}
$t = 8/9$	{NF-κB, HMTs, p5LTR, p3LTR, RNAs9kbN, vsiRNA, vsaRNA, RNAs4kbN, RNAs2kbC, RNAs4kbC, RNAs9kbC, asRNA, Tat, Rev, Nef, Vpr, p24Gag}
$t = 1$	{NF-κB, HMTs, p5LTR, p3LTR, RNAs9kbN, vsiRNA, vsaRNA, RNAs4kbN, RNAs2kbN, RNAs2kbC, RNAs4kbC, RNAs9kbC, asRNA, Tat, Rev, Nef, Vpr, p24Gag}

Misma que proporciona una medida para determinar cuánto cambia la dinámica de la red en presencia de una perturbación fija. Esta medida también se ocupó para determinar la estabilidad de la dinámica de la red en presencia de una perturbación permanente de dos nodos σ_i y σ_j , ya sea para inhibirlos, sobre-estimularlos o inhibir uno mientras se sobre-estimula el otro.

6.2.5. Probabilidad de activación viral

Después de encontrar los atractores con los tres esquemas de actualización (síncrono, asíncrono y semi-síncrono), se clasificó a los atractores en función del valor del nodo correspondiente a p24Gag (i.e. la salida de la red). Todos los atractores en los cuales se expresaba una proteína tardía como p24Gag fueron considerados como atractores de activación, porque la expresión de las proteínas tardías es el paso previo a la producción de nuevas partículas virales (Capítulo 2). En cambio, todos los atractores que no presentaron expresión de p24Gag fueron clasificados como atractores de latencia. En base a esta clasificación, y considerando el hecho de que los esquemas de actualización son deterministas, se definió la probabilidad de activación del provirus W_{on} como el peso relativo del estado de activación, mismo que fue calculado sumando el tamaño de las cuencas de atracción de todos los atractores de activación, y después se dividió entre la suma total de los estados de la red, en otras palabras:

$$W_{on} = \frac{1}{\Omega} \sum_k |B(a_k)| \quad (6.22)$$

Donde $\Omega = 2^N$ es el total de estados de la red, y $|B(a_k)|$ es el tamaño de la cuenca de atracción del k -ésimo atractor. De igual forma, el peso relativo del estado de latencia W_{off} se calculó de la siguiente manera:

$$W_{off} = 1 - W_{on} \quad (6.23)$$

Estas métricas se utilizaron para determinar cuál de los dos estados operativos de la red (i.e. latencia o activación) está más favorecido por la dinámica.

6.3. Modelo continuo

6.3.1. Derivación del modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias

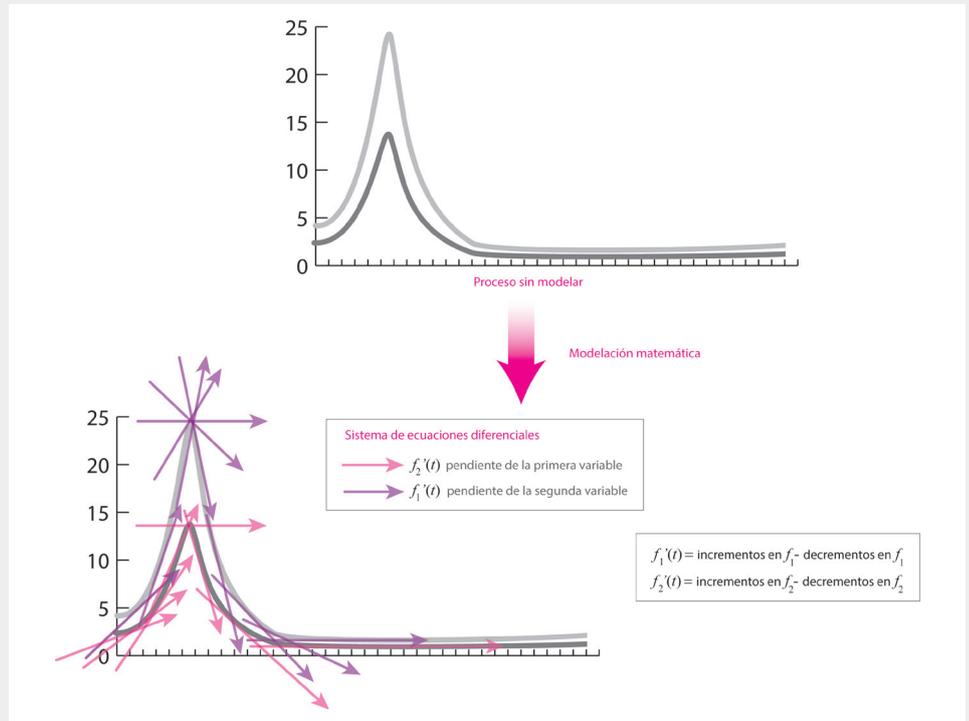
En el modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) se representaron los estados de los nodos de la red como variables continuas $\{x_1, \dots, x_N\}$, las cuales satisfacen la ecuación general de balance de masa (Cuadro 6):

$$\frac{dx_n}{dt} = \sum_k J_{n_k}^i - \sum_r J_{n_r}^o \quad (6.24)$$

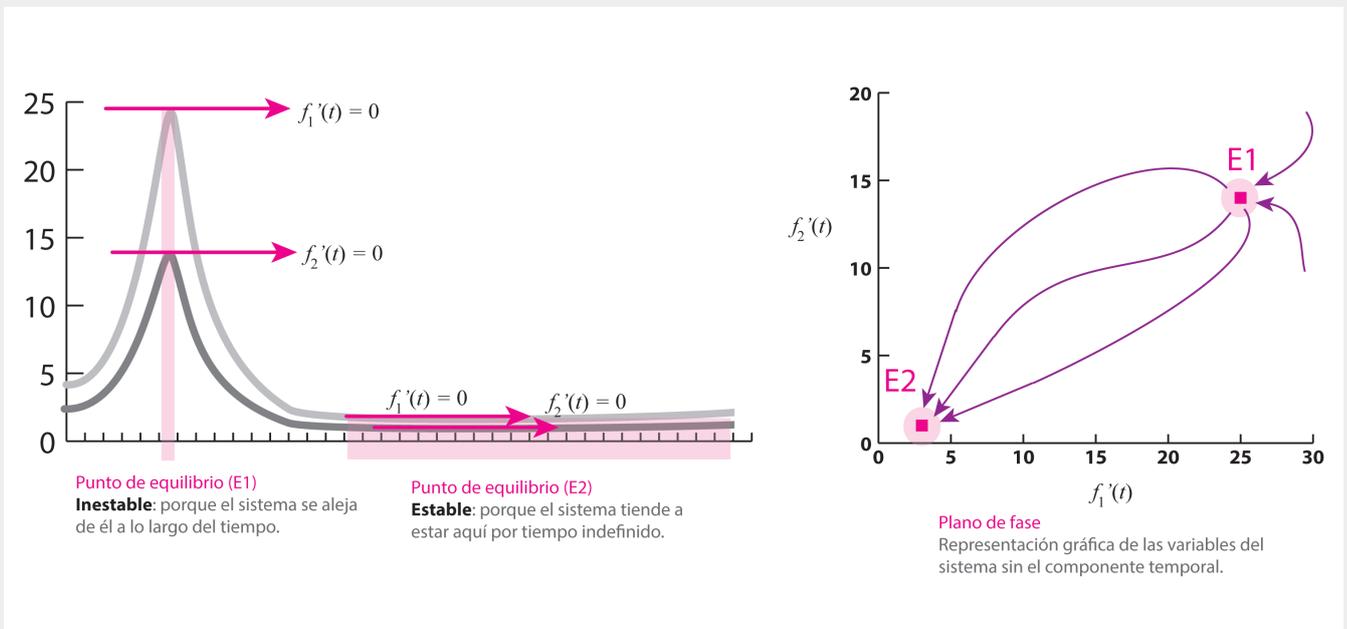
Donde $\sum_k J_{n_k}^i$ representa a la suma de todos los flujos que incrementan la cantidad de la variable x_n , por otra parte el flujo $\sum_r J_{n_r}^o$ representa a la suma de todos los factores que reducen el valor de la variable x_n . A continuación se muestra la derivación detallada de todas las ecuaciones diferenciales empleadas en este modelo.

Cuadro 6 | Modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias

Los procesos continuos pueden aproximarse con una serie de rectas tangentes. La pendiente de cada curva corresponde a una ecuación diferencial ordinaria (ODEs), misma que se plantea sumando todos los factores del proceso que contribuyen a que aumente la variable menos la suma de todos los factores que disminuyen el valor de la variable. Los puntos donde la pendiente de las curvas es cero, se conocen como *puntos de equilibrio* y corresponden a los estados del sistema. Los puntos de equilibrio pueden mantener al sistema en valores constantes a lo largo del tiempo, es decir ser estables, o pueden mantener al sistema ahí por poco tiempo, es decir: ser inestables.



Representación gráfica de un modelo de ODEs



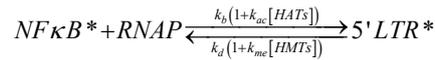
Representación gráfica de los estados de un modelo de ODEs

La gráfica de las variables de un sistema de ecuaciones diferenciales sin la presencia del tiempo se conoce como espacio de fase, y en ella emergen patrones característicos que forman las trayectorias del sistema entorno a un punto de equilibrio, a esto se le conoce como "retrato de fase".

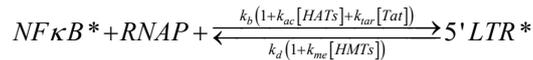
La transcripción génica es un proceso complejo que requiere de la remodelación de la cromatina, así como de la unión de varios factores transcripcionales junto con la RNA polimerasa II en la región promotora. En el caso del VIH-1, la región 5'LTR tiene muchos sitios de unión a factores transcripcionales (Capítulo 2), sin embargo se ha visto que para que inicie la transcripción únicamente basta con que haya suficiente NF-κB (Liu et al. 2014; Giorgetti et al. 2010; Fiume et al. 2012). Evidencia reciente ha mostrado que sólo se necesita una molécula de NF-κB para iniciar la transcripción del provirus y se ha descartado la existencia de cooperatividad (Giorgetti et al. 2010), en otras palabras:



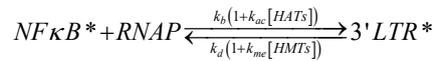
Dentro de la maquinaria de remodelación de la cromatina, el efecto de las HATs consiste en acetilar el DNA con la finalidad de relajarlo para que se vuelva más accesible a los factores transcripcionales, por otra parte las HMTs metilan el DNA con la finalidad de que se compacte y se restrinja el acceso de los factores transcripcionales al genoma (Groen & Morris 2013; Agbottah et al. 2006; Reuse et al. 2009). Considerando estos datos, se puede suponer que las HATs incrementan la afinidad de NF-κB por el promotor 5'LTR, mientras que las HMTs la reducen. Por consiguiente:



En el promotor 5'LTR existe una región especial que al ser transcrita origina una estructura de RNA llamada TAR (Capítulo 2). Esta horquilla de RNA se encuentra presente en todos los RNAs virales y es el sitio de unión de Tat, para inducir la hiperfosforilación de la RNA polimerasa II por parte de P-TEFb. En consecuencia, Tat incrementa la transcripción de los RNAs genómicos de 9 kb (D'Orso et al. 2012). Agregando este término el equilibrio queda de la siguiente manera:



Por otra parte, en el caso del promotor anti-sentido ubicado en la región nef-3'LTR se puede considerar que:



Por consiguiente, la actividad de ambos promotores puede modelarse usando una ecuación de la cinética de Michaelis-Menten como sigue:

$$\dot{J}_{5LTR} = k_b(1+k_{ac}[HATs]+k_{tar}[Tat])[RNAP][NF\kappa B] - k_d(1+k_{me}[HMTs])[5LTR] \quad (6.25)$$

$$\dot{J}_{3LTR} = k_b(1+k_{ac}[HATs])[RNAP][NF\kappa B] - k_d(1+k_{me}[HMTs])[3LTR] \quad (6.26)$$

Si consideramos que la concentración de la RNA polimerasa II es constante en el interior de la célula, es decir: $[RNAP]_T = [3LTR] + [5LTR] + [RNAP]$ entonces se pueden reescribir las ecuaciones 4.25 y 4.26 de la siguiente manera:

$$\dot{J}_{5LTR} = J_1 - J_2 \quad (6.27)$$

$$\dot{J}_{3LTR} = J_3 - J_4 \quad (6.28)$$

Donde: $J_1 = k_b(1 + k_{ac}[HATs] + k_{TAR}[Tat])([RNAP]_T - [3LTR] - [5LTR])[NF\kappa B]$, $J_2 = k_d(1 + k_{me}[HMTs])[3LTR]$, y para el p3'LTR: $J_3 = k_b(1 + k_{ac}[HATs])([RNAP]_T - [3LTR] - [5LTR])[NF\kappa B]$ y $J_4 = k_d(1 + k_{me}[HMTs])[3LTR]$.

Una vez que el 5'LTR promotor está activo y hay niveles suficientes de Tat, se puede llevar a cabo la transcripción de los RNAs genómicos de 9 kb con una tasa de síntesis a_1 . Los RNAs genómicos pueden ser editados a su forma intermedia de 4 kb con una tasa s_1 , también pueden exportarse al citoplasma de forma basal τ o por la actividad de Rev k_{RRE} (Saurya et al. 2005). Finalmente la concentración de los RNAs genómicos de 9 kb puede disminuir por su degradación δ_1 en el interior de la célula. Por consiguiente, la ecuación de balance de masa para los RNAs genómicos de 9 kb en el interior de la célula está dada por:

$$\dot{J}_{9kbN} = J_5 - J_6 - J_7 - J_8 \quad (6.29)$$

Donde: $J_5 = a_1[5LTR]$, $J_6 = (\tau + k_{RRE}[Rev])[RNA9kbN]$, $J_7 = \delta_1[RNA9kbN]$ y $J_8 = s_1[RNA9kbN]$.

Además del RNA genómico, el promotor 5'LTR también produce RNAs trancos con una velocidad a_2 , que son procesados a RNAs pequeños. Varios de ellos pueden reprimir las funciones celulares al igual que a los RNAs virales en el citoplasma (Schopman et al. 2012; Nathans et al. 2009; Bennasser et al. 2005). Recientemente se ha mostrado que Tat es capaz de interferir con la síntesis de los RNAs virales pequeños mientras induce la replicación viral (Ponia et al. 2013). Esta represión se lleva a cabo con una velocidad r_1 . En términos matemáticos se puede representar la síntesis de los RNAs virales pequeños de interferencia como:

$$\dot{J}_{vsRNA} = J_9 - J_{10} \quad (6.30)$$

Donde: $J_9 = a_2[5LTR]$ y $J_{10} = (\delta_2 + r_1[Tat])[vsRNA]$.

Recientemente se ha reportado un nuevo tipo de RNA viral pequeño derivado del gen pol el cual es capaz de activar la transcripción viral (Zhang et al. 2014). Su concentración depende exclusivamente de su síntesis a partir del promotor 5'LTR y de su degradación. En otras palabras:

$$\dot{J}_{vsRNA} = J_{11} - J_{12} \quad (6.31)$$

Donde: $J_{11} = a_3[5LTR]$ y $J_{12} = \delta_3[vsRNA]$.

Por otra parte, el promotor anti-sentido 3'LTR controla la transcripción de un RNA viral largo y anti-sentido (asRNA), el cual posiciona a las HMTs en las región 5'LTR del provirus, para inducir la represión del provirus (Saayman et al. 2014). A nivel fisiológico, este tipo de RNAs son el blanco de RNAs pequeños activadores, los cuales forman se les unen para inducir su degradación, induciendo la expresión génica (Schwartz et al. 2008). En el genoma del VIH-1 existen los componentes básicos de este mecanismo: un asRNA y un RNA viral pequeño y activador (vsaRNA) (Zhang et al. 2014), lo cual sugiere que este mecanismo puede darse en el contexto de la regulación génica del provirus. La concentración del asRNA depende de su síntesis a_4 , de su degradación δ_4 al igual que de la represión producida por el vsaRNA dada a una tasa r_2 . Es decir:

$$\dot{J}_{asRNA} = J_{13} - J_{14} \quad (6.32)$$

Donde $J_{13} = a_4[3LTR]$ y $J_{14} = (\delta_4 + r_2[vsaRNA])[asRNA]$.

Cuando los RNAs genómicos de 9 kb son totalmente transcritos éstos son parcialmente editados en formas de 4 kb a una velocidad s_1 , y totalmente editados en formas de 2 kb a una velocidad s_2 (Jacquet et al. 2005). Los RNAs nucleares de 4 kb también pueden ser transportados al citoplasma de forma basal (a una tasa τ) o por la interacción de su RRE (elemento responsivo de Rev) con Rev a una velocidad (k_{RRE}). Estos RNAs también pueden ser degradados con una tasa δ_5 . Por consiguiente, la variación en el tiempo de la concentración de los RNAs de 4 kb en el núcleo está dada por:

$$\dot{J}_{4kbN} = J_8 - J_{15} - J_{16} - J_{17} \quad (6.33)$$

Donde $J_{15} = (\tau + k_{RRE}[Rev])[RNA4kbN]$, $J_{16} = \delta_5[RNA4kbN]$ y $J_{17} = s_2[RNA4kbN]$.

Por otra parte, los RNAs totalmente editados de 2 kb son capaces de abandonar el núcleo sin la necesidad de ser transportados por Rev y lo hacen a una velocidad k_{exp} . En el núcleo estos RNAs también son degradados a una velocidad δ_6 . Por consiguiente la ecuación que describe la variación en su concentración en el tiempo está dada por:

$$\dot{J}_{2kbN} = J_{17} - J_{18} - J_{19} \quad (6.34)$$

Donde $J_{18} = k_{exp}[RNA2kbN]$ y $J_{19} = \delta_6[RNA2kbN]$.

Una vez que están en el citoplasma, los RNAs virales de 2, 4 y 9 kb pueden ser silenciados por el complejo RISC usando a los vsiRNA (Ponia et al. 2013; Nathans et al. 2009) con una tasa r_3 , independientemente de su tasa de degradación natural δ_7 . Entonces, las ecuaciones correspondientes a estos RNAs en el citoplasma están dadas por:

$$\dot{J}_{2kbC} = J_{18} - J_{20} - J_{21} \quad (6.35)$$

Donde $J_{20} = \delta_7[RNA2kbC]$ y $J_{21} = r_3[vsiRNA][RNA2kbN]$.

$$\dot{J}_{4kbC} = J_{15} - J_{22} - J_{23} \quad (3.36)$$

Donde $J_{22} = \delta_8 [RNA4kbC]$ y $J_{23} = r_3 [vsRNA][RNA4kbN]$.

$$\dot{J}_{9kbC} = J_6 - J_{24} - J_{25} \quad (3.37)$$

Donde $J_{24} = \delta_9 [RNA9kbC]$ y $J_{25} = r_3 [vsRNA][RNA9kbN]$.

Con los RNAs virales en el citoplasma se favorece la síntesis de las proteínas virales. Las primeras en aparecer son las proteínas tempranas: Tat, Rev, Nef y Vpr (Capítulo 2), mismas que dependen de los RNAs totalmente editados de 2 kb (Jacquet et al. 2005). Por otra parte, los RNAs de 4 kb también codifican a Tat y Vpr (Jacquet et al. 2005), lo cual favorece el incremento en estas proteínas una vez que inicia la replicación viral. Considerando estos datos, la ecuación de balance de masa que describe la variación en el tiempo de la concentración de Tat está dada por:

$$\dot{J}_{Tat} = J_{26} + J_{27} - J_{28} \quad (3.38)$$

Donde $J_{26} = a_5 [RNA kbC]$, $J_{27} = a_6 [RNA4kbC]$ y $J_{28} = \delta_{10} [Tat]$.

De igual forma la ecuación que modela la concentración de Rev está dada por:

$$\dot{J}_{Rev} = J_{29} - J_{30} \quad (3.39)$$

Donde $J_{29} = a_7 [RNA2kbC]$ y $J_{30} = \delta_{11} [Rev]$.

Análogamente para Nef se tiene que:

$$\dot{J}_{Nef} = J_{31} - J_{32} \quad (3.40)$$

Donde $J_{31} = a_8 [RNA2kbC]$ y $J_{32} = \delta_{12} [Nef]$.

Y para Vpr se tiene que:

$$\dot{J}_{Vpr} = J_{33} + J_{34} - J_{35} \quad (3.41)$$

Con $J_{33} = a_9 [RNA2kbC]$, $J_{34} = a_{10} [RNA4kbC]$ y $J_{35} = \delta_{13} [Vpr]$.

Por último, cuando el ciclo de replicación avanza e inicia la fase final, las proteínas tardías son expresadas, dentro de las cuales está p24Gag. En este modelo se utilizó a p24Gag como una salida, porque es la proteína viral más abundante (Jacquet et al. 2005). Para modelar la variación en el tiempo de la concentración de esta proteína se tiene que:

$$\dot{J}_{p24Gag} = J_{36} - J_{37} \quad (6.42)$$

Donde $J_{36} = a_{11}[RNA9kbC]$ y $J_{37} = \delta_{14}[p24Gag]$.

Como todos los virus, el VIH-1 es capaz de modular al hospedero para sacar provecho de él. Dentro de las principales proteínas manipuladas está NF- κ B, mismo que en condiciones normales es activado por TNF en un contexto inflamatorio. Sin embargo, las proteínas virales Tat, Nef y Vpr son capaces de elevar artificialmente los niveles de NF- κ B aún sin la señalización de TNF (Varin et al. 2003; Fiume et al. 2012; Varin et al. 2005), con la finalidad de potenciar la transcripción del genoma viral. Considerando estos datos, la expresión que modela la variación en el tiempo de la concentración de NF- κ B disponible está dada por:

$$\dot{J}_{NF\kappa B} = J_{38} - J_{39} \quad (6.43)$$

Donde $J_{38} = k_1([NF\kappa B]_T - [NF\kappa B])(k_0[TNF] + k_2[Tat] + k_3[Nef] + k_4[Vpr])$ y $J_{39} = k_{-1}[NF\kappa B]$.

Además se consideró que la concentración total de NF- κ B en el interior de la célula es constante, es decir: $[NF\kappa B]_T = [NF\kappa B] + [NF\kappa B^*]$.

Otros componentes intracelulares importantes que se ven manipulados por el VIH-1 son las HMTs y las HATs. Por su parte, Tat (Agbottah et al. 2006) y Vpr (Felzien et al. 1998) reclutan a las HATs en el promotor 5'LTR y en lo concerniente a las HMTs, los asRNAs los reclutan en el promotor 5'LTR para cerrarlo (Saayman et al. 2014). Por consiguiente, las ecuaciones para estos factores de remodelación de la cromatina están dadas por:

$$\dot{J}_{HATs} = J_{40} - J_{41} \quad (6.44)$$

Donde $J_{40} = k_5([HATs]_T - [HATs])(I_{HATs} + k_6[Tat] + k_7[Vpr])$ y $J_{41} = k_{-5}[HATs]$.

Al igual que con NF- κ B, aquí también se consideró que la concentración total de las HATs en el interior de la célula es constante, es decir: $[HATs]_T = [HATs] + [HATs^*]$ (la concentración total de las HATs es igual a la suma de las HATs activas más las HATs inactivas). Finalmente:

$$\dot{J}_{HMTs} = J_{42} - J_{43} \quad (6.45)$$

Donde $J_{42} = k_8([HMTs]_T - [HMTs])(I_{HMTs} + k_9[asRNA])$ y $J_{43} = k_{-8}[HMTs]$.

Al igual que con las HATs aquí también se hizo la suposición de que la concentración total de las HMTs es constante en el interior de la célula, es decir: $[HMTs]_T = [HMTs] + [HMTs^*]$.

Las entradas de la red TNF, I_{HATs} e I_{HMTs} fueron modeladas con una función de pulso cuadrado como se muestra a continuación:

$$TNF(t) = \begin{cases} 1, & t \in T_1 \\ 0, & t \notin T_1 \end{cases} \quad (6.46)$$

$$I_{HATs}(t) = \begin{cases} 1, & t \in T_2 \\ 0, & t \notin T_2 \end{cases} \quad (6.47)$$

$$I_{HMTs}(t) = \begin{cases} 1, & t \in T_3 \\ 0, & t \notin T_3 \end{cases} \quad (6.48)$$

Donde $T_1 = [25,80] \cup [525,530] \cup [825,830]$, $T_2 = [10,50] \cup [170,200] \cup [470,500]$, $T_3 = [57,187] \cup [507,577] \cup [707,777] \cup [957,1000]$. Nota: el valor de las condiciones iniciales en todas las simulaciones fue cero para todas las variables del Sistema. En la **Tabla 6.3** se muestran los valores del conjunto de parámetros de las ecuaciones del modelo continuo.

Tabla 6.3 | Parámetros del modelo continuo

Símbolo	Valor numérico	Significado biológico	Referencia
k_5	0.1 min ⁻¹	Tasa de activación de las HATs	[Estimado para este trabajo]
k_6	2 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de las HATs por la acción de Tat	[Estimado para este trabajo]
k_7	2 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de las HATs por la acción de Vpr	[Estimado para este trabajo]
k_{-5}	0.2 min ⁻¹	Tasa de inactivación de las HATs	[Estimado para este trabajo]
k_8	0.1 min ⁻¹	Tasa de activación de las HMTs	[Estimado para este trabajo]
k_9	0.6 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de las HMTs por el asRNA	(Saayman et al. 2014)
k_{-8}	0.1 min ⁻¹	Tasa de desactivación de las HMTs	[Estimado para este trabajo]
k_0	1 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de la vía de NF-κB por TNF	[Estimado para este trabajo]
k_1	0.1 min ⁻¹	Tasa de liberación (activación) de NF-κB	[Estimado para este trabajo]
k_2	2 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de NF-κB dependiente de Tat	(Westendorp et al. 1995)
k_3	2 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de NF-κB dependiente de Nef	(Varin et al. 2003)
k_4	2 u.a.c. ⁻¹	Tasa de activación de NF-κB dependiente de Vpr	(Felzien et al. 1998)
k_{-1}	0.3 min ⁻¹	Tasa de inhibición de NF-κB	[Estimado para este trabajo]
k_b	0.102 min ⁻¹	Tasa de apertura del promotor LTR	[Estimado para este trabajo]
k_{ac}	29.4 u.a.c. ⁻¹	Tasa de acetilación del promotor LTR	[Estimado para este trabajo]

*u.a.c. = unidades arbitrarias de concentración

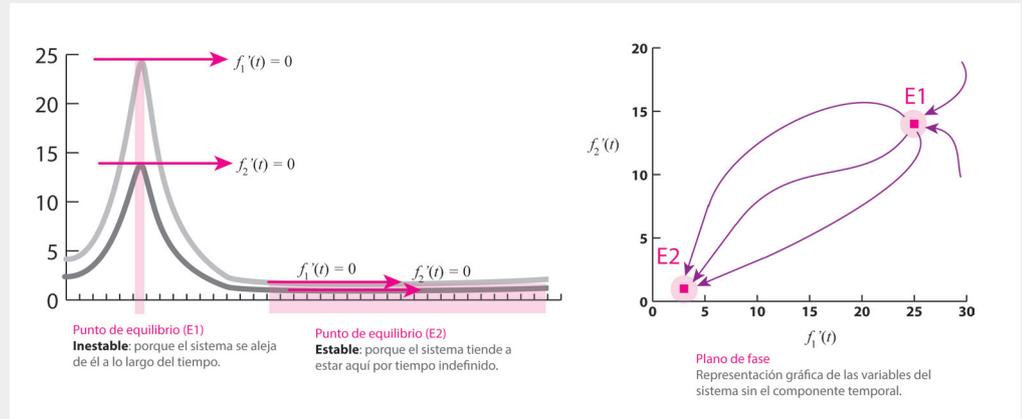
Tabla 6.3 | Parámetros del modelo continuo (Continuación)

Símbolo	Valor numérico	Significado biológico	Referencia
k_{TAR}	147 u.a.c. ⁻¹	Tasa de transactivación mediada por la interacción Tat-TAR	(Feinberg et al. 1991)
k_d	0.2 min ⁻¹	Tasa de cierre del promotor LTR	[Estimado para este trabajo]
k_{me}	100 u.a.c. ⁻¹	Tasa de metilación del promotor LTR	(du Chéné et al. 2007)
α_1	2 min ⁻¹	Tasa de síntesis de RNA viral	[Estimado para este trabajo]
s_1	0.59 min ⁻¹	Tasa de splicing de RNAs de 9 kb a RNAs de 4 kb	[Estimado para este trabajo]
s_2	0.4 min ⁻¹	Tasa de splicing de RNAs de 4 kb a RNAs de 2 kb	[Estimado para este trabajo]
τ	0.1 min ⁻¹	Tasa de transporte de RNA independiente de Rev	[Estimado para este trabajo]
k_{REE}	0.1 (u.a.c.*min) ⁻¹	Tasa de transporte de RNA dependiente de Rev	[Estimado para este trabajo]
δ_1	0.01 min ⁻¹	Degradación de RNA en el núcleo	[Estimado para este trabajo]
α_2	0.1 min ⁻¹	Tasa de síntesis del vsiRNA	[Estimado para este trabajo]
δ_2	0.3 min ⁻¹	Tasa de mediada por vsiRNA	[Estimado para este trabajo]
r_1	10 (u.a.c.*min) ⁻¹	Tasa de represión mediada por Tat	[Estimado para este trabajo]
α_3	0.05 min ⁻¹	Tasa de síntesis del vsaRNA	[Estimado para este trabajo]
δ_3	0.3 min ⁻¹	Tasa de degradación del vsaRNA	[Estimado para este trabajo]
δ_5	0.1 min ⁻¹	Tasa de degradación de los RNAs de 4 kb nucleares	[Estimado para este trabajo]
k_{exp}	0.5 min ⁻¹	Tasa de transporte del RNA al citoplasma	[Estimado para este trabajo]
δ_6	0.01 min ⁻¹	Tasa de degradación de los RNAs de 2 kb nucleares	[Estimado para este trabajo]
r_3	2 (u.a.c.*min) ⁻¹	Tasa de inhibición mediada por los vsiRNA	[Estimado para este trabajo]
δ_7	0.1 min ⁻¹	Tasa de degradación de los RNAs de 2 kb citoplásmicos	[Estimado para este trabajo]
δ_8	0.5 min ⁻¹	Tasa de degradación de los RNAs de 4 kb citoplásmicos	[Estimado para este trabajo]
δ_9	0.5 min ⁻¹	Tasa de degradación de los RNAs de 9 kb citoplásmicos	[Estimado para este trabajo]
α_4	3 min ⁻¹	Tasa de síntesis del asRNA	[Estimado para este trabajo]
r_2	2 (u.a.c.*min) ⁻¹	Tasa de inhibición mediada por el vsaRNA	[Estimado para este trabajo]
δ_4	0.5 min ⁻¹	Tasa de degradación del asRNA	[Estimado para este trabajo]
α_5	0.2 min ⁻¹	Tasa de síntesis de Tat dependiente de los RNAs de 2 kb	[Estimado para este trabajo]
α_6	0.1 min ⁻¹	Tasa de síntesis de Tat dependiente de los RNAs de 4 kb	[Estimado para este trabajo]
δ_{10}	0.1 min ⁻¹	Tasa de degradación de Tat	(Desfosses et al. 2005)
α_7	0.5 min ⁻¹	Tasa de síntesis de Rev dependiente de los RNAs de 2 kb	[Estimado para este trabajo]
δ_{11}	0.1 min ⁻¹	Tasa de degradación de Rev	(Kubota et al. 1996)
α_8	2 min ⁻¹	Tasa de síntesis de Nef dependiente de los RNAs de 2 kb	[Estimado para este trabajo]
δ_{12}	0.1 min ⁻¹	Tasa de degradación de Nef	[Estimado para este trabajo]
α_9	0.2 min ⁻¹	Tasa de síntesis de Vpr dependiente de los RNAs de 2 kb	[Estimado para este trabajo]
α_{10}	0.1 min ⁻¹	Tasa de síntesis de Vpr dependiente de los RNAs de 4 kb	[Estimado para este trabajo]
δ_{13}	0.1 min ⁻¹	Tasa de degradación de Vpr	(Kewalramani et al. 1996)
α_{11}	10 min ⁻¹	Tasa de síntesis de p24 dependiente de los RNAs de 9 kb	[Estimado para este trabajo]
δ_{14}	0.5 min ⁻¹	Tasa de degradación de p24Gag	(Coffin et al. 1997)

*u.a.c. = unidades arbitrarias de concentración

Cuadro 7 | Análisis de modelos de ecuaciones diferenciales ordinarias

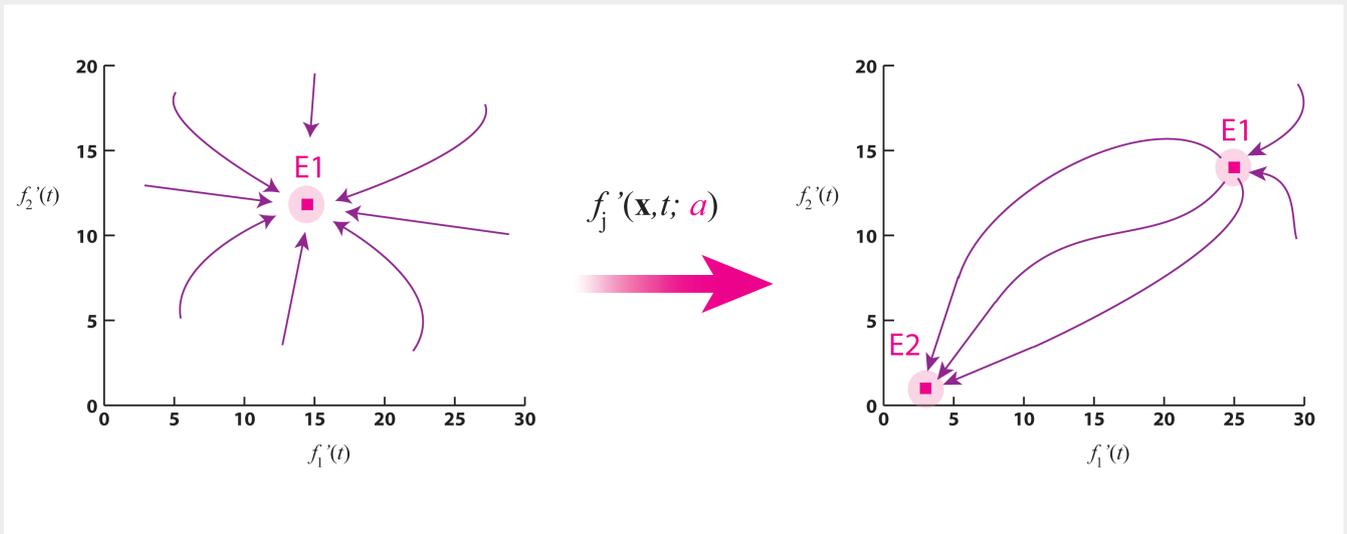
De forma gráfica es muy fácil saber si un equilibrio de un sistema es estable o inestable, sin embargo a veces es imposible resolver directamente las ecuaciones y se tiene que hacer análisis cualitativo de las mismas, a fin de conocer sus propiedades topológicas. Cuando esto sucede, es necesario calcular los *eigenvalores* del sistema, ya que estos nos dan información de cómo se comportan las trayectorias alrededor de los equilibrios del sistema. Los eigenvalores tienen una parte real (Re) y una parte imaginaria (Im), por regla general si la parte real es negativa, el equilibrio al que pertenecen los eigenvalores es estable. Caso contrario si la parte real es positiva. Al igual que en los modelos booleanos, si se perturba un sistema (variando uno o más parámetros), puede ser que el retrato de fase del sistema cambie radicalmente. Este tipo de cambios derivados de la variación de un parámetro se conocen como "bifurcaciones".



Retrato de fase de un sistema de ODEs

Re(λ_i)	Im(λ_i)	Nombre	Estabilidad
(-)	(0)	Nodo estable/atractor	Estable
(+)	(0)	Nodo inestable/repulsor	Inestable
(+/-)	(0)	Punto silla	Inestable
(-)	(+/-)	Espiral estable	Estable
(+)	(+/-)	Espiral inestable	Inestable
(0)	(+/-)	Centro, órbita	Estable

Estabilidad según los eigenvalores



Representación gráfica del efecto de la variación de los parámetros

Si un sistema mantiene su dinámica a pesar de las variaciones en sus parámetros, podemos decir que el sistema es "robusto" e insensible a perturbaciones (tal como ocurre con el estado crítico de los modelos booleanos).

6.3.2. Análisis de estabilidad

Considere un sistema de n variables independientes en el cual un estado del sistema al tiempo t está determinado por un conjunto de variables $\{x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)\}$. El sistema se escribe en términos de ecuaciones diferenciales no-lineales $\dot{x}_j(t) = f_j(x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t))$, $j=1, 2, \dots, n$, sujeto a la condición inicial $\{x_1^0(0), x_2^0(0), \dots, x_n^0(0)\}$. El conjunto de variables $\{x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)\}$ define el espacio de fase del sistema dinámico en el cual el movimiento del sistema ocurre. Conforme avanza el tiempo, el punto $\mathbf{x}(t) = (x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t))$ se mueve a lo largo del espacio de fase y define una curva o trayectoria del sistema para cada condición inicial. El objetivo es analizar la dinámica del sistema con la finalidad de conocer el conjunto de trayectorias del sistema en el espacio de fase (i.e. el *retrato de fase*), y determinar el comportamiento de tales trayectorias en la vecindad del *punto de equilibrio* (punto fijo) del sistema dinámico.

Por definición, los puntos de equilibrio son aquellos en los cuales las derivadas se convierten en cero. Si las fluctuaciones $\delta x_1(t), \delta x_2(t), \dots, \delta x_n(t)$ perturban el punto fijo \mathbf{x}^0 el sistema se desplaza a un nuevo estado $\delta \mathbf{x}(t) = (x_1^0(t) + \delta x_1(t), x_2^0(t) + \delta x_2(t), \dots, x_n^0(t) + \delta x_n(t))$, y la trayectoria que emerge de este punto del espacio de fase puede acercarse al equilibrio original o bien puede divergir de él. Si la trayectoria tiende a acercarse asintóticamente al punto fijo, entonces x es estable, por consiguiente es un atractor. Si las trayectorias divergen, entonces x es inestable y por tanto un repulsor (Cuadro 7). El comportamiento dinámico de las fluctuaciones determina la estabilidad del sistema, y es fundamental establecer una forma de analizar la evolución de las fluctuaciones a lo largo del tiempo. A fin de lograr este objetivo, es necesario suponer que el comportamiento de las fluctuaciones en la vecindad de los puntos fijos es lineal, es decir: los términos no-lineales pueden ser despreciados, para obtener la matriz Jacobiana del sistema linealizado como sigue:

$$J(\mathbf{x}^0) = \begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \dots & \frac{\partial f_1}{\partial x_n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial x_1} & \dots & \frac{\partial f_n}{\partial x_n} \end{pmatrix} \quad (6.49)$$

La evolución de las trayectorias en el espacio de fase es dada por cada una de las n raíces de la ecuación característica de la matriz Jacobiana: $\det(J(\mathbf{x}^0) - \lambda I) = 0$, donde λ es el número a ser determinado e I es la matriz identidad. La ecuación característica tiene n raíces, o también conocidas como eigenvalores, mismos que pueden ser reales, imaginarios o complejos. Para el caso general de un sistema dinámico n -dimensional hay n eigenvalores, y si la componente real de los eigenvalores es negativa, i.e. $\text{Re}(\lambda) < 0$, el punto fijo es un nodo estable. Si por el contrario $\text{Re}(\lambda) > 0$, entonces el punto fijo es inestable. Si existe una combinación de partes reales positivas y negativas en los eigenvalores, entonces el punto de equilibrio es un punto silla por definición. El cálculo numérico de este procedimiento se realizó en MATLAB versión 2014b con la siguiente secuencia de pasos: 1) resolver las ecuaciones diferenciales para hallar sus puntos de equilibrio, 2) evaluar la matriz Jacobiana del sistema con cada punto de equilibrio encontrado, 3) realizar el cálculo de los eigenvalores a partir de solucionar el polinomio característico en un punto de equilibrio específico.

6.3.3. Análisis de bifurcación

Este análisis se realizó variando cada uno de los parámetros del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias. Se hizo hincapié en la constante de disociación de NF- κ B, las constantes de asociación y disociación de las proteínas virales, al igual que la constante de degradación de los RNAs y de las proteínas virales. Entonces, cada parámetro se varió tres órdenes de magnitud hacia arriba y hacia abajo. Se usó MATLAB versión 2014b para calcular el cambio en la estabilidad de los puntos de equilibrio del sistema junto con su respectiva estabilidad.

6.3.4. Análisis de sensibilidad global

La sensibilidad del modelo de ecuaciones diferenciales ante perturbaciones aleatorias se evaluó creando una distribución normal a partir de los valores de referencia de cada parámetro mostrado en la [Tabla 6.3](#) los cuales fueron tomados como la media, y a cada distribución se le asignó el 10% como desviación estándar. Posteriormente se hizo un muestreo aleatorio de cada distribución para obtener conjuntos de parámetros, con los cuales se usaron para resolver las ecuaciones del modelo durante 1,500 unidades de tiempo. Después de 10,000 iteraciones de este proceso, se utilizó la concentración de p24Gag para observar la respuesta del sistema ante las variaciones de sus parámetros. En todas las simulaciones se usó $TNF(\dot{t}) = 0$, $I_{HATs}(\dot{t}) = 0$ y $I_{HMTs}(\dot{t}) = 0$.

6.3.5. Simulación de mutantes y tratamientos

El comportamiento de los provirus mutantes durante la condensación de los nucleosomas virales y la activación de las células T fue modelado de la siguiente manera: en el provirus mutante se redujo 10 veces el valor de la tasa splicing s_1 del RNA viral de 4 kb en el núcleo. La condensación nucleosomal se modeló usando pulsos cuadrados de I_{HMTs} , la activación de las células T también se modeló incrementando el valor de la tasa de activación de NF- κ B k_1 . Los efectos temporales de los tratamientos con inhibidores de las histona-deacetilasas (HDACis), los agonistas de PKC, los liberadores de P-TEFb, los inhibidores de las histona-metiltransferasas (HMTis), los micro-RNAs antagonistas (Antagomirs) fueron simulados de la siguiente manera: el aumento en la acetilación debido a la actividad de los HDACis se simuló incrementando 2 veces el valor de la tasa de actividad de las HATs k_5 . El incremento en los niveles de NF- κ B en su forma activa por causa de los agonistas de PKC ([Mehla et al. 2010](#)) se simuló incrementando la tasa de activación de NF- κ B, k_1 . Se sabe que los liberadores de P-TEFb como el compuesto JQ1, potencian la función de Tat para secuestrar a P-TEFb y activan al provirus ([Li et al. 2013](#)), considerando estos datos los fármacos liberadores de P-TEFb fueron modelados incrementando el parámetro asociado a la actividad de Tat a_5 . El efecto de los HMTis y de los Antagomirs fue modelado reduciendo 2 veces el valor de referencia de los parámetros de activación de las HMTs k_8 y de la síntesis de los RNAs virales no codificantes (vncRNAs), es decir: vsiRNA (a_2) y asRNA (a_4). Los provirus mutantes tratados con HDACis fueron simulados de la siguiente manera: la sobre estimulación farmacológica dada por los HDACis se realizó incrementando 2 veces el valor del parámetro de activación de las HATs k_5 , la delección de los genes de tat, nef y vpr se modeló fijando en cero el valor de los parámetros de síntesis de Tat (a_5 y a_6), Nef (a_8) y Vpr (a_9 y a_{10}). La inhibición de los vncRNAs se modeló reduciendo 2, 20 y 200 veces el valor de la síntesis de vsiRNA (a_2) y asRNA (a_4).

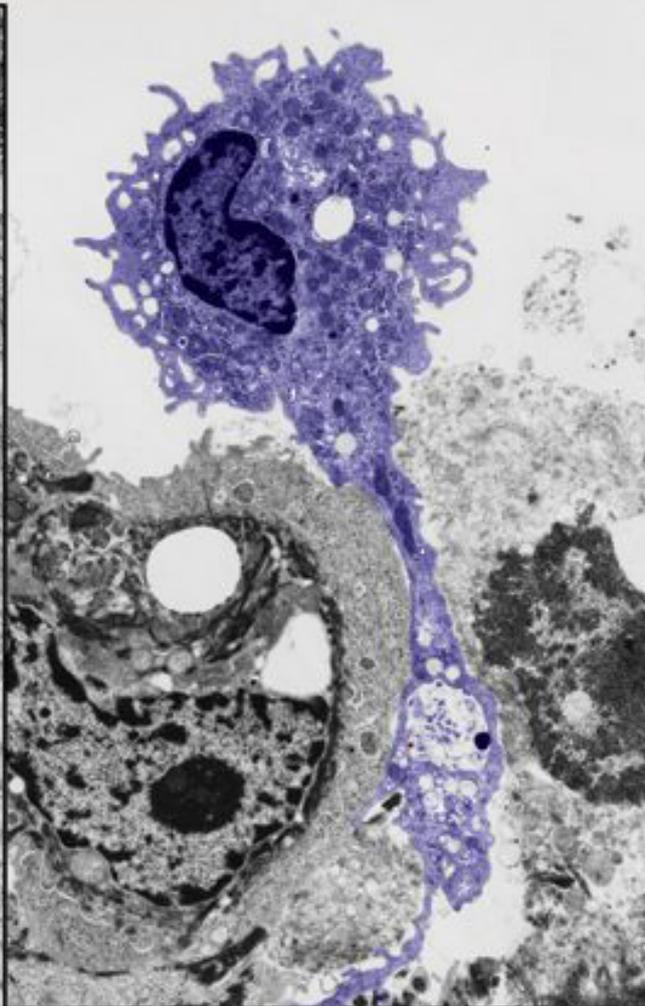
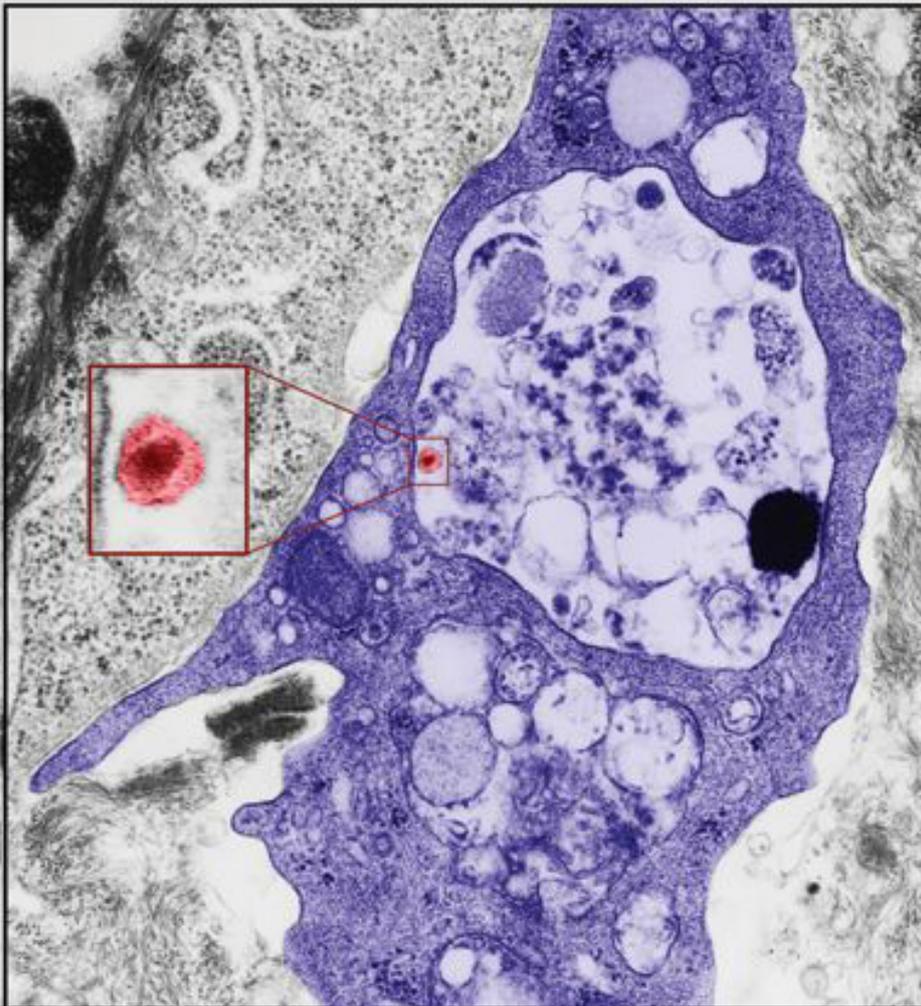
Para medir el impacto de las mutaciones y de los tratamientos farmacológicos sobre la expresión de p24Gag se empleó un razonamiento parecido al presentado en la [ecuación 6.21](#). Sin embargo en esta ocasión se estudió la diferencia entre los niveles de expresión de p24Gag para cada perturbación E_j versus los niveles de p24Gag que expresa el provirus sin ser perturbado E_0 . En otras palabras:

$$\Delta E = E_j - E_0 \quad (6.50)$$

6.4. Validación de los modelos

La compatibilidad de los modelos discreto y continuo para reproducir el comportamiento del provirus fue cualitativamente evaluada mediante la comparación de los estados dinámicos de cada modelo con la dinámica de la expresión génica del provirus reportada *in vitro*. Para realizar esto, primero se calcularon los atractores del modelo discreto y los puntos de equilibrio del modelo continuo de la red de expresión génica del provirus para cuando ésta no tenía perturbaciones (i.e. tipo silvestre) y para cuando esta presentaba deleciones en los genes de *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, en los sitios de splicing y en el promotor 5'LTR, es decir: $p5'LTR(t) = 0$, $Tat(t) = 0$, $Vpr(t) = 0$, $Rev(t) = 0$, $Nef(t) = 0$ y $RNA4kbN(t) = 0$. Después, los atractores y puntos de equilibrio se clasificaron de acuerdo con el nivel de expresión de p24Gag. Aquellos atractores y puntos de equilibrio que expresaban a p24Gag eran correspondientes al estado de activación viral, y en los que no había expresión de p24Gag eran correspondientes al estado de latencia. Posteriormente fueron comparados con los resultados reportados en observaciones *in vitro* de provirus tipo silvestre, provirus con promotores p'5LTR deficientes ([Ho et al. 2013](#)), deleciones en *tat* ([Verhoef & Berkhout 1999](#)), *vpr* ([Rücker et al. 2004](#)), *rev* y *nef* ([Churchill et al. 2007](#)), al igual que deleciones en los sitios de splicing ([Purcell & Martin 1993](#)).

Una vez que la compatibilidad entre ambos modelos fue probada, el modelo discreto fue cualitativamente validado mediante la comparación del tamaño relativo del estado de activación (W_{on}) de las perturbaciones de los nodos $HATs(t) = 1$, $Tat(t) = 1$, $vsRNA(t) = 1$ y las combinaciones ($NF\kappa B(t) = 1, HATs(t) = 1$), ($NF\kappa B(t) = 1, HMTs(t) = 0$), contra sus respectivos equivalentes *in vitro*, las cuales son: tratamientos con HDACis ([Cillo et al. 2014](#)), liberadores de P-TEFb ([Li et al. 2013](#)), el uso de Antagomirs ([Zhang et al. 2014](#)), combinaciones de Briostatina con liberadores de P-TEFb ([Laird et al. 2015](#)) y combinaciones de Briostatina con HMTis ([Bouchat et al. 2012](#)). El modelo continuo fue validado mediante la comparación de los niveles de los RNAs genómicos del provirus obtenidos *in silico* contra los datos *ex vivo* obtenidos por ([Laird et al. 2015](#)). Para realizar esto, se normalizaron los niveles de p24Gag obtenidos con las ecuaciones diferenciales del modelo para hacer un análisis de regresión lineal junto con una prueba de correlación de Pearson con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$).



Resultados

7.1. Validación de los modelos

El primer resultado interesante que se encontró, fue la compatibilidad del modelo booleano con el modelo continuo para reproducir el comportamiento general de la dinámica del provirus (Figura 7.1A), ya que cuando ambos modelos predicen que el virus entra en latencia o en activación, así ocurre según lo reportado *in vitro*. Por su parte, el modelo discreto mostró que sus tres esquemas de actualización eran capaces de capturar cualitativamente el comportamiento del provirus *in vitro* (Figura 7.1B). Por otro lado, el modelo continuo mostró que existe una correlación positiva y significativa ($R^2 = 0.9426$ con $p < 0.05$) entre los datos obtenidos a partir de las simulaciones y los datos *ex vivo* (Laird et al. 2015) (Figura 7.1C). Lo cual indica que el modelo continuo es capaz de predecir las variaciones en la concentración de los componentes de la red de expresión génica del provirus.

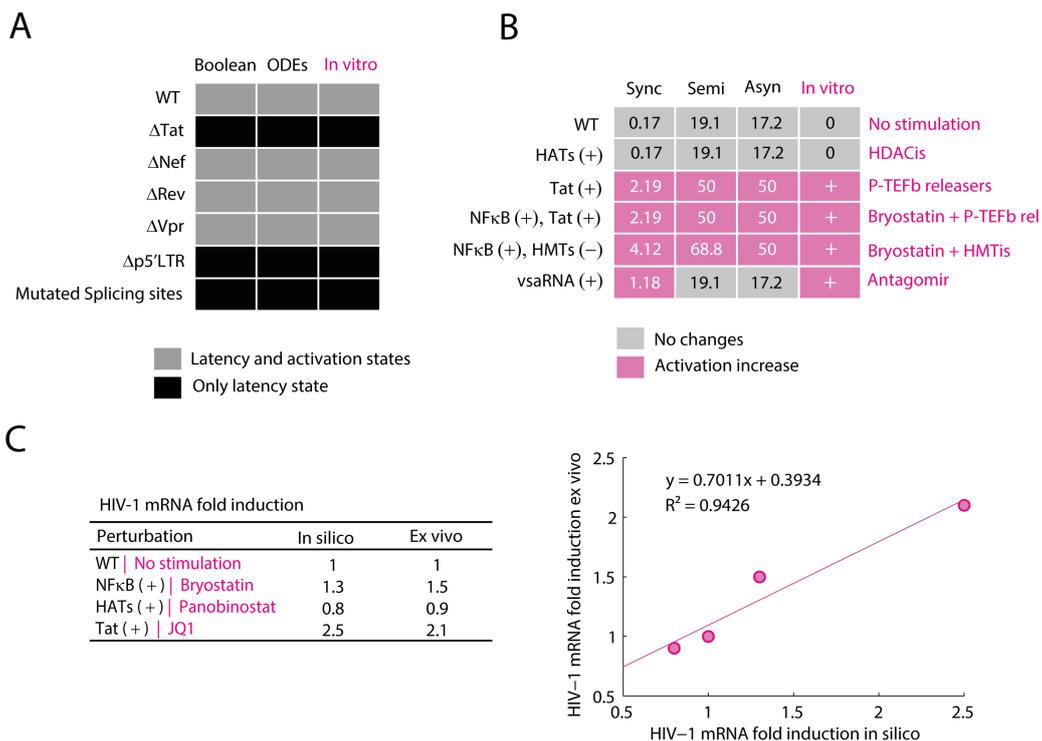


Figura 7.1 | Validación de los modelos matemáticos de la red del VIH-1

A) Comparación cualitativa entre los atractores del modelo discreto, los puntos de equilibrio del modelo continuo y el comportamiento del provirus observado *in vitro*. Ambos modelos matemáticos presentan activación y latencia para los provirus WT, y para las deleciones de *vpr* (Rücker et al. 2004), *rev* y *nef* (Churchill et al. 2007). Por el contrario muestran silenciamiento total de la expresión génica del provirus para las deleciones del p5'LTR (Ho et al. 2013), *tat* (Verhoef & Berkhout 1999) y los sitios de splicing (Purcell & Martin 1993). **B)** Comparación de la probabilidad de reactivación obtenida (*Won*) con los tres esquemas de actualización del modelo discreto: síncrono, semi-síncrono y asíncrono contra el comportamiento reportado del provirus *in vitro*. En la columna de observaciones *in vitro*, el símbolo "+" representa "aumento en la expresión del provirus" y "0" representa: "sin cambios". Los datos de los HDACis fueron obtenidos de (Cillo et al. 2014), liberadores de P-TEFb de (Li et al. 2013), el uso de Antagomirs de (Y. Zhang et al. 2014), la combinación de briostatina con liberadores de P-TEFb de (Laird et al. 2015) y la combinación de briostatina con HMTis de (Bouchat et al. 2012). **C)** Comparación de los niveles de RNA sin editar (9 kb) obtenidos con el modelo continuo contra datos obtenidos de pacientes con VIH-1 tratados con briostatina (Bullen et al. 2014), panobinostat (Laird et al. 2015) y JQ1 (Laird et al. 2015). La correlación de Pearson entre ambos conjuntos de datos fue lineal y positiva, $p = 0.0291$, $r(3) = 0.9708$, lo cual muestra la validez del modelo. El error estándar asociado fue de 0.1613.

Tabla 7.1 | Atractores del modelo discreto

Nodo	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	a_{10}	a_{11}	a_{12}
TNF	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
IHATs	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
IHMTs	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
NF- κ B	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
HATs	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
HMTs	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
p5'LTR	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
p3'LTR	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
RNA9kbN	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
vsRNA	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
vsRNA	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
RNA4kbN	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
RNA2kbN	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
RNA2kbC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
RNA4kbC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
RNA9kbC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
asRNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tat	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Rev	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Nef	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Vpr	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
p24Gag	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	Atractores de latencia								Atractores de activación			

7.2. La activación de las células T no basta para inducir la expresión del provirus

Razooky y colegas encontraron evidencia que sugiere que la latencia del provirus está regulada principalmente por la transactivación del promotor 5'LTR mediada por Tat en vez de la activación inmunológica de las células T como se pensaba anteriormente, lo cual implica que la latencia viral es un proceso regulado de forma autónoma por virus (Razooky et al. 2015). A la luz de este hallazgo se decidió investigar cómo se modificaría la dinámica de la expresión génica del provirus si se consideran los reguladores epigenéticos. Para responder esta interrogante se analizaron los atractores del modelo booleano así como sus cuencas de atracción en presencia de reguladores de la remodelación de la cromatina como las HATs y las HMTs. De igual forma se analizaron los atractores en presencia de TNF con la finalidad de observar si el efecto de la inmuno-estimulación sería capaz de modificar la dinámica de la red booleana. Usando los tres esquemas de actualización (síncrono, semi-síncrono y asíncrono) se encontraron 12 atractores puntuales idénticos. Mis- mos que se clasificaron en dos grupos: 1) atractores que producen proteínas tardías como p24Gag (*atractores de activación*); y 2) atractores que carecen de expresión de proteínas (*atractores de latencia*) (Tabla 7.1).

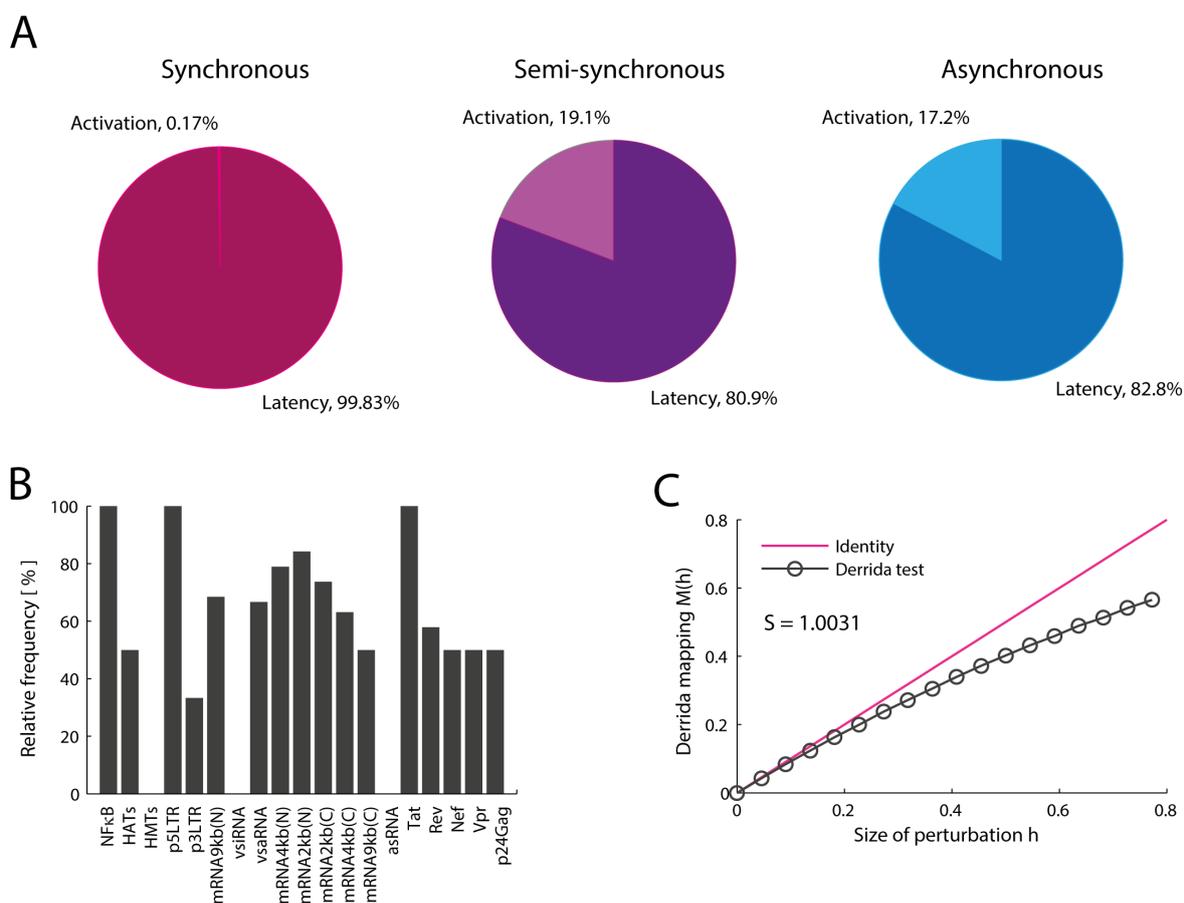


Figura 7.2 | La expresión del provirus es inhibida por los vncRNAs y reactivada por Tat

A) Peso relativo porcentual del estado de activación (W_{on}) obtenido con los tres esquemas de actualización del modelo discreto (síncrono, semi-síncrono y asíncrono). En todos los casos se observa que después de la integración del provirus en el genoma del hospedero, la latencia es el estado más favorecido por la dinámica. **B)** Intersección de todas las trayectorias de activación del provirus en los tres esquemas de actualización. Este resultado indica que para que el provirus se reactive, obligatoriamente tiene que estar activo el promotor 5'LTR, deben haber niveles suficientes de NF- κ B y Tat. De igual forma no deben estar presentes los vncRNAs (i.e. asRNA y vsiRNA) ni las HMTs. **C)** Cálculo del mapeo de Derrida, el cual indica que la red del provirus opera en el punto crítico. Estos datos obtenidos con el modelo discreto sugieren que Tat y los vncRNAs son los principales reguladores de la latencia codificados por el provirus.

Se encontró que los atractores de activación podían ser alcanzados con o sin estimulación de las HATs y de TNF (Tabla 7.1), lo cual es congruente con reportes previos en los que se observa que el provirus es capaz de expresar sus proteínas en células T CD₄⁺ quiescentes (Razooky et al. 2015). No obstante, esta dinámica se bloquea en caso de encontrarse activas las HMTs (Tabla 7.1). Por otra parte, el tamaño de las cuencas de atracción de los atractores de latencia y activación permitió determinar cualitativamente qué tan probables son los estados de activación (W_{on}) y de latencia (W_{off}). Se encontró que W_{on} es siempre más pequeño que W_{off} (Figura 7.1A) incluso cuando las señales de activación transcripcional como NF- κ B o las HATs están activadas. Estos resultados sugieren que aún en un contexto de activación de las células T CD₄⁺, el provirus puede permanecer latente debido al carácter autónomo de su dinámica, misma que está limitada únicamente por el silenciamiento epigenético mediado por las HMTs.

7.3. Los vncRNAs son esenciales para regular la latencia

Reportes recientes indican que Tat es el único regulador codificado en el genoma del VIH-1, siendo fundamental para brindarle a la latencia un carácter autónomo de la regulación celular (Razooky et al. 2015; Weinberger et al. 2005). Sin embargo, también se han encontrado otras moléculas codificadas por el virus que son capaces de regular la expresión de su genoma, por ejemplo existe un RNA pequeño que es capaz de activar la transcripción viral (Zhang et al. 2014). Además, también existen otros reguladores codificados por VIH-1 como los vncRNAs que directamente reprimen la expresión génica del provirus (Saayman et al. 2014; Groen & Morris 2013; Suzuki et al. 2015). Por consiguiente es importante determinar si realmente los otros reguladores virales como los vncRNAs son importantes para la regulación de la dinámica del virus o no. Para responder esta interrogante, se buscaron los estados comunes que existen en las cuencas de atracción del estado de activación obtenidas con los tres esquemas de actualización (Figura 7.2B). El objetivo de este cálculo fue determinar cuáles son los requerimientos obligatorios que se deben cumplir para que el provirus se active. En concordancia con varios reportes experimentales previos, se encontró que el provirus requiere de altos niveles de NF- κ B (Westendorp et al. 1995), altos niveles de Tat (Razooky et al. 2015; Weinberger et al. 2005), la ausencia de daño en el promotor 5'LTR (Ho et al. 2013) así como la ausencia de las HMTs (Jordan et al. 2003; du Chéné et al. 2007). Interesantemente se encontró que además de lo anterior, el provirus requiere de la ausencia de los vncRNAs (denotados por vsiRNA y asRNA) para poder activarse (Figura 7.2B). Lo cual indica que tanto Tat como los vncRNAs son reguladores indispensables de la latencia y ambos están codificados en el genoma viral.

7.4. La dinámica del provirus es resistente a fármacos y perturbaciones intracelulares

Las redes genéticas de organismos son capaces de mantener y adaptar su funcionamiento en respuesta a los cambios del entorno. Estudios previos han demostrado que la coexistencia de robustez y adaptabilidad observada en las redes genéticas es característica de los sistemas que operan en el punto crítico, es decir, en el borde del caos y el orden (Balleza et al. 2008). Esta característica dinámica ha sido reportada para redes genéticas de *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *S. cerevisiae*, *E. coli*, *B. subtilis* (Balleza et al. 2008) y para macrófagos de ratones (Nykter et al. 2008). Se ha sugerido que operar en el punto crítico es esencial para asegurar la evolución de cualquier organismo (Balleza et al. 2008). Para determinar si la red genética del provirus también poseía esta característica, se evaluó la estabilidad de la red usando el mapeo de Derrida. Como resultado de esto se encontró que la sensibilidad promedio de la red era $S = 1.0031$, valor inesperado y muy cercano al punto crítico. Esto significa que la red de expresión génica del provirus opera en un régimen crítico (Figura 7.2C). Por lo tanto, esta red presenta un equilibrio entre robustez y adaptabilidad en el interior de las células T CD4+ quiescentes. Este resultado sugiere que la regulación de la expresión del genoma del VIH es robusta frente a perturbaciones intracelulares y puede adaptarse en respuesta a perturbaciones crónicas, como las producidas por la terapia antirretroviral o por los LRAs. Cabe señalar que la red VIH-1 se ha construido teniendo en cuenta las interacciones activadoras e inhibitoras reportadas en la literatura sin considerar la criticidad como un criterio relevante.

Tabla 7.2 | Puntos de equilibrio del modelo continuo

Nodo	Latencia (unidades arbitrarias)	Activación (unidades arbitrarias)
NF- κ B	0	0.6243
HATs	0	0.2747
HMTs	0	0.1963
p5'LTR	0	0.3379
p3'LTR	0	0.0831
RNA _{9kbN}	0	1.0559
vsiRNA	0	0.1056
vsaRNA	0	0.0211
RNA _{4kbN}	0	0.0807
RNA _{2kbN}	0	0.0279
RNA _{2kbC}	0	0.2792
RNA _{4kbC}	0	0.0154
RNA _{9kbC}	0	0.0563
asRNA	0	0.4070
Tat	0	0.1893
Rev	0	0.4035
Nef	0	1.6142
Vpr	0	0.1893
p24Gag	0	5.5836

7.5. La arquitectura de la red genética del VIH-1 favorece la persistencia

Se ha visto que el asa de realimentación positiva mediada por Tat es un circuito genético capaz de amplificar las fluctuaciones transcripcionales del provirus de manera transitoria, es decir, de un periodo de alta actividad tiende a decaer a una latencia estable (Weinberger et al. 2005). También se ha propuesto que los retrasos en la actividad de Tat promueven el establecimiento de la latencia (Weinberger et al. 2005), lo cual favorece el mantenimiento de los reservorios virales durante la terapia antirretroviral (Rouzine et al. 2015). Sin embargo, este no es el único circuito existente en la red de regulación del provirus, de hecho existen más asas de realimentación positiva mediadas por Nef y Vpr (Varin et al. 2003; Liu et al. 2014) sin mencionar la presencia de una gran variedad de vncRNAs. Por tal razón, se decidió investigar cómo se modifica la dinámica de Tat en presencia de las otras asas de realimentación positivas y negativas, propias de la red genética del provirus. Para lograr este objetivo se usó el modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias, ya que en él es posible observar los comportamientos temporales que no son detectables en el modelo discreto. Como resultado del análisis del modelo continuo se encontró que éste posee dos puntos de equilibrio, uno en el que había expresión de p24Gag y otro en el que no, y por consiguiente ambos equilibrios corresponden al estado de activación y otro al de latencia (Tabla 7.2). El análisis de estabilidad del sistema mostró si la concentración de NF- κ B se mantenía en niveles altos, el estado de activación era estable y el de latencia inestable (Figura 7.3A). El análisis de sensibilidad global del modelo continuo mostró que el sistema es robusto contra perturbaciones (Figura 7.4), al igual que se observó con el modelo discreto. Lo cual sugiere que si el sistema logra activarse, éste mantendrá su comportamiento independientemente de lo que suceda en su entorno intracelular.

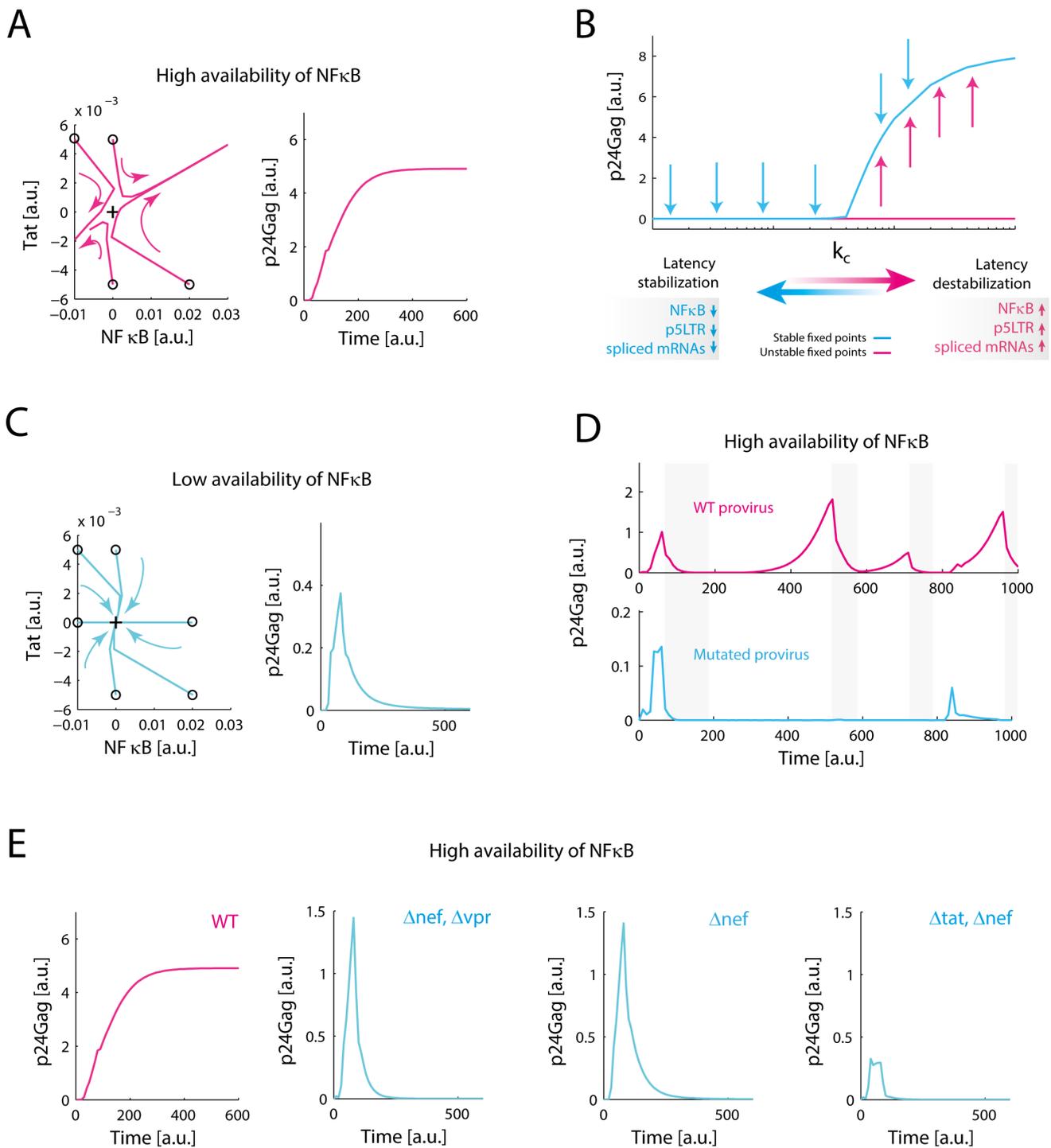


Figura 7.3 | Las asas de realimentación positiva de Tat, Nef y Vpr promueven la reincidencia

A) Retrato de fase del sistema entorno al equilibrio de la latencia (cruz negra) con niveles altos de NF-κB. Aquí, todas las trayectorias son repelidas hacia un estado estable de activación. Esta simulación fue hecha con nuestro conjunto de parámetros de referencia. **B)** Al variar los parámetros de la activación de NF-κB (k_c), la actividad del promotor 5'LTR y el splicing del mRNA viral, se encontró una bifurcación transcítica que era capaz de estabilizar la latencia (Tabla 7.3). **C)** Cuando se reduce 10 veces el valor de la constante de activación de NF-κB (k_c) se observa que la latencia se estabiliza y el equilibrio de activación desaparece, lo cual favorece la producción de p24 de forma transitoria, alcanzando un máximo para después decaer a cero. **D)** En ausencia de esta bifurcación los provirus deficientes reducen su habilidad para reincidir después de un período de represión. Esta simulación se hizo reduciendo 10 veces el valor de la constante de splicing de RNAs de 9 kb a RNAs de 4 kb (s_1). La franja gris indica los periodos de compactación de los nucleosomas por acción de las HMTs. **E)** Al deletar los genes de *tat*, *nef* y *vpr* se observa que el provirus expresa sus proteínas de manera transitoria como en el panel C, y la bifurcación transcítica sólo aparece si se encuentran estas tres asas de realimentación positivas. Δnef , Δvpr y Δtat fueron simulados reduciendo a cero el valor de la síntesis de estas proteínas. Estos datos sugieren que la activación redundante de NF-κB por parte de Tat, Nef y Vpr asegura la reactivación viral después de un período de represión intracelular fuerte.

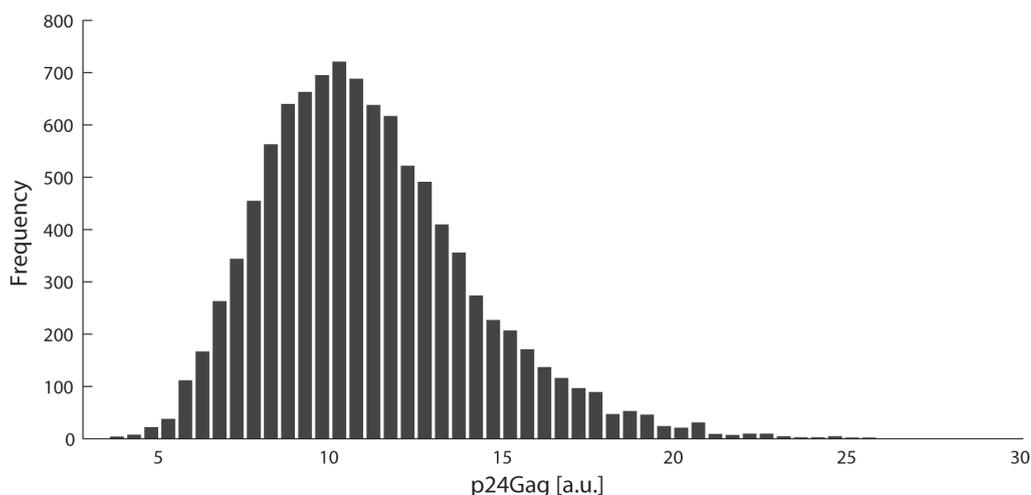


Figura 7.4 | Terapia de reversión de la latencia

Resultado del análisis de sensibilidad global del modelo continuo. El histograma fue hecho con el valor de p24Gag después de 10,000 simulaciones usando diferentes muestras de parámetros en un intervalo de tiempo equivalente a 1,500 unidades arbitrarias de tiempo. En respuesta a las variaciones paramétricas, se encontró que los valores de salida del sistema permanecían bien acotados. Además, es infrecuente que la variación de parámetros desencadene la aparición de valores máximos fuera de rango, lo cual muestra que el modelo no es sensible a las fluctuaciones de los parámetros.

A continuación se buscó determinar bajo qué condiciones el sistema mantenía este comportamiento, y para ello se realizó un análisis de bifurcación. Como resultado de este procedimiento se encontró que ocurrían cambios en el espacio de fase del sistema, estabilizando la latencia y desapareciendo la activación viral (Figura 7.3B). El análisis también mostró que esto se debía a la presencia de una bifurcación transcítica (Tabla 7.3), en la cual la latencia se estabilizaba si se disminuyen los valores del parámetro de activación de NF- κ B (k_1), de la tasa de splicing (s_1) y de la activación del promotor 5'LTR (k_b) (Figura 7.3C), por otro lado si el valor de estos parámetros aumentaba, entonces la latencia se desestabilizaba y aparecía un estado de activación estable. Estas observaciones son congruentes con lo que se tiene reportado acerca de los factores estabilizadores de la latencia, tales como los bajos niveles de NF- κ B (Westendorp et al. 1995), deficiencias en los sitios de splicing (Purcell & Martin 1993), y daños en la región del promotor 5'LTR (Dar et al. 2014). Para entender mejor el funcionamiento biológico de la bifurcación transcítica en el contexto de la infección se comparó el desempeño de un provirus tipo silvestre con un provirus mutado en presencia y ausencia de silenciamiento epigenético mediado por las HMTs. El provirus mutado se simuló disminuyendo 10 veces el valor de referencia de la tasa de splicing s_1 . Como resultado de esta simulación se encontró que la bifurcación transcítica ayuda a los provirus tipo silvestre a restituir su expresión génica después de una inhibición intracelular fuerte y prolongada, cosa que no sucede en la ausencia de la bifurcación (Figura 7.3D). Esto sugiere que la persistencia viral está "codificada" en su propio genoma.

Estos resultados sugieren que la bifurcación transcítica provee al VIH-1 de dos comportamientos dinámicos: 1) en ambientes transcripcionalmente represivos, como durante la terapia antirretroviral, la latencia del provirus se estabiliza permitiendo que los reservorios se mantengan y sobrevivan. 2) en casos transcripcionalmente favorables, se favorece la aparición de una activación fuerte, lo cual asegura la producción de progenie viral así como la expansión de la infección en el organismo. Estas propiedades dinámicas del virus pueden explicar por qué reaparece la carga viral tras periodos prolongados recibiendo medicación antirretroviral y por qué el hospedero no puede controlar la infección por sí mismo.

Tabla 7.3 | Identificación de parámetros críticos del modelo continuo

Nodo	Parámetro	Reducir 3 órdenes	Aumentar 3 órdenes	Origen biológico
NF-κB	k ₀ k ₁ k ₂ k ₃ k ₄ k-1	Punto silla Nodo estable* Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	- Reducción de NF-κB - - - -
HATs	k ₅ k ₆ k ₇ k-5	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	- - - -
HMTs	k ₈ k ₉ k-8	Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla	- - -
p5'LTR	kb kac kTAR kd kme	Nodo estable Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Inhibición del promotor 5'LTR - - - -
p3'LTR	kb kac kd kme	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	- - - -
RNA ₉ kbN	a ₁ s ₁ τ kREE δ ₁	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	- - - - -
vsRNA	a ₂ δ ₂ r ₁	Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla	- - -
vsRNA	a ₃ δ ₃	Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla	- -
RNA ₄ kbN	s ₁ s ₂ τ kREE δ ₅	Nodo estable Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Nodo estable Nodo estable Nodo estable Nodo estable	Inhibición del splicing viral Inhibición del splicing viral Inhibición del transporte de RNA Inhibición del transporte de RNA Inhibición del splicing viral
RNA ₂ kbN	s ₂ kexp δ ₆	Nodo estable Punto silla Punto silla	Punto silla Nodo estable Nodo estable	Inhibición del splicing viral Inhibición del transporte de RNA Inhibición del splicing viral
RNA ₂ kbC	kexp r ₃ δ ₇	Nodo estable Punto silla Punto silla	Punto silla Nodo estable Punto silla	Inhibición del transporte de RNA Inhibición del transporte de RNA -
RNA ₄ kbN	T kREE δ ₈ r ₃	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	Punto silla Punto silla Punto silla Punto silla	- - - -

*En color rosa se resaltan los parámetros críticos del modelo continuo

Tabla 7.3 | Identificación de parámetros críticos del modelo continuo (continuación)

Nodo	Parámetro	Reducir 3 órdenes	Aumentar 3 órdenes	Origen biológico
asRNA	a_4	Punto silla	Punto silla	-
	r_2	Punto silla	Punto silla	-
	δ_4	Punto silla	Punto silla	-
Tat	a_5	Punto silla	Punto silla	-
	a_6	Punto silla	Punto silla	-
	δ_{10}	Punto silla	Punto silla	-
Rev	a_7	Punto silla	Punto silla	-
	δ_{11}	Punto silla	Punto silla	-
Nef	a_8	Punto silla	Punto silla	-
	δ_{12}	Punto silla	Punto silla	-
Vpr	a_9	Punto silla	Punto silla	-
	a_{10}	Punto silla	Punto silla	-
	δ_{13}	Punto silla	Punto silla	-

7.6. La activación de la red se debe a los circuitos de Tat, Nef y Vpr

Tras la caracterización fenomenológica de la bifurcación transcítica, el siguiente objetivo fue establecer su origen molecular a fin de lograr entender su mecanismo. Para cumplir este propósito se simuló provirus mutados en los cuales se deletaban los genes de *tat*, *nef* y *vpr*, haciendo cero el valor de sus respectivos parámetros de síntesis. Como resultado de esto se encontró que el circuito de realimentación positiva de Tat siempre produce una rama estable en la latencia, lo que en términos biológicos significa que el circuito de Tat tiene un periodo fuerte de activación para luego silenciarse y mantenerse en latencia, tal como lo reportaron previamente Weinberger y colegas (Weinberger et al. 2005) (Figura 7.3E). Sin embargo, combinando los tres circuitos de Tat, Nef y Vpr aparecía la bifurcación transcítica. También se encontró que en ausencia de Tat las otras asas podían incrementar la expresión génica del provirus (Figura 5.3E), aunque este efecto es despreciable en comparación con la transactivación observada en presencia de Tat. Considerando el hecho de que todas estas asas promueven el aumento en la concentración de NF- κ B (Figura 6.2), es razonable pensar que la redundancia en la activación de NF- κ B es la causa de la bifurcación transcítica y de sus propiedades amplificadoras.

7.7. El silenciamiento de la red es más probable que su reactivación

Recientemente se ha propuesto que el uso de algunos compuestos que tienen la particularidad de incrementar los niveles basales de la transcripción del provirus, podrían potenciar el funcionamiento de los LRAs (Dar et al. 2014). Estos compuestos actúan directamente sobre el promotor 5'LTR incrementando su actividad. La duda que plantea este hallazgo es si existirán más blancos en la red de regulación que pudieran aumentar la eficacia de los LRAs. Para clarificar esta incógnita se utilizó el modelo discreto para explorar todas las posibles perturbaciones de la red que pudieran incrementar la reactivación del virus.

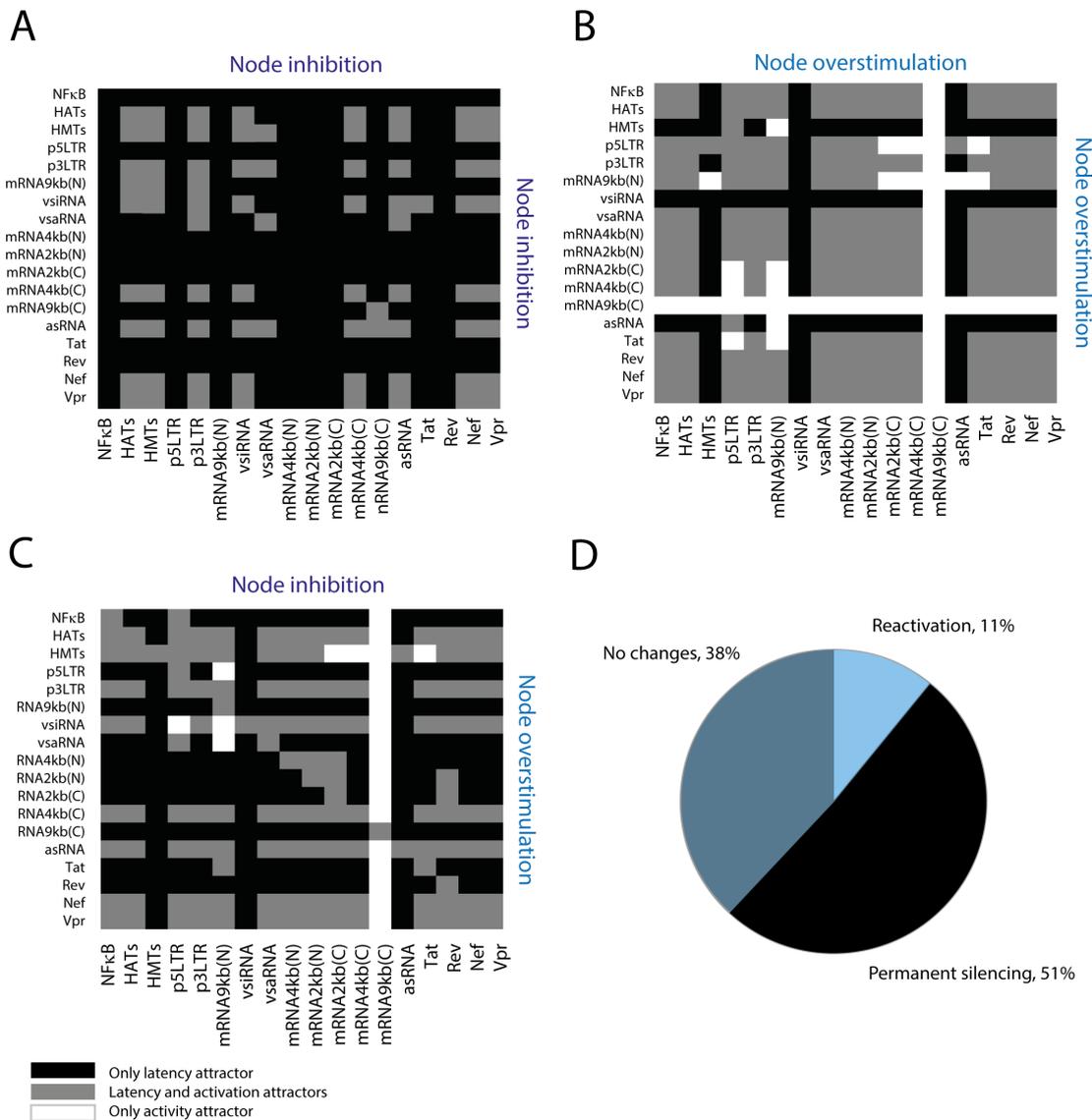


Figura 7.5 | Análisis de perturbaciones permanentes de la red del provirus

A) Resultado de inhibir dos nodos de la red al mismo tiempo. **B)** Matriz de resultados de sobre-estimular dos nodos al mismo tiempo. **C)** Resultado de inhibir un nodo y sobre estimular un nodo de la red al mismo tiempo. **D)** Del total de las perturbaciones que se hicieron al modelo discreto se encontró que el 51% de ellas inducían "silenciamiento permanente", i.e. destruían los atractores de activación. Por otra parte el 38% de las perturbaciones no afectaron a los atractores y sólo el 11% de ellas logró inducir la reactivación del provirus, i.e. destruyeron los atractores de latencia.

Esto se hizo perturbando simultáneamente dos nodos de la red, ya sea activándolos, inhibiéndolos o activando uno mientras se inhibe al otro (Figura 7.5). Como resultado de esta estrategia matricial de búsqueda se encontró que el 51% de las perturbaciones eliminan los atractores de activación, lo cual sugiere que estas perturbaciones son capaces de inducir silenciamiento permanente (Figura 7.5D). Por otro lado, también se encontró que sólo 28 de 648 perturbaciones eran capaces de reactivar al virus usando LRAs y Antagomirs disponibles actualmente (Tabla 7.4). Cabe señalar que varias de las 28 perturbaciones con potencial reactivador no han sido estudiadas aún. Interesantemente, estos resultados sugieren que es mucho más fácil inducir el silenciamiento permanente del provirus antes que reactivarlo artificialmente.

Tabla 7.4 | Perturbaciones farmacológicamente factibles

Perturbación	Equivalente farmacológico	Estado actual
HMTs (-)	HMTis	Evaluado <i>ex vivo</i> (Bouchat et al. 2012)
HMTs (-), vsiRNA (-)	HMTis + Antagomirs	No evaluado aún
HMTs (-), asRNA (-)	HMTis + Antagomirs	No evaluado aún
vsiRNA (-)	Antagomirs	No evaluado aún
vsiRNA (-), asRNA (-)	Antagomirs	No evaluado aún
asRNA (-)	Antagomirs	Evaluado <i>in vitro</i> (Saayman et al. 2014)
NF-κB (+)	Agonistas de PKC	Evaluado <i>ex vivo</i> (Mehla et al. 2010)
NF-κB (+), HATs (+)	Agonistas de PKC + HDACis	Evaluado <i>ex vivo</i> (Laird et al. 2015)
NF-κB (+), vsaRNA (+)	Agonistas de PKC + Antagomirs	No evaluado aún
NF-κB (+), Tat (+)	PKC agonists + liberadores de P-TEFb	Evaluado <i>ex vivo</i> (Laird et al. 2015)
HATs (+)	HDACis	Evaluado <i>ex vivo</i> (Bullen et al. 2014)
HATs (+), vsaRNA (+)	HDACis + Antagomirs	No evaluado aún
HATs (+), Tat (+)	HDACis+ liberadores de P-TEFb	Evaluado <i>in vitro</i> (Darcis et al. 2015)
vsaRNA (+)	vsaRNA	Evaluado <i>in vitro</i> (Y. Zhang et al. 2014)
vsaRNA (+), Tat (+)	Antagomirs + liberadores de P-TEFb	No evaluado aún
Tat (+)	Liberadores de P-TEFb	Evaluado <i>in vitro</i> (Darcis et al. 2015)
NF-κB (+), HMTs (-)	Agonistas de PKC + HMTis	Evaluado <i>ex vivo</i> (Bouchat et al. 2012)
NF-κB (+), vsiRNA (-)	Agonistas PKC + Antagomirs	No evaluado aún
NF-κB (+), asRNA (-)	Agonistas PKC + Antagomirs	No evaluado aún
HATs (+), HMTs (-)	HDACis + HMTis	Evaluado <i>ex vivo</i> (Bouchat et al. 2012)
HATs (+), vsiRNA (-)	HDACis + Antagomirs	No evaluado aún
HATs (+), asRNA (-)	HDACis + Antagomirs	No evaluado aún
vsaRNA (+), HMTs (-)	Antagomirs + HMTis	No evaluado aún
vsaRNA (+), vsiRNA (-)	Antagomirs	No evaluado aún
vsaRNA (+), asRNA (-)	Antagomirs	No evaluado aún
Tat (+), HMTs (-)	P-TEFb releasers + HMTis	No evaluado aún
Tat (+), vsiRNA (-)	P-TEFb releasers + Antagomirs	No evaluado aún
Tat (+), asRNA (-)	P-TEFb releasers + Antagomirs	No evaluado aún

Las perturbaciones más sobresalientes pueden implementarse farmacológicamente de la siguiente forma: El incremento de los niveles de NF-κB levels (denotados por NF-κB (+)) puede obtenerse usando agonistas de PKC como la briostatina-1 (Mehla et al. 2010). El incremento en la acetilación de los nucleosomas del provirus (denotado por HATs (+)) puede inducirse protegiendo la actividad de las HATs usando inhibidores de las histona deacetilasas (HDACis) tales como la romidepsina o el SAHA (vorinostat) (Bullen et al. 2014; Reuse et al. 2009). El incremento de los efectos transcripcionales de Tat (denotado por Tat (+)) puede inducirse con liberadores de P-TEFb como el compuesto JQ1 (Li et al. 2013). La supresión de la actividad de las HMTs (denotada por HMTs(-)) puede efectuarse con inhibidores de estas enzimas (i.e. HMTis) tales como la caetocina (Bouchat et al. 2012). La inhibición de los vncRNAs, como el asRNA y los vsiRNA (denotados por asRNA (-) y vsiRNA (-), respectivamente) puede realizarse con antagomirs (Yeung et al. 2009; Saayman et al. 2014).

7.8. Inhibir las HMTs y sobre-estimular a P-TEFb es la clave para reactivar al provirus

Tras el hallazgo de 28 perturbaciones que potencialmente podrían utilizarse para planear nuevas estrategias de reactivación viral (Tabla 7.4), lo siguiente que se hizo fue caracterizar sus propiedades dinámicas para determinar cuál de todas era la mejor. Para esto se comparó el tamaño de las cuencas de atracción del estado de activación (W_{on}) y la diferencia de sensibilidad (ΔS) calculadas con el modelo discreto, así como determinar la diferencia en los niveles de expresión de p24Gag (ΔE) obtenida a partir del modelo de ecuaciones diferenciales para cada una de las combinaciones terapéuticas. Como resultado de esto se encontró que todas las combinaciones incrementaban la probabilidad del estado de activación excepto la perturbación HATs(+) (Figura 7.6A), misma que equivale al uso de HDACis (Tabla 7.4). Además, todas las perturbaciones disminuyeron la sensibilidad promedio de la red (Figura 7.6B), y todas excepto HATs(+) incrementaron la expresión de p24Gag (Figura 7.6C). De todas las combinaciones analizadas, el modelo discreto mostró que la perturbación con mejores resultados para reactivar al provirus era HMTs(-), Tat(+), misma que equivale al uso de HMTis y liberadores de P-TEFb (Li et al. 2013) (Tabla 7.4). En la Tabla 7.4 se muestran todas las equivalencias farmacológicas de las perturbaciones reactivadoras de la expresión del provirus encontradas con el modelo discreto.

7.9. El rendimiento de los LRAs es obstaculizado por los vncRNAs

Reportes ex vivo recientes mostraron que los HDACis no eran efectivos para reactivar provirus latentes (Bullen et al. 2014a; Cillo et al. 2014). En concordancia con estos reportes, ambos modelos mostraron que la perturbación correspondiente a los HDACis no producía cambios en la probabilidad de activación del virus (Figura 7.6A) ni en los niveles de expresión de p24Gag (Figura 7.6C). Sin embargo se ha visto que los HDACis sí incrementan la transcripción del provirus. Para explicar por qué los HDACis sí inducen la síntesis de RNAs virales pero no favorecen su expresión se ha propuesto la existencia de mecanismos post-transcripcionales que contrarrestan la síntesis de proteínas (Mohammadi et al. 2014). Además, se ha reportado que HDACis como el SAHA (Vorinostat) puede incrementar los niveles de los RNAs no codificantes celulares (Lee et al. 2009). Tomando en consideración estos datos, se propone que los HDACis incrementen la transcripción viral incluyendo la síntesis de los vncRNAs, lo cual podría promover el silenciamiento de la expresión de proteínas virales. Se exploró la posibilidad de que esta hipótesis fuera cierta comparando el W_{on} , ΔS y el ΔE de cada perturbación en la que participan los HDACis en presencia y ausencia de los vncRNAs. Como resultado de esta comparación se encontró que la supresión de los vncRNAs mejoraba drásticamente el desempeño de las perturbaciones en las que participaban los HDACis (Figura 7.7A, B y C). Lo cual sugiere que los HDACis pueden promover la síntesis de vncRNAs, lo cual explicaría por qué estos LRAs incrementan la transcripción del provirus pero no la síntesis de proteínas (Figura 7.7D).

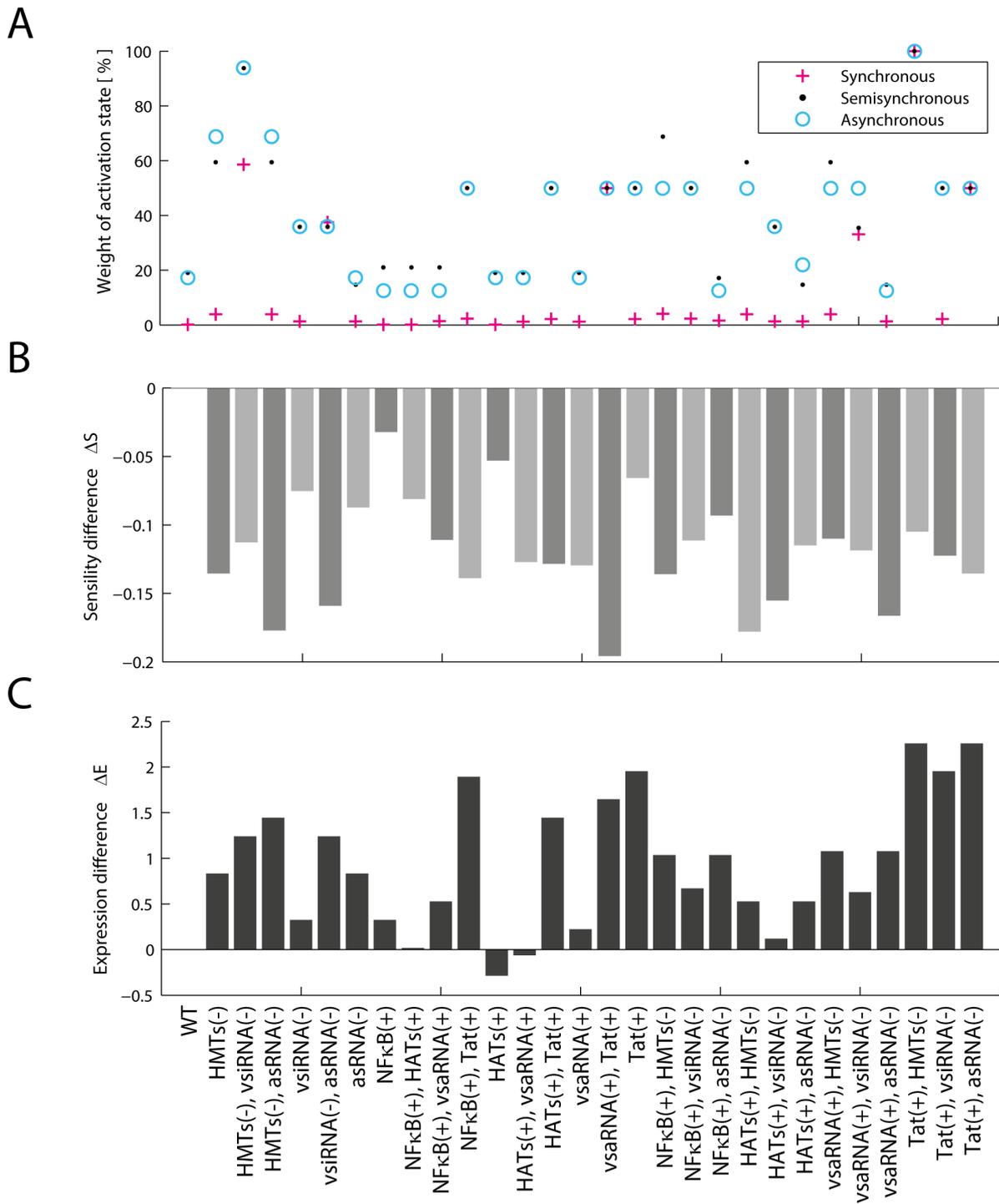


Figura 7.6 | Características dinámicas de las perturbaciones sobresalientes con LRAs

A) Peso relativo del estado de activación obtenido con los tres esquemas de actualización del modelo discreto (síncrono, semi-síncrono y asíncrono). **B)** Sensibilidad de la red calculada con el test de Derrida en el modelo discreto. **C)** Valor de equilibrio de p24Gag calculado con el modelo continuo. En todos los casos se observa que las perturbaciones modifican las propiedades dinámicas del provirus WT. Nótese que HATs(+) reduce el nivel de expresión de p24Gag y {Tat(+),HMTs(-)} dispara el valor del estado de activación al máximo.

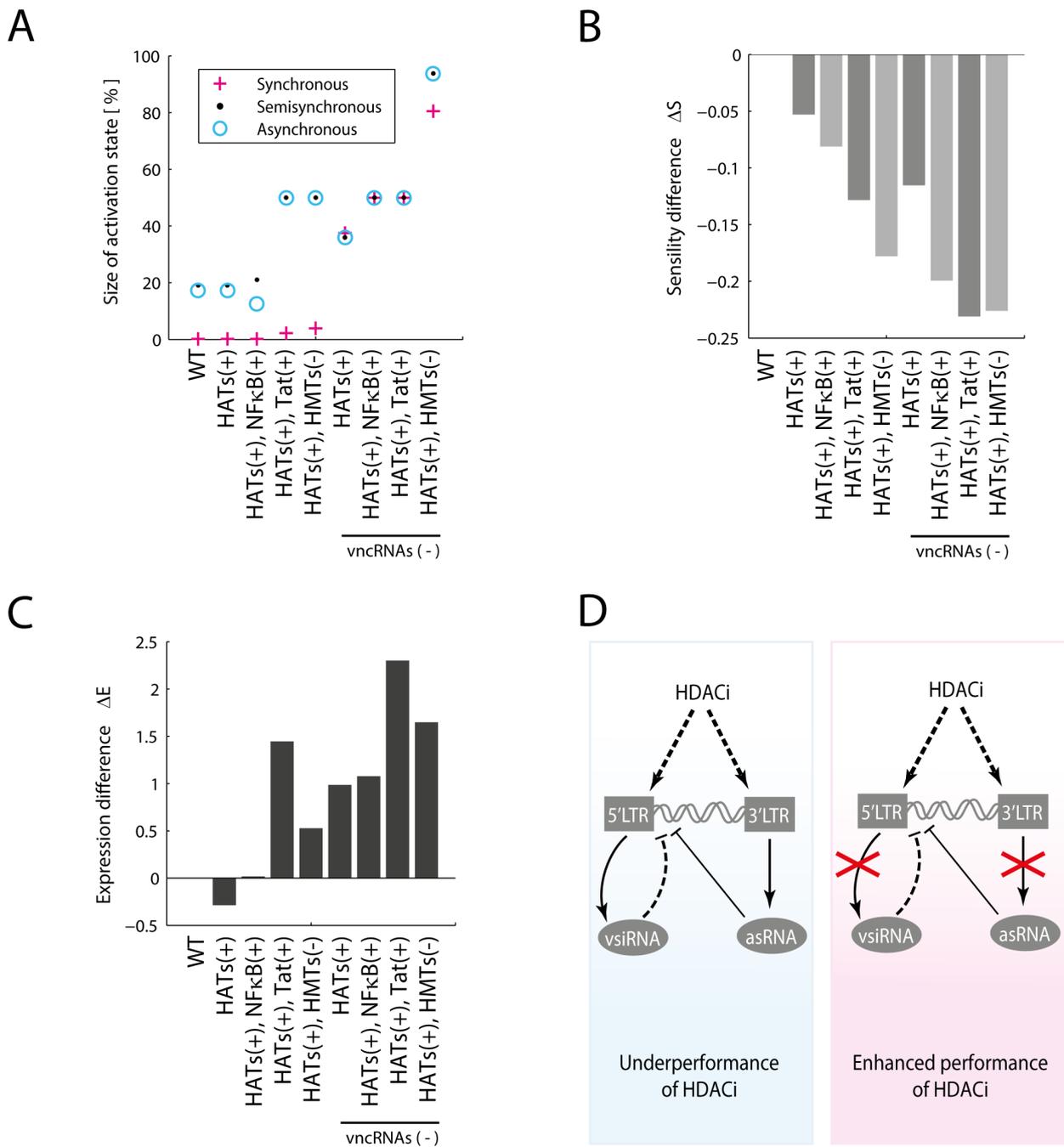


Figura 7.7 | Los HDACis promueven la síntesis de los vncRNAs

A) Peso relativo porcentual del estado de activación (W_{on}) obtenido con los tres esquemas de actualización del modelo discreto antes y después de la inhibición de los vncRNAs. **B)** Sensibilidad de la red calculada con el test de Derrida antes y después de la inhibición de los vncRNAs. **C)** Niveles en equilibrio de p24Gag calculados antes y después de la inhibición de los vncRNAs. **D)** Los resultados anteriores permiten suponer que la falta de efectividad de los HDACis para incrementar la expresión de proteínas virales se debe a que estos LRAs promueven la síntesis de todos los RNAs virales, incluyendo a los vncRNAs. De esta forma, los HDACis promueven la aparición de RNAs virales pero impiden que estos produzcan antígenos reconocibles para el sistema inmunológico.

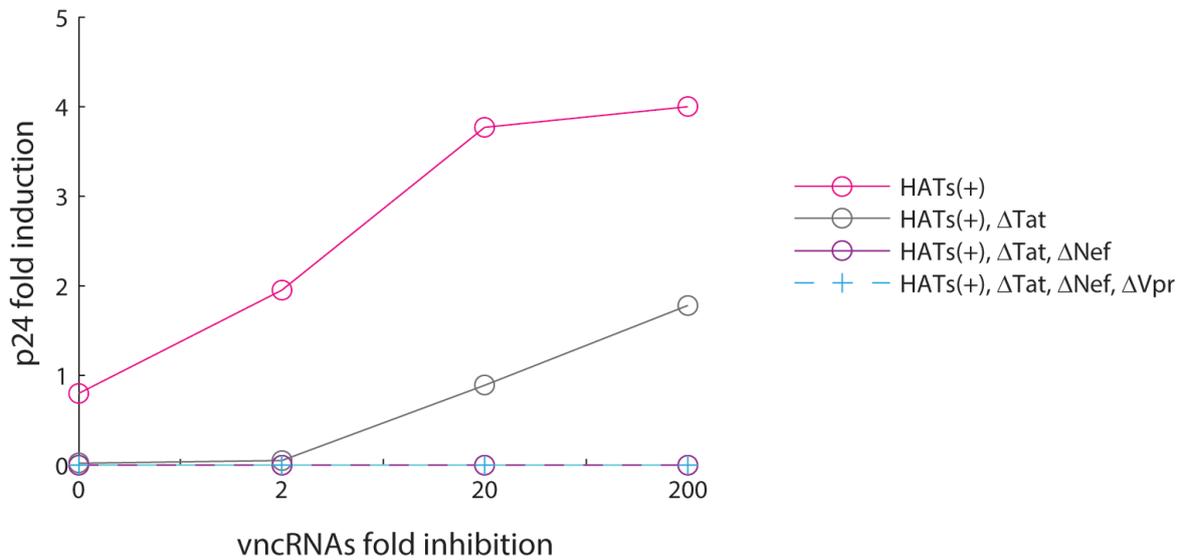


Figura 7.8 | Efecto de la inhibición de los vncRNAs en provirus defectuosos

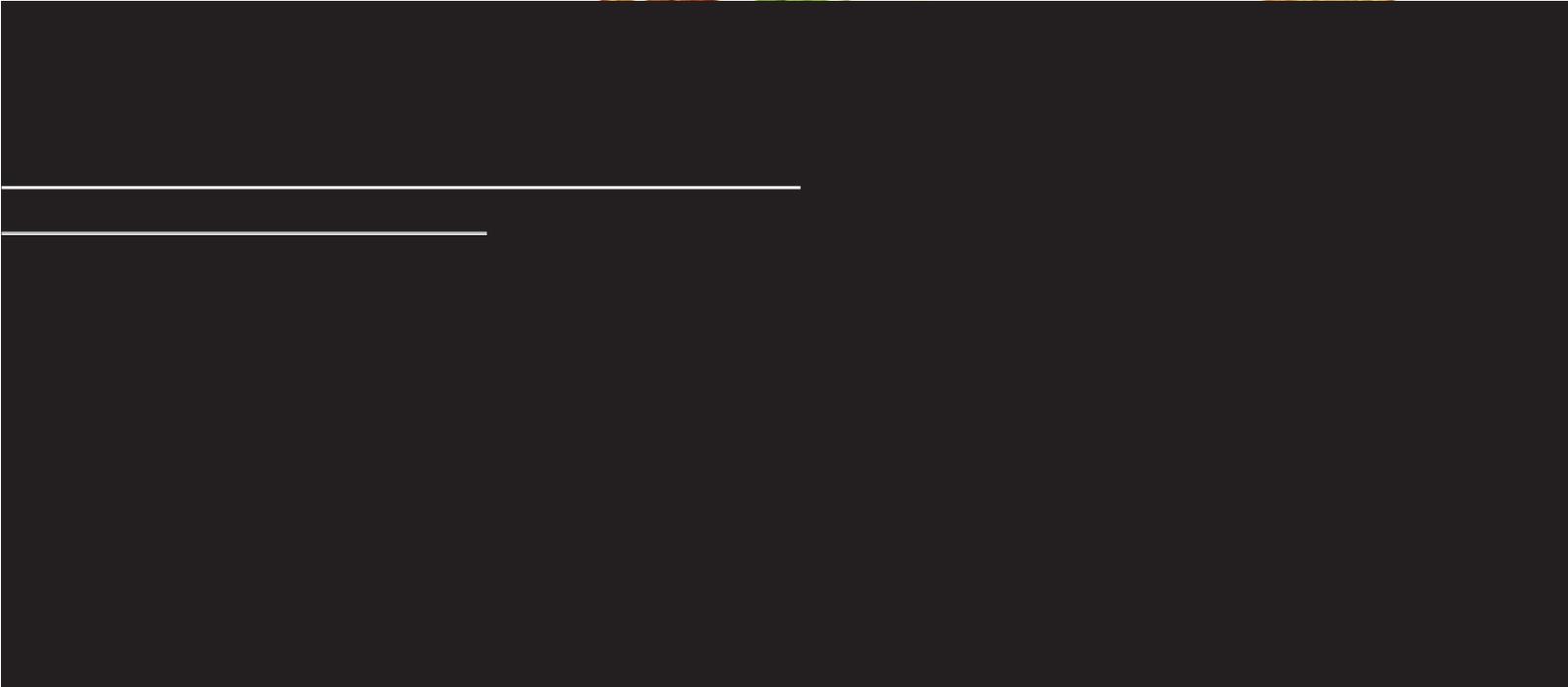
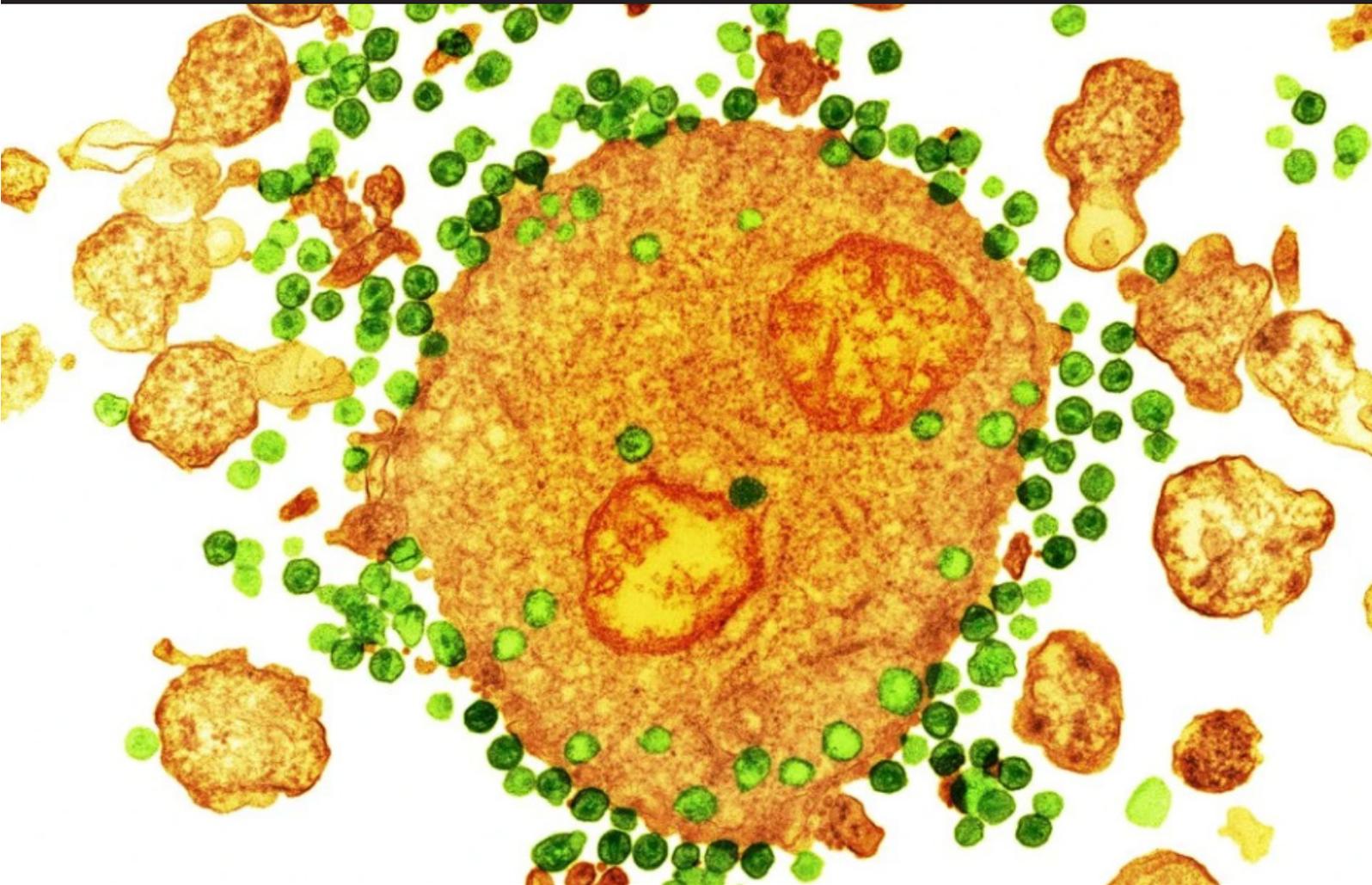
En esta figura se muestra el efecto de tratar de reactivar provirus defectuosos con HDACis. Para simular a los provirus Δtat , Δnef y Δvpr así como sus respectivas combinaciones, se igualó a cero el parámetro de su síntesis en el modelo continuo. La inhibición de los vncRNAs se realizó dividiendo por 2, 20 y 200 veces el valor de la síntesis de los vncRNAs (asRNA y vsiRNA) en el modelo continuo. Estos resultados muestran que aunque se lograra una supresión total de los vncRNAs, los provirus defectuosos son imposibles de reactivar con HDACis.

7.10. La inhibición de los vncRNAs no es suficiente para reactivar al provirus

La hipótesis de que los vncRNAs son los causantes del malfuncionamiento de los HDACis abre la posibilidad de usarlos como blancos para potenciar la reactivación viral (Figura 7.7D). Sin embargo no queda claro si la inhibición de los vncRNAs podría reactivar a los provirus que tiene mutaciones. Para investigar este punto, se utilizó al modelo continuo para simular el efecto de inhibir los vncRNAs en provirus tipo silvestre versus provirus mutados durante un tratamiento con HDACis. Como resultado de esta simulación se encontró que los provirus que carecen de Tat pueden ser reactivados en menor medida que los provirus intactos (Figura 7.8). Sin embargo, los provirus deficientes que carecen de dos o más circuitos de realimentación positiva no pueden ser reactivados ni con la inhibición total de los vncRNAs (Figura 7.8). Estos resultados sugieren que la inhibición de los vncRNAs no puede asegurar la reactivación total de los reservorios virales.

Capítulo 8

Discusión y conclusiones



Discusión y conclusiones

8.1. Semblanza de la tesis

Los reservorios de larga vida del VIH-1 son el principal obstáculo para erradicar la infección. Se han realizado muchos esfuerzos para eliminarlos usando los LRAs, desafortunadamente estos no fueron exitosos *in vivo* (Bullen et al. 2014), y hasta ahora siguen sin conocerse las causas. En este trabajo de tesis se analizó *in silico* el funcionamiento de la expresión génica del provirus, con la finalidad de investigar las causas del bajo desempeño de los LRAs. Para ello, se construyó una red de regulación de la expresión génica del provirus, misma que fue analizada con un modelo booleano y un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias no-lineales. Ambos modelos predicen que los vncRNAs son los principales reguladores negativos de la expresión génica del provirus, estando también implicados en el bajo rendimiento de los LRAs. Finalmente, ambos modelos predicen que los tratamientos con inhibidores de las HMTs y liberadores de P-TEFb son la mejor forma de maximizar la reactivación viral.

8.2. ¿Cuál es la función de los vncRNAs en la dinámica de expresión génica del provirus?

Tradicionalmente se había pensado que Tat es el único regulador de la latencia codificado por el VIH-1. Sin embargo, evidencia reciente muestra que los vncRNAs son esenciales para regular la latencia del provirus. Saayman y colegas caracterizaron un RNA largo y anti-sentido cuya inhibición desencadena la reactivación de células con provirus latentes (Saayman et al. 2014). Zapata y colaboradores demostraron que este RNA largo y anti-sentido es capaz de silenciar la expresión génica del provirus mediante la estimulación de las HMTs (Zapata et al. 2017). Dada la importancia de los vncRNAs, se decidió investigar cuál es su papel dentro de la dinámica de la expresión de genes del provirus. La primera particularidad que se encontró al analizar la red de expresión génica del provirus con el modelo discreto, fue que el peso estadístico del estado de latencia (W_{off}) era muy superior al que presentaba el estado de activación (W_{on}), sin importar el estado de activación de la célula (Figura 7.2A). Después, el análisis de las cuencas de atracción reveló que la ausencia de los vncRNAs y la presencia de Tat son condiciones obligatorias para la activación del provirus (Figura 7.2B). Además, se encontró que la inhibición de los vncRNAs incrementa el W_{on} (Figura 7.7A). Estos hallazgos indican que los vncRNAs, como grupo, son los principales reguladores negativos de la expresión génica del provirus.

8.3. ¿Cómo regulan Tat y los vncRNAs la latencia?

La siguiente pregunta que se investigó fue determinar cómo regulan conjuntamente Tat y los vncRNAs la latencia viral. Reportes previos demostraron que el asa de realimentación positiva de Tat presenta un pico de actividad fuerte seguido por un decaimiento hasta alcanzar un estado de latencia estable (Weinberger & Shenk 2007; Weinberger et al. 2005).

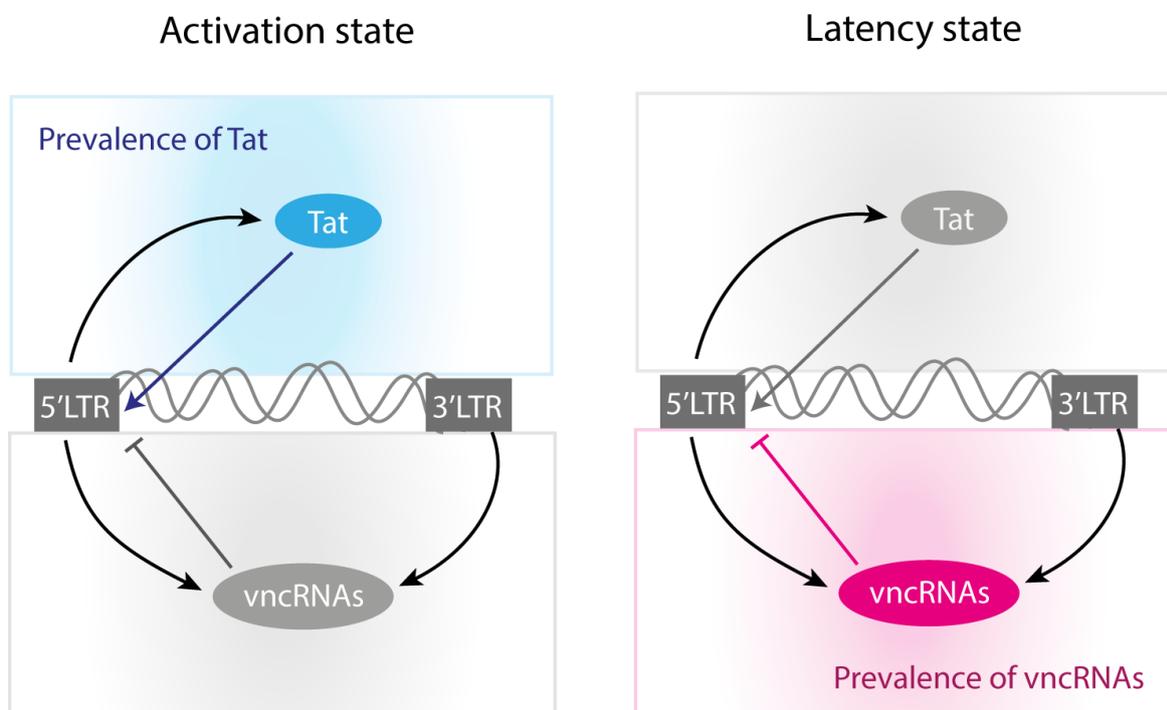


Figura 8.1 | Mecanismos moleculares de la autorregulación viral de la latencia

De acuerdo con todos los resultados encontrados en esta tesis, el estado de activación puede alcanzarse únicamente si Tat presenta niveles altos en su concentración. Por el contrario, si la concentración de Tat no es óptima, el provirus favorece la síntesis de los vncRNAs y estos a su vez inducen el silenciamiento de la expresión génica del provirus, manteniendo la latencia y estabilidad del reservorio.

En este trabajo se observó el mismo comportamiento temporal del circuito de Tat (Figura 7.3E). Sin embargo, este comportamiento dinámico también se observó en los circuitos de realimentación positiva de Vpr y Nef (Figura 7.3E). Además, se encontró que una bifurcación transcítica aparecía cuando estos circuitos de realimentación positiva se combinan (Figura 7.3), lo cual permite que el provirus reinicie la expresión de sus genes aún después de largos periodos de represión con la terapia antirretroviral (Figura 7.3D). Es razonable suponer que la existencia de estos circuitos de realimentación positiva potencian la actividad de Tat para reactivar al virus, y al mismo tiempo permiten que la reactivación se dé a pesar de la fuerte actividad represora que ejercen los vncRNAs, al igual que los mecanismos de silenciamiento del hospedero. No obstante, una reactivación fuerte y descontrolada puede ser perjudicial para la supervivencia del virus, de hecho, Rouzine y colegas encontraron que una alta tasa de reactivación viral impide la formación de reservorios en el organismo (Rouzine et al. 2015). Ellos también observaron que las fluctuaciones de la actividad transitoria de Tat decrece la frecuencia de activación del provirus, lo cual permite que los reservorios se estabilicen (Rouzine et al. 2015). Expandiendo estas observaciones, en este trabajo se encontró que, además de las fluctuaciones de Tat, los vncRNAs también reducen la reactivación viral. Por lo tanto, la fuerte represión ejercida por los vncRNAs acoplada a la reducción de los niveles de Tat, son la clave para estabilizar la latencia del provirus (Figura 8.1).

8.4. ¿Cómo se relacionan los vncRNAs con el bajo desempeño de los LRAs *in vivo*?

En este trabajo se encontraron 28 perturbaciones capaces de potenciar la reactivación del provirus (Tabla 7.4), siendo la combinación de inhibidores de las HMTs junto con liberadores de P-TEFb la más prominente de todas. Interesantemente, se encontró que las perturbaciones hechas con inhibidores de las HDACs no incrementaron la expresión de proteínas del provirus (Figura 7.6C), tal como lo reportaron Cillo y colegas (Cillo et al. 2014). No obstante, Mohammadi y su grupo encontraron que los inhibidores de las HDACs sí incrementan la transcripción del provirus, pero no su expresión de proteínas (Mohammadi et al. 2014). Se propuso que la falta de expresión de proteínas del provirus ocurría por la existencia de algún mecanismo represor no identificado a nivel post-transcripcional (Mohammadi et al. 2014). Siguiendo con esta línea, los resultados de este trabajo de tesis predicen que los niveles de los vncRNAs incrementan en respuesta a la estimulación transcripcional producida por los inhibidores de las HDACs (Figura 7.7). Por consiguiente, esta hipótesis puede explicar por qué los inhibidores de las HDACs inducen la transcripción pero no la síntesis de proteínas virales. Situación que permite entender por qué estos LRAs ampliamente usados no tienen un rendimiento satisfactorio a nivel clínico (Figura 8.2).

8.5. ¿Cómo mejorar el rendimiento de los LRAs?

El ensayo de perturbaciones realizado con el modelo discreto reveló que el mejor tratamiento para reactivar al provirus de su latencia, consiste en utilizar inhibidores de las HMTs junto con liberadores de P-TEFb (Figura 7.5). El mecanismo de acción detrás de esta combinación consiste en bloquear la acción del principal efector de los vncRNAs, las HMTs (Zapata et al. 2017), y estimular al mismo tiempo la función de Tat con los liberadores de P-TEFb (Li et al. 2013) (Figura 8.2). Sería interesante realizar ensayos *in vitro* con cultivos *ex vivo* de pacientes con VIH-1 para evaluar el grado de efectividad clínica de este tratamiento propuesto.

8.6. ¿Hay otra manera de controlar al VIH-1?

Los resultados del ensayo de perturbaciones del modelo discreto plantearon una posibilidad interesante acerca de la existencia de otra forma de controlar crónicamente la infección por VIH-1. Con este ensayo, se encontró que el 51% de las perturbaciones pueden silenciar permanentemente al provirus, eliminando el estado de activación sin importar el estado de activación celular del hospedero (Figura 7.5). Es importante mencionar que las perturbaciones que logran este efecto se enfocan en inhibir los nodos de la red de expresión génica del provirus relacionados con la transcripción, tales como el promotor 5'LTR y los sitios de splicing (Figura 7.5). Esto implica que el provirus puede ser silenciado definitivamente si se induce una hipermutación de su genoma. Esta estrategia es usada por el hospedero para defenderse naturalmente del provirus usando a la enzima APOBEC3G, misma que induce la hipermutación del genoma del provirus. No obstante, APOBEC3G es inhibida por Vif durante la expresión génica del provirus. Afortunadamente, a recientes fechas se ha encontrado que los fármacos activadores de ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) puede restaurar la actividad de APOBEC3G, aún en presencia de Vif (Miyakawa et al. 2015). Por lo tanto, la hipermutación del genoma viral mediada por APOBEC3G en conjunción con la terapia antirretroviral, pueden ser una opción alternativa para suprimir definitivamente a la infección por VIH-1 (Figura 8.2).

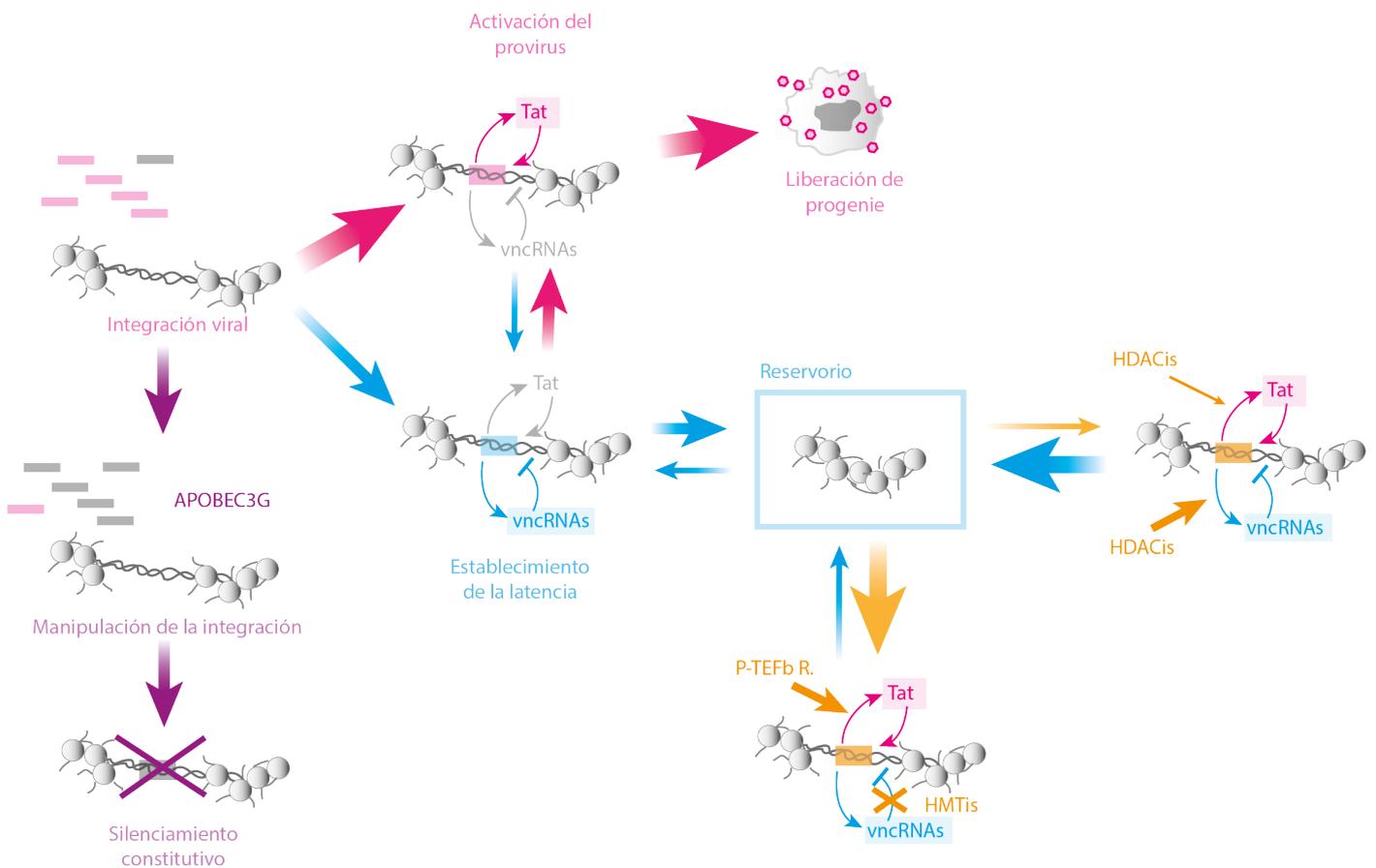


Figura 8.2 | Resumen gráfico de la tesis

De acuerdo con todo lo encontrado en este trabajo de tesis, cuando el cDNA viral se integra al genoma del hospedero, el provirus puede iniciar directamente su transcripción, lo que eventualmente hará que la célula produzca partículas virales y muera; o bien el provirus puede entrar en latencia hasta que se cierran los nucleosomas virales, estableciendo así el reservorio. Los LRAs como los HDACis promueven la apertura de los nucleosomas, y potencian la transcripción de los RNAs virales. Sin embargo, cuando esto ocurre, también se sintetizan los vncRNAs, mismos que inducen el silenciamiento de la expresión génica del provirus, lo cual explica el bajo rendimiento de los LRAs *in vivo*. Para mejorar el rendimiento de los LRAs, se propone usar liberadores de P-TEFb junto con inhibidores de las HMTs, a fin de bloquear los efectos inhibitorios de los vncRNAs y promover la actividad de Tat. Una ruta alternativa para controlar la infección consiste en usar estimuladores de APOBEC3G, a fin de dañar el cDNA viral, y promover la inserción de provirus dañados e incapaces de reactivarse.

8.7. Conclusiones y perspectiva

Los tratamientos actuales para reactivar al provirus de su latencia pueden fallar porque el VIH utiliza a los vncRNAs como reguladores negativos para mantener su latencia. Algunos LRAs, como los inhibidores de las HDACs, pueden incrementar la transcripción del provirus al igual que los niveles de los vncRNAs, reduciendo su efectividad para reactivar a los reservorios virales. Sin embargo, si se neutraliza el efecto represor de los vncRNAs inhibiendo a las HMTs con fármacos como la caetocina y se potencia la actividad de Tat con liberadores de P-TEFb, la reactivación de los reservorios podría incrementarse sustancialmente a nivel clínico. En futuros trabajos se extenderá el análisis realizado en esta tesis hacia el VIH-2, a fin de determinar las particularidades dinámicas del mismo y entender por qué es un virus poco letal aunque puede generar un cuadro clínico de inmunodeficiencia como el VIH-1. También es de interés implementar las perturbaciones con potencial activador en cultivos celulares *ex vivo* de pacientes con VIH-1.

Apéndice A

Parte del trabajo realizado en esta tesis fue publicado en un artículo original titulado como: “*Dynamics of the gene regulatory network of HIV-1 and the role of viral non-coding RNAs on latency reversion*” en la revista *Frontiers in Physiology*. A continuación se muestra la carta de aceptación probatoria:

About | Submit | Journals | Research TopicsMy FrontiersAntonio Bensussen

Email

Inbox

Outbox

Compose

MESSAGE DETAILS

[Back to Inbox](#)

 From: [Frontiers in Physiology](#)

To: Antonio Bensussen

Date: Fri, 7 Sep 2018 at 2:45 PM (GMT)

Subject: Congratulations! Your manuscript is accepted - 379144

Dear Dr Bensussen,

I am pleased to inform you that your manuscript *Dynamics of the gene regulatory network of HIV-1 and the role of viral non-coding RNAs on latency reversion* has been approved for production and accepted for publication in *Frontiers in Physiology*, section *Systems Biology*.

Manuscript title: *Dynamics of the gene regulatory network of HIV-1 and the role of viral non-coding RNAs on latency reversion*
Journal: *Frontiers in Physiology*, section *Systems Biology*
Article type: Original Research
Authors: Antonio Bensussen, Christian Torres-Sosa, Ramón A. González, José Díaz
Manuscript ID: 379144
Edited by: Matteo Barberis

Your manuscript is currently being prepared for production, and the abstract or introductory section is available online in provisional form. Please click here to access the final review reports and your manuscript directly: <http://www.frontiersin.org/Review/EnterReviewForum.aspx?activationno=9b241d1a-3656-4e04-87f0-c7cac527f845>

You will be contacted as soon as the author proofs are ready for your revisions. Please do not communicate any changes until then.

As an author, it is important that you maintain your Frontiers research network (Loop) profile up to date, as your publication will be linked to your profile allowing you and your other publications to become more discoverable. You can update profile pages (profile pictures, short bio, list of publications) by clicking on this link: <http://loop.frontiersin.org/people/>

Tell us what you think!

At Frontiers we are constantly trying to improve our Collaborative Review process and would like to get your feedback on how we did. Please complete our short 3-minute survey and we will donate \$1 to *Enfants du Monde*, a Swiss non-profit organization:
https://frontiers.qualtrics.com/jfe/form/SV_8q8kYmXfVx8H5at?survey=author&aid=379144&uid=544458

Thank you very much for taking the time to share your thoughts.

Best Regards,

Your Frontiers in Physiology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
Avenue du Tribunal Fédéral 34, 1005 Lausanne, Switzerland
Office T 41 21 510 17 40

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

Delete

[Back to top](#)

Home	Contact	Submit	Newsletters
About Frontiers	Media Relations	FAQs	RSS/Twitter
Journals A-Z	News	Terms & Conditions	Team
Institutional Membership	Blog		Careers

© 2007 - 2018 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved

Referencias

- Abraham, L. & Fackler, O.T., 2012. HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Communication and Signaling*, 10(1), p.39.
- Acheson, N.H., 2011. *Fundamentals of molecular virology*, John Wiley & Sons.
- Agbottah, E. et al., 2006. Effect of SWI/SNF chromatin remodeling complex on HIV-1 Tat activated transcription. *Retrovirology*, 3, p.48.
- Aldana, M., 2003. Boolean dynamics of networks with scale-free topology. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 185(1), pp.45–66.
- Allers, K. et al., 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood*, 117(10), pp.2791–9.
- Althaus, C.L. & De Boer, R.J., 2010. Intracellular transactivation of HIV can account for the decelerating decay of virus load during drug therapy. *Molecular systems biology*, 6, p.348.
- Anderson, J. & Akkina, R., 2007. Complete knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed siRNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection. *Gene Therapy*, 14(17), pp.1287–1297.
- Archin, N.M. et al., 2012. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*, 487(7408), pp.482–485.
- Archin, N.M. et al., 2014. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 12(11), pp.750–764.
- Ariën, K.K., Vanham, G. & Arts, E.J., 2007. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nature Reviews Microbiology*, 5(2), pp.141–151.
- Balleza, E. et al., 2008. Critical dynamics in genetic regulatory networks: Examples from four kingdoms. *PLoS ONE*, 3(6).
- Banerjea, A. et al., 2003. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 8(1), pp.62–71.
- Barré-Sinoussi, F. et al., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*, 220(4599), pp.868–71.
- Bartholomeeusen, K. et al., 2013. Histone Deacetylase Inhibitors (HDACis) That Release the Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb) from Its Inhibitory Complex Also Activate HIV Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp.14400–14407.

Bello, G., Afonso, J.M. & Morgado, M.G., 2012. Phylodynamics of HIV-1 subtype F1 in Angola, Brazil and Romania. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5), pp.1079–1086.

Bennasser, Y. et al., 2005. Evidence that HIV-1 Encodes an siRNA and a Suppressor of RNA Silencing. *Immunity*, 22(5), pp.607–619.

Blazkova, J. et al., 2009. CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS pathogens*, 5(8), p.e1000554.

Blazkova, J. et al., 2012. Paucity of HIV DNA Methylation in Latently Infected, Resting CD4+ T Cells from Infected Individuals Receiving Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology*, 86(9), pp.5390–5392.

Bouchat, S. et al., 2012a. Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4(+) T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *AIDS (London, England)*, 26(12), pp.1473–82.

Bouchat, S. et al., 2012b. Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4+ T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *Aids*, 26(12), pp.1473–1482.

Brenchley, J.M. et al., 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), pp.1365–1371.

Broder, M.S. et al., 2017. The Cost of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in the United States. *American health & drug benefits*, 10(7), pp.366–374.

Bullen, C.K. et al., 2014b. New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nature medicine*, 20(4), pp.425–9.

Campbell-Yesufu, O.T. & Gandhi, R.T., 2011. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(6), pp.780–7.

Carter, C.C. et al., 2010. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nature Medicine*, 16(4), pp.446–451.

Cassels, S., Clark, S.J. & Morris, M., 2008. Mathematical models for HIV transmission dynamics: tools for social and behavioral science research. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 47 Suppl 1(Suppl 1), pp.S34-9.

Charpentier, C. et al., 2013. HIV-2EU: Supporting Standardized HIV-2 Drug Resistance Interpretation in Europe. *Clinical Infectious Diseases*, 56(11), pp.1654–1658.

du Chéné, I. et al., 2007. Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *The EMBO journal*, 26(2), pp.424–35.

Chono, H. et al., 2011. In Vivo Safety and Persistence of Endoribonuclease Gene-Transduced CD4+ T Cells in Cynomolgus Macaques for HIV-1 Gene Therapy Model J. J. Rossi, ed. *PLoS ONE*, 6(8), p.e23585.

Churchill, M.J. et al., 2007. Persistence of attenuated HIV-1 rev alleles in an epidemiologically linked cohort of long-term survivors infected with nef-deleted virus. *Retrovirology*, 4, p.43.

Cillo, A.R. et al., 2014. Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4+ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), pp.7078–83.

Cohn, L.B. et al., 2015. HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell*, 160(3), pp.420–32.

Colin, L. & Van Lint, C., 2009. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology*, 6(1), p.111.

Cullen, B.R., 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(8), pp.419–424.

D'Orso, I. et al., 2012. A transition step during assembly of HIV Tat:P-TEFb transcription complexes and transfer to TAR RNA. *Molecular and Cellular Biology*, 32(23), pp.4780–4793.

Dar, R.D. et al., 2014. Screening for noise in gene expression identifies drug synergies. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6190), pp.1392–6.

Darcis, G. et al., 2015. An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS pathogens*, 11(7), p.e1005063.

Deeks, S.G., 2012. HIV: Shock and kill. *Nature*, 487(7408), pp.439–40.

Derrida, B. & Pomeau, Y., 1986. Random Networks of Automata: A Simple Annealed Approximation. *Europhysics Letters (EPL)*, 1(2), pp.45–49.

DiGiusto, D.L. et al., 2010. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Science translational medicine*, 2(36), p.36ra43.

Dinso, J.B. et al., 2009. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), pp.9403–9408.

Dong, C. et al., 2007. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *Journal of virology*, 81(20), pp.11352–62.

Elliott, J.H. et al., 2014. Activation of HIV Transcription with Short-Course Vorinostat in HIV-Infected Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy B. R. Cullen, ed. *PLoS Pathogens*, 10(11), p.e1004473.

Faria, N.R. et al., 2014. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, 346(6205), pp.56–61.

Fauci, A.S., Mavilio, D. & Kottlil, S., 2005. NK cells in HIV infection: Paradigm for protection or targets for ambush. *Nature Reviews Immunology*, 5(11), pp.835–843.

Felber, B.K., Drysdale, C.M. & Pavlakis, G.N., 1990. Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *Journal of virology*, 64(8), pp.3734–41.

Felzien, L.K. et al., 1998. HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), pp.5281–6.

Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M., 2005. Integration of Retroviruses: A Fine Balance between Efficiency and Danger. *PLoS Medicine*, 2(1), p.e10.

Fiume, G. et al., 2012. Human immunodeficiency virus-1 Tat activates NF- κ B via physical interaction with κ B- α and p65. *Nucleic Acids Research*, 40(8), pp.3548–3562.

Fun, A. et al., 2012. Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology*, 9(1), p.63.

Gagnon, K.T. & Corey, D.R., 2012. Argonaute and the nuclear RNAs: new pathways for RNA-mediated control of gene expression. *Nucleic acid therapeutics*, 22(1), pp.3–16.

Gallo, R.C. et al., 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4648), pp.500–3.

German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup "Assessment of Pathogens Transmissible by Blood," G.A.C.B. (Arbeitskreis & Blood', S. 'Assessment of P.T. by, 2016. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 43(3), pp.203–22.

Gershenson, C., 2002. Classification of Random Boolean Networks. In p. 8.

Giorgetti, L. et al., 2010. Noncooperative Interactions between Transcription Factors and Clustered DNA Binding Sites Enable Graded Transcriptional Responses to Environmental Inputs. *Molecular Cell*, 37(3), pp.418–428.

Gottlieb, M.S. et al., 1981. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine*, 305(24), pp.1425–1431.

Groen, J.N. & Morris, K. V., 2013. Chromatin, non-coding RNAs, and the expression of HIV. *Viruses*, 5(7), pp.1633–1645.

Gutiérrez, C. et al., 2016. Bryostatins for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS*, 30(9), pp.1385–1392.

Hamer, D.H., 2004. Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. *Current HIV research*, 2(2), pp.99–111.

Hammarskjöld, M.L. et al., 1989. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *Journal of virology*, 63(5), pp.1959–66.

Heeney, J.L., Dagleish, A.G. & Weiss, R.A., 2006. Origins of HIV and the Evolution of Resistance to AIDS. *Science*, 313(5786), pp.462–466.

Henrich, T.J. et al., 2014. Antiretroviral-Free HIV-1 Remission and Viral Rebound After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Annals of Internal Medicine*, 161(5), p.319.

Herbein, G. et al., 1998. Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes. *Journal of virology*, 72(1), pp.660–70.

Herbein, G. et al., 2010. Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology*, 7(1), p.34.

Hernandez-Vargas, E.A., 2017. Modeling kick-kill strategies toward HIV cure. *Frontiers in Immunology*, 8(AUG).

Herout, S. et al., 2016. Impact of Early Initiation of Antiretroviral Therapy in Patients with Acute HIV Infection in Vienna, Austria N. Sluis-Cremer, ed. *PLOS ONE*, 11(4), p.e0152910.

Hill, A.L. et al., 2014. Predicting the outcomes of treatment to eradicate the latent reservoir for HIV-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(37), pp.13475–80.

Hladik, F. & McElrath, M.J., 2008. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), pp.447–457.

Ho, Y.-C. et al., 2013. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), pp.540–51.

Hoxie, J.A. & June, C.H., 2012. Novel cell and gene therapies for HIV. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(10).

Iwujj, C.C. et al., 2013. Older HIV-infected individuals present late and have a higher mortality: Brighton, UK cohort study. *BMC Public Health*, 13(1), p.397.

Jacquenot, S. et al., 2005. Dual effect of the SR proteins ASF/SF2, SC35 and gG8 on HIV-1 RNA splicing and virion production. *Retrovirology*, 2, p.33.

Jordan, A., Bisgrove, D. & Verdin, E., 2003. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *The EMBO journal*, 22(8), pp.1868–77.

Kauder, S.E. et al., 2009. Epigenetic Regulation of HIV-1 Latency by Cytosine Methylation S. Ross, ed. *PLoS Pathogens*, 5(6), p.e1000495.

Ke, R. et al., 2015. Modeling the Effects of Vorinostat In Vivo Reveals both Transient and Delayed HIV Transcriptional Activation and Minimal Killing of Latently Infected Cells. *PLoS pathogens*, 11(10), p.e1005237.

Keele, B.F. et al., 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5786), pp.523–6.

Kim, K. et al., 2012. Vpr-Binding Protein Antagonizes p53-Mediated Transcription via Direct Interaction with H3 Tail. *Molecular and Cellular Biology*, 32(4), pp.783–796.

Kimaro, G.D. et al., 2017. The costs of providing antiretroviral therapy services to HIV-infected individuals presenting with advanced HIV disease at public health centres in Dar es Salaam, Tanzania: Findings from a randomised trial evaluating different health care strategies G. V. De Socio, ed. PLOS ONE, 12(2), p.e0171917.

Kinoshita, S. et al., 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*, 6(3), pp.235–44.

Kok, Y.L. et al., 2018. Spontaneous reactivation of latent HIV-1 promoters is linked to the cell cycle as revealed by a genetic-insulators-containing dual-fluorescence HIV-1-based vector. *Scientific Reports*, 8(1), p.10204.

Krawitz, P. & Shmulevich, I., 2007. Basin Entropy in Boolean Network Ensembles. *Physical Review Letters*, 98(15), p.158701.

Laird, G.M. et al., 2015. Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), pp.1901–1912.

Lambris, J.D., Ricklin, D. & Geisbrecht, B. V., 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), pp.132–142.

Lederman, M.M. & Pike, E., 2017. Ten Years HIV Free: An Interview with “The Berlin Patient,” Timothy Ray Brown. *Pathogens & immunity*, 2(3), pp.422–430.

Lee, E.-M. et al., 2009. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) changes microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells. *International journal of molecular medicine*, 24(1), pp.45–50.

Lemey, P. et al., 2007. Synonymous Substitution Rates Predict HIV Disease Progression as a Result of Underlying Replication Dynamics. *PLoS Computational Biology*, 3(2), p.e29.

Levine, B.L. et al., 2006. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), pp.17372–17377.

Levy, J.A. et al., 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science (New York, N.Y.)*, 225(4664), pp.840–2.

Levy, J.A., 2011. Virus-host interactions in HIV pathogenesis: directions for therapy. *Advances in dental research*, 23(1), pp.13–8.

Li, Z. et al., 2013. The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Research*, 41(1), pp.277–287.

Lindbäck, S. et al., 2000. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS (London, England)*, 14(15), pp.2333–9.

Van Lint, C. et al., 2004. Molecular mechanisms involved in HIV-1 transcriptional latency and reactivation: implications for the development of therapeutic strategies. *Bulletin et memoires de l'Academie royale de medecine de Belgique*, 159(Pt 2), pp.176–189.

- Liu, R. et al., 2014. HIV-1 Vpr stimulates NF- κ B and AP-1 signaling by activating TAK1. *Retrovirology*, 11(1), p.45.
- Liu, R. et al., 2013. HIV Infection in Gastric Epithelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(8), pp.1221–1230.
- Locatelli, S. & Peeters, M., 2012. Cross-species transmission of simian retroviruses. *AIDS*, 26(6), pp.659–673.
- Macpherson, J.L. et al., 2005. Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected patients. *The Journal of Gene Medicine*, 7(5), pp.552–564.
- Maher, D. et al., 2005. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), pp.11504–11509.
- Managlia, E.Z., Landay, A. & Al-Harthi, L., 2006. Interleukin-7 induces HIV replication in primary naive T cells through a nuclear factor of activated T cell (NFAT)-dependent pathway. *Virology*, 350(2), pp.443–452.
- Martin, G.E. et al., 2017. Post-treatment control or treated controllers? Viral remission in treated and untreated primary HIV infection. *AIDS*, 31(4), pp.477–484.
- Masur, H. et al., 1981. An Outbreak of Community-Acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 305(24), pp.1431–1438.
- McManamy, M.E.M. et al., 2014. Therapy for Latent HIV-1 Infection: The Role of Histone Deacetylase Inhibitors. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23(4), pp.145–149.
- Mehla, R. et al., 2010. Bryostatins modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS ONE*, 5(6).
- Menéndez-Arias, L., 2013. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments. *Antiviral Research*, 98(1), pp.93–120.
- Miyakawa, K. et al., 2015. ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. *Nature communications*, 6, p.6945.
- Mohammadi, P. et al., 2014. Dynamics of HIV latency and reactivation in a primary CD4+ T cell model. *PLoS pathogens*, 10(5), p.e1004156.
- Moudgil, T. & Daar, E.S., 1993. Infectious decay of human immunodeficiency virus type 1 in plasma. *The Journal of infectious diseases*, 167(1), pp.210–2.
- Mourez, T., Simon, F. & Plantier, J.-C., 2013. Non-M Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), pp.448–461.
- Nabel, G. & Baltimore, D., 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326(6114), pp.711–713.

Nathans, R. et al., 2009. Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Molecular cell*, 34(6), pp.696–709.

Novis, C.L. et al., 2013. Reactivation of latent HIV-1 in central memory CD4⁺ T cells through TLR-1/2 stimulation. *Retrovirology*, 10(1), p.119.

Nykter, M. et al., 2008. Gene expression dynamics in the macrophage exhibit criticality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), pp.1897–900.

Ogawa, Y. et al., 2013. Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell Host & Microbe*, 13(1), pp.77–86.

Ophinni, Y. et al., 2018. CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures. *Scientific Reports*, 8(1), p.7784.

Parren, P.W. et al., 1999. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS (London, England)*, 13 Suppl A, pp.S137–62.

Perelson, A.S. et al., 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5255), pp.1582–6.

Perelson, A.S. & Ribeiro, R.M., 2013. Modeling the within-host dynamics of HIV infection. *BMC biology*, 11(1), p.96.

Pinkevych, M. et al., 2015. HIV Reactivation from Latency after Treatment Interruption Occurs on Average Every 5-8 Days--Implications for HIV Remission. *PLoS pathogens*, 11(7), p.e1005000.

Policicchio, B.B. et al., 2016. Multi-dose Romidepsin Reactivates Replication Competent SIV in Post-anti-retroviral Rhesus Macaque Controllers. *PLoS pathogens*, 12(9), p.e1005879.

Ponia, S.S. et al., 2013. Arginine rich short linear motif of HIV-1 regulatory proteins inhibits dicer dependent RNA interference. *Retrovirology*, 10(1), p.97.

Purcell, D.F. & Martin, M.A., 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *Journal of virology*, 67(11), pp.6365–78.

Rabson, A.B. & Martin, M.A., 1985. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell*, 40(3), pp.477–80.

Raha, T., Cheng, S.W.G. & Green, M.R., 2005. HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs. *PLoS biology*, 3(2), p.e44.

Ramakrishnan, R. et al., 2012. Identification of novel CDK9 and Cyclin T1-associated protein complexes (CCAPs) whose siRNA depletion enhances HIV-1 Tat function. *Retrovirology*, 9(1), p.90.

Rambaut, A. et al., 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(1), pp.52–61.

Rasmussen, T.A. et al., 2014. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *The Lancet HIV*, 1(1), pp.e13–e21.

Razooky, B.S. et al., 2015. A Hardwired HIV Latency Program. *Cell*, 160(5), pp.990–1001.

Reddy, B. & Yin, J., 1999. Quantitative Intracellular Kinetics of HIV Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 15(3), pp.273–283.

Reuse, S. et al., 2009. Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS one*, 4(6), p.e6093.

Rivadeneira, P.S. et al., 2014. Mathematical Modeling of HIV Dynamics After Antiretroviral Therapy Initiation: A Review. *BioResearch open access*, 3(5), pp.233–41.

Robbins, K.E. et al., 2003. U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *Journal of virology*, 77(11), pp.6359–66.

Robert-Guroff, M. et al., 1990. Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *Journal of virology*, 64(7), pp.3391–8.

Rouzine, I.M., Weinberger, A.D. & Weinberger, L.S., 2015. An Evolutionary Role for HIV Latency in Enhancing Viral Transmission. *Cell*, 160(5), pp.1002–1012.

Rowland-Jones, S.L., 2003. AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nature Reviews Immunology*, 3(4), pp.343–348.

Rücker, E. et al., 2004. Vpr and Vpu are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and CD4+ T-cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. *Journal of virology*, 78(22), pp.12689–93.

Saayman, S. et al., 2014. An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(6), pp.1164–75.

Sáez-Ciri3n, A. et al., 2013. Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study J. Lifson, ed. *PLoS Pathogens*, 9(3), p.e1003211.

Saurya, S., Lichtenstein, Z. & Karpas, A., 2005. Defective rev response element (RRE) and rev gene in HAART treated AIDS patients with discordance between viral load and CD4+ T-cell counts. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 33(4), pp.324–7.

Sauter, D. et al., 2015. Differential Regulation of NF-κB-Mediated Proviral and Antiviral Host Gene Expression by Primate Lentiviral Nef and Vpu Proteins. *Cell Reports*, 10(4), pp.586–599.

Schopman, N.C.T. et al., 2012. Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs. *Nucleic Acids Research*, 40(1), pp.414–427.

Schwartz, J.C. et al., 2008. Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nature structural & molecular biology*, 15(8), pp.842–8.

Shafer, R.W. & Schapiro, J.M., 2008. HIV-1 drug resistance mutations: An updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Reviews*, 10(2), pp.67–84.

Siliciano, J.D. et al., 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nature medicine*, 9(6), pp.727–8.

Siliciano, R.F. & Greene, W.C., 2011. HIV latency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), p.a007096.

Simonetti, F.R. et al., 2016. Clonally expanded CD4⁺ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), pp.1883–8.

Sloan, R.D. & Wainberg, M.A., 2011. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology*, 8(1), p.52.

Søgaard, O.S. et al., 2015. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo R. F. Siliciano, ed. *PLOS Pathogens*, 11(9), p.e1005142.

Soto-Rifo, R. et al., 2012. Different effects of the TAR structure on HIV-1 and HIV-2 genomic RNA translation. *Nucleic acids research*, 40(6), pp.2653–67.

Stanley, B.J. et al., 2008. Structural Insight into the Human Immunodeficiency Virus Vif SOCS Box and Its Role in Human E3 Ubiquitin Ligase Assembly. *Journal of Virology*, 82(17), pp.8656–8663.

Stevenson, M., 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, 9(7), pp.853–860.

Sugden, S.M. et al., 2016. Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses*, 8(3), p.67.

Suzuki, K. et al., 2015. Promoter Targeting RNAs: Unexpected Contributors to the Control of HIV-1 Transcription. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 4, p.e222.

Swingler, S. et al., 2003. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature*, 424(6945), pp.213–9.

Tough, D.F., Prinjha, R.K. & Tak, P.P., 2015. Epigenetic mechanisms and drug discovery in rheumatology. *Clinical Medicine*, 15(Suppl_6), pp.s64–s71.

Varin, A. et al., 2003. Exogenous Nef protein activates NF- κ B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells: Role in AIDS pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), pp.2219–2227.

Varin, A. et al., 2005. Synthetic Vpr protein activates activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and NF- κ B and stimulates HIV-1 transcription in promonocytic cells and primary macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), pp.42557–42567.

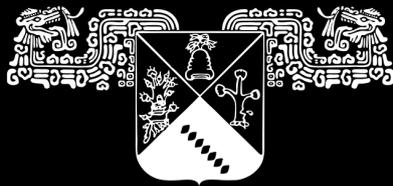
- Verhoef, K. & Berkhout, B., 1999. A second-site mutation that restores replication of a Tat-defective human immunodeficiency virus. *Journal of virology*, 73(4), pp.2781–2789.
- Watts, J.M. et al., 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, 460(7256), pp.711–716.
- Wei, X. et al., 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), pp.1896–905.
- Weinberger, L.S. et al., 2005. Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell*, 122(2), pp.169–82.
- Weinberger, L.S. & Shenk, T., 2007. An HIV feedback resistor: auto-regulatory circuit deactivator and noise buffer. *PLoS biology*, 5(1), p.e9.
- Westendorp, M.O. et al., 1995. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *The EMBO journal*, 14(3), pp.546–54.
- Wilen, C.B. et al., 2011. Engineering HIV-Resistant Human CD4+ T Cells with CXCR4-Specific Zinc-Finger Nucleases A. Trkola, ed. *PLoS Pathogens*, 7(4), p.e1002020.
- WILLIAMS, G., STRETTON, T.B. & LEONARD, J.C., 1960. Cytomegalic inclusion disease and *Pneumocystis carinii* infection in an adult. *Lancet (London, England)*, 2(7157), pp.951–5.
- Williams, S.A. et al., 2006. NF- κ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *The EMBO Journal*, 25(1), pp.139–149.
- Williams, S.A. & Greene, W.C., 2007. Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation. *Cytokine*, 39(1), pp.63–74.
- Wu, L. & KewalRamani, V.N., 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), pp.859–868.
- Wu, Y., Beddall, M.H. & Marsh, J.W., 2007. Rev-dependent indicator T cell line. *Current HIV research*, 5(4), pp.394–402.
- Yeung, M.L. et al., 2009. Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid. *Nucleic acids research*, 37(19), pp.6575–86.
- Ylisastigui, L. et al., 2004. Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *AIDS (London, England)*, 18(8), pp.1101–8.
- Young, J. et al., 2008. Selective killing of HIV-1-positive macrophages and T cells by the Rev-dependent lentivirus carrying anthrolysin O from *Bacillus anthracis*. *Retrovirology*, 5, p.36
- Zapata, J.C. et al., 2017. The Human Immunodeficiency Virus 1 ASP RNA promotes viral latency by recruiting the Polycomb Repressor Complex 2 and promoting nucleosome assembly. *Virology*, 506(January), pp.34–44.

Zeng, M. et al., 2012. Lymphoid Tissue Damage in HIV-1 Infection Depletes Naïve T Cells and Limits T Cell Reconstitution after Antiretroviral Therapy G. Silvestri, ed. *PLoS Pathogens*, 8(1), p.e1002437.

Zhang, Y. et al., 2014. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology*, 11(1), p.23.

Zhang, Y.J. et al., 1997. Induction of apoptosis by primary HIV-1 isolates correlates with productive infection in peripheral blood mononuclear cells. *AIDS (London, England)*, 11(10), pp.1219–25.

Zhou, A. et al., 2003. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene*, 22(13), pp.2054–64



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada *"Análisis de las Propiedades Dinámicas de los Reservorios Celulares del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1"* que presenta el alumno **Antonio José Bensussen Salazar (5620120108)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay IBT-UNAM	Aprobado	
Dra. Lorena Díaz González CINC-UAEM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. Masuma Atakishiyeva Kyazim Zade CINC-UAEM	Aprobado	
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama FM-UAEM	Aprobado	
Dr. Ramón A. Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. José Fermín Díaz Escudero CIDC-UAEM	Aprobado	