



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGIA  
Trabajo Fin de Grado

# RESISTENCIA GENÉTICA A LA INFECCION POR VIH MEDIADA POR POLIMORFISMOS EN C4BPA

CARLOS GARCIA PADILLA

Universidad de Jaén, 10 de Septiembre de 2013



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGIA  
Trabajo Fin de Grado

# RESISTENCIA GENÉTICA A LA INFECCION POR VIH MEDIADA POR POLIMORFISMOS EN C4BPA

CARLOS GARCIA PADILLA

Universidad de Jaén, 10 de Septiembre de 2013

## Índice

1. Resumen/Abstract.....	Pagina 4.
2. Objetivo.....	Pagina 4.
3. Introducción.....	Paginas 5-13.
4. Materiales y Métodos.....	Paginas 14-20.
4.1. Materiales.....	Paginas 14-15.
4.2. Métodos.....	Paginas 15-20.
4.2.1. Genotipado C4BPA.....	Paginas 16-17.
4.2.2. Cuantificación C4BPA.....	Paginas 17-20.
4.2.3. Test estadístico.....	Pagina 20.
5. Resultados.....	Paginas 21-28.
5.1. Genotipado C4BPA.....	Paginas 21-24.
5.2. Cuantificación C4BPA.....	Paginas 24-28.
6. Discusión.....	Paginas 29-30.
7. Bibliografía.....	Paginas 31-33.

## **1. Abstract**

The proteins present in the envelope of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activate the complement system which plays an important role in the immune response to viral infection. However, the virus out of the host cell membrane incorporated into its complement regulatory proteins (RCA) in order to avoid the cytolytic mechanism. This incorporation of complement regulatory proteins contributes significantly to increasing viral cycle survival rate.

Among these are RCA CD55, CD44, CD59, CR1, CR2, C4BPA. It is the latter that focus our attention throughout this article. There are functional polymorphisms in genes that reduce the ability RCA inhibiting complement of being associated with resistance to bacterial and viral infections.

The hypothesis on which this paper is based is that these mutations, namely a mutation affecting C4BPA, could protect from HIV infection by reducing C4BPA functional capacity as a result of this increase virolysis by the complement system.

## **2. Objetivo**

Caracterizar e identificar el fenotipo y genotipo de C4BPA para así dilucidar el posible papel de C4BPA en la infección frente al VIH.

### 3. Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es un lentivirus de la familia *retroviridae*, causante del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA). El VIH comparte con los retrovirus las características esenciales de esa familia. El virión contiene información genética bajo la forma de ARN, protegido por una envoltura de membrana (1) (2). Los retrovirus insertan información genética en las de las células hospedadoras por acción de la transcriptasa inversa. (3)

Un virión del VIH tiene una forma aproximadamente esférica con un diámetro de unos 80-100nm. Está constituido por tres capas. La exterior es una bicapa lipídica. Posee 72 prolongaciones formadas por glicoproteínas gp120 y gp41 que son de suma importancia en el momento de la unión del virus a la célula hospedadora ya que esta primera interacciona con los receptores en la superficie como de CD4 de la célula que va a ser infectada. Posteriormente mediante un cambio conformacional permite la exposición de gp41 la cual participa en la fusión de las membranas viral y celular. La capa intermedia constituida por la nucleocapsida icosaédrica y la capa interior que está constituida por un ARN de cadena sencilla. Dentro de su genoma el virus presenta genes estructurales (que ocupan la mayor parte de este) y genes que codifican proteínas reguladoras y accesorias (1) (4). En lo referente a su ciclo de replicación el VIH invade esencialmente a linfocitos T CD4, pero también en menor medida a los macrófagos/monocitos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de la microglía del cerebro. La replicación del virus se desarrolla en las siguientes etapas (1) (2):

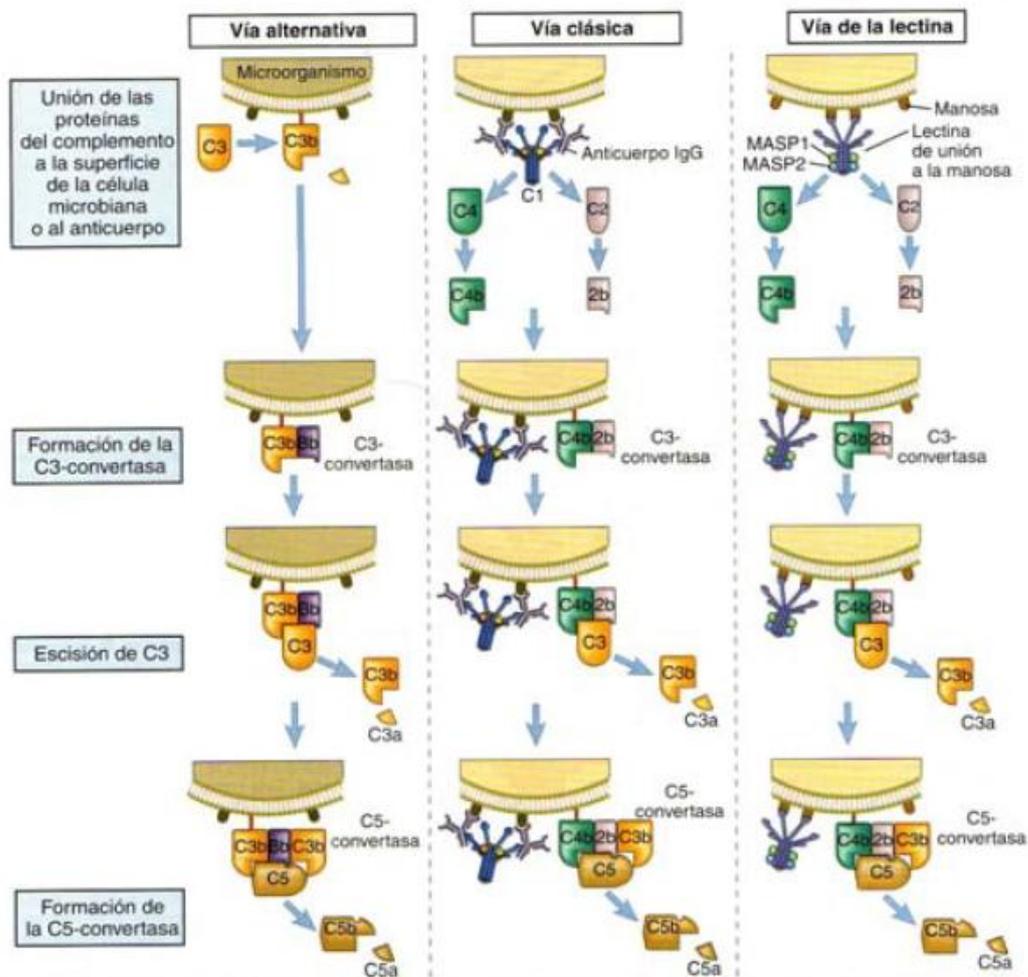
- 1) Fijación: Se basa en el reconocimiento mutuo y acoplamiento de proteínas de la envoltura del virión, las gp120 y gp41 y los receptores de la célula blanca, los CD4.
- 2) Penetración: Una vez reconocido el virión por los receptores de la superficie, se vacía dentro de las células fusionándose la envoltura lipídica del virión con la membrana plasmática de la célula.
- 3) Transcripción inversa del ARN vírico para formar ADNc

- 4) Integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped: Para ello penetra en el núcleo y se inserta en el ADN celular con ayuda de una integrasa, que procede del virión infectante.
- 5) Transcripción del ADN vírico por los mecanismos normales de la célula: El resultado de la transcripción es un ARNm. Una vez procesado este ARN mensajero puede salir del núcleo a través de los poros nucleares
- 6) Traducción: Por acción de peptidasas específicas del VIH, las poliproteínas producto de la traducción son procesadas, para formar proteínas constitutivas del virus. Las proteínas víricas fabricadas se ensamblan, junto con ARN provirales, para formar los componentes internos de la estructura del virión, los que constituyen la cápsida y su contenido
- 7) Gemación: Es el último paso, ocurre cuando los nucleoides víricos se aproximan a la membrana plasmática y se hacen envolver en una verruga que termina por desprenderse, formando un nuevo virión o partícula infectante.

La presencia del VIH en el organismo desata la respuesta inmune. El sistema del complemento es uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad humoral y también lo es de la inmunidad innata. Su principal misión es la de lisar agentes infecciosos presentes en el plasma. Consta de proteínas séricas y de superficie celular que interactúan entre ellas y con otras moléculas del sistema inmunitario de una forma sumamente regulada. La activación del complemento supone la proteólisis secuencial de proteínas para generar enzimas con actividad proteolítica. Los productos de dicha activación se unen de forma covalente a la superficie de las células microbianas o a los anticuerpos fijados a los microorganismos. Las distintas proteínas que conforman el sistema del complemento forman un complejo de ataque a la membrana, el cual genera un poro en la membrana microbiana lisándola. Este sistema del complemento está inhibido de forma endógena por el propio organismo mediante proteínas reguladoras presentes en las células normales del huésped y ausente en el microorganismo evitando así enfermedades autoinmunes. (5)

Existen tres vías de activación del sistema del complemento:

1. Vía Clásica: Activada por ciertos isotipos de anticuerpos unidos a antígenos.
2. Vía alternativa: Se activa sobre las superficies de las células microbianas sin los anticuerpos.
3. Vía de la lectina: Activa por una lectina plasmática que se une a manosas sobre los microorganismos.



**Figura 1.** Pasos iniciales de la activación del complemento

El acontecimiento central en la activación del complemento es la proteólisis de la proteína del complemento C3 para generar productos biológicamente activos y la posterior unión covalente de un producto de C3, denominada C3b, a las superficies de las células microbianas o a los anticuerpos unidos a antígenos.

La activación del complemento depende de la generación de dos complejos proteolíticos, la C3-convertasa, que escinde C3 en dos grandes fragmentos proteolíticos denominados C3a y C3b y la C5-convertasa, que escinde C5 en C5a y C5b. La activación del complemento consta de unos pasos iniciales, que originan la proteólisis de C3, y de unos pasos finales que llevan a la formación de un complejo proteínico que lisa las células (1) (5) (6).

Como hemos dicho anteriormente la activación de la cascada del complemento y la estabilidad de las proteínas del complemento activas se encuentran reguladas estrechamente para evitar la activación del complemento en las células normales del huésped y limitar la duración de la activación del complemento. Esta regulación esta mediada por varias proteínas circulantes y de la membrana celular conocidas como proteínas reguladoras de la actividad del complemento (RCA). Estas RCA mantienen un control estricto sobre varias etapas de la activación del sistema del complemento así como en el resultado de este. Este control se mantiene mediante cuatro estrategias básicas (6):

- 1) Inhibición de la activación de C1 mediante el inhibidor de la proteasa de serina que forma un complejo con C1r y C1s inactivándolos.
- 2) Disociación de los componentes de la convertasa C3, reduciendo la vida media del complejo mediado por los denominados “Decay accelerators” como el factor H, C4bp, DAF (CD55) y CR1.
- 3) Activación Cofactor que permite al Factor I romper e inactivar C3b o C4b, además de las tres proteínas anteriores también participa MCP(CD46)
- 4) Inhibición del complejo final de ataque a la membrana , bien por unión a c5b-7 y bloqueo de la interacción con la membrana plasmática o mediante el bloqueo de la polimerización de C9 (CD59, HRF)

La siguiente tabla muestra las principales proteínas reguladoras del sistema del complemento

Receptor	Estructura	Distribución	Interacción	Función
Inhibidor de C1	104 kD	Proteína plasmática	C1r, C1s	Inhibición de proteasa de serina; se une

				a C1r y C1s y los disocia de C1q
<b>Factor I</b>	Dímero de 88 kD de subunidades de 50 y 38 kD	Proteína plasmática	C4b, C3b	Proteasa de serina; escinde C3b y C4B, usando como cofactor a factor H, MCP, C4BP o CR1.
<b>Factor H</b>	150 kD; múltiples RPCC	Proteína plasmática	C3b	Se une a C3b y desplaza a Bb. Cofactor de la escisión de C3b mediada por factor I
<b>Proteína de unión a C4 (C4BP)</b>	570 kD	Proteína Plasmática	C4b	Se une a C4b y desplaza a C2. Cofactor de la escisión de C4b mediada por factor I
<b>Cofactor de membrana para proteínas (MCP, CD48)</b>	45-70 kD; cuatro RCPP	Leucocitos, células epiteliales, células endoteliales	C3b, C4b	Cofactor de la escisión de C3b y C4b mediada por factor I
<b>Factor acelerador de la degradación (DAF)</b>	70 kD; unido a GPI, cuatro RCPP	Células sanguíneas, células endoteliales, células epiteliales	C4b2b, C3bBb	Desplaza a C2b de C4b y a Bb de C3b (disociación de C3-convertasas)
<b>CD59</b>	18 kD; unida a	Células	C7 y C8	Bloquea la

	GPI	sanguíneas, células endoteliales, células epiteliales	unión de C9 e impide la formación del complejo de ataque a la membrana
--	-----	---	---

**Figura 2.** Principales proteínas reguladoras del Sistema del Complemento.

Muchos patógenos humanos, desde bacterias hasta pequeños nematodos se sirven de estas proteínas reguladoras del sistema del complemento para escapar de la acción citolítica del sistema del complemento. La adquisición de esta capacidad hace alusión a la convergencia evolutiva. Esta convergencia evolutiva postula que distintas especies evolutivamente hablando presentan estructuras o mecanismos similares debido a la adaptación a un medio similar. Un ejemplo de esta convergencia evolutiva sería la utilización de las RCA por parte de los distintos patógenos (bacterias, nematodos, garrapata o virus) para poder colonizar el organismo humano. (7)

Así estos patógenos se recubren de las distintas RCA presentes en la membrana de las células que infectan (CD46, CD55 y CD59) o sintetizan sus propios inhibidores del complemento. De esta manera consiguen disfrazarse ante los ojos del sistema del complemento al presentar las mismas proteínas o factores existentes en las células normales. Por ejemplo los miembros de la familia de *orthopoxvirus*, *herpesvirus* y de *retrovirus* imitan proteínas RCA codificando proteínas homologas a las del sistema de complemento que aceleran la descomposición del complejo C3 convertasa. (7) (8) (9)

El virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) es un claro ejemplo de patógeno que utiliza esta vía para replicarse y no ser detectado por el sistema del complemento, siendo demostrado la incorporación de las proteínas CD46, CD55 y CD59 en los viriones aumentando así la resistencia del virus al ataque del complemento. Este hecho es de gran importancia para el ciclo viral puesto que tanto los viriones como las células infectadas serán inmunes a los anticuerpos circulantes. De la misma manera el VIH-1 sintetiza proteínas

incluidas en su membrana como es el caso de gp41 que atrae al Factor H, una RCA que inhibe al sistema de complemento uniéndose a C3b y desplazando a Bb. Este último mecanismo es utilizado por una gran variedad de patógenos humanos (9) (10) (11) (12).

Sin embargo la exposición al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 no siempre se encuentra asociado a una infección productiva. En los últimos años gracias a una recopilación de datos se ha podido determinar la probabilidad de infección en función de los distintos tipos de contacto con el virus como se muestra en la siguiente figura:

<b>Tipo de exposiciones</b>	<b>Número estimado de infecciones por cada 10.000 exposiciones</b>
<b>Trasfusiones de sangre</b>	9000 (13)
<b>Parto</b>	2500 (14)
<b>Inyección de droga</b>	67 (15)
<b>Coito anal receptivo</b>	50 (16) (17)
<b>Aguja de laboratorio percutánea</b>	30 (18)
<b>Coito vaginal receptivo</b>	10 (16) (17) (19)
<b>Coito anal insertivo</b>	6,5 (16) (17)
<b>Coito vaginal insertivo</b>	5 (16) (17)
<b>Felación receptiva</b>	1 (17)
<b>Felación insertiva</b>	0 (17)

**Figura 3.** Tipo de Exposiciones y número de infecciones.

En el caso de una transfusión con material contaminado la tasa de infección es bastante alta (90%) así como en el caso de parto (25%) pero al mirar el resto de prácticas de riesgo, se evidencia un descenso en la tasa de infección del virus. Este hecho hace plantearse una inmunidad innata frente a la infección del virus, inmunidad innata que más tarde fue demostrada.

Llegados a este punto debemos de poner en el punto de mira a un grupo de individuos que aun que están expuestos a la infección del virus permanecen seronegativos para VIH, son los conocidos como expuestos no infectados (ENI). (20)

Estos individuos constituyen un grupo muy importante para identificar factores genéticos asociados a esta inmunidad innata frente al virus.

De hecho en los últimos años muchos factores genéticos asociados han sido identificados gracias a estudios de asociación de genes candidatos que influyen en la tasa de infección o en la velocidad del curso clínico de la infección. Estos genes pueden ser clasificados en tres tipos (21):

- 1) Polimorfismos en genes del virus que afectan a la capacidad replicativa o a su evasión del sistema inmunitario.
- 2) Polimorfismos humanos en genes codificantes para proteínas necesarias para la correcta entrada y replicación del virus en las células humanas.
- 3) Polimorfismos humanos en genes codificantes para proteínas que modulan la respuesta inmunitaria innata o adquirida frente a la infección

Estos últimos han sido asociados con esta inmunidad innata frente al virus del VIH. Esta respuesta innata frente a la infección por VIH-1 depende de varios factores entre los que destaca el sistema del complemento, ya que como hemos dicho anteriormente este sistema es de vital importancia a la hora de la lisis bacteriana y/o vírica. En especial la activación del mismo por la ruta independiente de la unión de anticuerpos. La activación normal de la ruta del complemento depende de la polimerización de anticuerpos (especialmente IgG) sobre la superficie del patógeno y la activación de la ruta clásica dependiente de C1. Sin embargo, superficies “sospechosas” con características especiales (por ejemplo alta concentración de residuos de manosa, N-acetilglucosamina, etc....) pueden desencadenar la activación de las tres rutas independientemente de la presencia de anticuerpos y ello constituye una primera línea de defensa innata frente a diversos microorganismos. C1q y MBL son moléculas de reconocimiento solubles que identifican y se unen a varios patógenos, incluyendo el VIH-1. Son capaces de asociarse a proteasas para desencadenar la activación del complemento a través de las rutas clásica y la dependiente de lectina. Este proceso desencadena la inactivación viral. El VIH-

1 es capaz de activar el complejo C1 a un nivel similar al obtenido por inmunocomplejos, dicha activación depende de la unión directa de C1q a la proteína de la envuelta gp41 (6) (22) (23)

La inmunidad innata de estos individuos que han estado expuestos a la infección se explica haciendo referencia a los numerosos polimorfismos que afectan tanto a los genes del complemento como del RCA los cuales pueden producir mutaciones funcionales. Así estas mutaciones producirían proteínas anómalas que no podrían ser aprovechadas por el virus para escapar del ataque citolítico del complemento evitando así la infección y confiriendo una inmunidad innata al individuo (21).

Los individuos portadores de polimorfismos que disminuyan la capacidad funcional de las proteínas RCA o bien su sitio de interacción con gp120/gp41 podrían tener un fenotipo de resistencia natural a la infección mediada por una mayor capacidad de lisis viral. Estudios recientes han postulado que mutaciones funcionales en C4BP y más concretamente en la cadena alfa codificada por el gen C4BPA están asociadas con esta inmunidad innata (24).

La proteína de unión a C4b (C4BP) es una proteína implicada en el sistema del complemento, donde actúa inhibiéndolo. Está formada por siete cadenas alfa idénticas y una única cadena beta. Los genes que codifican para la cadena alfa de C4BP (C4BPA) y la cadena beta (C4BPB) se encuentran en el brazo largo del cromosoma 1 próximos a otros genes que codifican inhibidores del complemento. Su función es la inhibir la acción de C4, más específicamente en la vía clásica y de la lectina, aunque también tiene la capacidad de unirse a C3b y acelerar la descomposición de C3-convertasa además de ser un cofactor de serina proteasa I (Factor H), que escinde C4b y C3b.

Puesto que tanto al inhibir al sistema de complemento como al participar como cofactor en la inhibición llevada a cabo por el Factor H una mutación en este RCA podría influir en la inmunidad innata frente a VIH.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Materiales**

En lo referente al material humano partimos de una población sana de individuos donantes de sangre de la provincia de Jaén, dichos individuos nunca han estado expuestos a la infección y son seronegativos para VIH-1, Virus de la Hepatitis C, Virus de la Hepatitis B, Sífilis y Gonorrea para llevar a cabo la genotipación de C4BPA. Para realizar la cuantificación utilizamos muestras procedentes de pacientes de la provincia de Córdoba, que previamente fueron genotipadas con el fin de conocer el genotipo de C4BPA

Todo el material no biológico empleado fue aportado por la universidad de Jaén, en concreto por el departamento de inmunogenética y financiado con fondos procedentes de la Junta de Andalucía (Consejería de Salud y Bienestar Social).

Como material técnico se utilizó un termociclador con sensores capaces de captar fluorescencia en el cual se llevó a cabo la PCR a tiempo real, una centrifugadora para evitar burbujas que interfiriesen con los resultados finales, una cabina de flujo vertical cuyo fin era el de evitar la contaminación de las muestras por parte del investigador y un agitador así como pipetas de distintos volúmenes. En todo momento se utilizó material estéril para evitar la contaminación.

Cabe destacar la utilización de una habitación específica libre de ARNASAS para llevar a cabo la preparación de las muestras y así evitar la contaminación de las mismas.

En cuanto a material fungible, se emplearon puntas de pipetas con filtro con el fin de evitar la contaminación de las muestras por la posible producción de aerosoles a la hora de pipetear, entre otro material usual en el laboratorio así como todo el material necesario para preparar la reacción de la PCR. Haciendo hincapié en los reactivos utilizados para llevar a cabo la PCR a tiempo real,

podemos destacar el kit enzimático que además de proporcionar la enzima taq contenía tampón para estabilizar la reacción así como las distintas sondas específicas para C4BPA (tanto la de cuantificación como la de Genotipado) y Actina (cuantificación)

## **4.2. Métodos**

Se procedió a una extracción voluntaria de sangre de estos individuos por parte de los sanitarios del Hospital Ciudad de Jaén y su posterior traslado a la universidad de Jaén para su análisis en condiciones de frío para evitar que las muestras sufriesen algún tipo de deterioro. En las instalaciones de la universidad de Jaén se procedió al tratamiento de la muestras de sangre para llevar a cabo la genotipación y cuantificación del gen C4BPA. En primer lugar genotipamos el ADN de donantes sanos para identificar individuos portadores de los marcadores genéticos asociados a resistencia o susceptibilidad a la infección, tras esto aislamos las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación en gradiente de ficoll. Para terminar aislaremos el ARN total para la cuantificación de la expresión de ARNm, Este tratamiento de la muestras consistió en la extracción del ARN y la transformación del ARNm en cDNA en el caso de la cuantificación de C4BPA. En cuanto a la genotipación de C4BPA, solo en necesario llevar a cabo la lisis de las células sanguíneas con el fin de obtener el ADN de las mismas. Tanto la genotipación como la cuantificación de C4BPA se realizaron mediante la técnica de PCR a tiempo real.

La PCR a tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. En esta variante se utiliza del mismo modo que en la PCR convencional, un molde de ADN, cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

Esta técnica presenta una importante ventaja a la frente a la PCR convencional a la hora de cuantificar el resultado de la misma. La PCR convencional requiere de un procedimiento posterior para observar los resultados, un procedimiento, que al ser llevado a cabo puede presentar un fallo humano lo que no hace validos los resultados, este problema no existe en la PCR a tiempo real.

El porqué de que la cuantificación requiera de la extracción previa de ARN y su transformación en cDNA reside en el dogma principal de la biología molecular el cual dice que un gen transcribe para un ARNm, el cual se traducirá por acción de los ribosomas en una proteína de esta manera si tras transformar el ARNm en cDNA, la sonda hibrida con el mismo y se produce la amplificación mediante la PCR del fragmento deseado se puede afirmar que ese gen esta transcribiendo para esa proteína.

Este problema no está presente en la genotipación pues lo que único que se busca con esta prueba es determinar el genotipo del gen en cada individuo y para ello solo es necesario ADN sobre el que realizar la PCR a tiempo real.

#### **4.2.1. Genotipación C4BPA**

En cuanto a la genotipación se procedió a la optimización de la técnica puesto que los primeros resultados de la misma no eran validos. Para llevar a cabo esta optimización variamos ciertas variables como la adicción de una menor cantidad de ADN para evitar asociaciones inespecíficas de la sonda y mejorar así la unión a la región especifica donde se encuentra el C4BPA, un aumento de la temperatura y del numero de ciclos para mejorar la desnaturalización del ADN así como un rendimiento mas optimo de la enzima encargada de la replicación del ADN o la adicción de DMSO para evitar interferencias.

Tras variar estos parámetros comprobamos que tanto la adicción de DMSO como la reducción en la cantidad de ADN no mejoran los resultados de la prueba. Todo lo contrario que un aumento en la temperatura y en el número de ciclos. De esta manera un aumento en la temperatura en un grado o un

aumento en el número de ciclos optimiza el proceso haciendo validos los resultados.

<b>Condiciones Temperatura Y Numero de ciclos PCR a tiempo real</b>	
<b>1 ciclo</b>	95°C 5'
<b>45 ciclos</b>	95 °C 10'' 60°C 25''(Fluorescencia)

**Figura 4.** Condiciones del Genotipado a PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la PCR a tiempo real se prepararon las muestras en un cuarto especializado libre de ARNasas. Las muestras fueron preparadas en una cabina de flujo vertical con el objeto de evitar la contaminación de la muestra por parte del personal del laboratorio. A su vez todo el material usado en el proceso fue esterilizado asegurando de esta manera la ausencia de cualquier material biológico externo que pudiese interferir o alterar el resultado final.

El ADN empleado fue añadido a una mezcla específica para el fin que perseguimos en las siguientes cantidades:

<b>Mezcla Final Por Cada Pocillo</b>	<b>Volumen ( microlitros)</b>
<b>Agua destilada estéril</b>	3.6
<b>Kapa Mix</b>	6.3
<b>Sonda Genotipación C4BPA</b>	0.1
<b>ADN muestra</b>	1
<b>Volumen Final</b>	11

**Figura 5.** Mezcla final por cada pocillo

#### **4.2.2. Cuantificación C4BPA**

La cuantificación de C4BPA requiere de un proceso previo más complejo como hemos mencionado antes. Este procedimiento consta de dos pasos:

## 1.- Extracción de ARN

Añadimos 1ml de Tripure a 50-100 mg de tejido y homogenizamos el tejido en un homogeneizador. Lo incubamos durante 5 minutos a 25 °C para disociar los complejos nucleoproteicos. A continuación añadimos 0,2 ml de cloroformo (0,2 ml por 1ml de Tripure) y agitamos vigorosamente durante 15 segundos. Posteriormente se incubo la muestra durante 10 minutos a 25 °C y se centrifugo a 12.000 xg, durante 15 minutos a 8 °C, obteniendo al final 3 fases bien diferenciadas: una acuosa (contiene ARN), una interfase (contiene ADN) y una orgánica (contiene proteína).

Para aislar el ARN se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipito con 0,5 ml de isopropanol (0,5 ml por cada mililitro de Tripure) mezclándolo por inversión e incubándolo durante 10 minutos a 25 °C. A continuación se centrifugó a 12.000 xg durante 10 minutos a 8°C y descartamos el sobrenadante, prosiguiendo con el lavado del pellet con 1ml de Etanol al 75% (1ml de etanol por cada mililitro de Tripure).

Continuamos centrifugando la muestra a 7500 xg durante 5 minutos a 8°C. Tras esto descartamos el sobrenadante de nuevo y resuspendemos el pellet en agua libre de RNAasas o DECP tratado con 0,5% de SDS incubándolo durante 10-15 minutos a 55-60 °C.

Finalmente se conservo la muestra de RNA a -15°C.

## 2.- ARNm a cDNA

Para obtener un volumen de reacción de 20 microlitros usamos un volumen de 250 ng de ARNm. Adicionamos a un tubo de centrifuga libre de nucleasas los siguientes componentes:

1. 1 microlitro de oligo(dT)(50micromolar)
2. 250 ng de ARNm
3. 1 microlitro mM dNTP Mix
4. 11 microlitros de agua destilada estéril

Calentamos la mezcla a 65 °C durante cinco minutos para acabar incubándola en hielo durante al menos un minuto. A continuación procedimos con la centrifugación de la mezcla y la adicción de:

1. 4 microlitros 5X First-Strand Buffer
2. 1 microlitro 0,1M DTT
3. 1 microlitro de RNase Out (Inhibidor de ARNasas)
4. 1 microlitro de SuperScript III RT

A continuación mezclamos con la pipeta la mezcla e incubamos la muestra durante 5 minutos a 25 °C. Posteriormente incubamos la muestra durante 1 hora a una temperatura de 55 °C y finalizamos con la inactivación de la reacción. El cDNA puede ser utilizar ahora para llevar a cabo la PCR a tiempo real.

A la hora de determinar o cuantificar la expresión de un gen, es decir de la proteína que sintetiza, es necesario utilizar un normalizador que suele ser otro gen para poder determinar la expresión del gen problema. Este normalizador debe ser un gen que se exprese de manera constante en el organismo, de esta manera podríamos comparar la expresión de ambos genes y de dicha comparación deducir la expresión del gen problema.

En nuestro caso utilizamos como normalizador de la prueba la actina, esta proteína es sintetizada de manera constante y en cantidades relativamente importantes ya que debido a la renovación celular y/o destrucción tisular, el gen que la codifica se encuentra activo de manera constante.

En cuanto a las condiciones en las que se llevo a cabo la PCR a tiempo real en el caso de la cuantificación de C4BPA, se llevo a cabo un pequeño proceso de optimización tras unos resultados nulos que consistió en aumentar la cantidad de la sonda específica para C4BPA y reducir la cantidad de la sonda específica para actina puesto que la intensidad de la señal de esta ultima ocultaba la de la primera.

**Condiciones Temperatura Y Numero de ciclos PCR a tiempo real**

<b>1 ciclo</b>	95°C 5'
<b>45 ciclos</b>	95 °C 25'' 60°C 1' (Fluorescencia)

**Figura 6.** Condiciones Cuantificación de PCR a tiempo real

De la misma manera que en la genotipación, para llevar a cabo la PCR a tiempo real se prepararon las muestras en un cuarto especializado libre de ARNasas. Las muestras fueron preparadas en una cabina de flujo vertical con el objeto de evitar la contaminación de la muestra por parte del personal del laboratorio. A su vez todo el material usado en el proceso fue esterilizado asegurando de esta manera la ausencia de cualquier material biológico externo que pudiese interferir o alterar el resultado final.

<b>Mezcla Final Por Cada Pocillo</b>	<b>Volumen ( microlitros)</b>
<b>Agua destilada estéril</b>	3.1
<b>QuantiMlx (Biotools)</b>	6.3
<b>Sonda C4BPA</b>	1.5
<b>Sonda Actina</b>	0.1
<b>ADN</b>	1
<b>Volumen Final</b>	12

**Figura 7.** Mezcla por cada pocillo**4.2.3. Test estadístico**

Por último hablaremos de los test estadísticos a los que han sido sometidos los datos con el fin de saber si son estadísticamente significativos. Se llevo a cabo una desviación estándar así como la Prueba U de Mann-Whitney, esta prueba es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es, de hecho, la versión no paramétrica de la habitual prueba t de Student. Utilizamos esta prueba en lugar de la t de Student puesto que no tenemos el mismo número de muestras en una población que en la otra.

## 5. Resultados

### 5.1. Genotipado C4BPA

Nº donante	Distribución Alélica
7	AA
10	AA
13	AA
15	AA
18	AA
19	AA
33	AA
71	AA
73	AA
77	AA
78	AA
93	AA
95	AA
99	AA
108	AA
109	AA
112	AA
113	AG
115	AA
117	AG
121	AA
122	AA
124	AA
141	AA
144	AA
148	AG
154	AA
161	AA
163	AA
167	AA
174	AA
175	AG
182	AA
189	AA
191	AA
195	AA
200	AA
202	GG
204	AA
208	AA
213	AA
215	AG

Azul: Homocigótico A  
 Amarillo:  
 Homocigótico G  
 Verde: Heterocigoto

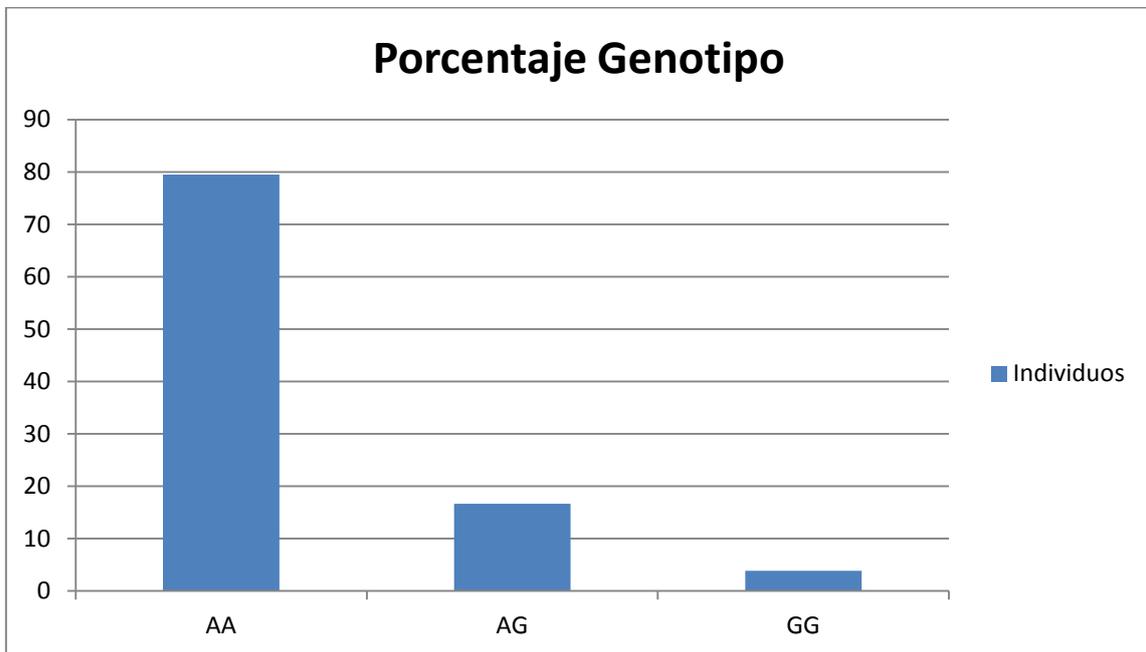
218	AG
220	AA
222	AA
227	AA
230	AA
232	GG
234	AG
244	AG
245	AA
254	AG
261	GG
264	AA
265	X
268	AA
272	AA
277	AA
279	AA
285	AA
291	AA
295	AG
296	AG
297	X
299	AA
300	AA
302	AG
303	X
304	X
310	AA
321	X
323	X
337	X
343	AA
344	X
351	X
356	AA
363	X
365	AA
374	X
376	X
377	X
379	X
381	X
382	X
386	AG
394	X
399	X

401	X
403	X
408	AA
413	AA
418	AA
431	AA
435	AA
450	X

**Figura 8.** Resultado de la genotipación

Los resultados nulos se deben a un error humano en cuanto a la hora de realizar el proceso o a una falta de ADN en la muestra de ciertos pacientes. Las primeras pruebas presentaban un número elevado de muestras nulas pero tras llevar a cabo la optimización del proceso ese número de muestras nulas se redujeron en gran parte.

En la siguiente tabla podemos ver los datos agrupados de los distintos genotipos estudiados. Los datos nulos no fueron incluidos en esta figura para evitar una distorsión en los datos.



**Figura 9.** Genotipado Individuos

Como podemos ver de las cien muestras recogidas el 79 % presentan el genotipo AA.

De estos datos también podemos deducir que el alelo G es dominante respecto al A y este primero es el que podría aportar la protección frente a la infección por VIH. De la misma manera podemos dilucidar que no estamos frente a una mutación puntual funcional puesto que dentro de la población estudiada el porcentaje del alelo G es mayor al 1%, por lo tanto estamos frente a un polimorfismo de un nucleótido simple que afecta a la producción de la proteína en el individuo.

## 5.2 Cuantificación C4BPA

Dividimos las muestras en tres lotes diferentes para evitar un error humano a la hora de realizar la PCR a tiempo real. En cada lote incluimos muestras distintas a las presentes en el resto de lotes con genotipo de protección (AG/GG) y con genotipo de riesgo (AA) de distintos pacientes. Todos los datos obtenidos de la cuantificación fueron analizados por el mismo programa informático que utilizamos a la hora de realizar la cuantificación, MxPro, software aportado por la universidad de Jaén.

Individuo	Genotipo
1	AA
2	AG
3	GG
4	AA
5	AA
6	AA
7	AA
8	AA

9	AA
10	GG
11	GG
12	AG
13	AA
14	AG
15	AG
16	AA
17	AA
18	AA
19	AA
20	AA

**Figura 10.** Número de Individuos y Su Correspondiente Genotipo del Lote 1

Individuo	Genotipo
1	AA
2	AA
3	AA
4	AA
5	AA
6	AG
7	AG
8	AA
9	AG

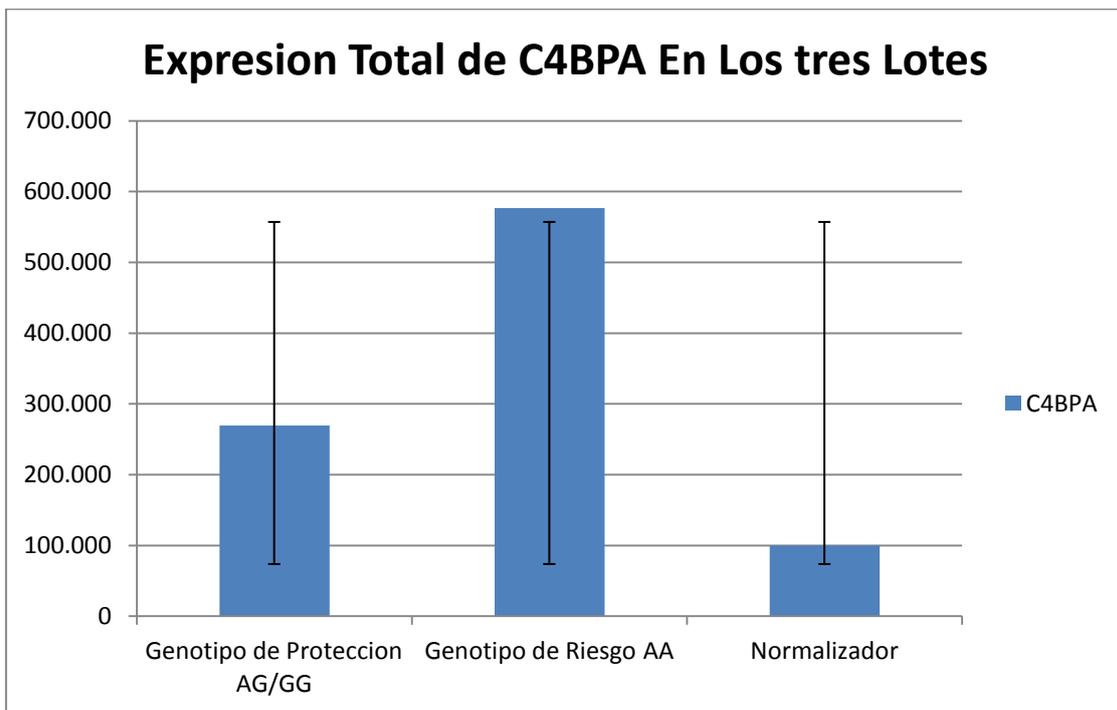
10	AA
11	AG
12	AA
13	AG
14	AG
15	AG
16	AG
17	AG
18	AA
19	AA
20	AA

**Figura 11.** Número de Individuos y Su Correspondiente Genotipo del Lote 2

Individuo	Genotipo
1	AG
2	AG
3	AG
4	AG
5	AA
6	AA
7	AG
8	AA
9	AG

10	AG
11	AG
12	AG
13	AG
14	AA
15	AG
16	AA
17	AA
18	AA
19	AA
20	AA

**Figura 12.** Número de Individuos y Su Correspondiente Genotipo del Lote 3



**Figura 13.** Expresión C4BPA en función del genotipo

Tras ser sometidos a test estadísticos podemos afirmar que estos datos no son significativos estadísticamente puesto que al realizar la prueba U de Mann-Whitney el valor p es 0,9442. Lo que indica que el resultado no es significativo a  $p \leq 0.05$ . De la misma manera el valor U es 95,5. El valor crítico de U en  $p \leq 0,05$  es de 54. Por lo tanto, el resultado no es significativo en  $p \leq 0,05$ . El uso de esta prueba en detrimento de la t de student ha sido comentado en el apartado de análisis estadísticos.

Aunque en la grafica se puede apreciar la diferente expresión de C4BPA entre los distintos genotipos estos datos no son significativos. En el caso de que si fuesen estadísticamente significativos el genotipo de resistencia tendría una menor expresión de esta proteína frente al genotipo de riesgo. Es decir aquellas personas que portasen los alelos AA tendrían una mayor expresión o mejor dicho una expresión normal de C4BPA mientras que aquellos que presentasen los alelos AG o GG tendrían una menor expresión de esta proteína. Este hecho es relevante a la hora de poner de manifiesto la participación de esta RCA en la respuesta inmune frente a un ataque viral. Lo que si podemos afirmar es que el genotipo AG o GG es consecuencia de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que produce ARNm aunque en menor cantidad.

El que estos datos no sean estadísticamente significativos se puede deber a un numero bajo de individuos o bien a que el normalizador utilizado a la hora de realizar la cuantificación en este caso la actina no sea adecuado. Se debería repetir el experimento bajo las mismas condiciones variando únicamente el número de la población y el normalizador para dilucidar porque estos datos no han sido estadísticamente significativos.

## 7. Discusión

A la vista de los resultados obtenidos durante el proceso experimental podemos afirmar la existencia de tres genotipos distintos; un genotipo común dentro de la población (AA) y dos genotipos menos comunes dentro de la misma AG y GG. Por desgracia los datos correspondientes a la cuantificación no son estadísticamente significativos por lo que no podemos afirmar con certeza cuál es el fenotipo de riesgo y cual es de protección puesto este ultimo estaba asociado hipotéticamente a un descenso en la expresión de C4BPA como consecuencia de una mutación funcional de C4BPA que daría lugar al genotipo AG y GG. Esta no significación estadística de los resultados es debida a la utilización de un normalizador inadecuado, la actina, cuya expresión teóricamente era mayor que C4BPA y aunque es así no lo es estadísticamente por lo que los resultados no son validos. Esto nos conduce a la búsqueda de un normalizador adecuado que nos permita cumplir los objetivos que buscábamos al llevar a cabo este proceso experimental así como la de comprobar nuestra hipótesis.

En el caso que nuestros resultados hubiesen sido estadísticamente significativos podríamos afirmar que el fenotipo de protección seria el correspondiente al genotipo GG y AG debido a que al presentar una menor expresión de C4BPA, esta proteína no podría estar presente en las cantidades suficientes como para ser aprovechadas por el VIH para escapar del sistema del Complemento. No hubiésemos podemos afirmar que una mutación aislada en esta RCA fuese una de las principales causas de la inmunidad innata frente a la infección del VIH pero si nos hubiese permitido poner la primera piedra para llevar a cabo otro proceso experimental cuyo fin sería el de determinar su grado de participación en la inmunidad innata.

Este SNP que da lugar al fenotipo de protección recibe el nombre de rs2842704 y se localiza el cromosoma 1: 207289436 en un intrón, por lo que su aparición en el ARNm se debe a un proceso alternativo de splicing.

Como ya sabemos los genes que codifican para las RCA se encuentran cercanos cromosómicamente, este hecho nos hace plantearnos si esta mutación en C4BPA es aislada o por si el contrario en una mutación que engloba a mas RCA. Si esta mutación no fuese aislada y afectase al resto de RCA, es decir que se produjese a lo largo de todo el segmento cromosómico que contiene los genes RCA, podríamos extender la mutación encontrada en C4BPA al resto de proteínas reguladoras explicando así la inmunidad innata aportada por los polimorfismos en las RCA frente a la infección por VIH. Si por el contrario esta mutación es aislada de la misma manera que podría ser su transmisión hereditaria, es decir, si el gen C4BPA no se encuentra lo suficientemente cercano al resto de genes para que se transmitan a las siguientes generaciones en bloque, no sería por si solo capaz de proteger al individuo frente a la infección por VIH y la inmunidad innata dependería del conjunto global de mutaciones aisladas de las distintas RCA utilizadas por el virus.

Estos datos abrirían nuevas puertas a la investigación de la inmunidad innata frente a la infección por VIH puesto que ponen en el punto de mira una posible mutación conjunta de los genes de RCA, mutación conjunta que debe ser probada experimentalmente. De la misma manera señalan a C4BPA como una diana farmacológica igual que el resto de proteínas reguladoras del sistema del complemento. Así la fabricación de un fármaco capaz de reducir sin llegar a inhibir la síntesis de estas proteínas, aunque haría al individuo más sensible a las infecciones autoinmunes lo protegería de una posible infección. Este fármaco podría ser administrado a personas que se encuentren en regiones en las que la incidencia del VIH sea mayor reduciendo el contagio

## 7. Bibliografía

1. Oxford, L. C. y J. (2008). *Virología humana: texto para estudiantes de medicina, odontología y microbiología*. México, McGraw-Hill Interamericana. Edición 3<sup>o</sup> ISBN: 978-97-0106-545-7
2. Madigan, M., R. Guerrero et al. (2009). *Biología de los microorganismos*. Madrid, Pearson education. Edición 12. ISBN: 978-84-7829-097-0
3. Lévy, J. A. (1993). *HIV pathogenesis and long-term survival*. *AIDS* 7 (11asdd): pp. 1401–10
4. Cesar Teijon Lopez, Amando Garrido Pertierra, R.O., Carlos Castel Aznar (2001). *Bioquímica metabólica: Concepto y test*. Madrid, Tebar. Edición 1. ISBN: 84-95447-29-0
5. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai (2012) *Inmunología celular y molecular*. Madrid, Elsevier, D.L. Edición 7<sup>o</sup>. ISBN: 978-84-8086-916-4
6. Tosi MF. *Innate immune responses to infection*. Current reviews of allergy and clinical immunology. 2005;116 (2), 241-249
7. Carroll MC. (2004) The complement system in regulation of adaptive immunity; *Nature Immunology*, 5: 981-986
8. Tortorella D., et al. *Viral subversión of the immune system*. *Ann.Rev. Immunol.* 2000, 18, 861- 926.
9. Saifuddin M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *J. Gen. Virol.* 1997, 78, 1907-1911.
10. Schmitz J. et al. Antibody-dependent complement mediated cytotoxicity in sera from patients with HIV-1 infection is controlled by CD55 and CD59. *J. Clin. Invest.* 1995, 96, 1520-1526.
11. Saifuddin M., et al. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line derived and primary isolates of HIV-1. *J. Exp. Med.* 1995, 182, 501-509.
12. Stoiber H., et al. *Role of complement in HIV-1 infection*. *Ann. Rev. Immunol.* 1997;15, 649-674

13. Donegan, E., Stuart, M., Niland, J. C., Sacks, H. S., Azen, S. P., Dietrich, S. L., Faucett, C., Fletcher, M. A., Kleinman, S. H., Operskalski, E. A., et al. *Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations*. *Ann. Intern. Med.* , 1990. **113**(10): p. 733-739.
14. Coovadia, H., *Antiretroviral agents--how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(3): p. 289-92.
15. Kaplan, E.H. and R. Heimer, *HIV incidence among New Haven needle exchange participants: updated estimates from syringe tracking and testing data*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1995. **10**(2): p. 175-6.
16. *Comparison of female to male and male to female transmission of HIV in 563 stable couples*. *European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV*. *Bmj*, 1992. **304**(6830): p. 809-13.
17. Varghese, B., et al., *Reducing the risk of sexual HIV transmission: quantifying the per-act risk for HIV on the basis of choice of partner, sex act, and condom use*. *Sex Transm Dis*, 2002. **29**(1): p. 38-43.
18. Bell, D.M., *Occupational risk of human immunodeficiency virus infection in healthcare workers: an overview*. *Am J Med*, 1997. **102**(5B): p. 9-15.
19. Leynaert, B., A.M. Downs, and I. de Vincenzi, *Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: variability of infectivity throughout the course of infection*. *European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV*. *Am J Epidemiol*, 1998. **148**(1): p. 88-96.
20. Shacklett, B.L., *Understanding the "lucky few": the conundrum of HIV-exposed, seronegative individuals*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2006. **3**(1): p. 26 - 31.
21. Lama J, Planelles V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology*. 2007 Jul 25;4:52.
22. Georg Huber, Zoltán Bánki, Susanne Lengauer and Heribert Stoiber. (2011) Emerging role for complement in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*.

23. Suzanne Willey, Marlén MI Aasa-Chapman, Stephen O'Farrel, Pierre Pellegrino, Ian Williams, Robin A Weiss, Stuart JD Neil (2011). Extensive complement-dependent enhancement of HIV-1 by autologous non-neutralising antibodies at early stages of infection. *Retrovirology*
  
24. Rocio Herrero, Piotr Konieczny, Juan Antonio Pineda, Antonio Rivero, Angela Camacho, Juan Macía, Marina Laplana, Piotr Konieczny and Joan Fibla, Antonio Caruz. Association of Complement Receptor 2 and C4BPA polymorphisms with natural resistance to HIV-1 infection. (Submitted).