



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL VIH COMO BLANCO FARMACOLÓGICO

Ciclo de Metodología Científica II - 2022 - Grupo 116

Br. Alvarez Victor¹

Br. Amabile Martín¹

Br. Ferreira Giuliana¹

Br. Giannecchini Gonzalo¹

Br. Pareschi Agustín¹

Orientadoras:

Dra. Corvo Ileana²

Dra. Randall Lía²

¹ *Estudiante Metodología Científica II; Facultad de Medicina, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República; Paysandú - Uruguay*

² *Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República; Paysandú - Uruguay*

INDICE:

Resumen	2
Introducción	3
1. Importancia del VIH	3
2. Generalidades de la estructura del VIH y el ensamblado de la cápside	5
3. Generalidades de los fármacos antirretrovirales	8
4. Interferir con el ensamblaje de la cápside como terapia antirretroviral	9
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Metodología	10
1. Preparación de medios de cultivo y soluciones	10
2. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3) con el plásmido conteniendo el gen de la CANC	13
3. Expresión de la proteína CANC recombinante	14
4. Análisis de la expresión de la CANC recombinante mediante SDS-PAGE	15
5. Lisis celular	15
6. Purificación de la CANC recombinante	16
6.1 Precipitación con PEI y sulfato de amonio	16
7. Ensayo de multimerización de CANC recombinante in vitro	17
8. Ensayo de dosis-respuesta	17
Resultados y Discusión	18
1. Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido de expresión de CANC	18
2. Expresión de la proteína recombinante	18
3. Purificación de la CANC	19
Conclusiones	27
Referencias bibliográficas	28

Resumen

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un virus ARN de la familia Lentivirus, envuelto por una bicapa lipídica dentro de la cual se encuentra la cápside proteica (formada en su mayoría por la proteína de la cápside denominada CA). En el interior contiene el genoma viral, junto a proteínas necesarias para la replicación del mismo, como la transcriptasa inversa e integrasa. Se ha observado que la cápside viral es fundamental en las etapas tempranas y tardías de la infección, favoreciendo la retrotranscripción del virus y el ensamblaje de nuevas partículas virales dentro de las células blanco, los Linfocitos TCD4+ (1). Para el control de la infección en el ser humano, se cuenta con tratamientos efectivos basados en múltiples fármacos administrados en forma combinada, pudiendo así disminuir la carga viral en el individuo, llegando a ser indetectable y evitando la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (2). Si bien se tiene clara la importancia de la cápside viral en la infección por VIH y hay reportadas moléculas con capacidad de interferir en la formación de la cápside y la replicación viral, aún no se encuentran disponibles tratamientos farmacológicos enfocados en la misma (3). Por ende, en la presente investigación se pretende analizar diferentes moléculas que permitan interferir con la multimerización de la proteína de la cápside, dado su rol crucial en la virulencia y supervivencia del virus, en el marco del desarrollo de nuevas moléculas con potencial farmacológico contra el VIH.

PALABRAS CLAVE: VIH; CÁPSIDE, VIROLOGÍA; MULTIMERIZACIÓN; DESARROLLO DE FÁRMACOS

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a virus belonging to the Lentivirus family, enveloped by a lipidic bilayer inside of which is found the capsid protein (mainly formed by a protein called CA). Inside this capsid there is a viral genome alongside the proteins reverse transcriptase and integrase, both necessary for viral replication. Viral capsid has been linked to key early and late stages of viral infection, promoting reverse transcription and assembly of new viral particles within target cells, TCD4+ lymphocytes (1). To control infection in humans, there are effective treatments based on multi drug therapy, administered in combination, lowering the patient's viral load to undetectable values, thus avoiding the appearance of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) (2). Despite the known importance of the viral capsid on HIV infection and the report of existing molecules with the ability to interfere in capsid formation and viral replication, there are still no pharmacological treatments focused on the capsid (3). Thus, the current investigation is intended to analyze different molecules that allow interference with capsid multimerization, given its key role in virus survival and virulence, in the context of an anti-HIV drugs development research program.

KEY WORDS: HIV; CAPSID; VIROLOGY; PROTEIN MULTIMERIZATION; DRUG DEVELOPMENT

Introducción

1. Importancia del VIH

El VIH continúa siendo uno de los mayores problemas para la salud pública mundial, causando a nivel global unas 36,3 millones de muertes a noviembre del 2021 (4). A finales de 2020 había 37,7 millones de personas VIH positivas, y 680.000 murieron por causas relacionadas con el VIH (5).

En América, a fines de 2020 había 3,7 millones de personas infectadas con VIH, aproximadamente un 10% del total mundial. Se estima que la cantidad de nuevos casos de VIH en América Latina se incrementaron un 21 % desde 2010, con aproximadamente 120.000 nuevas personas infectadas en 2019. A finales de ese año, 1,3 millones de personas que viven con VIH recibían tratamiento antirretroviral (TAR) en América Latina y 210 mil en el Caribe (60 % de cobertura de los pacientes con VIH en América Latina y 63 % en el Caribe) (6).

Según el Ministerio de Salud Pública, en Uruguay en la actualidad hay 14.080 personas con VIH, de las cuales 11.400 conocen su estado serológico y 8.115 se encuentran bajo tratamiento antirretroviral, poco más del 50 %. Entre los años 2013-2019 se establece una relación de nuevos casos 2:1 en hombres, siendo éstos el 67 % de los nuevos diagnósticos en el año 2019. La tasa de notificación de nuevos casos predomina en personas entre 25 y 44 años de edad y la principal vía de contagio sigue siendo la sexual (7). En la Figura 1. observamos que las mayores tasas de contagio se dan en los departamentos de Montevideo y Maldonado, seguido de Rivera y Artigas.

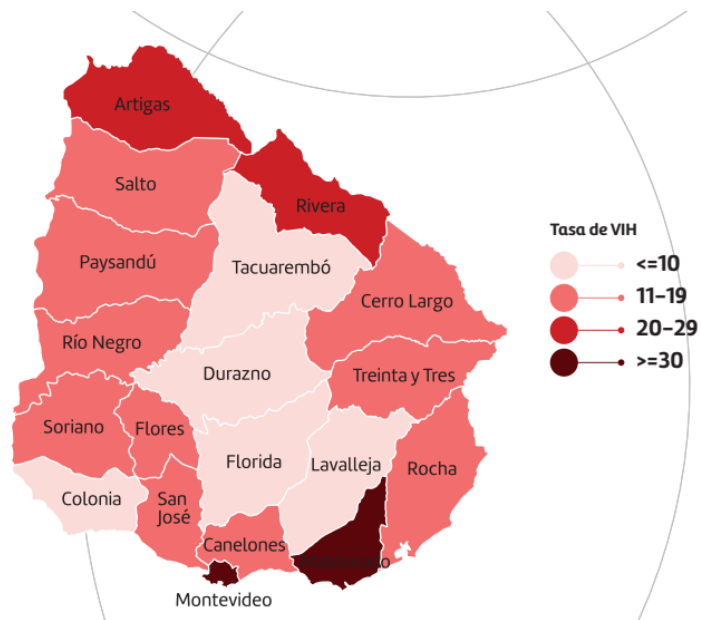


Figura 1. Densidad de incidencia cada 100.000 habitantes según departamento. Uruguay 2013-2018 (7).

En la Figura 2 se esquematizan las fases de la infección por VIH. La primoinfección o fase inicial, suele manifestarse entre las 2 y 10 semanas posteriores al contagio. Clínicamente se expresa con fiebre, dolor de cabeza, adenomegalias y erupción cutánea. Hay una gran propagación del virus por el organismo. Al cabo de semanas, los síntomas ceden y se pasa a la siguiente fase. El VIH puede ser contagioso en cualquier etapa, pero esta primera fase es en donde hay mayor riesgo.

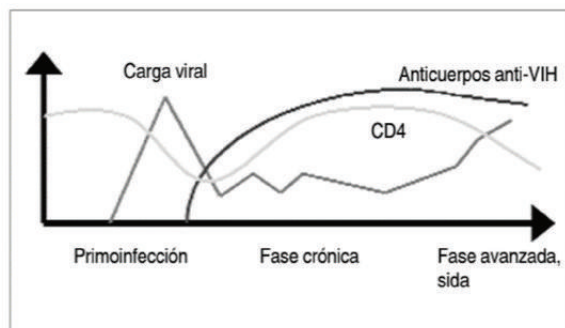


Figura 2. Fases de la infección por VIH. Figura tomada de (8)

En la fase intermedia, o fase de latencia, el VIH se encuentra replicándose en el organismo, con destrucción de linfocitos CD4. En este estadio, el organismo tiene la capacidad de reponerlas, por lo que los sujetos se mantienen asintomáticos, sin presentar manifestaciones de la infección. El único síntoma que puede aparecer en esta fase, es el aumento de tamaño ganglionar indoloro. Si el paciente no inicia con el tratamiento indicado, al cabo de 10 a 12 años, evolucionaría al último estadio, conocido como SIDA. Finalmente, la mayor manifestación del VIH es cuando el sujeto se encuentra en estadio SIDA, que corresponde a la fase avanzada o fase final de la enfermedad. El individuo en esta etapa se encuentra más susceptible a adquirir infecciones oportunistas y a desarrollar diferentes tipos de tumores. Algunos de los ejemplos de infecciones oportunistas son *Pneumocystis jirovecii* y *Mycobacterium tuberculosis*. Podemos lograr hacer diagnóstico de SIDA cuando una persona con VIH presenta un recuento de linfocitos CD4 inferior a 200/mm³ y/o una o más infecciones oportunistas (8).

Toda persona con diagnóstico de VIH es candidata a iniciar tratamiento antirretroviral (TARV) que se basa en la asociación de fármacos que optimizan la tolerabilidad, la seguridad a largo plazo y la eficacia de la terapia. El tratamiento debe realizarse de forma crónica ya que no erradica la infección sino que limita la replicación viral frenando el avance de la enfermedad hacia las etapas tardías (9).

2. Generalidades de la estructura del VIH y el ensamblado de la cápside

En la actualidad se encuentran descritos dos tipos de VIH (VIH-1 y VIH-2), siendo el VIH-1 el causante de la pandemia mundial. El VIH-1 corresponde a una partícula esférica de 90 a 120 nm de diámetro. Está constituido principalmente por Gag, la poliproteína encargada de la coordinación de la morfogénesis del virión, junto con sus productos de maduración proteolítica. La proteína Gag representa un 50 % de la masa viral, los lípidos de membrana representan el 30 %, otras proteínas virales y celulares representan aproximadamente un 20 %, mientras que el ARN genómico y otros ARN pequeños representan un pequeño porcentaje del total de la masa (11).

Al ser un virus envuelto, se halla rodeado de una bicapa lipídica tomada de la membrana de la célula humana durante el proceso de gemación de nuevas partículas (8). Además de su envoltura, podemos encontrar otras dos regiones características de este virus, la matriz viral formada por la proteína de matriz (MA) y en el centro la cápside, constituida por la proteína viral más abundante, la proteína de la cápside o partícula CA. En el interior de la cápside se encuentra el material necesario para armar el

provirus: las proteínas virales, proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT), integrasa (IN), nucleocápside (NC), más las dos cadenas idénticas de ARN e iniciadores de ARN transferente (ARNT Lys).

En su genoma, podemos encontrar tres regiones codificantes: *gag*, *pol* y *env* (Figura 3). El gen *gag* codifica las principales proteínas estructurales: la proteína MA, la proteína CA y la NC. El gen *pol* se encarga de codificar las tres enzimas necesarias para el ciclo infeccioso del virus, la PR, la RT e IN. El gen *env* se encarga de codificar las proteínas de la envoltura, que incluyen la glicoproteína 120 (gp120) y la glicoproteína 41 (gp41). Se considera que la funcionalidad de *env*, es clave para entender los aspectos importantes de la biología del VIH-1, tales como la interacción con receptores celulares (tropismo) y la evasión inmune (10).

Además el VIH-1 contiene otros seis genes denominados inicialmente accesorios: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*, encargados de la regulación de la síntesis y de la organización de las partículas virales infecciosas (11).

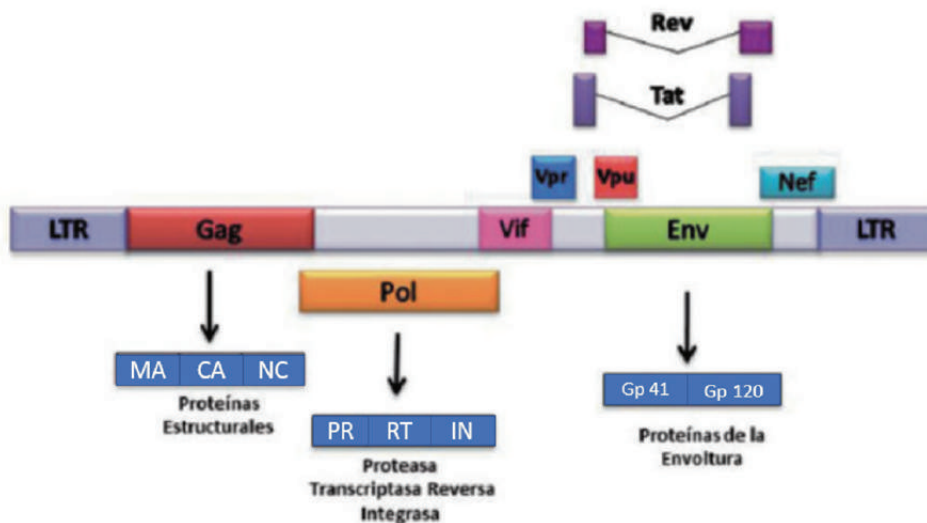


Figura 3. Estructura genómica del VIH-1. Figura modificada de (12).

La cápside del VIH-1 es de forma cónica y consiste en un polímero formado únicamente por la proteína CA. El VIH se ensambla como una partícula inmadura, en la que CA se libera de la poliproteína Gag durante la escisión proteolítica y la maduración de las partículas, y se auto-ensambla para formar la estructura cónica cerrada final (13). Esta proteína de la cápside se compone de dos dominios

independientemente plegados, el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C-terminal (CTD), conectados por un *linker* flexible (14). Las subunidades de CA están organizadas en anillos de entre cinco a seis monómeros (15). La cápside presenta una estructura de aproximadamente 1.500 subunidades de CA dispuestas en anillos de hexámeros en las cuales se insertan 12 pentámeros de CA que permiten la curvatura y el cierre de los extremos de la cápside (Figura 4) (16). Los hexámeros se estabilizan mediante interacciones inter subunitarias entre los NTD de la CA y entre los NTD y los CTD de las subunidades adyacentes (15). La red de hexámeros se estabiliza adicionalmente mediante tres interacciones CTD-CTD entre subunidades en hexámeros vecinos (17).

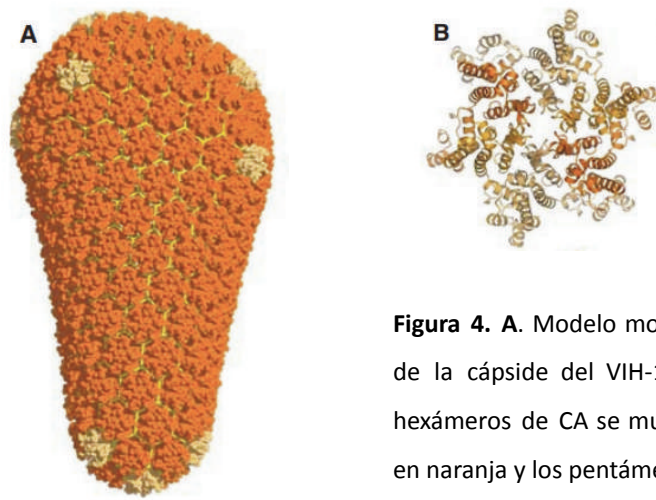


Figura 4. A. Modelo molecular de la cápside del VIH-1. Los hexámeros de CA se muestran en naranja y los pentámeros en beige. **B.** Estructura del hexámero de CA del VIH-1 (16).

Mutaciones en las interfaces de subunidades NTD-NTD y CTD-CTD afectan la estabilidad de la cápside. CA mutados con estabilidad de cápside reducida, frecuentemente exhiben infectividad deficiente, sugiriendo que la cápside intacta desempeña una función crucial en la infectividad tras la penetración de la célula blanco (18).

3. Generalidades de los fármacos antirretrovirales

Se encuentran 5 tipos principales de fármacos que se utilizan para el tratamiento de pacientes con VIH: Inhibidores nucleosídicos/nucleotídicos de la Retrotranscriptasa (INRT); Inhibidores no nucleosídicos de los Retrotranscriptasa (INNRT), Inhibidores de proteasas (IP); Inhibidores de la integrasa e Inhibidores de entrada o de fusión (19).

Dentro del grupo de los INRT, se encuentran la zidovudina (AZT), la lamivudina (3TC), la emtricitabina (FTC), el abacavir (ABC), el tenofovir (TDF) y el tenofovir alafenamide (TAF). Estos son compuestos con una estructura análoga a nucleótidos que actúan interrumpiendo la síntesis del ADN proviral mediada por la RT. Por el mismo mecanismo actúan los inhibidores de la RT que no son análogos de nucleótidos, los INNRT como lo son el efavirenz (EFV), la nevirapina (NVP), la etravirina (ETR) y la rilpivirina (RPV). Dentro de los IP se encuentran el atazanavir (ATV), el lopinavir (LPV), el fosamprenavir (FPV), el saquinavir (SQV), el ritonavir (R), el darunavir (DRV) y el tipranavir (TPV), que corresponden a fármacos que presentan una fuerte afinidad por el sitio activo de la proteasa viral e inhiben su actividad catalítica de manera altamente selectiva impidiendo el correcto procesamiento de los precursores de las proteínas del virus. En referencia a los inhibidores de la integrasa, como lo son el raltegravir (RAL), el dolutegravir (DTG), el elvitegravir (ETG) y el bictegravir (BIC), estos son fármacos que evitan que el ADN proviral se inserte en el genoma de las células huésped. Por último, los inhibidores de entrada o fusión, como el maraviroc (MVC) y el enfuvirtide (T20) corresponden a fármacos que se adhieren a la glicoproteína de superficie, bloqueando la unión de esta con los receptores CD4. De esa manera se evita la fase de adsorción viral, sin afectar el funcionamiento normal de la célula (8). La combinación de fármacos de estas familias es la estrategia de TARV actualmente utilizada, la cual tiene elevada eficacia para evitar la progresión de la enfermedad. La recomendación general es combinar dos INTR con un fármaco de alguno de los otros grupos.

El VIH-1 tiene una alta tasa de mutación, se estima que acumula una mutación de nucleótido por ciclo de replicación. Esto le permite eludir el sistema inmunitario y fomenta el desarrollo de resistencia a los medicamentos ARV. Así, la eficacia del TARV está dada por la actividad del fármaco y la cantidad de mutaciones capaces de generar resistencia que contiene el virus para cada ARV, denominada barrera genética a la resistencia. La resistencia puede adquirirse a través de la presión de selección de medicamentos (resistencia adquirida) o transmitirse de persona a persona (resistencia transmitida). Los pacientes que se infectan principalmente con virus resistentes a algún fármaco ARV tienen menos

opciones de tratamiento y corren un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad. Los fármacos con la mayor barrera genética a la resistencia son los IP potenciados (con Ritonavir), que pueden usarse en estos casos como TARV inicial (20). Se describen dos tipos de resistencia retroviral: viral (cualquier cambio que mejore la replicación del virus en presencia de los inhibidores) y celular (alteraciones en la penetración o activación del fármaco). Esta puede sospecharse cuando se presenta falla del TARV sin presencia de resistencia genotípica en un paciente con buena adherencia al tratamiento, ya que la mala adherencia a los planes terapéuticos es generalmente la responsable de la falla del TARV (19).

4. Interferir con el ensamblaje de la cápside como terapia antirretroviral

La aparición de resistencia a los fármacos antirretrovirales existentes para el tratamiento del VIH y el descubrimiento de la cápside como blanco terapéutico llevó al estudio de nuevas moléculas capaces de inhibir la replicación viral que podrían emplearse en combinación con otros fármacos o en el caso de virus resistentes a los tratamientos actuales. Una de estas es el Berivimat: 3-O-(3'-3'-dimethyl succinyl) ácido betulínico (BMV), un inhibidor de primera generación de la maduración viral que impide el clivado del precursor CA-SP1 para liberar la proteína CA, evitando así la formación de la cápside (21). Este compuesto llegó a un ensayo clínico fase IIB con disminución de la carga viral en los pacientes, sin embargo dicho efecto sólo ocurrió en el 50% de los participantes. Esto llevó al reconocimiento y estudio de los muchos polimorfismos que conforman la región Gag (precursora de la cápside) y al desarrollo de moléculas análogas al BVM que pudieran cubrir mayor número de pacientes (21) (22). Otro estudio tuvo como objetivo la búsqueda de moléculas que actuaran mediante la desestabilización de la interfaz entre los NTD que forman el núcleo rígido de la CA (22). Inicialmente se identificó al ácido dibenzoico 4,4'-[dibenzo[b,d]furan-2,8-diylbis(5-phenyl-1H-imidazole-4,2-diyl)] (CK026) como precursor para el diseño de nuevos inhibidores. Esto llevó al descubrimiento de I-XW-053, molécula pequeña que se une a un sitio en el NTD de la CA afectando el procesamiento del precursor y la replicación del virus en etapas tempranas de la infección (23). Más recientemente, se desarrolló el Lenacapavir, un fármaco de acción prolongada dirigido a la cápside del VIH-1 que se encuentra en ensayos clínicos de fase II/III, siendo el inhibidor del ensamblaje de la cápside de mayor éxito hasta la fecha (24). Es necesario continuar el desarrollo de moléculas que tengan como blanco la cápside del virus ya que esta proteína es esencial como diana farmacológica para evitar la replicación viral (25).

Objetivo general

Identificar moléculas que interfieren con la multimerización de la cápside del VIH utilizando un modelo de ensamblaje *in vitro*.

Objetivos específicos

- 1- Expresar y purificar la proteína de la cápside del VIH-1 recombinante.
- 2- Evaluar la actividad de distintas moléculas en la multimerización de la proteína de la cápside.
- 3- Efectuar ensayos de dosis-respuesta con las moléculas que presenten actividad.

Metodología

1. Preparación de medios de cultivo y soluciones

Medio de cultivo Luria Bertani

Se preparan 6,5 L de medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) (composición: 1 % triptona + 1 % extracto de levaduras + 0,5 % NaCl) y 100 mL de LB 1,5 % agar.

Se distribuye 1,5 L en 4 matraces de 5 L + 150 mL en 2 frascos + 50 mL en 2 matraces de 250 mL y 100 mL + agar en 1 frasco.

1 % triptona (65 g): 1 g cada 100 ml → 65 g para 6,5 L de solución

1 % extracto de levaduras (65 g): 1 g cada 100 mL → 65 g para 6,5 L de solución

0,5 % NaCl (32,5 g): 0,5 cada 100 mL → 32.5 g para 6,5 L de solución

La esterilización de los medios de cultivo y LB + Agar se realiza autoclavado a 121°C por 15 min.

Antibiótico

Se preparan 10 mL de ampicilina a una concentración de 100 mg/ml (1 g en 10 mL).

1 mL de solución → 1000 veces la concentración deseada de Ampicilina (1000X). Para 100 mL de LB necesitamos 0,1 mL de Ampicilina 1000X. La ampicilina se disuelve en agua y se esteriliza mediante filtración por 0,22 µm. Se almacena a -20°C.

Cloruro de calcio

Para preparar las células competentes se necesitan 10 mL de CaCl₂ 100 mM

$$M = m \text{ (g)} / PM \text{ (g/mol)} \times V \text{ (L)} \rightarrow m = 0,1 \text{ M} \times 110,98 \text{ g/mol} \times 0,01 \text{ L} \rightarrow m = 0,11098 \text{ g}$$

Se disuelve en agua y se esteriliza mediante filtración por 0,22 μm. Se almacena a 4°C.

Agente inductor

Para la inducción de la expresión de la CANC se utiliza el isopropiltiogalactósido (IPTG). Se preparan 10 mL de IPTG 1 M

$$m \text{ IPTG} = 1 \text{ M} \times 238,3 \text{ g/mol} \times 0,01 \text{ L} = 2,383 \text{ g}$$

Se disuelve en agua y se esteriliza mediante filtración por 0,22 μm. Se almacena a -20°C.

Preparación de buffer

Buffer Lisis (500 mL): para lisar bacterias

- 25 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ → 25 x 10⁻³ M.
- 500 mM NaCl → 500 x 10⁻³ M
- 5 mM de β-mercaptoetanol
- pH 6,0

A continuación se desarrolla a modo de ejemplo cómo se calcula en base al pH que se necesita en el buffer la masa de cada compuesto para preparar el buffer. Se implementa la misma fórmula en la preparación de todos:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \text{Log}([A^-]/[HA])$$

$$[\text{Buffer}] = [A^-][HA]$$

$$\text{pH} = 7,21 + \text{Log} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$\text{pH} = 7,21 + \text{Log} \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} \rightarrow 6,0 = 7,21 + \text{Log} \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]}$$

$$6,0 - 7,21 = \text{Log} \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} \rightarrow -1,21 = \text{Log} \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]}$$

$$10^{-1,21} = \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]}$$

$$0,0617 = \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]}$$

$$KH_2PO_4 + K_2HPO_4 = 25 \text{ mM}$$

$$KH_2PO_4 = 25 \text{ mM} - K_2HPO_4$$

$$0,0617 = \frac{25\text{mM} - KH_2PO_4}{KH_2PO_4} \rightarrow 0,0617 = \frac{25\text{mM}}{KH_2PO_4} - \frac{KH_2PO_4}{KH_2PO_4}$$

$$0,0617 = \frac{25\text{mM}}{KH_2PO_4} - 1 \rightarrow 0,0617 + 1 = \frac{25\text{mM}}{KH_2PO_4}$$

$$KH_2PO_4 = \frac{25\text{mM}}{1,0617} \rightarrow 23,5 \times 10^{-3} \text{ (0.0235 mM)}$$

$$K_2HPO_4 = 25 \times 10^{-3} \text{ M} - 23,5 \times 10^{-3} \text{ M} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ M (0,0015 mM)}$$

$$m = M_{(\text{mol/L})} \times PM_{(\text{g/mol})} \times Vol_{(\text{L})}$$

$$m_{KH_2PO_4} = 23,5 \times 10^{-3} \text{ M} \times 228,23 \text{ g/mol} \times 0,5 \text{ L} = 2,68 \text{ g}$$

$$m_{K_2HPO_4} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ M} \times 136,09 \text{ g/mol} \times 0,5 \text{ L} = 0,102 \text{ g}$$

$$m_{NaCl} = 0,5 \text{ M} \times 58,44 \text{ g/mol} \times 0,5 \text{ L} = 14,6 \text{ g}$$

Una vez masados los compuestos, se disuelven en agua destilada en vaso de bohemía y luego se lleva a volumen en probeta. En caso que el pH sea más básico del esperado se ajusta el mismo con HCl

Buffer Diálisis (2 x 2L)

- 25 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4
- 50 mM NaCl
- 5 mM β -mercaptoetanol
- pH 6,0

High Salt Buffer (1L)

- 25 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4
- 1 M NaCl
- 5 mM β -mercaptoetanol
- pH 6,0

No Salt Buffer (30 mL):

- 25 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4
- 1,5 mM Na_2HPO_4
- 5 mM β -mercaptoetanol
- pH 6,0

Buffer NaPi (100mL)

- 50 mM $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 = 50 \times 10^{-3} \text{ M}$
- pH 8,0

2. Preparación de células competentes y transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido conteniendo el gen de la CANC

En zona estéril (bajo mecheros) se utiliza un ansa para inocular un tubo falcón conteniendo 3 ml de LB + 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicilina con la cepa *E.coli* BL21DE3. Se deja crecer en incubadora a 37°C, 220 rpm *overnight* (ON).

A partir de este pre-cultivo de la cepa *E.coli* BL21(DE3) se inocula un tubo conteniendo 10 mL de LB para preparar las células competentes. Este tubo se incuba a 37° C 220 rpm y se controla la DO a 600 nm hasta que la misma sea de 0,4, donde el crecimiento bacteriano es exponencial y es el momento óptimo para prepararlas para la introducción del ADN plasmídico.

Se toman 1,5 mL en dos microtubos, se centrifuga durante 1 min a 10.000 x g, se descarta sobrenadante y vuelven a tomar 1,5 mL más para trabajar con 3 mL de cultivo totales. Luego de repetir la centrifugación se resuspende el *pellet* de células con 100 μL de CaCl_2 100 mM estéril a 4°C. Se centrifuga nuevamente a 10.000 x g por 1 minuto y se descarta el sobrenadante con pipeta. Se resuspenden las células en 100 μL de CaCl_2 a 4°C y se añaden 100 ng de plásmido (Figura 5). Se incuba por 30 minutos en hielo.

Para favorecer la incorporación del plásmido se realiza un *shock* térmico incubando 3 minutos a 37°C y luego se coloca en hielo por unos minutos más. Se añade medio LB precalentado a 37°C y se incuba durante una hora a 37° C 220 rpm para permitir la expresión del gen de resistencia. Se siembran 3 placas con medio LB con Ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) y se incuban en estufa a 37°C ON.

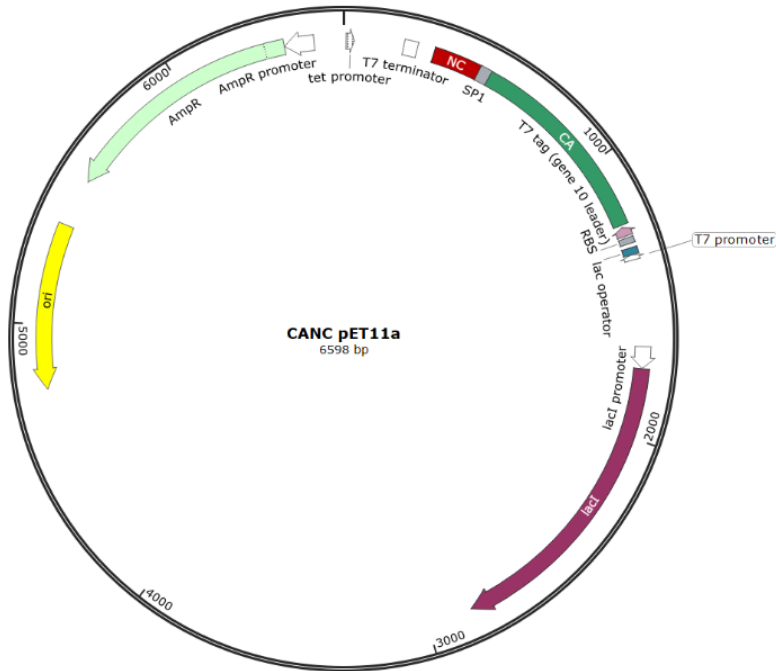


Figura 5. Esquema del plásmido pET11a con la CANC clonada bajo el control del promotor T7. Se observa el origen de replicación del plásmido (ori), el gen codificante de la resistencia a ampicilina (AmpR) y del represor lac (lacI).

3. Expresión de la proteína CANC recombinante

Se realiza precultivo en 2 matraces de 20 mL LB con ampicilina inoculando en zona estéril bajo mechero una de las colonias transformadas. Se crece a 37°C, 220 rpm ON.

Al día siguiente se inoculan 4 matraces de 1,5 L con 12,5 mL del precultivo + 1,5 mL de ampicilina 100 mg/ml. Se deja crecer durante aproximadamente 2 horas a 37°C 220 rpm hasta que la DO a 600nm sea 0,6.

Se toma muestra de 1 mL pre inducción y luego se agrega IPTG a una concentración final de 1 mM induciendo la expresión de la CANC recombinante en las bacterias, se baja la temperatura y se deja incubando a 20°C, 250 rpm ON.

Al día siguiente se toma una muestra de 1 mL post inducción antes de colectar los cultivos inducidos, se centrifuga 10.000 x g durante 15 min y se descarta el sobrenadante. Se pesan los *pellet* bacterianos y se almacenan a -20°C. Los *pellet* obtenidos luego de centrifugar las alícuotas que se utilizarán para analizar la expresión mediante electroforesis SDS-PAGE se resuspenden en 100 µl de *buffer de muestra* 1X con SDS y agente reductor y se guardan a -20°C.

4. Análisis de la expresión de la CANC recombinante mediante SDS-PAGE

Se analizan las muestras pre y post-inducción mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), en geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras para confirmar la expresión de la CANC antes de proceder a la purificación.

Composición de Gel para electroforesis:

Gel de corrida:

- 6 mL Acrilamida: bisacrilamida 30%
- 3,9 mL Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, SDS 0,4%
- 80 μ L PSA 10%
- 18 μ L TEMED
- 4,8 mL H₂O milliQ

Gel de Carga:

- 730,5 μ L Acrilamida: bisacrilamida 30 %
- 1,4 mL Tris-HCl 0,5 M, ph 6,8, SDS 0,4 %
- 4,0 μ L PSA 10 %
- 8 μ L TEMED
- 3,4 mL H₂O milliQ

Las muestras se hierven 3 minutos antes de sembrar el gel. En paralelo se carga un marcador de peso molecular.

5. Lisis celular

Se descongela el *pellet* de bacterias en hielo y se resuspende en *buffer* de lisis (fosfato de potasio 25 mM, 500 mM NaCl, pH 6,0 conteniendo 5 mM β -mercaptoetanol (β -ME)) utilizando 50 mL por cada 2 L de cultivo. Las bacterias se lisan mediante 5 ciclos de sonicado a máxima potencia hasta la homogeneización de la suspensión. Se centrifuga a 13.000 x g, durante 15 minutos a 4°C para separar la fracción soluble e insoluble.

6. Purificación de la CANC recombinante

6.1 Precipitación con PEI y sulfato de amonio

Se purifica la CANC recombinante mediante pasos sucesivos de precipitación con sales y mediante técnicas cromatográficas. Se realiza una precipitación inicial con 1,5 mL de polietilenimina (PEI) al 10 % cada 100 mL de lisado. Se incuba en agitación orbital a 4°C por 2 horas y luego se centrifuga a 13.000 x g, por 15 minutos a 4°C.

Luego se realiza una primera precipitación con sulfato de amonio al 10 %, calculando la masa a agregar con la aplicación www.encorbio.com. Se incuba en agitación orbital a 4°C durante 1 hora y nuevamente se centrifuga a 13.000 x g, durante 15 minutos a 4°C.

Se recupera el sobrenadante y se agrega sulfato de amonio hasta llegar a una concentración de 25 % y se incuba en agitación orbital a 4°C durante 1 hora. Se centrifuga a 13.000 x g, a 4°C durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende con 30 mL de fosfato de potasio 25 mM, 1,5 mM fosfato de sodio, pH 6,0 y 5 mM β -ME, cada 2 L de cultivo.

Se dializa en 2 L de buffer fosfato de potasio 25 mM, 50 mM NaCl, pH 6,0, 5 mM β -ME, en agitación orbital a 4°C, durante 24 h con un cambio de buffer a las 12 h.

Se toman muestras de cada etapa para analizar mediante SDS-PAGE, a las cuales se adiciona *buffer de muestra* 1X con SDS y agente reductor y se guardan a -20°C.

6.2 Cromatografías de intercambio iónico y exclusión molecular

Se centrifuga a 18.000 x g, 30 min a 4°C la solución dializada para recuperar la fracción soluble. Previo a sembrar en la columna se filtra por 0,45 μ m. Se utiliza una columna CM FF 16/10 (GE) conectada a un equipo AKTA Pure, lavada y equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 25 mM, 50 mM, pH 6,0 con 5 mM β -ME. Se colecta la fracción no unida a la columna, se realiza un lavado con 5% de amortiguador fosfato de potasio 25 mM, 1 M NaCl, pH 6,0, 5 mM β -ME (amortiguador de elución) y se eluye con 60% de amortiguador de elución. Se colectan las fracciones con absorbancia a 280 nm y se analizan por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%.

Para realizar la cromatografía de exclusión molecular se juntan las fracciones con la proteína de interés y se concentran por centrifugación a 4°C hasta obtener un volumen de 500 μ L. Se centrifuga a 10.000 x g, 30 minutos a 4°C y se siembra la muestra en una columna Superdex 75 10/300 (GE) conectada a equipo AKTA Pure, equilibrada con *buffer* 20 mM Tris, 5 mg $MgCl_2$, 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM β -ME, pH 7,5. Se colectan las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia a 280 nm para analizar la pureza de la CANC por SDS-PAGE en geles al 12 %. Las fracciones con la proteína pura se juntan y se cuantifican realizando un espectro de absorbancia a 280 nm y se almacenan a 4°C.

7. Ensayo de multimerización de CANC recombinante *in vitro*

Los experimentos de multimerización *in vitro* se realizan en placas de 96 pocillos midiendo turbidez en un lector de placas con modo cinético Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™) a 37°C, durante 30-60 minutos. La mezcla de reacción de ensamblaje de CANC se realiza en un volumen final de 100 µL con una concentración final de proteína de 150 µM, en amortiguador NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,4. Se sigue turbidez midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cada 30 segundos. Los compuestos disueltos en DMSO se evalúan por triplicado a una dosis inicial de 50 µM, diluyendo 1/200 a partir de un stock a 10 mM. Se incluye un control con 0,5% de DMSO, concentración final del mismo en el ensayo. A partir de las pendientes de cada ensayo se calculó la velocidad de multimerización para cada compuesto (V compuesto) y se estimó el porcentaje de inhibición/aceleración en relación a la velocidad del control en ausencia de compuesto (V control) según la fórmula:

$$\% \text{ de afectación} = (V \text{ compuesto} * 100) / V \text{ control}$$

8. Ensayo de dosis-respuesta

Para el ensayo de dosis respuesta se evaluó la velocidad de multimerización de la CANC frente a diferentes concentraciones del compuesto **1470**: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 80 µM. Se incubó el compuesto con 150 µM de CANC durante 15 minutos en *buffer* NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,4. Cada condición se ensayó por triplicado en placas de 96 pocillos midiendo turbidez a 340 nm como se describió anteriormente. Se graficó el % de afectación en función del logaritmo de la concentración del compuesto (expresado en nM) (Figura 14).

Resultados y Discusión

1. Transformación de *E. coli* con el plásmido de expresión de CANC

Luego de incubar las placas toda la noche a 37°C en agar con ampicilina, observamos el crecimiento de colonias aisladas en la placa transformada con el plásmido pET11a, conteniendo el gen de la CANC. Dado que este plásmido le confiere resistencia al antibiótico ampicilina podemos comprobar la incorporación del mismo en la bacteria (Figura 6B). En la placa control, donde no se agregó el plásmido, como se esperaba, no se observa crecimiento bacteriano (Figura 6A).

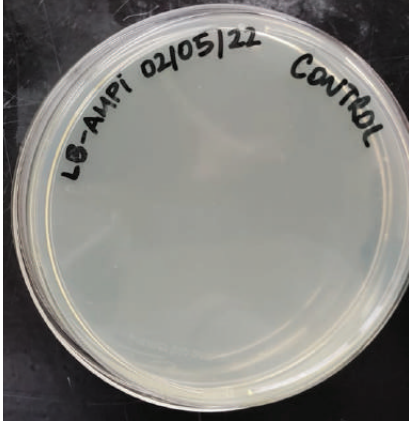
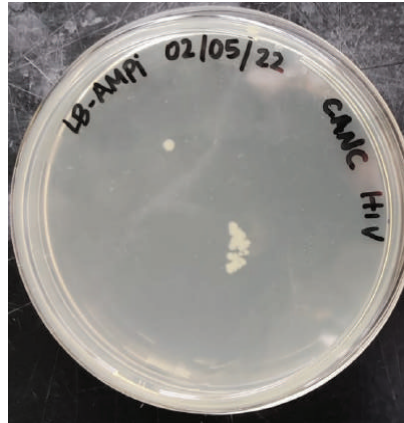
A**B**

Figura 6. Resultado de la transformación de *E. coli* BL21(DE3). **A.** Placa de control sin crecimiento. **B.** Placa de transformación con el plásmido conteniendo el gen de la CANC.

2. Expresión de la proteína recombinante

Se seleccionó una colonia aislada para la expresión de la CANC recombinante. Se inoculó en un matraz conteniendo 20 ml de LB para realizar el precultivo y luego escalar a los matraces conteniendo 1,5 L de medio. La inducción de la expresión de la CANC se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la metodología. En la Figura 7A se observa el medio de cultivo previo a la inoculación con bacterias, luego en la Figura 7B se puede constatar la turbidez del medio que evidencia el crecimiento bacteriano.

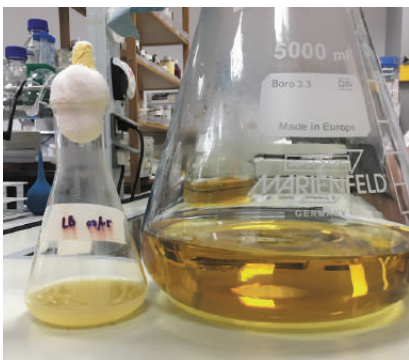
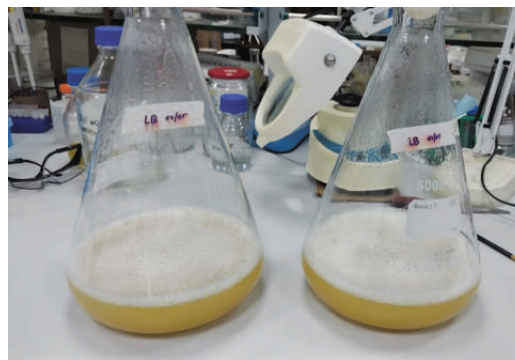
A**B**

Figura 7. Crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) en medio LB. **A.** Precultivo crecido y matraz de escalado antes de la inoculación. **B.** Matraces de escalado al finalizar la expresión de la CANC.

3. Purificación de la CANC

Los diferentes pasos de la purificación de la CANC recombinante descritos en la metodología se analizaron mediante toma de muestras y posterior electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 8A, en los primeros dos carriles se observa que luego de la inducción con IPTG aparece una banda mayoritaria que corresponde a la expresión de la CANC recombinante, que corre entre las bandas del marcador de peso molecular (MPM) correspondientes a 31 y 38 kDa. Esto está de acuerdo al peso molecular de la CANC que es de 34 kDa. La banda que se ve en el carril sin inducir corresponde a proteína de la fracción inducida que debido a un sembrado de mayor volumen al sugerido para el pocillo, el carril contiguo fue contaminado.

Una vez corroborada la expresión de la proteína de interés, el primer paso para purificarla es la lisis bacteriana para separar la fracción soluble de la fracción insoluble. Se observa que la CANC permanece en la fracción soluble junto con la mayoría de las proteínas de *E. coli* de las cuales se busca purificarla. Los siguientes pasos de la purificación consistieron en la precipitación secuencial con polietilenimina (PEI) para eliminar los ácidos nucleicos y luego con concentraciones crecientes de sulfato de amonio. Los dos primeros pasos permiten separar la CANC de otras proteínas de *E. coli* que precipitan y quedan en la fracción insoluble (Figura 8A, carriles 6 y 8).

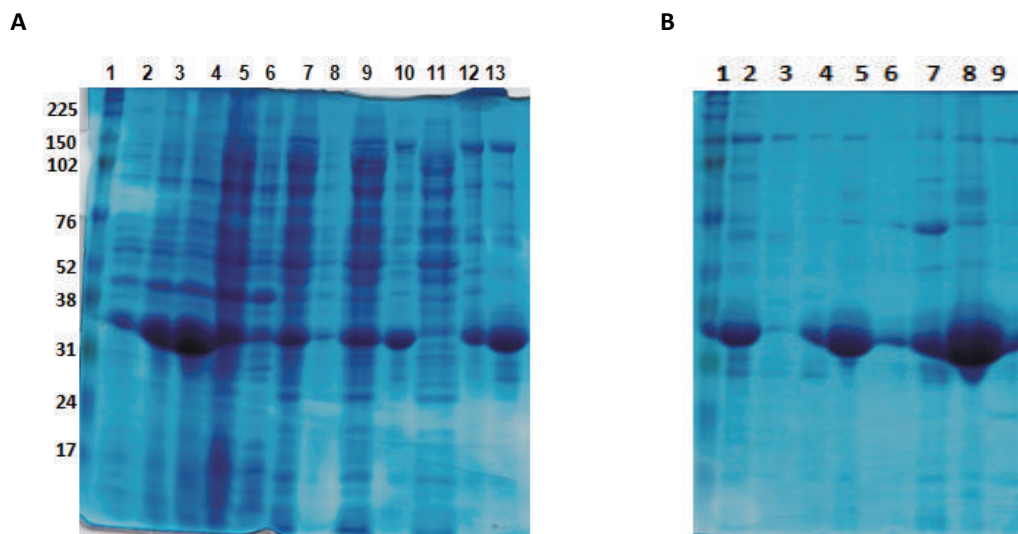


Figura 8. Análisis de las fracciones de purificación de la CANC recombinante por electroforesis SDS-PAGE. A. 1-MPM, 2-*E. coli* BL21(DE3) sin inducir, 3-*E. coli* BL21(DE3) post-inducción con IPTG 1 mM, 4-fracción insoluble, 5-fracción soluble, 6-precipitado PEI, 7-fracción soluble PEI, 8-precipitado AmSO₄ 10%, 9-fracción soluble AmSO₄ 10 %, 10-precipitado AmSO₄ 25 %, 11-fracción soluble AmSO₄ 25 %, 12-precipitado post-díalisis, 13-fracción soluble diálisis. **B.** 1-MPM, 2-siembra de columna SP, 3- fracción no unida SP, 4- Lavado 5% *high salt buffer*, 5-Pico columna SP, 6-Lavado 100 % *high salt buffer*, 7-Pico SP concentrado, 8- Pico SEC 1, 9- Pico SEC 2.

En el último paso la CANC es la que precipita, recuperándose mediante solubilización del precipitado de la fracción insoluble. Si comparamos el carril 3 con la fracción soluble de *E. coli* y el carril 13 que corresponde a la fracción recuperada luego de la diálisis, se observa una reducción de la cantidad de proteínas contaminantes en relación a la CANC.

Para obtener la proteína en el amortiguador deseado para la cromatografía de intercambio iónico, se dializó la muestra y posteriormente se centrifugó para clarificarla antes de sembrarla en la columna. En la Figura 9 se observa el cromatograma del primer paso de purificación mediante intercambio catiónico. Luego de la inyección se colecta la fracción no unida a la resina, y los eluidos con 5% de amortiguador con 1M NaCl (lavado) y 60% de amortiguador con 1M NaCl, donde esperamos eluya mayoritariamente la CANC recombinante. En el análisis de la purificación mediante SDS-PAGE (Figura 8B) se observa en el carril 2 la muestra post-díalisis antes de sembrar en la columna. Podemos verificar que la CANC se unió a la resina de intercambio catiónico ya que no se observa la banda de 34 kDa en el carril correspondiente a la fracción no unida (carril 3, figura 8B). Se evidencian bandas correspondientes a otras proteínas que no

se unen a la columna, al igual que en el lavado con 5% de amortiguador 1M NaCl, lo cual es esperable debido a que el proceso de purificación sirve para descartar proteínas que están presentes en las bacterias y se unen más débilmente a la columna pero no son la de interés. Con 60% de amortiguador 1M NaCl se realizó la elución, obteniendo en esta fracción la proteína CANC que se encontraba unida a la columna (Figura 8B).

A continuación se efectuó un último paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular, en la cual se separan las proteínas por tamaño. Se concentró el eluido anterior a 1 mL para sembrar en dos veces con un *loop* de 500 μ L, dado que este es el volumen máximo que puede inyectarse en la columna utilizada. En la Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido en los dos pasos sucesivos de la gel filtración. Se observan 2 picos de absorbancia que corresponden al eluido de cada una de las siembras, los cuales se analizaron por SDS-PAGE para evaluar la pureza de la proteína CANC (Figura 8B carriles 8 y 9). Si bien se observan algunas bandas más tenues en relación a la CANC, se considera que se halla lo suficientemente pura para realizar los experimentos de multimerización.

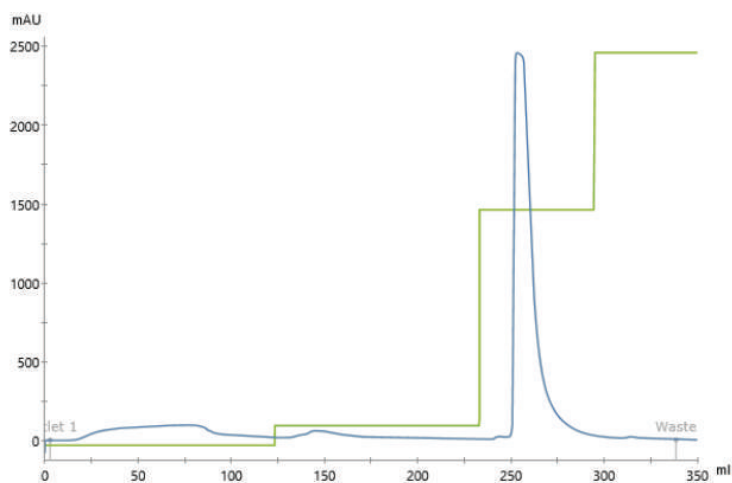


Figura 9. Cromatografía de intercambio iónico. Se grafica la absorbancia a 280 nm en función del volumen de elución en mL: curva azul. Se muestra también el porcentaje de *buffer* B en verde.

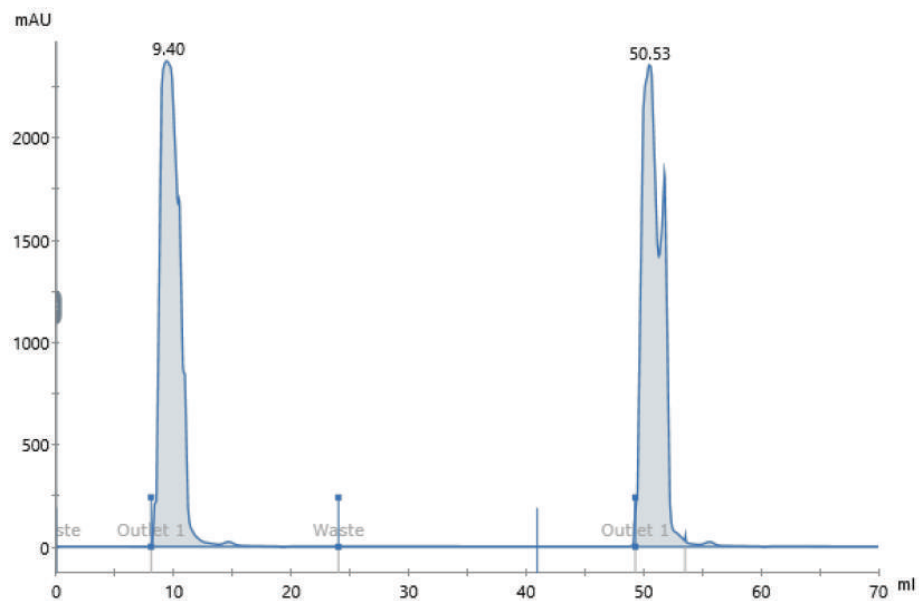


Figura 10. Cromatografía de exclusión molecular. Se grafica la absorbancia a 280 nm (mAU) en función del volumen de elución (mL) de las 2 siembras realizadas. La primera siembra se realizó al inicio y la segunda a los 41 mL (marca vertical).

4. Cuantificación de la CANC recombinante

Antes de realizar el ensayo de multimerización se concentró la proteína CANC obtenida luego de la cromatografía de exclusión molecular y se cuantificó midiendo absorbancia en un espectro de 250 a 350 nm en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis. A partir del coeficiente de absortividad molar ($40.950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se estimó la concentración (C) mediante la ley de Lambert-Beer como: $C = (\text{Abs}/(40.950 \times l)) \times$ factor de dilución, (l corresponde al paso óptico de la cuba utilizada que fue de 1 cm). En la Figura 11 se observa el espectro entre 250 y 350 nm, con el pico máximo de absorbancia en ese rango a 280 nm como se espera para una proteína con aminoácidos aromáticos en su secuencia aminoacídica.

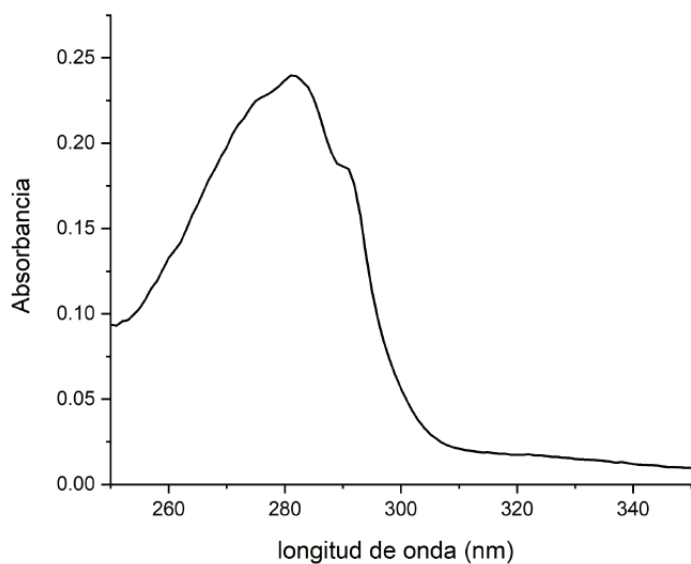


Figura 11. Espectro de absorción UV-visible de la proteína CANC recombinante en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0.

5. Ensayo con compuestos a dosis fija

Los compuestos fueron evaluados por triplicado a dosis fijas de 50 μ M siguiendo la turbidez a 340 nm de acuerdo a lo descrito previamente en la metodología. Se seleccionaron 7 moléculas disponibles en la quimioteca del laboratorio con similitud estructural al compuesto 696, que mostró disminuir la velocidad de multimerización de la cápside del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) identificado previamente por el grupo de investigación (25).

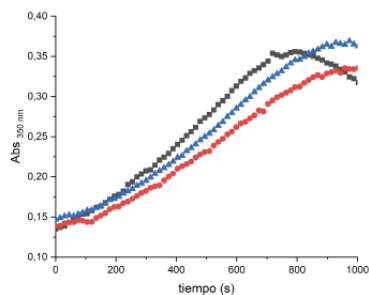
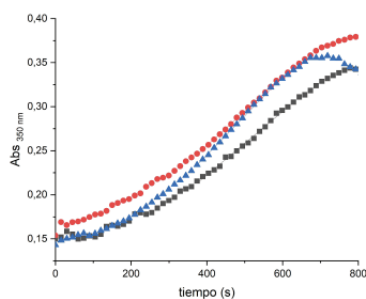
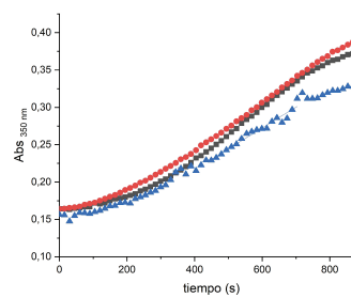
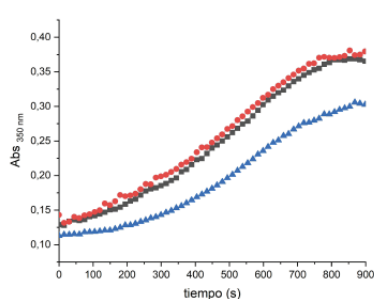
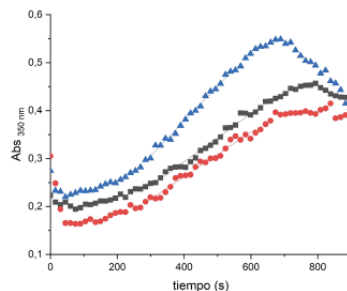
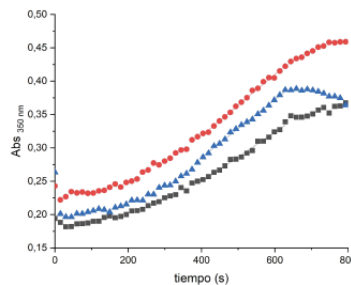
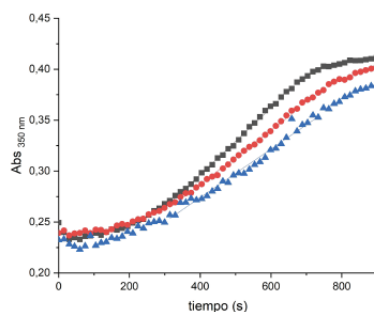
1465**1466****1467****1468****1469****1470****1471**

Figura 12: Ensayo de multimerización de la proteína CANS en presencia de compuestos a dosis fija. El ensayo se realizó en placa de 96 pocillos, utilizando 150 μM de proteína en un volumen final de 100 μL . Se pre-incubó la proteína con cada uno de los compuestos a concentración final de 50 μM durante 15 min a TA. Pasado ese tiempo se siguió la absorbancia en función del tiempo a 37 $^{\circ}\text{C}$ en un lector de placas VarioskanTM. Las corridas se realizaron en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0.

En la Figura 12 se muestran las curvas de absorbancia en función del tiempo, de forma sigmoidea, que traduce la lectura del equipo ante el aumento de la turbidez de los pocillos, lo que evidencia la presencia de multimerización de la proteína CANS en estas condiciones. Se calculó la velocidad de multimerización representada por las pendientes del ajuste de la porción lineal a la ecuación de la recta. Las velocidades de multimerización en presencia de compuestos se compararon con un control sin compuesto en presencia de DMSO, para evaluar si se modifica en presencia del compuesto.

En la Figura 13 se presenta el efecto de cada uno de los compuestos ensayados sobre la velocidad de multimerización en relación al control con DMSO 0,5%. El resultado se expresa como porcentaje de alteración de la pendiente. Se observa que todos los compuestos salvo uno mostraron una aceleración de la multimerización, siendo las moléculas **1469** y **1470** las que mostraron mayor aceleración. El compuesto **1471** no afectó la velocidad del proceso. Llama la atención el comportamiento de estos compuestos, dado que los resultados no fueron concordantes con los datos obtenidos anteriormente en el laboratorio. En particular, el compuesto 696 había evidenciado previamente inhibición de la multimerización de la CANC de VIH recombinante, mientras que en este trabajo mostró aceleración del proceso. Esto cuestiona la reproducibilidad del ensayo de multimerización, e impone la necesidad de complementar estos resultados con otras metodologías de cribado de estos compuestos.

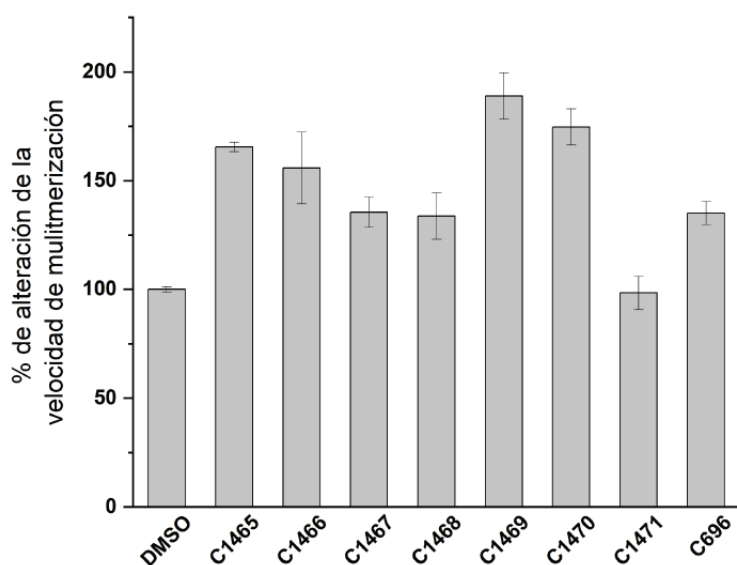


Figura 13: Efecto de los compuestos ensayados sobre la velocidad de multimerización de la CANC recombinante *in vitro*.

El hecho que haya una aceleración nos indica que estos compuestos alteran la formación de la cápside viral, por lo que *in vivo* podrían afectar la infectividad del virus ya que estarían alterando la dinámica del proceso natural de multimerización, como se discute en Sierra *et al.* (2018) (27).

A continuación, se decidió realizar el ensayo dosis-respuesta para evaluar la dependencia del comportamiento en la velocidad de multimerización en relación a la concentración de compuesto

ensayada. El compuesto 1469 aceleró en un 90% la multimerización en el ensayo a 50 μ M, pero en otros ensayos se constató que al agregar el compuesto al amortiguador, el mismo precipitaba, por lo que se seleccionó ensayar el compuesto 1470, el cual mostró una aceleración similar en el ensayo a dosis fija. Como se observa en la Figura 14, se evidencia un efecto dosis-dependiente en la velocidad de multimerización de la CANC recombinante *in vitro*. Sin embargo, para caracterizar mejor esta dependencia, debería replicarse este ensayo llegando a mayores concentraciones de compuesto.

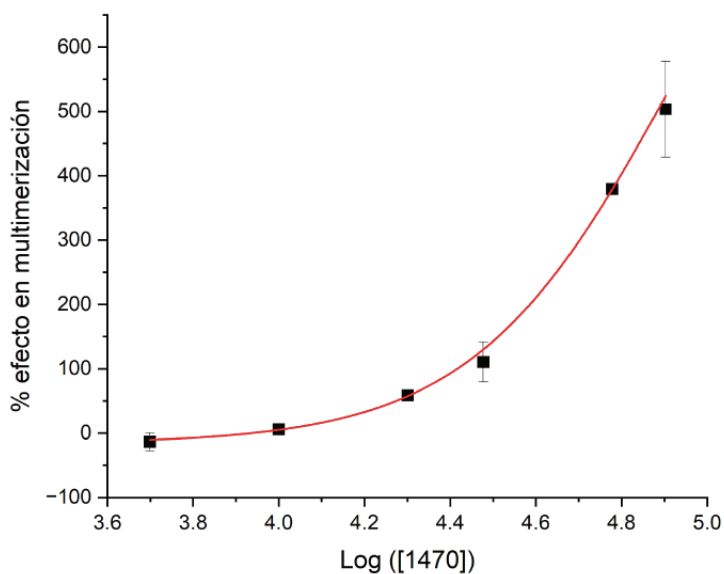


Figura 14. Estudio del efecto dosis-dependiente del compuesto 1470 sobre la multimerización de la CANC de VIH recombinante.

Conclusiones

En el proceso de descubrimiento de fármacos se utilizan frecuentemente métodos de *screening* masivos en los cuales se identifican algunas moléculas con actividad de interés, las que sirven como puntapié inicial para continuar estudios de eficacia y seguridad. Es un proceso costoso que requiere mucho tiempo, estimándose que en promedio lleva hasta 14 años desde la identificación del objetivo hasta la obtención de un fármaco aprobado por la FDA (26).

En esta investigación, realizamos la evaluación de un conjunto de pequeñas moléculas orgánicas como modificadoras del proceso de multimerización de la proteína de la cápside del VIH. La identificación de moléculas con una actividad biológica deseada es una de las primeras etapas del desarrollo preclínico de fármacos.

En este trabajo se cumplió con los objetivos planteados: se transformaron las bacterias *E. coli* con el plásmido de interés y se expresó y purificó la CANC recombinante del VIH-1 obteniéndose cantidades suficientes para realizar los ensayos de multimerización *in vitro*. Se evaluaron 7 compuestos a dosis fija de los cuales, sorprendentemente, 6 aceleraron dicho proceso. Si bien, tanto las moléculas que aceleran como aquellas que inhiben la multimerización de la CANC pueden ser candidatas a fármacos, nos llama la atención este resultado porque los compuestos evaluados son estructuralmente similares a un compuesto inhibidor de la CA del VIF (27) que había mostrado inhibir la multimerización de la CANC de VIH en ensayos previos del grupo. En este trabajo se realizó el *screening* con este compuesto en dos experimentos independientes, ensayando cada condición por triplicado. Dada esta discordancia, en el laboratorio se continuará la optimización del ensayo buscando mayor reproducibilidad. La dependencia directa de la aceleración en relación a la concentración del compuesto 1470 observada en la curva dosis-respuesta apoya los resultados de aceleración obtenidos en el ensayo a dosis fija. No se debe perder de vista que el ensayo se realiza con un modelo *in vitro*, el cual constituye una primera aproximación al estudio de los compuestos.

Como perspectiva se plantea continuar con la evaluación preclínica de estas moléculas, estimando los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, toxicidad y capacidad de afectar la replicación del virus en ensayos con células infectadas *in vitro*.

Referencias bibliográficas

1. Santana A, Domínguez C, Lemes A, Molero T, Salido E. Biología celular y molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *Rev Diagnóstico Biológico*. 2003;52:07-18.
2. Basso DJ. Pautas de atención a personas con VIH en el primer nivel de atención. 2016;131:77-78.
3. Wang W, Zhou J, Halambage UD, Jurado KA, Jamin AV, Wang Y, et al. Inhibition of HIV-1 Maturation via Small-Molecule Targeting of the Amino-Terminal Domain in the Viral Capsid Protein. *J Virol*. 2017;91(9): e02155-16.
4. OPS/OMS: Organización Panamericana de la Salud. VIH/SIDA [Internet]. [citado 25 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/vih sida>
5. Organización Mundial de la Salud. VIH/sida [Internet]. OMS: VIH/sida. [citado 25 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
6. Organización Panamericana de la Salud. OPS. Los casos nuevos de infección por el VIH aumentaron más del 20% en América Latina en la última década [Internet]. [citado 25 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/30-11-2020-casos-nuevos-infeccion-por-vih-aumentaron-mas-20-america-latina-ultima-decada>
7. Ministerio de Salud Pública. Informe epidemiológico - Día Nacional del VIH/SIDA 2020 [Internet]. Ministerio de Salud Pública. [citado 25 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/informe-epidemiologico-dia-nacional-del-vih sida-2020>
8. Dr. Medina J, Dra. Flieller R, Dra. Cabrera S. Virus de Inmunodeficiencia humana y resistencia a antirretrovirales (Revisión). Cátedra de enfermedades infecciosas. UDELAR. Facultad de medicina, editor. 2019;15.
9. Atta MG, De Seigneux S, Lucas GM. Clinical Pharmacology in HIV Therapy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019; 14(3): 435-444.
10. Delgado R. Características virológicas del VIH. (2011) *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (29) 1: 58-65.
11. Rosas A, Hernández P, Nájjar I, Guzmán C, Castañeda F. Características estructurales y funcionales del virus de la inmunodeficiencia humana. (2013) *Enf Inf Microbiol*, 33(4): 163-173.
12. Arroyave JC, Pujol FH, Navas MC, Cortés-Mancera FM. Interacción entre el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus GB tipo-C durante el estado de co-infección. *Rev Chil Infectol*. 2013; 30(1): 31-41.
13. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(7): a006924.
14. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10(4): 279-90.
15. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, et al. X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell*. 2009; 137(7): 1282-92.
16. Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science*. 1999; 283(5398): 80-3.
17. Byeon IJL, Meng X, Jung J, Zhao G, Yang R, Ahn J, et al. Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell*. 2009; 139(4): 780-90.
18. Yufenyuy EL, Aiken C. The NTD-CTD intersubunit interface plays a critical role in assembly and stabilization of the HIV-1 capsid. *Retrovirology*. 2013; 10:29.
19. Medina DJ, Dra. Rosa Flieller, Dra. Susana Cabrera. Pautas para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades oportunistas en pacientes con VIH. Montevideo - Uruguay: Cátedra de Enfermedades

Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de la República; 2016.

20. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs*. 2012; 72(9): e1-25.
21. Timilsina U, Ghimire D, Timalina B, Nitz TJ, Wild CT, Freed EO, *et al.* Identification of potent maturation inhibitors against HIV-1 clade C. *Sci Rep*. 2016; 6:27403.
22. Nowicka-Sans B, Protack T, Lin Z, Li Z, Zhang S, Sun Y, *et al.* Identification and Characterization of BMS-955176, a Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Improved Potency, Antiviral Spectrum, and Gag Polymorphic Coverage. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(7): 3956-69.
23. Kortagere S, Madani N, Mankowski MK, Schön A, Zentner I, Swaminathan G, *et al.* Inhibiting early-stage events in HIV-1 replication by small-molecule targeting of the HIV-1 capsid. *J Virol*. 2012; 86(16): 8472-81.
24. McFadden, W.M., Snyder, A.A., Kirby, K.A. *et al.* Rotten to the core: antivirals targeting the HIV-1 capsid core. *Retrovirology* 2021; 18 41.
25. Thenin-Houssier S, Valente ST. HIV-1 Capsid Inhibitors as Antiretroviral Agents. *Curr HIV Res*. 2016; 14(3): 270-82.
26. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(11): 2783.
27. Sierra N, Folio C, Robert X, Long M, Guillon C, Álvarez G. Looking for Novel Capsid Protein Multimerization Inhibitors of Feline Immunodeficiency Virus. *Pharm Basel Switz*. 2018; 11(3): 67.