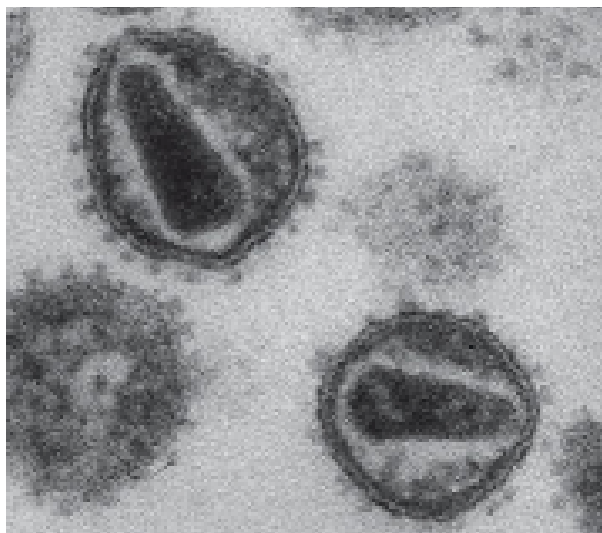


“Puesta a punto del ensayo de multimerización *in vitro* de la proteína de la cápside del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)”

Maximiliano Daniel Granzella Facchin

Trabajo de pasantía para la obtención del título de Tecnólogo Químico



Tutoras:

Dra. Lía Randall y Dra. Ileana Corvo (Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República)

Q.F. Rossina Figliolo (Universidad Tecnológica del Uruguay)

23 de noviembre de 2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermanos que me brindaron y brindan su apoyo y cariño, permitiéndome así, poder desarrollarme a nivel personal y profesional. Agradezco a mis compañeros y amigos, que con su compañerismo y amabilidad, hicieron de esta etapa una experiencia inolvidable.

Agradezco a la Universidad de la República y a mis tutoras; Dra. Lía Randall y Dra. Ileana Corvo, que me dieron la oportunidad y me guiaron en el desarrollo de este trabajo de pasantía, y que con palabras justas, enseñanzas y correcciones me permitieron alcanzar esta meta que es la culminación de mi formación profesional. Siempre las tendré presentes.

Agradezco a mi tutora académica; Q.F. Rossina Figliolo, y a cada uno de los docentes que formaron parte de mi trayecto universitario, y que fueron guía en la transmisión de los conocimientos necesarios para poder desempeñarme correctamente como profesional. Conocimiento que pude aplicar ampliamente en este trabajo de pasantía.

Agradezco a la Universidad Tecnológica, la Universidad de la República y a la Universidad del Trabajo del Uruguay, la cual me exigió y me permitió; gracias al trabajo constante de sus directivos y gestores, poder cursar una educación universitaria de manera gratuita y con un gran estándar de calidad.

RESUMEN

El virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un retrovirus que afecta el sistema inmunitario debilitando las defensas del huésped, y puede evolucionar eventualmente al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Para finales de 2021, se reportaban unas 38,4 millones de personas infectadas con el VIH a nivel mundial. Los fármacos clásicos utilizados para el tratamiento del VIH tienen como blanco de acción enzimas como la retrotranscriptasa, la proteasa o la integrasa viral, o inhiben la fusión entre virus y célula diana. La cápside del VIH está formada por una única proteína viral (CA), cuya alta conservación evidencia su papel en el éxito viral. Su correcto ensamblaje es necesario para la infección, siendo las moléculas capaces de interferir con la multimerización de CA posibles fármacos antirretrovirales, por lo que la aprobación en 2022 por primera vez un inhibidor de dicho proceso abre nuevas posibilidades terapéuticas. Este trabajo plantea la puesta a punto de un ensayo *in vitro* para estudiar el efecto de diferentes compuestos en el ensamblaje de CA recombinante. Se puso a punto un ensayo de cribado en placa de 96 pocillos, en el que se emplea 150 μ M CA en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2, a 42°C. A partir de los resultados obtenidos en el marco de este trabajo, se está llevando a cabo la evaluación de moléculas seleccionadas previamente seleccionadas por el grupo de investigación. Las moléculas que muestren interferir con este proceso *in vitro* serán seleccionadas para profundizar en su estudio.

Palabras claves: *VIH, puesta a punto, multimerización in vitro, CANC recombinante.*

ÍNDICE

1. PRESENTACIÓN DE LA INSTITUCIÓN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Relevancia en la Salud Pública del Virus de la Inmunodeficiencia Humana	10
2.2. Estructura y ciclo viral del VIH	11
2.3. Tratamientos actuales de la infección por VIH	15
2.4. La cápside como potencial blanco de acción farmacológica	16
2.5. Determinantes de la agregación proteica in vitro de la CANC recombinante	18
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Materiales	23
4.2. Instrumentos/Equipos	23
4.3. Reactivos	24
4.4. Material biológico	24
4.5. Métodos	25
4.5.1. Expresión y purificación de la CANC recombinante	25
4.5.2. Determinación de la concentración de CANC	27
4.5.3. Puesta a punto del ensayo de multimerización de la CANC recombinante in vitro	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. Expresión y purificación de la CANC recombinante.	30
5.2. Puesta a punto del ensayo de multimerización in vitro de la CANC recombinante.	33
5.2.1. Multimerización por acción de sales	34
5.2.2. Multimerización por acción de la temperatura	38
6. CONCLUSIONES	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXO	52

1. PRESENTACIÓN DE LA INSTITUCIÓN

El Departamento de Ciencias Biológicas (DCB) tiene su origen en el año 2014 y nuclea grupos académicos que realizan investigación en diversas áreas de la biología y están radicados en el Centro Universitario Regional (CENUR) Litoral Norte de la Universidad de la República. El laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas forma parte del DCB y realiza sus actividades de investigación en la Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) en el departamento de Paysandú (**Figura 1**).

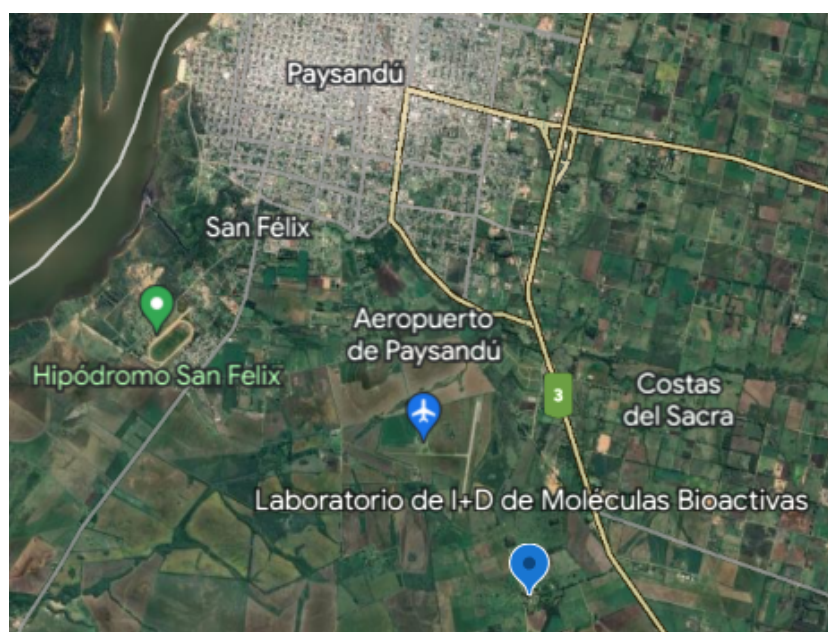


Figura 1. Ubicación de la EEMAC - Laboratorio de Moléculas Bioactivas.

Modificada de Google Earth, 2023.

Este grupo de trabajo interdisciplinario tiene como objetivo el diseño, síntesis y desarrollo preclínico de nuevos compuestos como potenciales fármacos para distintas patologías. El grupo posee dos grandes ejes de trabajo: el eje químico cuyo fin es el diseño, síntesis y caracterización de nuevas moléculas, y el eje biológico, que lleva adelante estudios de blancos moleculares y modelos celulares para valorar el efecto terapéutico de dichas moléculas y profundizar en los aspectos físico-químicos vinculados. Entre las líneas principales de investigación del laboratorio se encuentran: a) Enfermedades parasitarias en humanos y animales, b) Cáncer y Patologías neurodegenerativas, y c) I+D de antivirales. Esta pasantía se halla enmarcada en esta última línea de investigación.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Relevancia en la Salud Pública del Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) afecta el sistema inmunitario y debilita las defensas contra muchas infecciones y algunos cánceres, al infectar específicamente los linfocitos T CD4⁺. Por lo cual, a medida que el virus destruye las células inmunitarias e impide el normal funcionamiento del sistema inmune, la persona infectada va adquiriendo gradualmente una situación de inmunodeficiencia. La fase más avanzada de la infección por VIH es el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Abdulghani N. *et al*, 2020).

El VIH continúa siendo uno de los mayores problemas para la salud pública mundial, y se estima que ya ha cobrado unas 40,1 millones de vidas. Sin embargo, a pesar de que no existe cura para la infección por VIH y de que el acceso a la prevención, diagnóstico, tratamiento y atención eficaz del VIH y de las distintas infecciones oportunistas ha crecido, se ha convertido en un problema de salud crónico tratable que permite a las personas infectadas tener una expectativa y calidad de vida similar a las personas no infectadas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2023).

Para finales del 2021, se reportaban unas 38,4 millones de personas infectadas con VIH (OMS, 2023). En Uruguay, hay registro de 15,000 personas infectadas con VIH, de las cuales 13,529 conocen su estado serológico. Además, en 2022, se estimó una prevalencia en la población del 0,6 %. Del mismo modo, entre 2017 y 2021, se registró un promedio de 881 casos nuevos por año (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2022).

En Uruguay, según el Decreto 41/012 “Código de Eventos y Enfermedades de Notificación Obligatoria”, la infección con VIH es un evento de notificación obligatoria del grupo B (MSP, 2022). Donde los nuevos casos confirmados son notificados semanalmente a la División Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública (Decreto N°41, 2012). El “Manual de vigilancia y control de enfermedades y eventos sanitarios de notificaciones obligatorias” define como caso confirmado de VIH a “toda persona con pruebas confirmatorias de laboratorio para VIH según el algoritmo vigente en el país, actualmente Western Blot-INNO-LIA o diagnóstico en base a pruebas rápidas (ordenanza MSP N° 567 del 2014)” (MSP, 2022).

2.2. Estructura y ciclo viral del VIH

El VIH pertenece al género de los lentivirus, en el cual se encuentran los retrovirus; virus de genoma completo de ARN y que presentan una cápside proteica en forma de cono (Turner B. y Summers M., 1999). Una característica común de los lentivirus es que presentan una envoltura de bicapa lipídica, derivada de la membrana de la célula diana (Linfocito T CD4⁺), la cual posee glicoproteínas acopladas, las cuales junto con antígenos, juegan un rol importante en la fusión y penetración del virus (Arthur *et al.*, 1992). Dentro de la membrana lipídica encontramos una cubierta de proteínas de la matriz (MA) y en el centro el núcleo viral, el cual es un polímero de proteínas de la cápside (CA) que se unen para formar un cono. El núcleo viral contiene en su interior dos copias de ARN no enlazados, que se encuentran estabilizados por proteínas de la nucleocápside (NC), y además posee tres proteínas esenciales que son la transcriptasa inversa, la proteasa y la integrasa (Turner B. y Summers M., 1999). La **Figura 2** representa el esquema de la partícula viral del VIH.

La cápside es esencial para la replicación del VIH y desempeña funciones cruciales tanto en las etapas tempranas como tardías del ciclo de vida viral. En etapas tempranas, tras la fusión de las membranas viral y celular, la cápside viral se libera en el citoplasma de la célula huésped y se disocia en un proceso conocido como decapado, que está estrechamente relacionado con la transcripción inversa del genoma viral por acción de la enzima transcriptasa inversa tras la unión del cebador tRNA^{Lys}. Posteriormente, el ADN sintetizado es transportado hasta el núcleo celular y se integra al genoma celular por acción de la enzima integrasa. Por otro lado, durante las últimas etapas de la replicación viral, la poliproteína Gag, precursora de la proteína de la cápside (CA), se ensambla en la membrana plasmática para formar partículas virales inmaduras no infecciosas. Tras un paso de maduración por acción de la proteasa viral, la cápside se ensambla para formar una estructura cónica similar a un fullereno característica de la partícula infecciosa madura (Turner B. y Summers M., 1999; Thenin-Houssier S. y Valente H., 2016). En la **Figura 3** se esquematiza el ciclo de replicación del VIH.

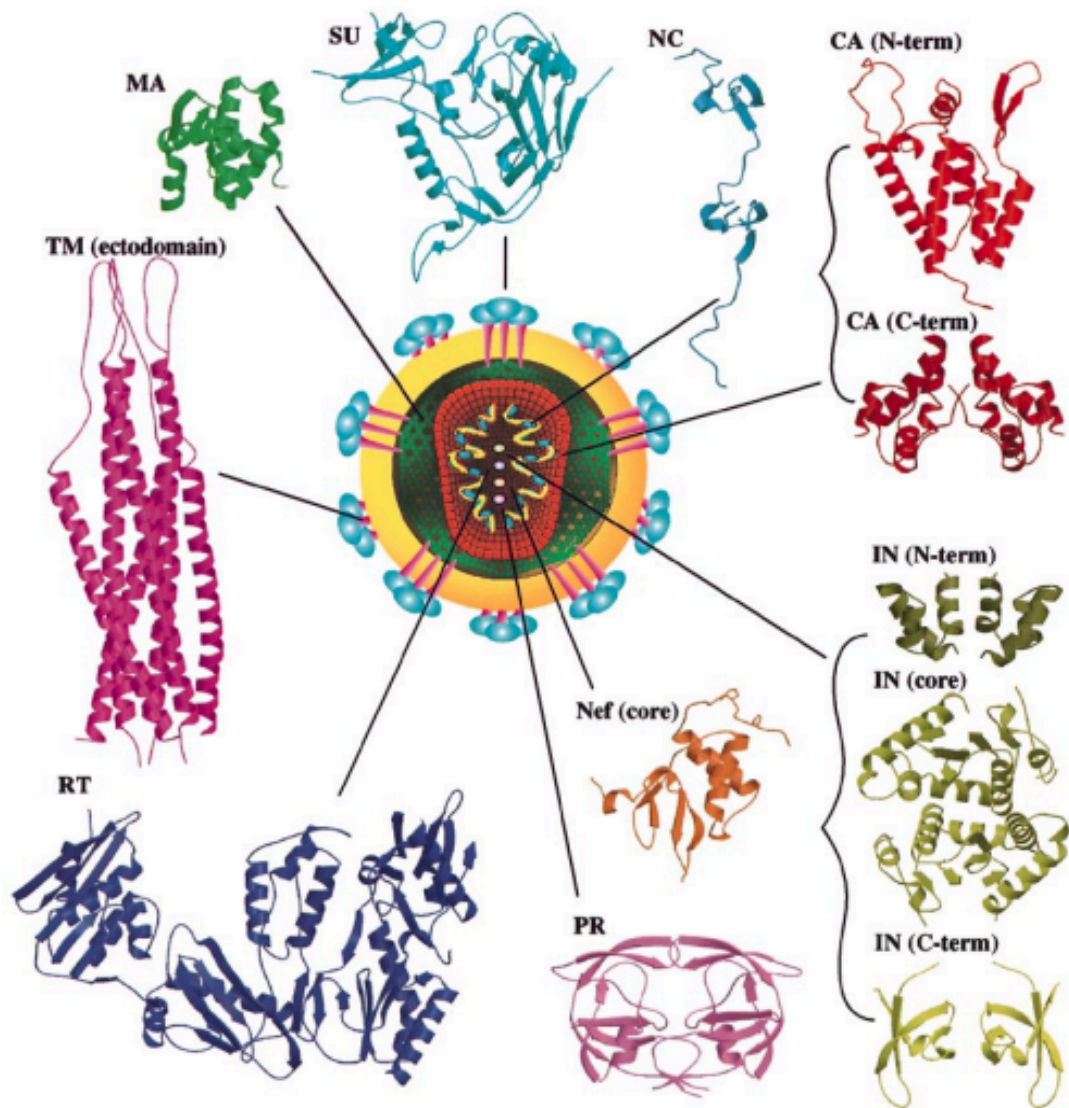


Figura 2. Esquema de la estructura del VIH y las proteínas que lo conforman. Modificada de Turner B. y Summers M., 1999. Se muestra en el centro un esquema de la partícula viral y alrededor se representan las estructuras secundarias de las diferentes proteínas que la forman (MA: proteína de la matriz p17; SU: glicoproteína de la superficie gp120; NC: proteína de la nucleocápside p7; CA: proteína de la cápside p24; IN: integrasa; Nef: proteínas accesorias; PR: proteasa; RT: Transcriptasa inversa, TM: proteína transmembrana gp41).

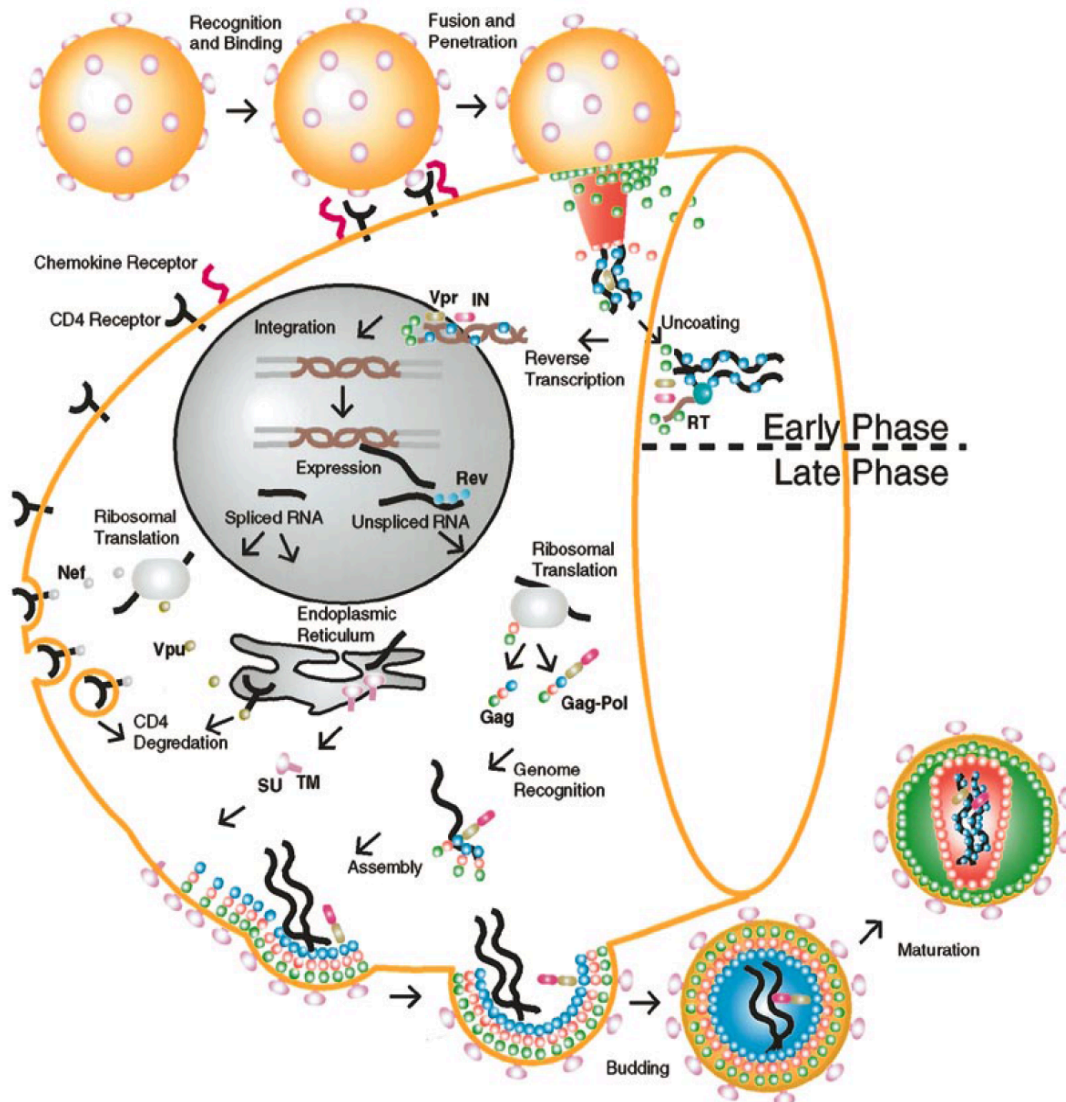


Figura 3. Esquema del ciclo de reproducción del VIH. Tomada de Turner B. y Summers M., 1999. El ciclo involucra dos fases: la fase temprana y la fase tardía. La fase temprana incluye el reconocimiento de las proteínas CD4⁺ (Linfocito T CD4⁺) y SU (glicoproteína de la superficie gp120 - VIH) y la fusión de las membranas de ambos. Seguidamente se da la retrotranscripción del genoma viral y su integración al genoma celular, para ello participan enzimas como la RT (transcriptasa inversa) y la IN (integrasa), así como la proteína MA (matriz) y las Nef (proteínas accesorias). En la fase tardía, se da la transcripción y traducción del genoma integrado por acción de las ARN polimerasas celulares y del ribosoma. Posteriormente, el complejo TM-SU (proteína transmembranal gp41-glicoproteína de la superficie gp120) migra a la membrana celular, este complejo atrae a los demás componentes necesarios y genera la partícula viral inmadura (entre ellos la poliproteína Gag y dos hebras de ARN viral) que emerge por gemación. Finalmente, en un paso de maduración la PR escinde la poliproteína Gag generando distintas subunidades como lo son la MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside).

La cápside viral se sintetiza a partir de la poliproteína Gag precursora, que se compone de cuatro dominios estructurales plegados de forma independiente separados por regiones flexibles (matriz, cápside, nucleocápside y p6) y dos péptidos espaciadores (SP1 y SP2) como muestra la **Figura 4** (Thenin-Houssier S. y Valente H., 2016). Todas estas proteínas juegan diferentes roles durante la replicación y maduración del VIH. El dominio N-terminal de la matriz (MA), facilita la unión de Gag a la membrana plasmática y recluta la proteína viral *Env* (envoltura). El dominio central de la cápside (CA) media la interacción Gag-Gag y la interacción CA-CA para formar la red inmadura y madura, respectivamente. El dominio de la nucleocápside (NC), está compuesto por dos dedos de zinc, que se unen al genoma del ARN viral durante el ensamblaje. El dominio C-terminal, correspondiente a la región p6, contiene dos motivos de secuencia corta conocidos como “dominio de ensamblaje tardío” que se unen a las proteínas y componentes de la maquinaria celular esenciales para el proceso de gemación. Los dos péptidos espaciadores, SP1 y SP2, ayudan a regular los cambios conformacionales que ocurren durante la maduración viral (Thenin-Houssier S. y Valente H., 2016).

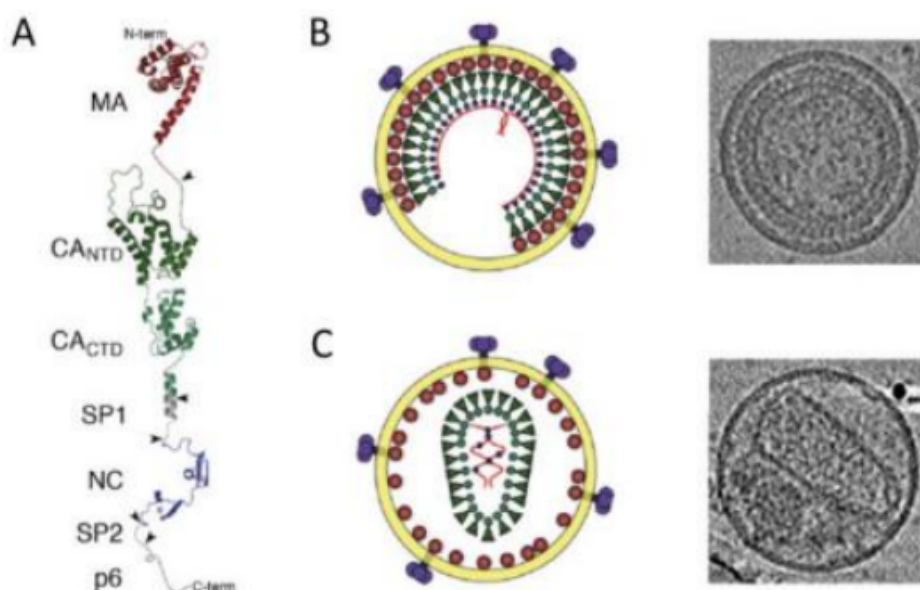


Figura 4. Estructura del VIH. (A) Representación de la estructura de la poliproteína Gag del VIH mostrando las proteínas que la forman (MA: proteína de la matriz; CA_{NTD}: dominio N-terminal de la proteína de la cápside; CA_{CTD}: dominio C-terminal de la proteína de la cápside, SP1: primer péptido espaciador; NC: proteína de la nucleocápside; SP2: segundo péptido espaciador; p6: proteína de bajo peso molecular, involucrada en la unión de proteínas accesorias), (B) Representación de la estructura del VIH inmaduro, y (C) Representación de la estructura del VIH maduro. En los paneles B y C, a la izquierda se muestra un esquema y a la derecha una imagen de microscopía electrónica. Tomada de (Thenin-Houssier S. y Valente H., 2016).

Las partículas virales liberadas de la célula huésped son inmaduras y se caracterizan por una capa de poliproteínas Gag sin procesar debajo de la membrana plasmática (**Figura 4**). Los viriones inmaduros contienen unas 2500 copias de la proteína Gag, ensambladas en una capa esférica extendidas y orientadas radialmente, con el dominio MA N-terminal unido a la membrana interna y el dominio p6 C-terminal mirando hacia el interior de la partícula, inmediatamente debajo de la envoltura viral. Coordinado con la gemación, el precursor de Gag sufre un proceso de maduración por la proteasa viral. La separación de los diferentes dominios de Gag genera reordenamientos estructurales, seguido por la multimerización de unos 1.500 monómeros de la proteína CA para formar partículas virales infecciosas caracterizadas por una cápside cónica similar a un fullereno maduro, compuesto por una red de 250 hexámeros y 12 pentámeros (Thenin-Houssier S. y Valente H., 2016).

Los estudios funcionales de las variantes del VIH-1 mediante mutagénesis dirigida revelaron que la estabilidad de la cápside es esencial para la acción de la enzima transcriptasa reversa y para una infectividad eficiente. La alta conservación de la secuencia aminoacídica de la CA y la alta sensibilidad a la mutagénesis, apoyan el importante rol que cumple la cápside para el virus y conforman la base que permite proponer que los antirretrovirales dirigidos a la cápside podrían llegar a ser terapias más duraderas. De esta manera, los compuestos que actúan a dicho nivel han mostrado tener actividad en etapas tempranas y tardías de la infección, afectando la eliminación del recubrimiento viral y el ensamblaje, revelando que la CA viral es un atractivo blanco de estudio farmacológico (Blair W. *et al.*, 2010, Rihn S. *et al.*, 2013, Wang W. *et al.*, 2017).

2.3. Tratamientos actuales de la infección por VIH

En las últimas décadas, la terapia antirretroviral (TARV) ha logrado avances notables en la mejora de la calidad de vida de las personas infectadas (National Institute of Health, 2023). La infección por VIH se puede tratar con pautas terapéuticas en las que se combinan varios antirretrovirales (ARV). Si bien la TARV no cura la infección, inhibe la replicación del virus en el organismo y permite que el sistema inmunitario funcione correctamente para combatir las infecciones oportunistas y algunos cánceres (OMS, 2022). Desde 2016, la Organización Mundial de la Salud recomienda una política de tratamiento generalizado en la cual se debe proporcionar TARV de por vida a todas las personas con VIH. En 2021, unas

28,7 millones de personas infectadas por VIH estaban en tratamiento con antirretrovirales (OMS, 2022).

Las TARV incluyen en general dos o más medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (National Institute of Health [NIH], 2023). Estos, constan de dos o más fármacos en una misma píldora, existiendo hoy en día más de 22 mezclas aprobadas por la FDA (Lillis C., 2022). Además, muchos medicamentos actúan como potenciadores farmacocinéticos apoyando a las TARV. Entre los medicamentos aprobados, se encuentran los inhibidores de enzimas, como los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a los nucleósidos (ITIN) que bloquean la acción de la transcriptasa inversa impidiendo la replicación del virus disminuyendo la carga viral, que incluyen el *abacavir (ABC)* y el *tenofovir disoproxil fumarato (TDF)*. También están los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINN), como la *doravirina (DOR)* y la *nevirapina (NVP)*. Asimismo, se emplean inhibidores de la proteasa viral, como el *ritonavir (RTV)* y el *atazanavir (ATV)*, e inhibidores de la integrasa, como el *cabotegravir (CAB)*. Por otro lado, existen fármacos que inhiben determinados procesos del ciclo viral como la fijación, uniéndose a receptores proteicos como el gp120 ubicado en la superficie de la célula CD4⁺, o inhibidores del antagonista CCR5, receptor superficial, como lo es el *fostemsacir*. También hay inhibidores de la fusión, que impiden que el virus ingrese a la célula diana, como el *enfuvirtida (T-20)* (Lillis C., 2022, NIH, 2023).

A pesar de la disponibilidad de diferentes fármacos, la resistencia viral a las terapias continúa desarrollándose, lo que destaca la necesidad de nuevas clases de ARV dirigidas a blancos moleculares alternativos (Kinch M. *et al.*, 2014). A la fecha, la FDA ha aprobado más de 50 medicamentos para ser utilizados en las TARV, siendo el último en ser aprobado por la FDA el *lenacapavir*, el 22 de diciembre de 2022, el cual constituye el primer ARV aprobado que actúa a nivel de la formación de la cápside (NIH, 2023).

2.4. La cápside como potencial blanco de acción farmacológica

Durante las últimas etapas del ciclo de vida viral, el ensamblaje y la maduración de la cápside son esenciales para la formación de partículas virales infecciosas. En solución, la CA del VIH-1 puede dimerizar con una constante de disociación de 18 μM . Esta interacción débil entre los dímeros de CA refleja la capacidad de la red proteica de la cápside, tanto inmadura

como madura, para establecer interacciones con diferentes superficies de proteínas durante los procesos de ensamblaje y desensamblaje. Esta dimerización depende de los residuos Trp-184 y Met-185 en la hélice 9 del dominio CTD de la CA (Gamble T. *et al.*, 1997) (**Figura 4**). La mutación de estos residuos a alanina (W184A y M185A) interfiere con el ensamblaje de CA *in vitro* y elimina la infectividad viral, lo que confirma que esta interfaz es esencial para el ensamblaje eficiente de la red de la cápside tanto madura como inmadura (Shin R. *et al.*, 2011). Dado que el ensamblaje y desensamblaje adecuado de la cápside regula tan finamente la replicación del VIH, representa un objetivo emergente y muy atractivo para el desarrollo de fármacos como se comentó anteriormente (Thenin-Houssier, S. y Valente, S., 2016).

El cribado de compuestos basado en la desestabilización del ensamblaje de la cápside ha identificado con éxito varias moléculas pequeñas con potencial de interferir en su correcta formación. A pesar de la alta tasa de mutagenicidad del virus, ciertas regiones de la CA presentan menos variabilidad y conservan su secuencia aminoacídica, en particular en la interfase entre monómeros. Esta baja o casi nula tasa de mutagenicidad es una ventaja para el desarrollo de fármacos dirigidos contra estas regiones de la CA, ya que la probabilidad de generación de resistencia es menor. La importancia de la cápside viral como un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos se vio reforzada en los últimos años por la identificación de varios inhibidores (Thenin-Houssier, S. y Valente, S., 2016). *Bevirimat* es un inhibidor de la maduración que inhibe el paso final del procesamiento de Gag evitando la liberación de la proteína CA, resultando en la producción de partículas virales inmaduras de VIH-1 (Martin D, *et al.*, 2008). Fue aprobado por la FDA, pero aún se encuentra en fase de ensayos clínicos (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2023).

Por su parte, *Lenacapavir* fue el primer medicamento aprobado por la FDA que inhibe el ensamblaje de la CA. Resultando importante como alternativa para el tratamiento de infecciones de VIH en pacientes con resistencia múltiple a los fármacos, donde ha llegado a disminuir en un 88 % la carga viral original (Segal-Maurer S. *et al.*, 2022). Además, se ha demostrado que tras una única inyección subcutánea los efectos permanecen de manera satisfactoria durante los seis meses posteriores. Así mismo, las mutaciones descritas en la cápside hasta el momento afectan de manera reducida la acción de dicho compuesto (Dvory-Sobol H., *et al.*, 2022).

2.5. Determinantes de la agregación proteica *in vitro* de la CANC recombinante

Para identificar moléculas con capacidad de interferir en el correcto ensamblaje de la proteína de la cápside viral en ausencia de material genético (cápside vacía), se requiere en muchas ocasiones de una aproximación *in vitro*, donde se utilizan componentes purificados, sistemas bien definidos y condiciones controladas (Medrano M., 2018). El estudio de la multimerización de la cápside ya ha sido mencionado por varios autores, y se fundamenta en la capacidad de multimerización de dichas proteínas tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que permite generar modelos de estudio de la multimerización de CA de gran utilidad para la evaluación del efecto de diferentes compuestos sobre este proceso (Lanman J *et al.*, 2002; Tang C. *et al.*, 2003; Ganser-Pornillo B. *et al.*, 2004; Medrano M., 2018).

En el caso de algunos virus, la cápside es capaz de autoensamblarse sin ayuda de proteínas auxiliares y del ácido nucleico viral, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta capacidad de autoensamblaje depende de varios factores, en particular de la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la concentración proteica (Gross I. *et al.*, 2000; San Martín C., 2013; Medrano M., 2018). Además, este proceso se puede seguir midiendo la turbidez a 340-350 nm. Si bien algunos autores describen condiciones óptimas para el ensayo *in vitro* en las que utilizan pH y temperatura que podrían considerarse cercanos a los fisiológicos, es posible realizar variaciones en estos parámetros sin afectar la utilidad del modelo (Gross I. *et al.*, 2000; Lanman J. *et al.*, 2002; Álvarez G. *et al.*, 2022). Por otro lado, los rangos de concentración proteica empleados presentan mayor variación entre autores, dependiendo del tipo de estudio y del constructo utilizado. En general, un aumento de la concentración de proteína provoca un acortamiento de la fase lag aumentando la velocidad de multimerización y en consecuencia la pendiente de la fase de crecimiento exponencial, alcanzando valores mayores de absorbancia máxima. Estos factores son de importante consideración al momento de plantear un ensayo de cribado en placas de 96 pocillos, donde el tiempo de siembra se vuelve relativamente largo y el tiempo entre medidas en un mismo pocillo también (Campbell S. *et al.*, 1995; Gross I. *et al.*, 1997; del Álamo M, *et al.*, 2005; Miyazaki Y. *et al.*, 2017). En general, se observa la multimerización eficiente *in vitro* de la cápside viral del VIH en presencia de concentración de proteína relativamente alta, con alta concentración de sal y pH neutro o alcalino (Medrano M., 2018).

El ensayo de multimerización *in vitro* de la cápside recombinante del VIH publicado por Lanman y colaboradores en 2002 fue el punto de partida (Lanman J. *et al.*, 2002). Los autores estudiaron la multimerización a concentraciones de CA entre 38 y 400 μM y concentraciones de NaCl entre 1,0 y 2,25 M, a 20°C y pH 8,0. Tanto la sal como la proteína se encontraban en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, y se realizó el seguimiento por un aumento de la densidad óptica (DO) a 350 nm. Además, se menciona que a pH 8,0 y 6,8, la cápside multimeriza formando esferas, mientras que a pH 7,0 forma polímeros cilíndricos, cuya estructura es más similar a la cápside madura del virus. De esta manera las condiciones del ensayo *in vitro* se aproximan más a los ensayos *in vivo*. También menciona que los resultados que se obtienen en experimentos con soluciones de fosfato de sodio son más consistentes que aquellos que utilizan amortiguador Tris-HCl.

Diferentes autores realizan ensayos con varias condiciones en común, como lo es el uso de amortiguador fosfato de sodio, y realizando seguimiento de la multimerización a 350 nm con una temperatura entre los 21 y los 25°C. La concentración final de proteína que emplean es 60 mM a pH 8,0, un valor mucho mayor al empleado en otros reportes, en comparación a una concentración de CA de 200 μM a pH 8,0 y una concentración de CA de hasta 80 μM a pH 7,5. Por otro lado, estos autores utilizan el agregado de 2 M NaCl como desencadenante de la multimerización, mientras otros utilizan hasta 5 M NaCl (Tang C. *et al.*, 2003, Abdurahaman S. *et al.*, 2008 y Tsiang M. *et al.*, 2012, Teow S. *et al.*, 2013, Bocanegra R., 2011). Por su parte, del Álamo (del Álamo M, *et al.*, 2005) estudió la influencia de la concentración de CA entre 5 y 600 μM en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, utilizando como desencadenante el agregado de soluciones salinas de NaCl a concentraciones entre 0,15 M y 2,25 M NaCl, con pH variable entre 7,0 y 7,8, y realizó las mediciones a 350 nm y 25°C. A partir de estos ensayos, las condiciones óptimas que ellos determinaron fueron 44 μM CA en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8, utilizando NaCl 2,25 M como desencadenante y midiendo a 350 nm y 25°C.

Por otro lado, otros autores realizan el ensayo de multimerización en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, a una concentración 50 μM CA, y desencadenan la multimerización mediante la adición de NaCl 1,5-2,0 M. El seguimiento se realiza midiendo la fluorescencia emitida a 350 nm a temperatura ambiente (Miyazaki Y. *et al.*, 2017). A su vez, realizan la reacción en presencia de 5 mM β -mercaptoetanol (β -ME); agente reductor de enlaces disulfuro, y a 4°C, temperatura mucho menor que la empleada por otros autores. Estos autores, si bien no realizan estudios de inhibición, buscan comprender el mecanismo de

ensamblaje y desensamblaje de la cápside viral, por lo cual, estas condiciones son útiles para la puesta a punto del ensayo de multimerización *in vitro* de la cápside del VIH.

En un abordaje diferente al estudio de la multimerización de la CA, Lemke y colaboradores realizan la multimerización de la CANC de una manera particular. Fijan la CA al fondo de la placa por unión con un oligonucleótido, y utilizan una solución 10 M ZnCl_2 como agente desencadenante en amortiguador Tris 50 mM, pH 7,5 (Lemke C. *et al.*, 2012). A su vez, agregan una incubación previa a las lecturas de 15 minutos a temperatura ambiente, la cual puede ser importante a la hora de evaluar el efecto de compuestos en el proceso en estudio. Otros autores describen que el ZnCl_2 a concentraciones más bajas (100 μM) es mejor iniciador de la multimerización *in vitro* de la CANC que el NaCl, debido a que el cloruro de zinc estabiliza el dominio N-terminal de la CA mediante interacciones con sitios de coordinación de zinc del dominio NC (Miyazaki Y. *et al.*, 2017).

Otros autores que estudian la morfología de la multimerización de la cápside *in vitro* del VIH-1 mediante microscopía electrónica (Gross I. *et al.*, 2000) realizan la multimerización tras una diálisis de la CA en amortiguador MES 30 mM, pH 6,0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 0,5 M NaCl. Además, en un trabajo previo desencadenan la multimerización de la CANC con Tris-HCl 50 mM a pH variable entre 7,0 y 8,0 o con amortiguador MES 50 mM, pH 6,0 ó 6,5, en presencia de 0,1 M NaCl, 1mM EDTA y 1 mM DTT (Gross I. *et al.*, 1997). Ganser-Pronillos y colaboradores describen el uso de una solución 1 M NaCl en amortiguador Tris 50 mM, pH 8,0 como desencadenante y utilizan concentraciones mayores de la proteína CA recombinante (200-625 μM) (Ganser-Pronillos B. *et al.*, 2004). Von Schwedler y colaboradores emplean la CA a 400 μM en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, y miden la DO a 37°C (Von Schwedler U.K. *et al.*, 1998). Por otro lado, Barklis y colaboradores realizan un experimento similar, donde la CA se utiliza a 100 μM en Tris 50mM, pH 8,0, 1 M NaCl y 5 mM β -ME, y utilizan distintas concentraciones de NaCl (0,1-1 M) como desencadenante de la multimerización, midiendo a 4°C (Barklis E. *et al.*, 2009). La principal variación a destacar es que realizan el ensayo en presencia del material genético de *E. coli*. Es importante mencionar que estos estudios no tienen el mismo objetivo que los estudios de blancos moleculares, más allá de que el protocolo experimental pueda ser similar y brindar datos útiles para la puesta a punto del diseño experimental por ser *in vitro*.

Por su parte, Long y colaboradores estudiaron la multimerización por acción de la temperatura de la proteína CA de un virus similar al VIH, el VIF (Long M. *et al.*, 2021). El ensayo descrito se realiza a una concentración 200 μ M de CA en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, utilizando 1 M NaCl como desencadenante de la multimerización, y midiendo la DO a 345 nm a 38°C.

Finalmente, previo al inicio de esta pasantía, en el laboratorio de I+D de biomoléculas activas se realizó la puesta a punto de la expresión y purificación de la CANS recombinate y se realizó el ensayo de multimerización y un cribado inicial en busca de moléculas capaces de alterar dicho proceso. Para ello, Alvarez G y colaboradores, utilizaron amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, con 100 mM NaCl, y las mediciones se realizaron a 340 nm a 37°C, utilizando la temperatura como desencadenante de la multimerización. Sin embargo, no se logró que las corridas fueran reproducibles por tener mucho ruido en relación a la señal y se resolvió trabajar específicamente en la puesta a punto del ensayo, lo que se pautó como objetivo general de este trabajo. En este sentido, se utilizaron como punto de partida las condiciones que presentaron mejores resultados en los trabajos mencionados, y se diseñaron diferentes ensayos variando el amortiguador, el pH, las sales, la concentración de proteína y la temperatura para encontrar las condiciones experimentales óptimas para el ensayo de cribado en placa en el laboratorio (Alvarez G. *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Poner a punto el ensayo *in vitro* de la multimerización de la proteína recombinante de la cápside del virus de la inmunodeficiencia humana.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar los medios y materiales necesarios para la expresión del constructo de proteínas cápside-nucleocápside (CANC) recombinante en *Escherichia coli* BL21(DE3).
- Expresar y purificar la proteína CANC recombinante en cantidades suficientes para la realización de ensayos de multimerización.
- Estudiar el efecto de la fuerza iónica, de sales monovalentes y divalentes, concentración proteica, temperatura y pH sobre la multimerización *in vitro* de la CANC recombinante.
- Identificar las condiciones óptimas para estudiar la multimerización de la CANC recombinante de forma reproducible en placa de cribado de 96 pocillos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

- Material graduado: probetas de distintos volúmenes.
- Material de contención: matraces erlenmeyer, vasos de precipitados.
- Materiales de calentamiento: Planchas, mecheros bunsen.
- Materiales generales: espátulas, pastillas magnéticas, barquillos para balanza.
- Pipetas automáticas.

4.2. Instrumentos/Equipos

- Autoclave Vertical Automático (LS-75HD)
- Balanza analítica (Radwag® AS 82/220.R2)
- Incubadora de agitación horizontal (Modelo: ZWY-211C)
- Cromatógrafo automatizado (ÄKTA Pure™)
- Columna de cromatografía de intercambio iónico (SP 6/10, Citiva™)
- Columna de cromatografía de exclusión molecular (10/300 GL, Superdex™ 75)
- Centrífuga refrigerada de alta velocidad (Modelo: H2050R)
- Espectrofotómetro Agilent technologies (Cary 60 Uv-vis)
- pH-metro OAKTON (pH-Mv-Temp PH700)
- Varioskan Flash (Thermo scientific)

4.3. Reactivos

- Cloruro de sodio (NaCl) - DROGUERÍA INDUSTRIAL URUGUAYA[®]
- Agua destilada y bidestilada (H₂O)
- Etanol C₂H₆O - DROGUERÍA INDUSTRIAL URUGUAYA[®]
- 2-β mercaptoetanol (C₂H₆OS) - ≥99,0 %; PanReac AppliChem
- Dimetilsulfóxido (C₂H₆OS) - ≥99,9 %; EMSURE[®]
- Triptona - SIGMA-ALDRICH[®]
- Extracto de levadura - FLUKA[®]
- Ampicilina de sodio (C₁₆H₁₉N₃O₄S) - ≥91,0 %; PanReac AppliChem
- Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) - ≥99,9 %; Millipore
- Fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄) - ≥99,0 %; EMSURE[®]
- Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) - ≥99,0 %; FLUKA[®]
- Cloruro de zinc (ZnCl₂) - EMSURE[®]
- Polietilenimina (PEI) - SIGMA[®]
- Sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) - ≥99,5 %; PanReac AppliChem
- Ácido clorhídrico (HCl) - Cicarelli[®]
- Hidróxido de sodio (NaOH) - ≥99,0 %; EMSURE[®]
- Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄) - ≥99,0%; SIGMA[®]
- Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) - ≥99,0 %; SIGMA-ALDRICH[®]
- Tris - ≥99,9 %; INVITROGEN[™]
- Cloruro de magnesio (MgCl₂) - ≥98,0 %; SIGMA[®]
- Cloruro de potasio (KCl) - ≥99,5 %; EMSURE[®]
- Marcador de Peso Molecular (MPM) Full Range Rainbow Sigma -RPN800E-

4.4. Material biológico

- Bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET11a; **Figura 5**, conteniendo el gen para la expresión del constructo CANC cedido por el Dr. Michael Summer de University of Maryland, Baltimore County, Estados Unidos.

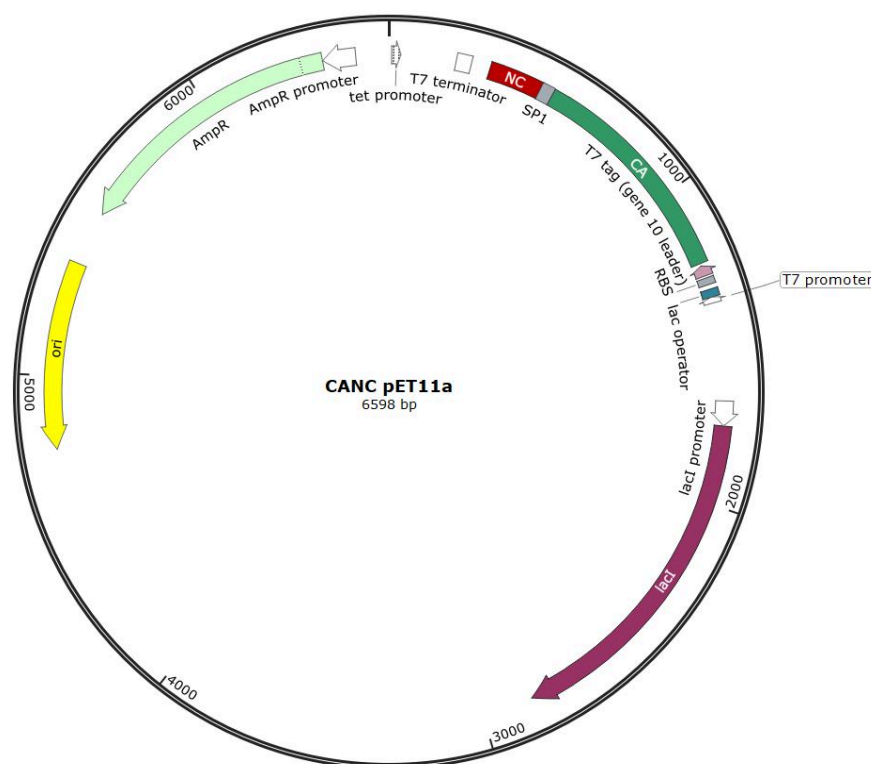


Figura 5. Esquema del plásmido pET11a conteniendo la secuencia para la expresión de la proteína CANK recombinante en *E. coli*. En el esquema se pueden observar las regiones vinculadas a la expresión del gen de interés así como la región que le confiere resistencia antibiótica (en este caso a ampicilina) a la bacteria.

4.5. Métodos

4.5.1. Expresión y purificación de la CANK recombinante

El protocolo empleado fue puesto a punto en el laboratorio en el año 2021. Para la expresión, se prepararon y esterilizaron los materiales, medios de cultivo y soluciones necesarias. Posteriormente, se crecieron las bacterias a 37°C en medio Luria Bertani -LB- (1% Triptona, 1% NaCl, 0,5% Extracto de levadura) en presencia de ampicilina 50 µg/mL hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,6 unidades. Seguidamente, se indujo la expresión de la CANK recombinante con 1 mM IPTG y se dejó incubando toda la noche a 20 °C con agitación orbital. Se colectaron las bacterias por centrifugación a 5.000 x g a 4°C por 30 minutos. El *pellet* de bacterias se suspendió en solución de fosfato de potasio 25 mM, pH 6,0,

con 500 mM NaCl, y se lisaron las células por ciclos sucesivos de sonicado. Se clarificó la fracción soluble por centrifugación a 13.000 x g, por 30 minutos a 4°C.

A continuación se realizaron varios pasos de precipitación sucesivos. Primero se realizó una incubación con PEI 1,5 % durante 2 horas a 4°C con agitación orbital. Al finalizar se homogeneizó y se centrifugó la muestra a 13.000 x g, por 30 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con 10 % sulfato de amonio durante 1 hora a 4°C con agitación orbital. A continuación, se centrifugó nuevamente a 13.000 x g, por 30 minutos a 4°C y se incubó el sobrenadante con 25 % sulfato de amonio durante 1 hora en las mismas condiciones. Nuevamente se centrifuga la muestra a 13.000 x g por 30 minutos a 4°C. Se resuspende el precipitado obtenido en amortiguador fosfato de potasio 25 mM, pH 6,0, con 1,5 mM fosfato de sodio y se dializó contra amortiguador fosfato de potasio 25 mM, pH 6,0 con 25 mM NaCl durante 16 horas a 4°C. Pasado ese tiempo, se recuperó la muestra y se clarificó por centrifugación a 13.000 x g, por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se clarifica con filtro de jeringa de 0,45 µm y se conserva en hielo hasta su siembra en la columna cromatográfica. En cada uno de los pasos se toman alícuotas del sobrenadante y del precipitado para analizar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) en qué fracción se encuentra la proteína de interés.

La muestra clarificada se sembró en una columna de cromatografía de intercambio iónico (SP 6/10, Citiva™) previamente equilibrada con el amortiguador de la muestra, acoplada a un cromatógrafo automatizado. Luego de lavar con 5 % de amortiguador de elución, se eluyen las proteínas unidas a la columna mediante aumento de la fuerza iónica, con 60% de amortiguador 25 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6,0 con 1 M NaCl. La corrida cromatográfica se siguió por espectrofotometría a 280 nm y se colectaron las fracciones en las que se ve un aumento de la absorbancia. En cada paso se tomaron alícuotas de 100 µL de cada fracción para su análisis por electroforesis SDS-PAGE.

Las fracciones en las que se vio mediante electroforesis que contenían la CANC recombinante se juntaron y se concentraron por centrifugación en filtros con membrana con punto de corte de 10 kDa hasta aproximadamente 1 mL. Posteriormente, se clarificó esta fracción por centrifugación durante 10 minutos a 10.000 x g a 4°C, y se realizaron 3 inyecciones de manera manual de 0,5 mL a una columna de gel filtración (Superdex™ 75, 10/300 GL) previamente equilibrada con amortiguador Tris 50 mM, pH 7,5, con 5 mM

MgCl₂, 140 mM KCl, 10 mM NaCl y 5 mM βME, para su separación por tamaño. Al igual que en la cromatografía anterior, la columna se conectó a un cromatógrafo automatizado y se siguió la corrida midiendo la absorbancia a 280 nm a la salida de la columna para identificar las fracciones conteniendo proteína mediante posterior electroforesis desnaturalizante.

*Nota: La **Figura 20**. ilustra un esquema del procedimiento de expresión y purificación de la CANC recombinante.*

4.5.2. Determinación de la concentración de CANC

Las fracciones conteniendo la CANC recombinante pura se juntaron y se cuantificó la proteína en dicha muestra. Esta medida se realizó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas. Para ello, se realiza un blanco con el amortiguador de la muestra y posteriormente se realizan medidas de absorbancia a 280 nm de la proteína diluida por duplicado o triplicado hasta concordancia. Con los valores obtenidos se calcula la concentración de CANC utilizando la Ley de Lambert-Beer ($A_{280\text{ nm}} = \epsilon * b * []$), siendo “ ϵ ” el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 40.950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), “ b ” el paso óptico ($b = 1 \text{ cm}$) y $A_{280\text{ nm}}$ el valor de absorbancia medido. El valor de “ ϵ ” se estimó a partir de la secuencia de aminoácidos de la CANC utilizando el programa ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), y la concentración de CANC (“[]”) se obtuvo despejando de la ecuación anterior y multiplicando por el factor de dilución. (**Figura 20, ANEXO**).

4.5.3. Puesta a punto del ensayo de multimerización de la CANC recombinante *in vitro*

Para la puesta a punto del ensayo de multimerización, se evaluaron condiciones relevadas a partir de la búsqueda bibliográfica y se sumaron condiciones de ensayos anteriores realizados por el equipo de investigación, las cuales se describen en la introducción de este trabajo. Las variables evaluadas fueron las siguientes: temperatura, concentración de proteína, concentración de sales y pH.

Como se desprende de la literatura y se expuso anteriormente, la multimerización de la CANC del VIH se puede inducir de dos maneras distintas, por acción de sales, ya sean estas monovalentes o divalentes, o por acción de la temperatura. Estas variables son los dos ejes principales para el diseño y la realización de los ensayos, los cuales se realizaron en placa de

96 pocillos con un volumen final de 100 μL . Para los ensayos de multimerización por adición de sales, se mezclaron en los pocillos los volúmenes correspondientes de proteína y amortiguador y luego se agregó el amortiguador conteniendo las sales como disparador del proceso de multimerización, según las concentraciones deseadas en cada caso. Por otra parte, para la multimerización por temperatura se adiciona a cada pocillo la CANC recombinante a la concentración deseada, y posteriormente se introduce la placa en el lector de placas seteado a la temperatura a evaluar, se homogeniza por agitación orbital y se mide la DO.

Para el estudio del efecto de las distintas concentraciones de sales en el ensamblaje *in vitro* de la CANC, en primer lugar, se ensayó a concentración fija de 30 μM CANC a 30°C y pH 7,4 en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, y distintas concentraciones de la sal monovalente NaCl (0; 1; 1,5; 2; 2,25 y 2,5 M). En segundo lugar, se repitieron los ensayos para las condiciones de 2,25 y 2,5 M de NaCl a dos concentraciones distintas de CANC 15 y 20 μM a 30°C en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. Finalmente, se realizó para las condiciones de 2,25 y 2,5 M de NaCl un ensayo en paralelo evaluando las 3 concentraciones de CANC: 15, 20 y 30 μM a en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 y a una temperatura de 20°C. Por otro lado, se ensayó el efecto de las sales divalentes como el ZnCl_2 . Para ello, se prepararon soluciones de 100 μM de ZnCl_2 en fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0 ó en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. En estos casos el ensayo se realizó con 30 ó 50 μM CANC y a una temperatura de 30°C.

Por otro lado, se estudió el ensamblaje *in vitro* desencadenado por acción de la temperatura. En primer lugar, se ensayó a una concentración fija de 150 μM de CANC el efecto del pH en la multimerización a distintas temperaturas. Para ello, se prepararon soluciones amortiguadoras con fosfato de sodio 50 mM a pH 7,0, 7,4, 7,8 y 8,0, y el ensayo se realizó con cada una de estas soluciones a varias temperaturas (30, 33, 37 y 40°C). A 40°C también se realizó el ensayo con el mismo amortiguador a pH 8,2 y 8,4. Adicionalmente, se realizó un nuevo ensayo a 42°C para los pH 7,8 hasta 8,2 a una concentración de 100 ó 150 μM CANC, y se realizaron ensayos a 40 y 42°C para los distintos pH comprendidos entre 8,0 y 8,4, a tres concentraciones diferentes de CANC (75, 100 y 150 μM). A partir de los resultados obtenidos, se repitieron los ensayos a 42°C a pH 8,2 con 150 μM de CANC, corriendo cuadruplicados para valorar la reproducibilidad y variabilidad del ensayo en estas condiciones. Finalmente, se realizó un ensayo a 42°C en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2 con 150 μM de CANC, para estudiar la influencia de la temperatura en el ensayo.

Tabla 1. Resumen de las condiciones experimentales ensayadas.

Condición N°	[CANC] (μ M)	T ($^{\circ}$ C)	pH	[Sal] (M)	Sal	Amortiguador
1	30	30	7,4	0; 1; 1,5; 2; 2,25; 2,5	NaCl	Fosfato de sodio 50mM
2	15, 20	30	7,4	2,25; 2,5	NaCl	Fosfato de sodio 50mM
3	15, 20, 30	20	7,4	2,25; 2,5	NaCl	Fosfato de sodio 50 mM
4	30, 50	30	8,0	100 μ M	ZnCl ₂	Fosfato de sodio 50mM
						Tris-HCl 50 mM
5	150	30, 33, 37, 40	7,0; 7,4; 7,8; 8,0	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
6	150	40	7,8; 8; 8,2; 8,4	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
7	150	42	7,8; 8,0; 8,2; 8,4	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
8	100	40	7,8; 8,0; 8,2; 8,4	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
9	75, 100, 150	40	8,0; 8,2; 8,4	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
10	75, 100 y 150	42	8,0; 8,2; 8,4	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
11	150	42	8,0; 8,2; 8,4	-	-	Fosfato de sodio 50 mM
12	150	42	8,2	-	-	Fosfato de sodio 50 mM

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Expresión y purificación de la CANC recombinante.

Para la expresión y purificación de la CANC recombinante se partió de bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET11a que contiene el gen para la expresión de la proteína CANC y confiere a las bacterias resistencia a la ampicilina. Como se describe en la sección de Metodología, cada paso del proceso se analizó mediante toma de muestras y SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. En la **Figura 6** se muestra el análisis de la primera parte del proceso, que incluye la expresión de la proteína de interés y los pasos sucesivos de precipitación iniciales.

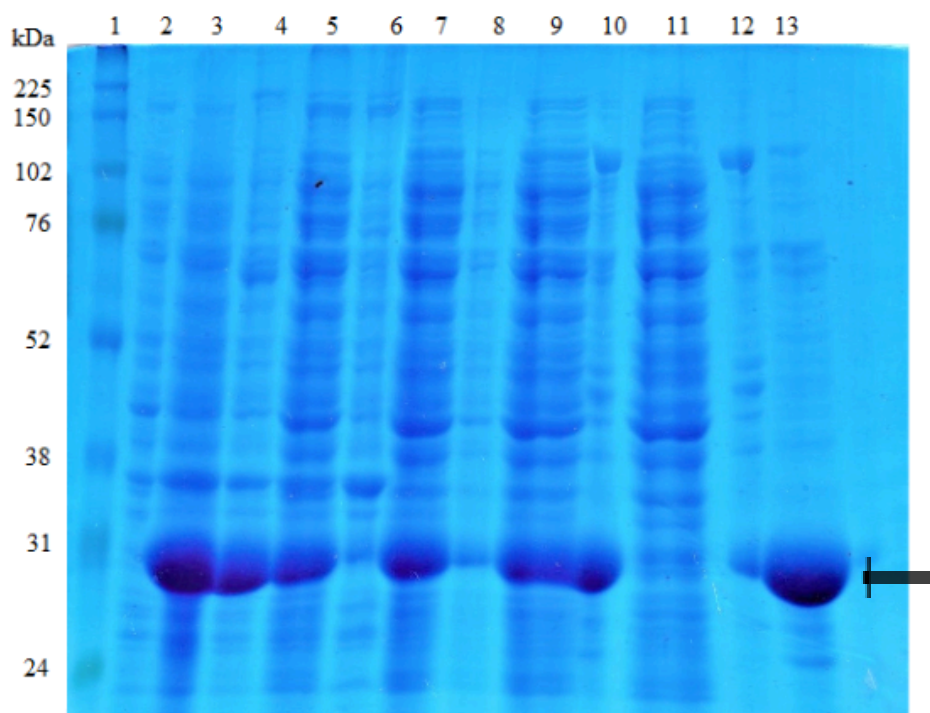


Figura 6. Análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación de la CANC recombinante mediante SDS-PAGE. Las fracciones colectadas durante la purificación fueron preparadas con amortiguador de muestra en presencia de agente reductor y analizadas mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12 %. La banda correspondiente a la CANC se señala con una flecha. El gel se sembró de la siguiente manera: carril 1) MPM, carril 2) muestra pre-inducción con IPTG, carril 3) muestra post-inducción con IPTG, carril 4) fracción insoluble del lisado bacteriano, carril 5) fracción soluble del lisado bacteriano, carril 6) fracción insoluble luego de precipitación con PEI, carril 7) fracción soluble luego de precipitación con PEI, carril 8) fracción insoluble luego de tratamiento con sulfato de amonio al 10 %, carril 9) fracción soluble luego del tratamiento con sulfato de amonio al 10 %, carril 10) fracción insoluble luego del tratamiento con sulfato de amonio al 25 %, carril 11) fracción soluble luego del tratamiento con sulfato de amonio al 25 %, carril 12) fracción insoluble luego de la diálisis, y carril 13) fracción soluble luego de la diálisis.

La purificación de la CANC recombinante se realizó en varios pasos, como se detalló anteriormente, los cuales comienzan con sucesivas etapas de precipitación y centrifugación. Inicialmente, se agregó PEI al 1,5 %, buscando precipitar el material genético (plásmidos y ADN de la bacteria) y proteínas de carácter ácido (con carga neta negativa). Posteriormente, con el agregado de sulfato de amonio al 10 % se busca precipitar otros contaminantes proteicos solubles. Finalmente, al aumentar la saturación de sulfato de amonio al 25 % se busca precipitar la proteína de interés para luego resuspenderla en un amortiguador que permite seguir trabajando con la proteína soluble.

Como se puede observar en la **Figura 6**, luego de la inducción con IPTG (carril 3) se identifica una banda mayoritaria que migra por debajo de las bandas de 31 kDa del MPM (carril 1), como era de esperar para la CANC recombinante expresada. En contraparte, se observa la ausencia de la misma en la pre-inducción (carril 2). Asimismo, se observa que luego de la lisis la mayor parte de la proteína de interés queda en la fracción soluble (carril 4), aunque una parte minoritaria se observa en la fracción insoluble (carril 5), lo cual indica que no se parte de la totalidad de la proteína expresada ya que la purificación se realiza a partir de la fracción soluble. Por otra parte, luego de la precipitación con PEI y con 10 % de sulfato de amonio, la proteína queda retenida en la fracción soluble (carril 7 y 9, respectivamente) y no en la fracción insoluble (carril 6 y 8, respectivamente), como era de esperarse. En cambio, al incubarse con 25 % de sulfato de amonio, la CANC recombinante se recupera en la fracción insoluble como prevé el protocolo (carriles 10 y 11, respectivamente). Por último, luego de la diálisis se observa que varios contaminantes precipitaron, e incluso parte de la proteína de interés (carril 12). Sin embargo, se ve claramente que luego de la diálisis la CANC permanece en su mayoría soluble y hay una disminución de los contaminantes proteicos (carril 13).

A continuación se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en la cual la CANC -cargada positivamente por utilizar un amortiguador de pH menor al punto isoeléctrico de la proteína de interés (pI 9,06)- interacciona con la resina de la columna que está cargada negativamente. Al inicio del procedimiento, como se observa en la **Figura 7A**, se colectó la fracción no unida (primeros 75 ml) correspondiente a todas aquellas proteínas que no interaccionan con la columna (carril 2 de la **Figura 7B**). A continuación se lavó la columna con 5% de amortiguador de elución (primer escalón verde en la **Figura 7A**) y se colectaron las fracciones correspondientes (carril 3 de la **Figura 7B**), observándose algunas bandas tenues correspondientes a proteínas contaminantes. Para eluir la proteína, se utilizó un gradiente de NaCl, lo que permite variar progresivamente la concentración de cationes, los

cuales compiten con la CANC por la columna. En el último paso se eluyó la proteína con 60% de amortiguador de elución, se obtuvo un pico de absorbancia a 280 nm (pasando los 200 mL de corrida en la **Figura 7A**), y al correr esta fracción (carril 4 de la **Figura 7B**) se observó una banda muy mayoritaria correspondiente a la proteína de interés.

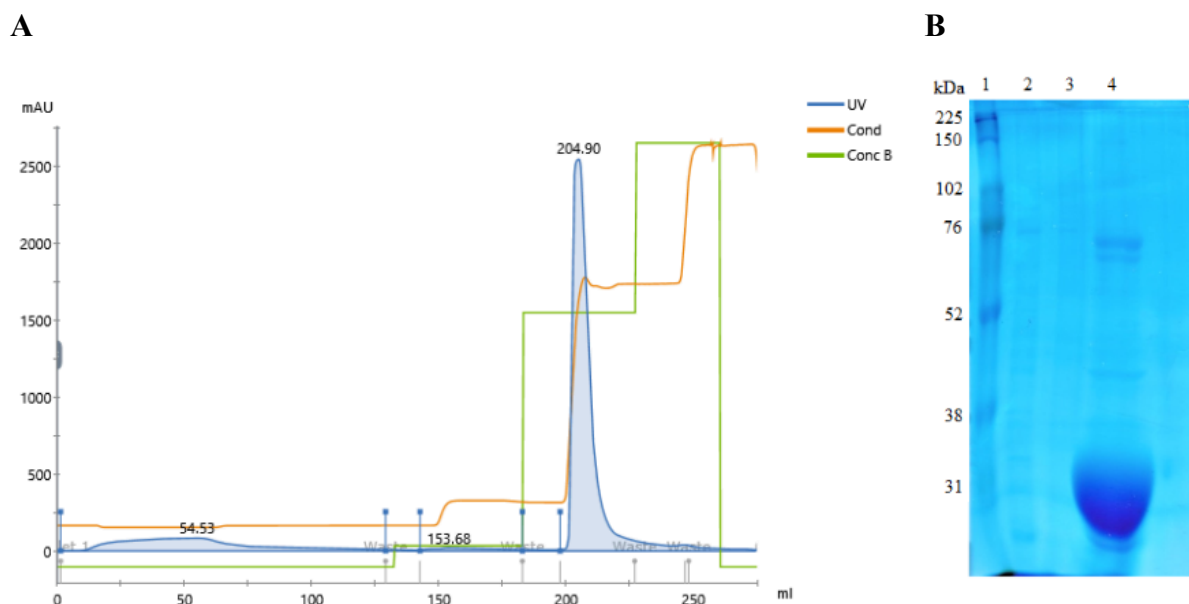


Figura 7. Cromatografía de intercambio iónico. A. Cromatograma obtenido para la cromatografía de intercambio iónico. Picos de izquierda a derecha: 54.53 ml: fracción no unida, 153.68 ml: 2° lavado con 5% de amortiguador de elución, 204.90 ml: elución con 60% de amortiguador de elución. **B. Análisis mediante SDS-PAGE al 12% de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de intercambio iónico, en condiciones reductoras.** Orden de siembra: 1) Marcador de peso molecular, 2) Fracción no unida, 3) Fracción de elución con 5% de amortiguador de elución, y 4) Fracción de elución con 60% de amortiguador de elución.

A partir del análisis realizado, se concentró el pico conteniendo la CANC (carril 4) hasta obtener un volumen adecuado para sembrar en la columna de gel filtración. Durante dicha cromatografía, se colectaron los picos obtenidos en cada una de las inyecciones (**Figura 8A**) y se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 8B**). A partir de este resultado, se resolvió juntar los picos obtenidos en una única fracción y proceder a trabajar con dicha muestra.

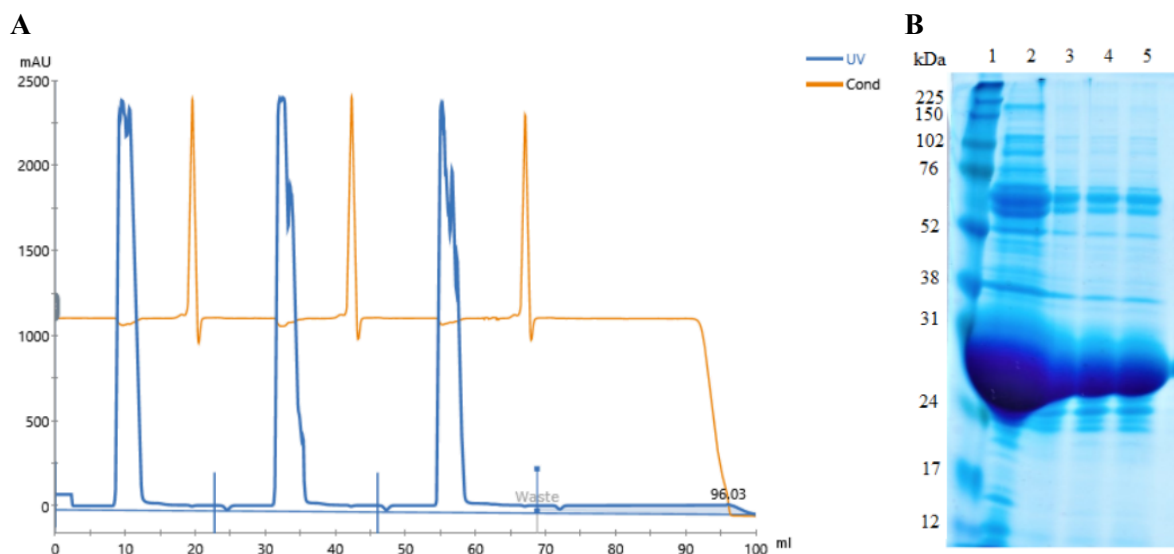


Figura 8. Cromatografía de exclusión molecular (SEC). A. Cromatograma obtenido para la cromatografía de exclusión molecular. Las flechas negras señalan las inyecciones. El trazo azul representa la absorbancia a 280 nm y el trazo naranja la conductancia registrada por el equipo durante la corrida. **B. Análisis de las fracciones obtenidas de la SEC mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras.** Orden de siembra: 1) Marcador de peso molecular, 2) Concentrado del pico obtenido de la cromatografía de intercambio iónico que se sembró en la SEC, 3) Pico de la primera corrida, 4) Pico de la segunda corrida, y 5) Pico de la tercera corrida.

5.2. Puesta a punto del ensayo de multimerización *in vitro* de la CANC recombinante.

Como se comentó, el objetivo general de este trabajo es poner a punto un ensayo de multimerización de la CANC recombinante de VIH que permita evaluar cientos a miles de compuestos mediante un ensayo en placa de 96 pocillos de la proteína aislada en un lector de placas con modo cinético. Para ello, es importante mencionar que el estudio de inhibición de compuestos se realiza a partir del estudio de pendientes en la zona media de las gráficas de aumento de la densidad óptica (DO) en función del tiempo. Además, la representación gráfica deseada para este estudio se asimila a una curva sigmoidea, la cual presenta tres regiones: una fase lag o logarítmica, una fase de crecimiento lineal, y una fase estacionaria final o asintótica. Esto es importante porque el ensayo debe permitir obtener una buena relación señal/ruido para su análisis confiable y reproducible, y debe ocurrir en tiempos manejables para ensayar cientos de compuestos, pero que cada fase sea suficientemente larga como para obtener suficientes medidas de cada una en el ensayo.

Como se describió anteriormente, la multimerización *in vitro* de la proteína CA del VIH se puede desencadenar de dos maneras distintas: por acción de sales o por acción de la temperatura. Por ser la más empleada en la literatura, se empezó ensayando la multimerización desencadenada por acción de sales monovalentes o divalentes, y posteriormente, se ensayó la temperatura como desencadenante.

5.2.1. Multimerización por acción de sales

En primera instancia, se analizó el ensayo de multimerización desencadenada por acción de sales monovalentes utilizando cloruro de sodio. Para ello, se partió de un ensayo exploratorio que se presenta en la **Figura 9**. En el mismo no se observó multimerización a concentraciones inferiores a 2,25 M NaCl. Esto es comparable con los resultados obtenidos en la búsqueda bibliográfica donde la multimerización de la CANC se ve beneficiada por altas concentraciones de sales. Sin embargo, la relación señal/ruido sigue siendo baja y no logra observarse el comportamiento sigmoideo esperado.

El hecho de que no fue posible visualizar la fase lag es de mucha importancia, ya que indica que la multimerización es rápida tras el agregado de NaCl, empezando la agregación proteica antes de las primeras medidas de DO. Esto genera un gran inconveniente para los ensayos de inhibición, ya que debe poder sembrarse la totalidad de la placa antes de que finalice la fase lag.

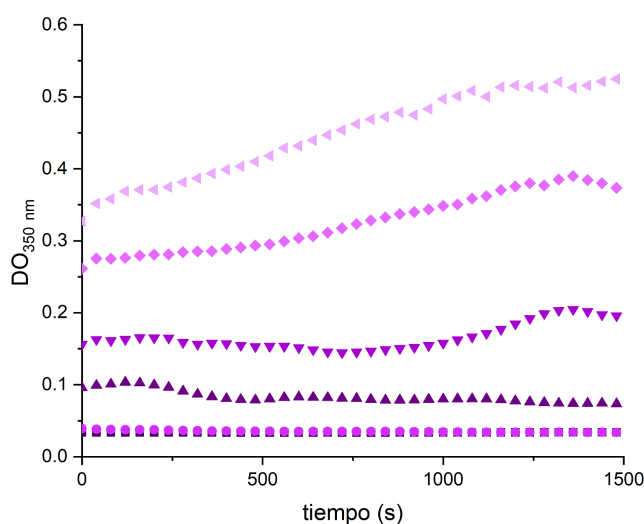


Figura 9. Estudio del efecto de la concentración de NaCl en la multimerización. Corridas representativas de la multimerización a 30°C y pH 7,4, en amortiguador fosfato de sodio 50 mM. Se utilizó una concentración de 30 μ M de CANC y concentración variable de cloruro de sodio: 0 M (■), 1 M (●), 1,5 M (▲), 2 M (▼), 2,25 M (◆) y 2,5 M (◄).

Con el fin de poder visualizar la fase lag, se disminuyó la concentración de CANC a 15 y 20 μM . Como se observa en la **Figura 10**, no fue posible visualizar dicha fase en ningún caso. No obstante, es posible observar una tendencia a la multimerización a una concentración de 15 μM y 2,5 M NaCl; aunque la variación de absorbancia correspondiente entre la fase lag y la fase final sería pequeña en comparación con la CANC a 20 μM y 2,5 M NaCl, y 30 μM , a ambas concentraciones de sal; esto debido a que un aumento de la concentración de proteína está asociado a un mayor valor de DO alcanzable. Además, al igual que el caso anterior, se observa que para una concentración fija de CANC aumentar la concentración de sal monovalente se asocia a un mayor aumento de la DO final alcanzada; mayor diferencia entre la fase lag y la fase estacionaria. Estas grandes variaciones de absorbancia son beneficiosas ya que implicaría una mayor sensibilidad por parte del método de medición. La **Figura 10** incluye también los resultados obtenidos del ensayo anterior; concentración de 30 μM CANC.

Al igual que el caso anterior, las gráficas observadas indican que gran parte de la reacción de multimerización ocurre durante el sembrado de la placa y por consiguiente antes de comenzar a medir. Además, fue posible observar la formación de un agregado de color blanco, lo que objetiviza la agregación de la proteína en la placa (**Figura 21, ANEXO**).

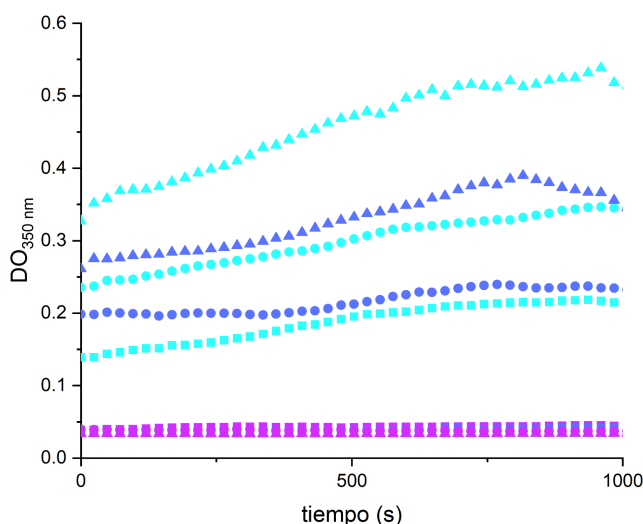


Figura 10. Multimerización a 30°C y amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, para concentración variable de CANC y concentración variable de NaCl. Corridas representativas de la multimerización a 30°C y amortiguador fosfato de sodio 50mM, pH 7,4. Se utilizó una concentración de 15 (■), 20 (●) y 30 (▲) μM de CANC y concentración variable de cloruro de sodio: 0 M (violeta), 2,25 M (azul), 2,5 M (celeste).

Finalmente, se realizó otro ensayo de multimerización con NaCl 2,25 y 2,5 M, CANC 15, 20 y 30 μM , pero bajando la temperatura a 20°C, con el objetivo de disminuir la velocidad del proceso. Las curvas obtenidas se presentan en la **Figura 11**.

Como se puede observar, no se detectó reacción de multimerización para ninguna de las condiciones ensayadas. Sin embargo, llama la atención cómo la polimerización se ve afectada por la temperatura, ya que las condiciones ensayadas difieren únicamente en esta variable, lo cual es acorde a lo reportado en la literatura. Es de esperar, por lo tanto, que al aumentar la temperatura la velocidad de multimerización sea mayor.

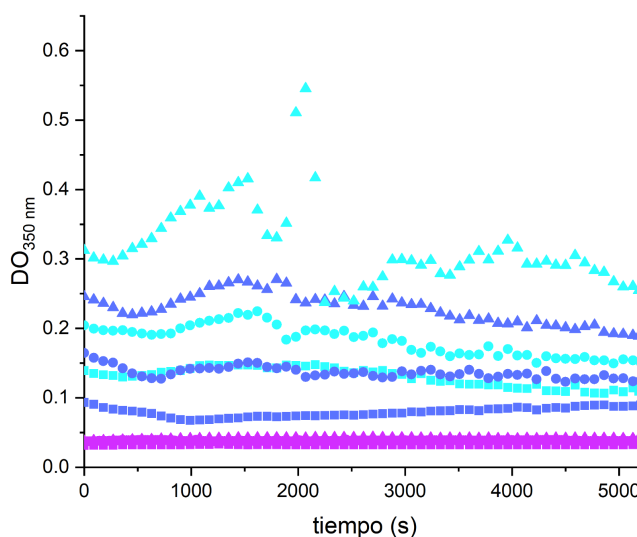


Figura 11. Multimerización a 20°C y amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, para concentración variable de CANC y concentración variable de NaCl. Corridas representativas de la multimerización a 20°C y amortiguador fosfato de sodio 50mM, pH 7,4. Se utilizó una concentración de 15 (■), 20 (●) y 30 (▲) μM de CANC (rosado, azul y celeste, respectivamente) y concentración variable de cloruro de sodio: 0 M (violeta), 2,25 M (azul), 2,5 M (celeste).

A continuación, debido a que está reportado el uso de ZnCl_2 para desencadenar este proceso *in vitro*, en particular en relación a los receptores de Zn^{2+} de la proteína de la nucleocápside, se probó dicha condición tanto en amortiguador fosfato como Tris-HCl a pH 8,0 y utilizando dos concentraciones distintas de CANC (30 y 50 μM).

Como se puede observar en la **Figura 12**, a medida que aumenta la concentración de CANC también aumenta la relación señal/ruido, puesto que aumentan los valores máximos

alcanzados. Asimismo, se constató que la DO máxima alcanzada es mayor al emplear Tris-HCl. Sin embargo, para ambas condiciones de ensayo, no fue posible visualizar completamente el gráfico deseado para el estudio, ya que al igual que la polimerización por acción de NaCl, la fase lag no se pudo registrar. También se constató que los valores máximos de DO obtenidos fueron menores en comparación con el ensayo con NaCl para la concentración 30 μM de CANC.

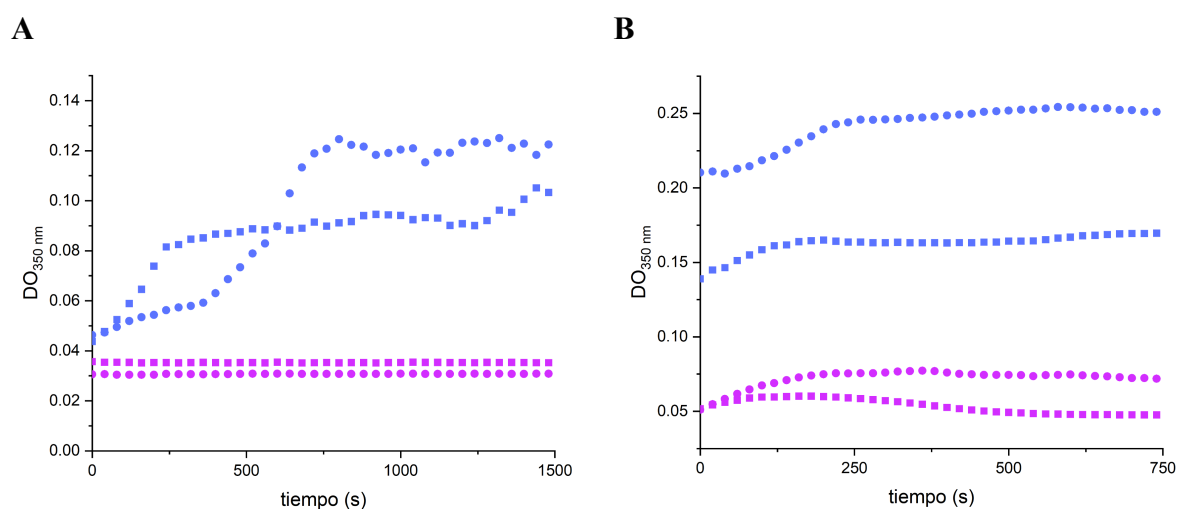


Figura 12. Multimerización a 30°C, pH 8,0, 30 y 50 μM de CANC y 100 μM ZnCl_2 , en amortiguador fosfato de sodio 50 mM y TRIS-HCl 50 mM. Corridas representativas de la multimerización a 30°C y pH 8,0, en amortiguador fosfato de sodio 50 mM (A) y TRIS-HCl 50 mM (B). Se utilizó una concentración de 30 μM de CANC (●) y 50 μM de CANC (■), concentración de cloruro de zinc: 0 μM ZnCl_2 (color violeta) y 100 μM ZnCl_2 (color azul).

En base a los resultados obtenidos, se puede observar que el tiempo que transcurre entre que es desencadenada la multimerización y comienza la lectura del proceso midiendo la DO *in vitro* presenta la problemática de que no es posible visualizar de forma satisfactoria todo el proceso de multimerización, ya que no se logra registrar la fase lag y la primera parte de la fase de crecimiento exponencial. Estas secciones del gráfico son de gran importancia debido a que se requiere tiempo suficiente para poder sembrar la placa durante los ensayos de inhibición y para efectuar la incubación de los compuestos previo a las medidas de DO. Además, como se mencionó, el estudio de inhibición o aceleración de la multimerización de la CANC recombinante se basa en el análisis de pendientes durante la fase de crecimiento

exponencial, siendo necesario que la misma se encuentre completa y cuente con suficientes puntos para su posterior análisis matemático.

5.2.2. Multimerización por acción de la temperatura

Con el fin de identificar condiciones reproducibles en las que sea viable la siembra de la placa completa así como el análisis posterior de la gráfica sigmoidea, se plantearon ensayos de multimerización en los cuales el desencadenante del proceso fuera la temperatura. Para ello, se trabajó modificando distintas variables que incluyeron el pH y la temperatura, manteniendo inicialmente fija la concentración de proteína en 150 μ M.

La **Figura 13** muestra los ensayos realizados a distintos pH entre 7,0 y 8,0 a las temperaturas de 30, 33, 37 y 40°C. Como se puede observar, recién a partir de los 37°C se logró registrar el comportamiento esperado para la multimerización. Comparando con los ensayos anteriores en los que se utilizaba el agregado de sales como desencadenante del proceso, en el que aumentar la concentración de proteína no permitía seguir correctamente la multimerización por este método, la incubación a 37 ó 40°C resulta en una curva sigmoidea con buena relación señal/ruido. En particular, al incubar a 40°C se obtiene una fase lag más clara y prolongada que habilitaría la siembra de una placa completa sin interferir con el seguimiento del proceso, ya que como se mencionó anteriormente, la fase lag es necesaria para poder realizar la siembra en placa en los ensayos de inhibición y de la incubación de la misma y la fase de crecimiento lineal es necesaria para hacer la determinación de la magnitud de las pendientes.

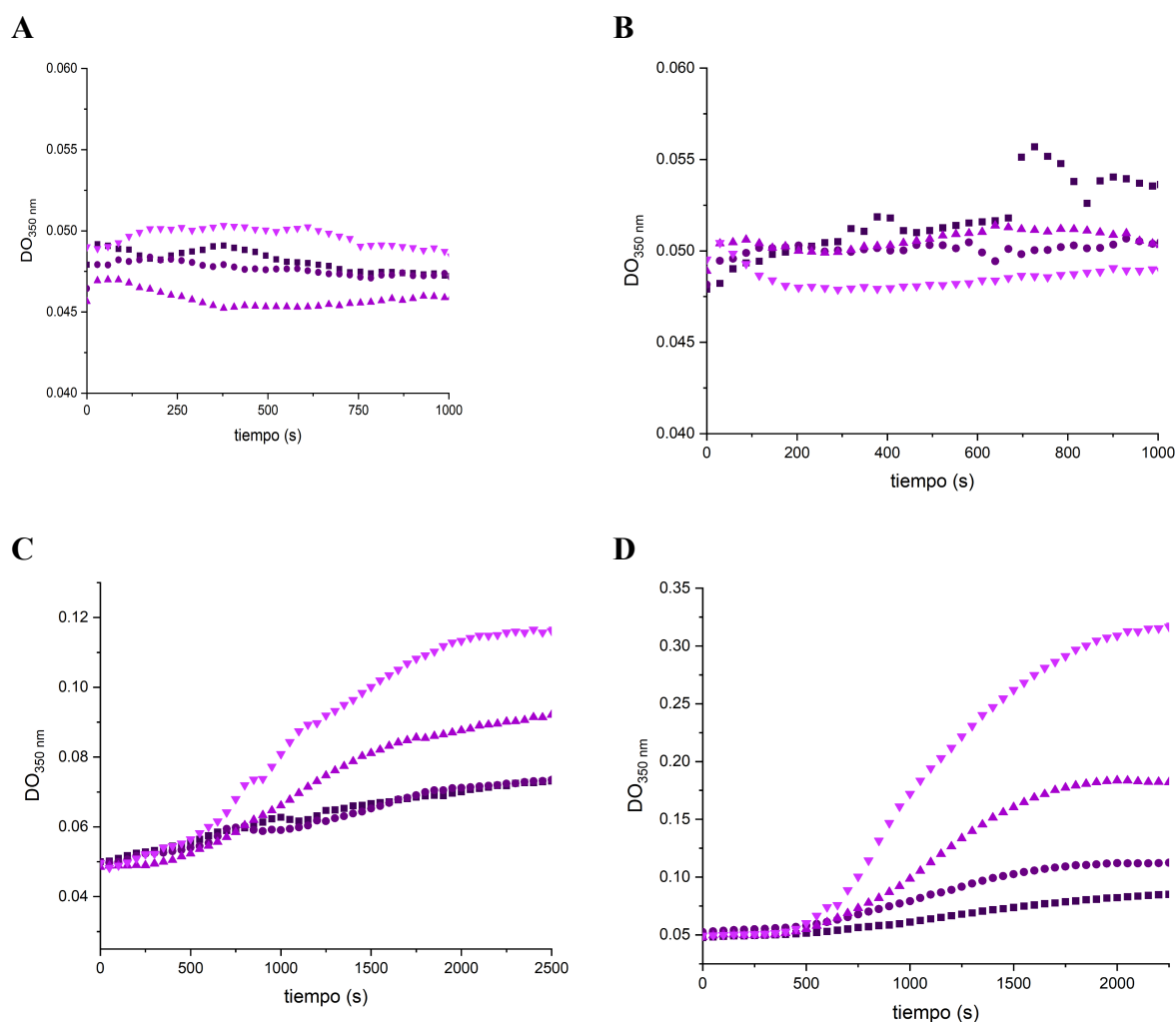


Figura 13. Multimerización a concentración fija de 150 μ M CANC y distintos valores de pH y temperatura. Panel A. Ensayo a 30°C, Panel B. Ensayo a 33°C, Panel C. Ensayo a 37°C y Panel D. Ensayo a 40°C. En cada panel los siguientes valores de pH: 7,0 (■), 7,4 (●), 7,8 (▲) y 8,0 (▼).

A su vez, es interesante mencionar que al igual que ocurrió en los experimentos ya discutidos de la **Figura 13**, al aumentar el pH se alcanzan mayores valores de DO, es decir mayor señal, lo que favorece el seguimiento del proceso. Por último, se observó que a pH 8,0 y 40°C los resultados presentan menor dispersión estándar relativa (RSD) respecto a aquellos obtenidos a pH 8,0 y 37°C, lo cual favorece la repetibilidad de la condición ensayada.

Debido a los resultados favorables obtenidos a 40°C y la tendencia descrita en relación al pH, se repitió dicha condición utilizando pH entre 7,8 y 8,4. La **Figura 14** ilustra los resultados obtenidos. Como se puede observar gráficamente, los valores máximos de DO

continúan aumentando conforme el pH aumenta, siguiendo la tendencia mencionada para los ensayos anteriores. Además, los resultados obtenidos para las pendientes a pH 7,8 y 8,0 fueron similares a los obtenidos en el ensayo de la **Figura 13**, mostrando reproducibilidad. En el mismo sentido, a pH 8,2 los resultados poseen una dispersión menor que las dos primeras condiciones, y los valores máximos de DO son mayores, lo cual es beneficioso. Sin embargo, a pH 8,4 si bien se observa que el valor máximo de DO alcanzado es aún mayor, la dispersión entre corridas también aumenta.

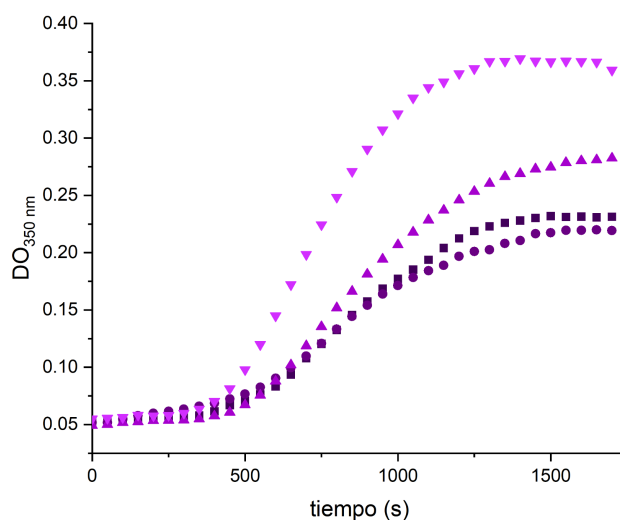


Figura 14. Multimerización a concentración fija de 150 μ M CANC y 40°C para distintos valores de pH. Se estudiaron los siguientes valores de pH: 7,8 (■), 8,0 (●), 8,2 (▲) y 8,4 (▼),

Debido a la dependencia entre el pH y la temperatura que se manifiesta en los resultados obtenidos en la multimerización *in vitro*, se estudió el ensayo a 42°C para los mismos cuatro valores de pH, como se muestra en la **Figura 15**. Se puede observar que para todos los pH se alcanzan variaciones de DO en el entorno de la unidad. Sin embargo, a los pH 7,8 y 8,4 se detectó menor reproducibilidad en relación a la velocidad de agregación de la proteína comparado con los pH 8,0 y 8,2.

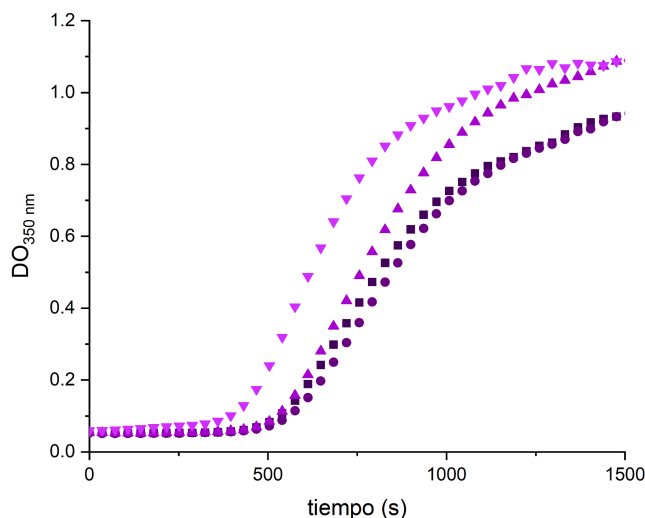


Figura 15. Multimerización a concentración fija de 150 μ M CANC y 42°C para distintos valores de pH. Se estudiaron los siguientes valores de pH: 7,8 (■), 8,0 (●), 8,2 (▲) y 8,4 (▼).

En base a los resultados obtenidos para los ensayos a distinto pH tanto a 40°C como a 42°C, se buscó reducir la cantidad de proteína utilizada para aumentar el rendimiento de la misma. En la **Figura 16** se muestran los resultados obtenidos para una concentración de CANC de 100 μ M a pH entre 7,8 y 8,4 a 40°C. Como se puede observar, la fase lag no se ve influenciada por esta disminución de la concentración de CANC, lo cual es beneficioso ya que aumentamos el rendimiento en el uso de la proteína de interés. Por otro lado, se vio que las pendientes a pH 8,2 y 8,4 son similares.

Llama la atención el hecho de que el ensayo presentado en la **Figura 16** presenta valores máximos de DO mayores respecto a los observados en la **Figura 14**, la cual utiliza mayor concentración de proteína. A pesar de que dentro de un mismo ensayo, se observa mayor incremento de la DO a mayor concentración proteica empleada, al comparar ensayos independientes no siempre se cumple esta tendencia. Esto refuerza la idea de que se hace necesario identificar condiciones que proporcionan resultados reproducibles y coherentes de manera sostenida entre ensayos independientes.

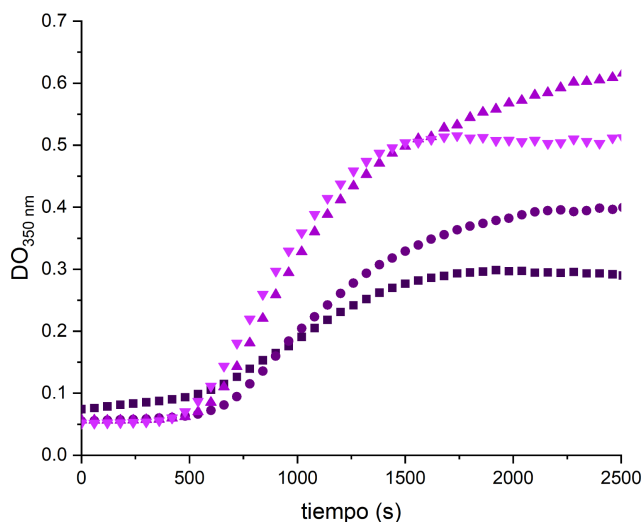
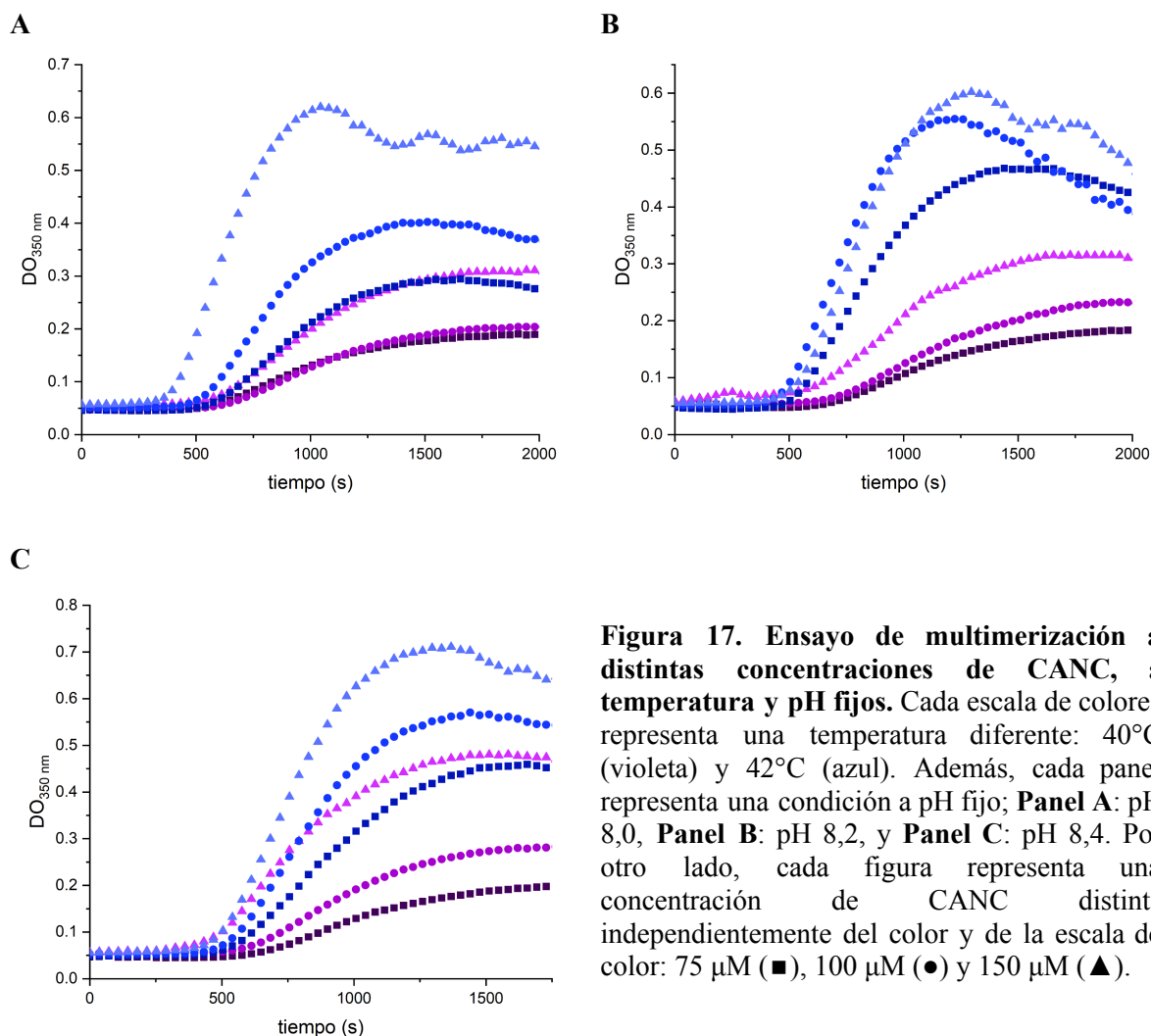


Figura 16. Multimerización a concentración fija de 100 µM CANC y 40°C para distintos valores de pH. Se estudiaron los siguientes valores de pH: 7,8 (■), 8,0 (●), 8,2 (▲) y 8,4 (▼).

Hasta el momento, se presentaron los resultados de los ensayos de multimerización desencadenada por aumento de temperatura y cómo está se relaciona con las distintas variables involucradas en el proceso. En este sentido y de acuerdo a lo esperado, se vio que a mayor concentración proteica, mayor es la velocidad de multimerización, y que lo mismo ocurre al aumentar el pH y la temperatura. En base a los experimentos previos se decidió ensayar las condiciones de multimerización a 40 y 42 °C, a pH 8,0, 8,2 y 8,4 y utilizar tres concentraciones diferentes de CANC, de manera de identificar las condiciones óptimas.



Como se puede observar en las **Figura 17** y **18**, a las dos temperaturas y pHs ensayados conforme aumentamos la concentración de CANC se incrementan las pendientes de la curva y se alcanzan valores más altos de DO final, lo que sugiere que independientemente de las otras variables la mayor concentración de proteína favorece la multimerización de la CANC. Además, se puede observar que a medida que se incrementa el pH para dosis fijas de CANC también se observa un aumento de la pendiente, siendo más evidente al comparar las concentraciones de 75 y 100 μM de CANC, con la de 150 μM. Esto es concordante con los ensayos reportados previamente (Gross I. et al, 1997; Medrano M, 2018).

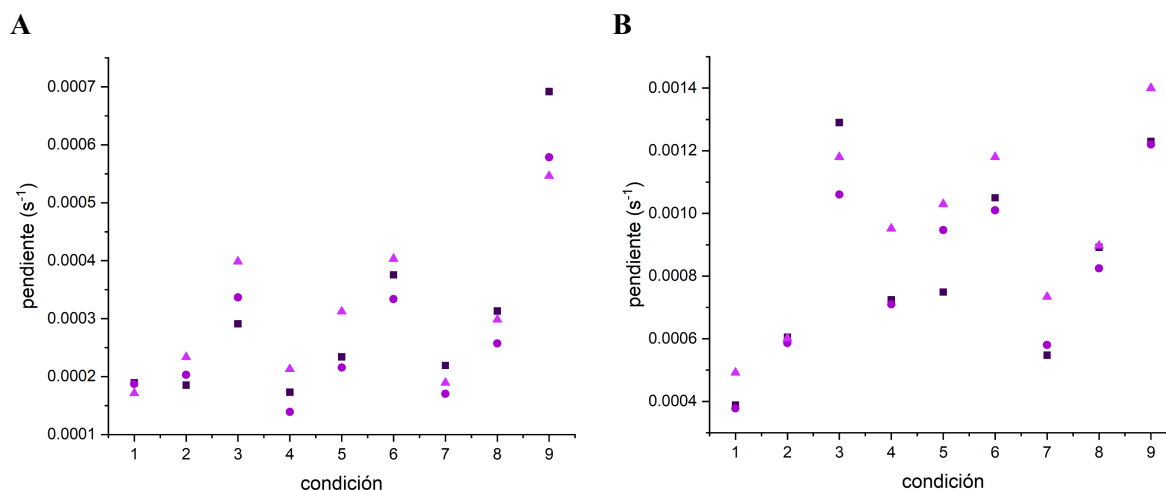


Figura 18. Gráficas comparativas de pendientes obtenidas en los ensayos a (A) 40°C y (B) 42°C. Estos experimentos se realizaron en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, a pH variable y a distintas concentraciones de CANC recombinante, según la siguiente referencia: **1)** 75 µM CANC y pH 8,0, **2)** 100 µM CANC y pH 8,0, **3)** 150 µM CANC y pH 8,0, **4)** 75 µM CANC y pH 8,2, **5)** 100 µM CANC y pH 8,2, **6)** 150 µM CANC y pH 8,2, **7)** 75 µM CANC y pH 8,4, **8)** 100 µM CANC y pH 8,4 y **9)** 150 µM CANC y pH 8,4.

En conjunto, los resultados muestran que las pendientes obtenidas se incrementan a medida que aumenta la concentración de CANC y el pH. Además, los valores de pendientes obtenidos a 42°C son mayores a los obtenidos a 40°C (**Figuras 18B y 18A**, respectivamente). Sin embargo, al analizar los estudios de dispersión de pendientes se observa que la misma es menor a pH 8,2 con respecto a los ensayos a pH 8,0 y 8,4. Debido a que los valores de pendiente obtenidos a 42°C y 150 µM CANC son mayores y presentan menor dispersión que a pH 8,2, se seleccionaron estas condiciones como óptimas para la realización del ensayo de multimerización *in vitro* y el cribado de moléculas en placa de 96 pocillos.

Finalmente, para evaluar la reproducibilidad del ensayo se realizó una comparación de las pendientes obtenidas en estas condiciones para cada uno de los ensayos realizados en diferentes días. Este análisis se muestra en la **Figura 19**.

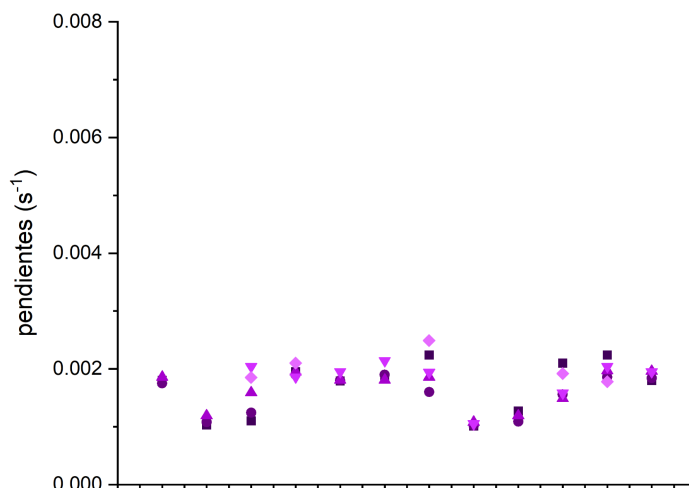


Figura 19. Resumen de pendientes ensayos de multimerización utilizando 150 μM de CANC en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2, a 42°C.

Resulta interesante notar que la condición de ensayo elegida posee un valor promedio de pendientes correspondiente a $0.0017 \pm 0.00038 \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, vemos que tenemos algunos ensayos que se alejan de este valor, lo cual indica que el ensayo presenta una variabilidad natural. Las pendientes presentan una desviación estándar relativa del 12,4 %, un valor algo mayor a la desviación estándar relativa del 10 % que es la deseada para un ensayo biológico robusto. Si no consideramos las pendientes por debajo de 0.0013 s^{-1} y la que está por encima de 0.0024 s^{-1} que se alejan claramente del promedio, la desviación estándar obtenida es del 6,5 %. Cabe destacar que la variabilidad puede estar influenciada por la manipulación y por el empleo de diferentes producciones de la proteína recombinante. Por otro lado, si consideramos que al momento de realizar los estudios de inhibición los ensayos se realizan por quintuplicado es posible obtener una estimación de la incertidumbre del método de ensayo, la cual corresponde para un 95 % de confianza a 0.0004 s^{-1} . Por otro lado, es importante aclarar que para la evaluación de los compuestos siempre se incluye un control de velocidad de multimerización en cada placa y el efecto de los mismos sobre el proceso se calcula siempre en relación al control de la propia placa.

6. CONCLUSIONES

Durante esta pasantía, se realizó la expresión y purificación de la proteína de la cápside del VIH en bacterias de *E. coli BL21(DE3)* en cantidad suficiente para la realización de ensayos de multimerización *in vitro* en placa de 96 pocillos, donde se logró estudiar el efecto de diferentes agentes desencadenantes de la agregación proteica (fuerza iónica de sales monovalentes y divalentes, concentración de proteína, temperatura, pH y solución amortiguadora). A su vez, se identificaron condiciones experimentales reproducibles con buena relación señal/ruido, que permiten el cribado e identificación de moléculas capaces de interferir con el proceso de multimerización de la CANC. Se establecieron como condiciones óptimas la realización del ensayo en placa de 96 pocillos, siguiendo la densidad óptica a 340 nm en un lector de placa con modo cinético, utilizando un volumen final de 100 μ L, una concentración de 150 μ M de CANC recombinante en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2 e incubando la placa a 42°C para desencadenar el proceso de ensamblaje.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulghani N., González E., Manzardo., Casanova JM., Pericás JM., (2020) Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria, Volume 27, Issue 3, Supplement 1, 2020, Pages 63-74, ISSN 1134-2072.
- Abdurahman S., Vegvári Á., Youssefi M., Levi M., Höglund S., Andersson E., Horal P., Svennerholm B., Balzarini J., Vahlne A. (2018). Activity of the Small Modified Amino Acid α -Hydroxy Glycinamide on *In Vitro* and *In Vivo* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Assembly and Infectivity. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. American Society for Microbiology.
- Álvarez, G., van Pul, L., Robert, X. *et al.* (2022) Identificación de 2-(4- *N,N*-dimetilaminofenil)-5-metil-1-fenetil-1H - bencimidazol dirigido a la proteína de la cápside CA del VIH-1 e inhibiendo la replicación del VIH-1 *en celulo* . *BMC Pharmacol Toxicol* 23 , 43.
- Barklis E., Alfadhli A., McQuaw C., Yalamuri S., Still A., Barklis R., Kukull B., López C. (2009). Characterization of the In Vitro HIV-1 Capsid Assembly Pathway. Journal of Molecular Biology. Elsevier Ltd.
- Blair W., Pickford C, Irving S., Brown D., Anderson M., Bazin R., Cao J., Ciaramella G., Isaacson J., Jackson L., Hunt R. Kjerrstrom A., Nieman J., Patick A., Perros M., Scott A., Whitby K., Wu H., Butler S. (2010). HIV Capsid is a Tractable Target for Small Molecule Therapeutic Intervention.
- Bocanegra R. (2011). Ensamblaje in vitro de la cápsida del virus de la inmunodeficiencia humana, y su inhibición por péptidos diseñados racionalmente. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular.
- Campbell S. y Vogt V. (1995). Self-Assembly In Vitro of Purified CA-NC Proteins from Rous Sarcoma Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1. Journal of Virology. Volumen 69, N° 10.
- Decreto N° 41 del año 2012. Por medio del cual se expide la “Actualización de Código Nacional sobre enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria”. (2012). Centro de Información Oficial. Normativa y Avisos Legales del Uruguay.
- del Álamo M. Rivas G., Mateu M. (2005) Effect of Macromolecular Crowding Agents on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein Assembly In Vitro. Journal of Virology. American Society for Microbiology.

- del Álamo M., Mateu M. (2005). Electrostatic Repulsion, Compensatory Mutations, and Long-range Non-additive Effects at the Dimerization Interface of the HIV Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology*.
- Dvory-Sobol H., Shaik N., Callebaut C., Rhee MS. (2022) Lenacapavir: a first-in-class HIV-1 capsid inhibitor. *Curr Opin HIV AIDS*. 1;17(1):15-21.
- Gamble T., Yoo S., Vajdos F., Von Schwedler U., Worthylake D., Wang H., McCutcheon J. Sundquist W., Hill C. (1997). Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *National Library of Medicine*.
- Ganser-Pornillos B., Von Schwedler UK, Stray K., Aiken C., Sundquist W. (2004). Assembly Properties of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 CA Protein. *Journal of Virology*.
- Gross I., Hohenberg H., Kräussilch H. (1997). In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus. *European Journal of Biochemistry*.
- Gross I., Hohenberg H., Wilk T., Wieggers K., Grättinger M., Müller B., Fuller S., Kräussilch H. (2000). A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *The EMBO Journal*. *European Molecular Biology Organization*.
- Kinch M., Patridge E. (2014). An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease: HIV/SIDA drugs.
- Lanman J., Sexton J., Sakalian M. Prevelige P. (2002). Kinetic Analysis of the Role of Intersubunit Interactions in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein Assembly In Vitro. *Journal of Virology*.
- Lemke C., Titolo S., Von Schwedler U., Goudreau N., Mercier J., Wardrop E., Faucher A., Coulombe R., Banik S., Fader L., Gagnon A., Kawai S., Rancourt J., Tremblay M., Yoakim C., Simoneau B., Archambault J., Sundquist W., Mason S. (2012). Distinct Effects of Two HIV-1 Capsid Assembly Inhibitor Families That Bind Same Site within the N-Terminal Domain of the Viral CA Protein. *Journal of Virology*.
- Lillis C. (2022). Lista de medicamentos para VIH: Tratamiento, prevención y cómo funcionan. *MedicalNewsToday*.
- Long M., Cantrelle FX., Robert X., Boll E., Sierra N., Gouet P., Hanouille X., Alvarez G.y Guillon C. (2021). Identification of the Potential Inhibitor of the FIV p24 Capsid Protein and Characterization of its Binding Site. *Bioquímica 2021* 60 (24), 1896-1908.

- Martin DE., Salzwedel K., Allaway GP. (2008) Bevirimat: a novel maturation inhibitor for the treatment of HIV-1 infection. *Antivir Chem Chemother.* 19(3):107-13.
- Medrano M., (2018). Fundamentos moleculares del ensamblaje y las propiedades mecánicas de partículas víricas con aplicaciones biotecnológicas y nanotecnológicas. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular.
- Ministerio de Salud Pública. (2022). Situación epidemiológica del VIH/SIDA en Uruguay 2022. Informes.
- Miyazaki Y., Doi N., Koma T., Adachi A. y Nomaguchi M. (2017). Novel *In Vitro* Screening System Based on Differential Scanning Fluorimetry to Search for Small Molecules against the Disassembly or Assembly of HIV-1 Capsid Protein. *Frontiers in Microbiology.*
- Miyazaki Y., Miyake A., Doi N., Koma T., Uchiyama T., Adachi A., Nomaguchi M. (2017). Comparison of Biochemical Properties of HIV-1 and HIV-2 Capsid Proteins. *Frontiers in Microbiology.*
- National Center for Biotechnology Information [NCBI] (2023). Bevirimat. PubChem Compound Summary for CID 457928.
- National Institute of Health [NIH] (2023). Medicamentos contra el VIH autorizados por la FDA.
- Organización Mundial de la Salud. (2023). Infección por el VIH. VIH y sida.
- Rihn S., Wilson S., Loman N., Alim M., Bakker S., Bhella D., Gifford R., Rixon F., Bieniasz P. (2013). Extreme Genetic Fragility of the HIV Capsid.
- San Martín C. (2013) Structure and assembly of complex viruses. *Subcell Biochem.* 68:329-60.
- Segal-Maurer S., DeJesus E., Stellbrink HJ., Castagna A., Richmond GJ., Sinclair GI., Siripassorn K., Ruane PJ., Berhe M., Wang H., Margot NA., Dvory-Sobol H., Hyland RH., Brainard DM., Rhee MS., Baeten JM., Molina JM.; CAPELLA Study Investigators (2022). Capsid Inhibition with Lenacapavir in Multidrug-Resistant. HIV-1 Infection. *The New England Journal of Medicine.* 386(19):1793-1803.
- Shin R., Tzou Y., Krishna N. (2011). Structure of a Monomeric Mutant of the HIV-1 Capsid Protein. *Biochemistry.* Estados Unidos.
- Tang C., Loeliger E., Kinde I., Kyere S., Mayo K., Barklis E., Sun Y., Huang M, Summers M. (2003) Antiviral Inhibition of the HIV-1 Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology.*

- Teow S., Mualif S., Omar T., Weil C., Yusoff N., Ali S. (2013). Production and purification of polymerization component HIV-1 capsid protein p24 (CA) in NiCo21(DE3) *Escherichia coli*. BMC Biotechnology.
- Thenin-Houssier, S. y Valente, S. (2016) HIV-1 capsid inhibitors as antiretroviral agents HHS Public Access.
- Tsiang M., Niedziela-Majka A., Hung M., Jin D., Hu E., Yant S., Samuel D., Liu X., Sakowicz R. (2012). A Trimer of dimers Is the Basic Building Block for Human Immunodeficiency Virus-1 Capsid Assembly. Biochemistry.
- Von Schwedler UK., Stemmler T., Klitschko V., Li S., Albertine K., Davis D., Sundquist W. (1998) Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. The EMBO Journal.
- Wang W, Zhou J, Halambage U, Jurado K, Jamin A, Wang Y, Engelman A, Aiken C. (2017). Inhibition of HIV-1 Mutation via Small-Molecule Targeting of the Amino-Terminal Domain in the Viral Capsid Protein. Journal of Virology.

8. ANEXO

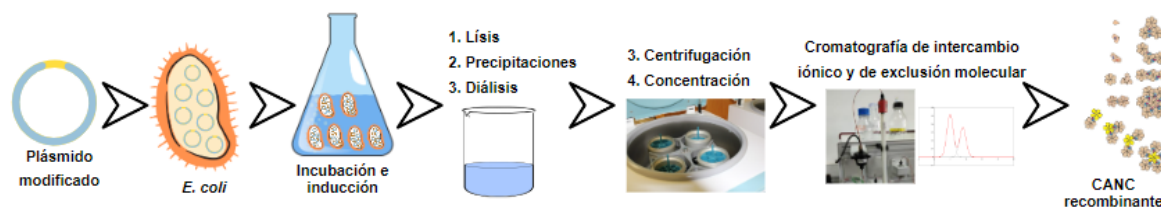


Figura 20. Esquema del proceso de expresión y purificación de la CANC recombinante. Se esquematizan los principales pasos de la expresión y purificación del CANC recombinante producida en *E. coli*.

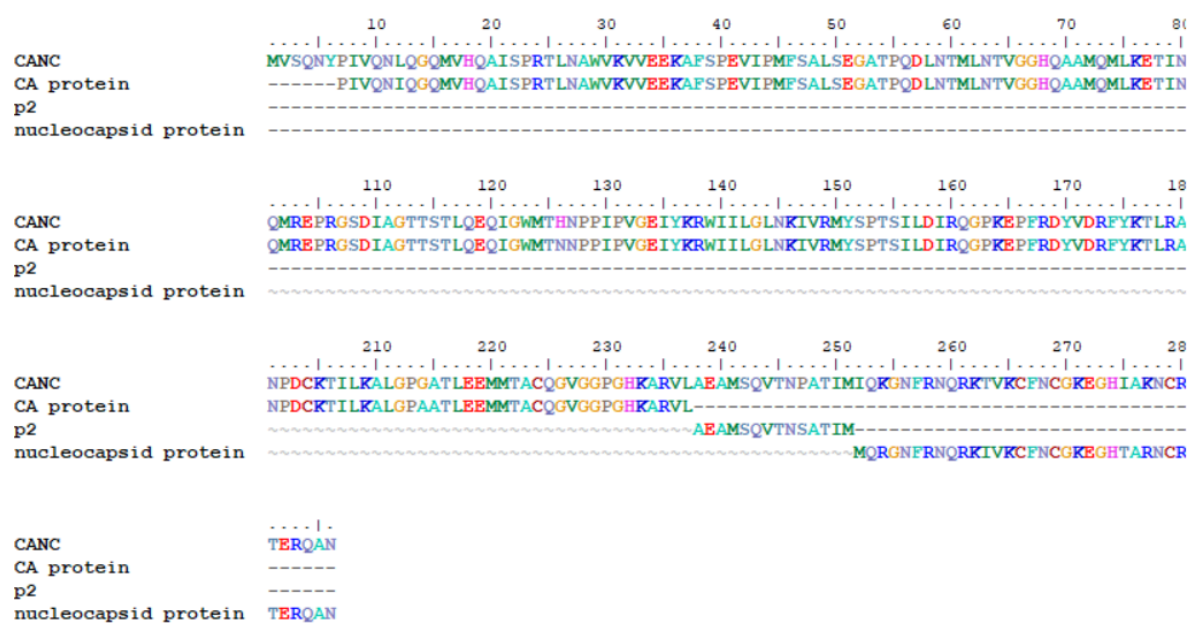


Figura 21. Secuencia aminoacídica de la CANC recombinante. Arriba se muestra la secuencia de la CANC alineada con los tres componentes que forman esta proteína de fusión: la proteína de la cápside CA, el péptido espaciador p2 y la proteína de la nucleocápside NC.

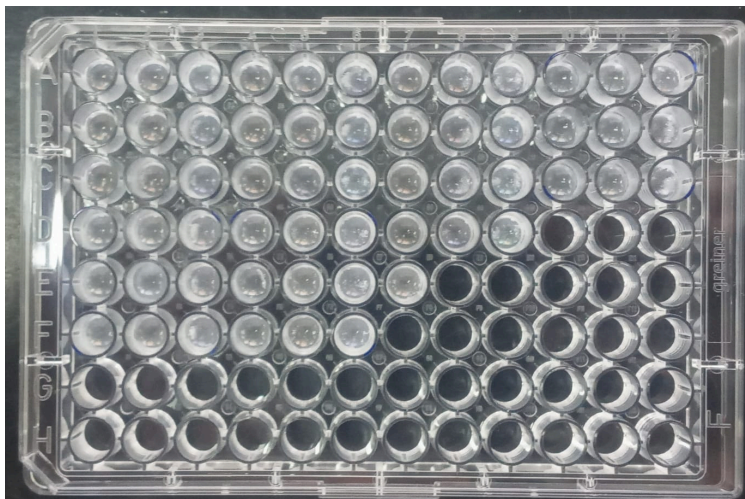


Figura 22. Siembra en placa para ensayos de multimerización genérica. En los pocillos donde ocurrió la multimerización se observa la aparición de agregados blanquecinos de CANC.



Figura 23. Espectrofotómetro Agilent technologies (Cary 60 Uv-vis)

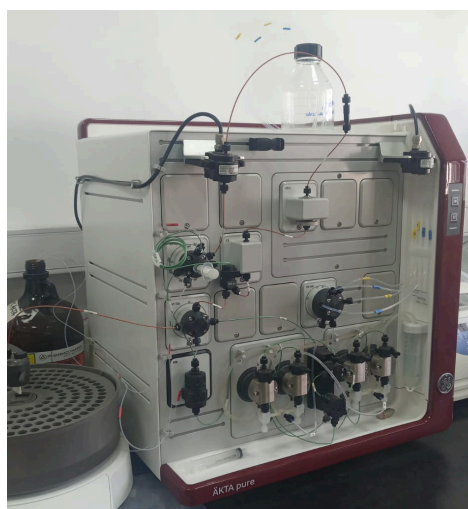


Figura 24. Cromatógrafo automatizado (ÄKTA Pure™)



Figura 25. Varioskan Flash (Thermo scientific; Biriden)



Figura 26. Columna de cromatografía de intercambio iónico (SP 6/10, Citiva™)

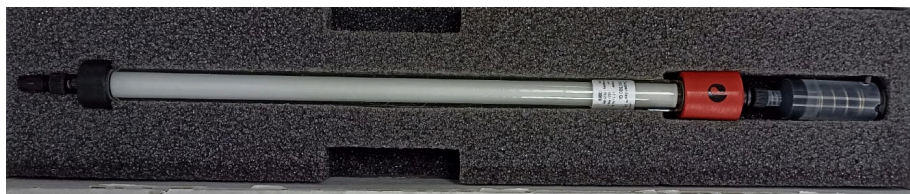


Figura 27. Columna de cromatografía de exclusión molecular (10/300 GL, Superdex™ 75).