



**Universidad
de Jaén**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL
AREA DE GENÉTICA**

TESIS DOCTORAL

**Resistencia innata a la infección por
VIH-1 mediada por *IFNL4* y variación
en el número de copias del gen *C4***

**PRESENTADA POR:
CLAUDIA PATRICIA JAIMES BERNAL**

**DIRIGIDA POR:
ANTONIO JOSÉ CARUZ ARCOS**

JAÉN, enero 2022

ISBN



UNIVERSIDAD DE JAÉN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Resistencia innata a la infección por VIH-1 mediada por *IFNL4* y variación en el número de copias del gen *C4*

Memoria presentada por:
Claudia Patricia Jaimes Bernal

Para optar al grado de:
Doctor por la Universidad de Jaén

Director:
ANTONIO JOSÉ CARUZ ARCOS

Jaén, enero 2022



Universidad de Jaén

Área de Genética

Departamento de Biología
experimental

Facultad de Ciencias
experimentales

Dr. Antonio José Caruz Arcos, Catedrático de Universidad del Área de Genética del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Celular titulado: "Resistencia innata a la infección por VIH-1 mediada por *IFNL4* y variación en el número de copias del gen *C4*" presentado por Dña. Claudia Patricia Jaimes Bernal y llevado a cabo en la Unidad de Inmunogenética del Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén, se ha realizado bajo mi dirección y reúne los requisitos para proceder a la lectura y la defensa del mismo.

Para que así conste, firma la presente:

Antonio José Caruz Arcos

Director

“Por encima de las querellas que continuaron enfrentando a los investigadores de las dos orillas del Atlántico, un campo de experimentación totalmente virgen se abría para ellos a partir de ahora. Al desvelar uno tras otro los secretos de los genes del virus, podrían comprender mejor su papel en la enfermedad. Podrían perfeccionar a medio plazo los *test* de diagnóstico y tal vez, en un futuro próximo, poner a punto unas vacunas” (p. 267)

Dominique Lapierre. Más grandes que el amor.

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido culminar una etapa más en mi vida no solo en el ámbito profesional sino también en lo personal

A mis padres y mis hermanas por su infinito amor, su apoyo y comprensión. Porque sin su cariño, confianza, acompañamiento esto no hubiese sido posible

A Antonio Caruz por su acogida en el laboratorio, por su dedicación, por su paciencia, por cada una de sus enseñanzas, que no solo fueron investigativas, sino por cada dato curioso que aprendía cada vez que había una asesoría.

A María Victoria López “Vicky” por su constante apoyo como gestora del convenio entre la Universidad de Boyacá, la AUIP y la Universidad de Jaén.

A la Dra. Rosita Cuervo Payeras quien fue la gestora del Programa DIA en la Universidad de Boyacá, por medio del cual pude cumplir mi deseo de avanzar en mi formación postgradual.

Al Ing. Rodrigo Correal por su apoyo como líder del equipo de la vicerrectoría académica, donde fui acogida como parte de un nuevo ciclo en mi paso por la Universidad de Boyacá.

A mis compañeros de esta travesía, a Luis, a Miller, a Lucía que fueron un apoyo importante. Y a todos los que hicimos parte de este grupo de becados por la AUIP, también a Gerónimo que desafortunadamente se nos adelantó en el camino.

A mis compañeros de la unidad de inmunogenética, a Miriam Garrido, a Beatriz Sanchez, a Almudena Exposito, a Verónica, a Ana María, a Jesús Vela, quienes, con su saludo, su sonrisa y su compañía hicieron de este paso por Jaén una experiencia muy agradable.

A mis amigos en la Universidad de Boyacá, a Nacho Torres, a Amanda García, a Adriana Pedraza, a Yaline Sanchez, a Elisa Cobo, a Patricia Quevedo, Jose Castellanos, María Inés

Torres y Ricardo Cifuentes por sus palabras de aliento cuando sentía desfallecer.

A María del Monte Trujillo por su amabilidad, a María Amparo Gómez por su apoyo, a Norma Rallón, porque me alegró mucho hablar con una coterránea durante mis estancias en Jaén y por su colaboración.

A la AUIP por el apoyo económico para la realización de las pasantías en la Universidad de Jaén.

Y a quienes no he alcanzado a nombrar también muchas gracias, a todos aquellos que hicieron parte de este camino.

La presente tesis doctoral fue posible gracias al apoyo académico, económico y en tiempo prestado por las siguientes instituciones:

- Universidad de Jaén
- Universidad de Boyacá
- Asociación Universitaria Iberoamericana de postgrados (AUIP)

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	29
1.1	INDIVIDUOS SERONEGATIVOS ALTAMENTE EXPUESTOS O HESN	32
1.1.1	<i>Parejas serodiscordantes.....</i>	<i>51</i>
1.1.2	<i>Individuos con alto riesgo de transmisión sexual: Trabajadoras sexuales y Hombres que practican sexo con hombres.....</i>	<i>51</i>
1.1.3	<i>Individuos expuestos no sexualmente.....</i>	<i>52</i>
1.2	PRINCIPALES GRUPOS DE GENES ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR VIH-1	54
1.2.1	<i>Receptores de quimiocinas y sus ligandos.....</i>	<i>65</i>
1.2.2	<i>Inmunidad innata</i>	<i>70</i>
1.2.3	<i>Inmunidad adquirida.....</i>	<i>100</i>
1.3	PRINCIPALES TECNOLOGÍAS DE GENOTIPADO	101
1.3.1	<i>Técnicas empleadas para la genotipación del CNV del gen C4.....</i>	<i>101</i>
1.3.2	<i>PCR en Tiempo Real (qPCR)</i>	<i>102</i>
1.4	ESTRATEGIAS PARA EL DESCUBRIMIENTO DE GENES IMPLICADOS EN RESISTENCIA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS	106
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	119
	HIPÓTESIS.....	121
2.1	HIPÓTESIS GLOBAL	121
	OBJETIVOS.....	121
2.2	OBJETIVO GENERAL.....	121
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	121
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	123
3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	125
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	125
3.3	POBLACIONES DE ESTUDIO.....	125
3.3.1	<i>Muestras empleadas para el genotipado de IFNL4</i>	<i>125</i>
3.3.2	<i>Muestras empleadas para el análisis de CNV de los genes C4</i>	<i>128</i>

3.3.3	<i>Cohorte VAXGEN para el análisis de CNV de los genes C4</i>	129
3.4	EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE	129
3.5	GENOTIPIFICACIÓN	130
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	130
3.7	CONDICIONES PARA QPCR	131
3.7.1	<i>Primers y master mix empleadas</i>	131
3.7.2	<i>Programa de PCR</i>	133
3.7.3	<i>CCR5Δ32 - rs333</i>	133
3.7.4	<i>IFNL4 - rs368234815</i>	134
3.7.5	<i>C4A, C4B, C4S y C4L mediante GRACE-PCR</i> 135	
3.8	PROCESO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE GRACE PCR PARA LA DETERMINACIÓN DE CNV DE C4....	138
3.8.1	<i>Concentración de primers</i>	138
3.8.2	<i>Número de ciclos para la qPCR</i>	139
3.8.3	<i>Concentraciones de ADN molde</i>	139
3.8.4	<i>Cálculo del número de copias</i>	140
3.9	PROCESO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE COPIAS DEL GEN C4A EN PLACEBOS Y VACUNADOS DE LA COHORTE VAXGEN 142	
4	RESULTADOS	143
4.1	ARTÍCULO 1.	145
4.2	ARTÍCULO 2	147
4.3	CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GEN C4A EN LA POBLACIÓN DEL ENSAYO CLÍNICO VAXGEN.....	149
5	DISCUSIÓN	153
6	CONCLUSIONES	165
7	PERSPECTIVAS	169
8	REFERENCIAS	173
9	ANEXOS	201
10	CURRICULUM VITAE	207

Lista de tablas

Tabla 1. Características de los diferentes fenotipos relacionados con la infección por VIH-1	34
Tabla 2. Cohortes de HESN, factores y genes estudiados en el mundo	38
Tabla 3. Principales características de cohortes de individuos con infección por VIH-1	45
Tabla 4. Genes y polimorfismos implicados en la patogénesis del VIH/SIDA, riesgo, adquisición y progresión	57
Tabla 5. Genes, deficiencias del complemento, base genética y su asociación con infecciones	86
Tabla 6. Frecuencias del número de copias del gen <i>C4A</i> en diferentes poblaciones	93
Tabla 7. Frecuencias del número de copias del gen <i>C4B</i> en diferentes poblaciones	93
Tabla 8. Frecuencias del número de copias del gen <i>C4S</i> en diferentes poblaciones	94
Tabla 9. Frecuencias del número de copias del gen <i>C4L</i> en diferentes poblaciones	95
Tabla 10. Mutaciones en el gen <i>C4</i> y su asociación con diversas enfermedades y condiciones.....	96
Tabla 11. Técnicas empleadas para la genotipificación del CNV del gen <i>C4</i>	102
Tabla 12. Enfermedades monogénicas que inducen resistencia a enfermedades infecciosas.....	108
Tabla 13. SNPs asociados con incremento a la susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas específicas	109
Tabla 14. Inmunodeficiencias primarias, genes y tipo de herencia	111
Tabla 15. Genome-wide association studies sobre la infección por VIH-1.....	115
Tabla 16. Líneas celulares humanas seleccionadas con CNV <i>C4</i> conocidas	128
Tabla 17. Método para genotipificación de variantes <i>rs333</i> y <i>rs368234815</i>	132
Tabla 18. Cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para el genotipado de <i>rs333</i>	133

Tabla 19. Cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para el genotipado de rs368234815.....	134
Tabla 20. Información de los primers para la genotipificación de CNV de <i>C4A</i> , <i>C4B</i> , <i>C4S</i> y <i>C4L</i>	136
Tabla 21. Cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para el genotipado de <i>C4A</i> , <i>C4B</i> , <i>C4S</i> y <i>C4L</i>	137
Tabla 22. Concentración final de cada cebador requerida para HRM-PCR / GRACE-PCR.	139
Tabla 23. Frecuencias del número de copias del gen <i>C4A</i> en la población del ensayo clínico VAXGEN	149

Lista de figuras

Figura 1. Clasificación de los HESN.....	36
Figura 2. Factores genéticos relacionados a la infección por el VIH-1.....	55
Figura 3. <i>CCR5</i> – locus y mutación <i>CCR5-Δ32</i>	68
Figura 4. Ruta de activación de los IFN tipo III	79
Figura 5. Gen <i>IFNL4</i> – locus	81
Figura 6. Sistema del complemento. Vías de activación y proteínas	85
Figura 7. Variación estructural del gen <i>C4</i>	90
Figura 8. Cohortes de individuos HESN empleadas en el estudio.	126
Figura 9. Resultados de genotipificación de <i>IFNL4</i>	135
Figura 10. Parámetros de la qPCR - HRM para la determinación de CNV de los genes <i>C4</i>	138
Figura 11. Pasos para el análisis y cálculo del número de copias.....	141
Figura 12. Grafica de función de supervivencia estimada..	150

Abreviaturas / Abbreviations

C4A	Componente C4A del complemento / complement component <i>C4A</i>
C4B	Componente C4B del complemento / complement component <i>C4B</i>
<i>C4L</i>	Gen C4 largo / long <i>C4</i> gene
<i>C4S</i>	Gen C4 corto / short <i>C4</i> gene
<i>CCR5</i>	C-C motif chemokine receptor 5
CNV	Copy number variation
EG	Graves Disease
GRACE	Gene ratio analysis copy enumeration
GWAS	Genome-wide association studies
HESN	HIV exposed seronegative
HRM	High resolution melting
HSH	Men who have sex with men, abreviado MSM
IDU	Injection drug use, también denominados UDI
IFN	Interferon
IL	Interleukina
<i>IFNA</i>	Interferon alpha 2
<i>IFNAR1</i>	Interferon alpha and beta receptor subunit 1
<i>IFNAR2</i>	Interferon alpha and beta receptor subunit 2
<i>IFNL4</i>	Interferon lambda 4 (gene/pseudogene)
INDEL	Polimorfismo genético de inserción o delección corta de nucleótidos
<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin like modifier
JAK-STAT	Transductor de la Cinasa-Señal de Jano y activador de la transcripción
L or mono-L	Monomodular with one long <i>C4</i> gene
LES	Lupus eritematoso sistémico systemic lupus erythematosus, abreviado SLE
LL	Bimodular with two long <i>C4</i> genes
LLL	Trimodular RCCX with three long <i>C4</i> genes
LLLL	Quadrimodular with four long <i>C4</i> genes
LLS	Trimodular with two long and one short <i>C4</i>
LS	Bimodular with one long <i>C4</i> and one short <i>C4</i> gene
LSS	Trimodular with one long and two short <i>C4</i> genes

LTNP	Long-term non-progressors
MHC	Major histocompatibility complex, abreviado también como HLA,
ONUSIDA	Programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH/SIDA
PCR	Polymerase chain reaction
PRT	Paralog ratio test
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RCCX	4-gene module
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
<i>RP1</i>	<i>HLA-RP1</i>
S or mono-S	Monomodular with one short <i>C4</i> gene
SNP	Single-nucleotide polymorphisms, polimorfismos de un solo nucleótido
SS	Bimodular with two short <i>C4</i> genes
<i>SOCS1</i>	Suppressor of cytokine signaling 1
<i>STK19</i>	Serine/threonine kinase 19, conocido también como <i>HLA-RP1</i> , referido aquí como <i>RP1</i>
TSC	Commercial sex workers, also known CSWs
µg	Microgram
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
<i>USP18</i>	Ubiquitin specific peptidase 18
WT	Wild type

Resumen / Abstract

Resumen/ Abstract

Introducción: Desde el año de 1981, cuando se descubrió el agente causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida hasta la actualidad, en el mundo se han infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 más de 79,3 millones de personas. Durante estos 40 años ha sido descrita una amplia heterogeneidad entre individuos a pesar de tener la misma vía de transmisión y con niveles de exposición de riesgo similares, que se ve reflejada en variaciones en la presentación del cuadro clínico, en la respuesta inmunológica frente a la infección y en la progresión de la enfermedad, a causa de los diferentes factores genéticos relacionados con el huésped y con el virus. Dentro de este conjunto de genes responsables de la respuesta inmune se encuentran el *IFNL4* y el *C4*. En cuanto al gen *IFNL4*, se ha descrito un alelo inactivo rs368234815 (TT), el cual está relacionado con la infección por el virus de la hepatitis C, dado que se asocia con una curación espontánea del virus dependiente del tratamiento con IFN- α y ribavirina. En relación con el rol que cumple este polimorfismo frente a la infección causada por el VIH-1 y la resistencia o susceptibilidad a la misma, es controversial. Por otro lado, se conoce el papel que cumple la variación en el número de copias del gen del complemento *C4* calificada como un determinante de la susceptibilidad genética a enfermedades comunes, como el lupus eritematoso sistémico, la esquizofrenia, la artritis reumatoide y las

enfermedades infecciosas. Objetivos: Considerando los dos genes mencionados, el objetivo general fue determinar si mutaciones en otros genes, diferentes al *CCR5*, que inducen un déficit de su función intervienen en la tasa de infección por VIH en cohortes de expuestos no infectados por vía sexual y parenteral. Para cumplir con este objetivo, se planteó primero, establecer la asociación entre el polimorfismo funcional *IFNL4* y la infección por VIH-1 de transmisión sexual en poblaciones bien caracterizadas de individuos HESN, donantes sanos e individuos infectados por VIH-1 de España e Italia. En segundo lugar, se proyectó desarrollar una nueva herramienta para la detección del número de copias de *C4A* y *C4B*, así como la detección del retrovirus endógeno HERV-K del exón 9 de *C4*. Materiales y métodos: se incluyeron las siguientes poblaciones: 228 personas VIH-1 positivas, 136 personas seronegativas expuestas al VIH, 72 muestras de ADN de donantes de sangre sanos y ocho muestras de ADN genómico de genotipo *C4* conocido, provenientes de muestras del Banco de ADN del Grupo de Trabajo de Histocompatibilidad Internacional (IHWG). Los métodos empleados fueron PCR en tiempo real, empleando tanto sondas Taqman como el agente intercalante EvaGreen. Así mismo, el ensayo optimizado para la detección del número de copias del gen *C4* se basó en una PCR de enumeración de copias de análisis de relación de genes (GRACE) combinada con PCR de fusión de alta resolución (HRM). Resultados: El alelo funcional ΔG de *IFNL4* se asocia con una mayor susceptibilidad a la infección por

VIH-1 por vía sexual (razón de posibilidades [OR], 2,1; intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,2–3,6; P= 0,004). Un metanálisis que incluyó una población de usuarios de drogas inyectables sugiere un modelo de herencia codominante de este factor de riesgo (OR, 2,0; IC del 95%, 1,3–3,2; p = 0,001). En cuanto a la metodología para detectar las variaciones en el número de copias, se generaron curvas estándar trazando los valores de la relación *C4/ RP1* contra la variación del número de copias (CNV) para cada gen, utilizando ADN genómico con CNV de *C4* conocidas. El rango de números de copias en los individuos de control fue comparable a las distribuciones observadas en estudios previos de ascendencia europea.

Conclusiones: Los resultados obtenidos proporcionan evidencia genética de que el genotipo *IFNL4 TT / TT* está asociado con la resistencia innata a la infección por VIH-1, independientemente de la vía de transmisión (sexual vs parenteral), lo que apoya la importancia de la conexión de IFN tipo I y tipo III en la patogenia de la infección por VIH. En segundo lugar, el método validado empleando qPCR HRM simplifica significativamente el diagnóstico de CNV de *C4*, permite su aplicación en el laboratorio para la determinación además de presencia o ausencia de variaciones en el número de copias.

Resumen/ Abstract

Introduction: Over 79,3 million people worldwide have been infected with HIV since 1981, when the causative agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome was discovered. During these 40 years a wide heterogeneity between individuals has been described, despite having the same transmission route and similar risk exposure levels. Due to different genetic factors related to the host and the virus, variations are observed in clinical manifestations, in the immune response against infection and disease progression. *IFNL4* and *C4* are within the group of genes responsible for the immune response. An inactive allele in the *IFNL4* gene, rs368234815; TT has been described related to hepatitis C virus infection, associated with a spontaneous cure dependent on IFN- α and ribavirin treatment. The role this polymorphism plays against HIV-1 infection and the resistance or susceptibility is still controversial. Moreover, the role copy number variation (CNV) plays in the number of copies of the complement *C4* gene is known, classified as a determinant of genetic susceptibility to common diseases, such as systemic lupus erythematosus, schizophrenia, rheumatoid arthritis and infectious diseases. Objectives: Considering the two aforementioned genes, the general objective was to determine whether mutations in genes different from *CCR5* that induce a deficit in its function influence the rate of HIV infection in cohorts of exposed persons not infected by sexual and

parenteral routes. To this end, the association between *IFNL4* functional polymorphism and sexually transmitted HIV-1 infection in well-characterized populations of HESN individuals, healthy donors, and HIV-1 infected individuals from Spain and Italy was first proposed. Second, develop a new tool for the detection of *C4A* and *C4B* gene copy number was established, as well as endogenous HERV-K retrovirus detection from exon 9 of the *C4* gene. Materials and methods: the following populations were included: 228 HIV-1 positive individuals, 136 seronegative HIV-exposed people, 72 DNA samples from healthy blood donors and eight genomic DNA samples of known *C4* genotype, from the International Histocompatibility Working Group (IHWG) DNA Bank. Real-time PCR, using both Taqman probes and EvaGreen intercalating agent were used. Likewise, the optimized assay for *C4* gene copy number detection was based on a gene ratio analysis copy enumeration PCR (GRACE) combined with high resolution fusion PCR (HRM). Results: *IFNL4* functional ΔG allele was associated with increased susceptibility to sexual HIV-1 infection (2.1 odds ratio [OR]; 95% confidence interval [CI], 1.2– 3.6; $P = 0.004$). A meta-analysis including a population of needle drug users suggested a codominant mode of inheritance for this risk factor (OR, 2.0, 95% CI, 1.3– 3.2, $P = 0.001$). Regarding the methodology to detect copy number variations, standard curves were generated by plotting *C4*/RP1 ratio values against copy number variation (CNV) for each gene, using genomic DNA with known *C4* CNV. The

range of copy numbers in control individuals was comparable to the distributions seen in previous studies of European descent. Conclusions: The results obtained provided genetic evidence that the IFNL4 TT / TT genotype was associated with innate resistance to HIV-1 infection, regardless of the route of transmission (sexual vs parenteral), which supports the importance of IFN type I and type III crosstalk in the pathogenesis of HIV infection. Secondly, the validated method using qPCR HRM significantly simplified C4 CNV diagnosis, allowing for its use in the laboratory in addition to the determination of presence or absence of variations in the number of copies.

1 Introducción

Según el programa conjunto de las naciones unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) desde el comienzo de la epidemia 79,3 millones de personas se han infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y 36,3 millones de personas han muerto a causa de enfermedades relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Adicionalmente 1,5 millones de personas contrajeron la infección por el VIH durante el año 2020, entre otros datos que presenta anualmente ONUSIDA a nivel global ¹ lo que constituye una evidencia de la dimensión pública de esta patología, siendo una causa importante de muerte a nivel mundial. Con el pasar de los años se ha descubierto que existen ciertos rasgos genéticos del huésped y del virus que influyen en la susceptibilidad a la transmisión del VIH-1, así como a la progresión de la enfermedad, rasgos que varían entre poblaciones a nivel mundial y que tienen un impacto real sobre la infección por VIH.

La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de la infección y la respuesta inmune innata y adaptativa frente al virus, tienen como referente principal la identificación de los genes asociados con la protección frente a la infección causada por el VIH-1, esto con el fin de identificar objetivos farmacológicos, incrementar la eficacia de los biológicos y fortalecer la respuesta del paciente a la terapia.

En este sentido, se presentará una descripción de los grupos de individuos identificados hasta el momento que no se infectan a pesar de estar expuestos a individuos VIH-1 seropositivos, así como los individuos progresores lentos, cuyos análisis han permitido identificar conjuntos de genes que posiblemente se encuentren relacionados con la resistencia innata a la infección por este virus. En este apartado se profundizará en tres genes a saber, *CCR5*, *IFNL4* y *C4*, junto con las variantes o mutaciones asociadas al comportamiento previamente mencionado. Posteriormente se presentarán otros polimorfismos genéticos relacionados y las metodologías empleadas para el genotipado de las mismas. Finalmente se hará mención a estrategias para el descubrimiento de genes implicados en resistencia a enfermedades infecciosas.

1.1 Individuos seronegativos altamente expuestos o HESN

Múltiples factores que involucran el sistema inmune innato y adaptativo contribuyen de manera natural a la prevención de la infección por VIH-1, esto haciendo referencia a individuos que no seroconvierten a pesar de sus múltiples exposiciones al virus, es decir los denominados “expuestos no infectados” o a aquellos que progresan lentamente de la enfermedad al SIDA ^{2,3}. Considerando la inmunidad innata como la primera línea de defensa no específica, presente de forma constitutiva y lista para movilizarse tras la infección, el conocimiento a

profundidad de los diversos mecanismos permitiría entender porque existen grupos de personas que logran controlar su infección frente al VIH-1 de manera natural ⁴.

Los individuos seronegativos expuestos al VIH-1 (VIH-1) denominados en inglés HIV Exposed Sero-Negative (HESN), no desarrollan la infección después de comportamientos de riesgo frecuentes, incluido el uso de drogas inyectables compartiendo agujas o las relaciones sexuales con parejas infectadas. La investigación en este grupo está condicionado por factores de confusión como las puntuaciones de riesgo, la vía de infección (parenteral vs sexual) o las respuestas inmunitarias innatas dependientes del sexo⁵. Además, se deben diferenciar de los individuos supresores (o controladores) de élite, los cuales presentan una carga viral muy baja o indetectable después de una infección aguda (tienen recuentos de linfocitos CD4+ >500/mm³ y control espontáneo del VIH-1 sin terapia antirretroviral durante más de 7 años) ⁶ o con pacientes no progresores a largo plazo (LNTP), quienes no han desarrollado SIDA durante un periodo prolongado después de la seroconversión al VIH.

En este aspecto se destaca que aun no se ha establecido un consenso en cuanto a la denominación dada a estos grupos de individuos. En la tabla 1 se presenta las principales características de los diferentes fenotipos definidos hasta el momento.

Tabla 1. Características de los diferentes fenotipos relacionados con la infección por VIH-1

Características	HESN	Progresores lentos	Controladores de élite	Progresores rápidos
Duración de infección VIH-1	No desarrolla infección	≥ 8 años	Inespecífico	Desarrolla SIDA en < 5 años
Conteo de células T CD4+	> 500 células/ ul de sangre	> 500 células/ ul de sangre	Inespecífico	<350 células / μl en el primer año de la infección
Carga ARN VIH-1 en plasma	Negativo	Inespecífico	< 50 copias/ml	Inespecífico
Infecciones oportunistas	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Sarcoma de Kaposi, linfoma, neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i> , toxoplasmosis, entre otras
Terapia antirretroviral	Ninguna	Ninguna	Ninguna por ≥ 1 año	Con o sin TAR en los primeros 3 años

Adaptado de Pantaleo, G & Fauc A, 2003; Deeks, S & Walker, B, 2007 y Casado C et al., 2010 ⁷⁻⁹

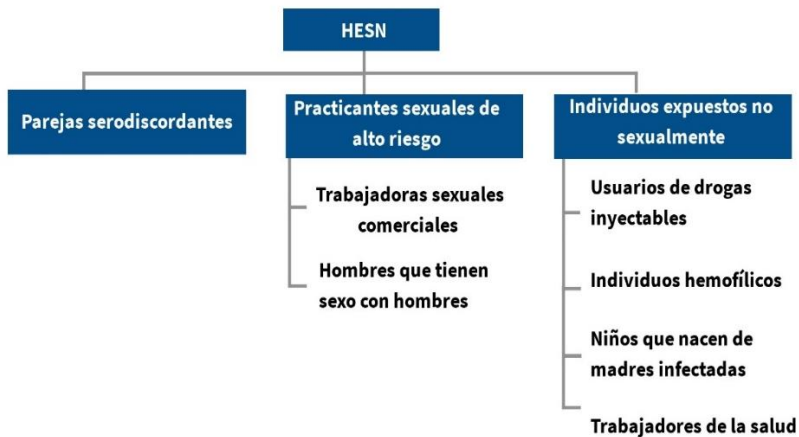
La carga viral se considera un punto clave en la progresión de la enfermedad, debido a que cargas con valores inferiores a 1000 – 2000 copias de ARN/ml están relacionadas con una supervivencia sin SIDA a largo plazo. Lo anterior, indica que la transmisión de la infección por VIH-1 y la progresión de la enfermedad estarían limitadas con éxito si se controla la replicación viral ¹⁰.

Los individuos HESN fueron descritos por Shearer y Clerici, quienes refirieron dos grupos que aparecieron al inicio de la pandemia, al interior de las diversas poblaciones que estaban infectadas o expuestas al VIH, distribuidos así: [1] un porcentaje de individuos VIH seropositivos con un recuento de linfocitos T- CD4+ estable sin progresión a SIDA a pesar de tener más de 10 años de haber sido infectados, denominados long-term non-progressors - LTNP y [2] un grupo de individuos expuestos al VIH en múltiples ocasiones pero que no seroconvierten o no muestran signos de infección ¹¹.

El segundo grupo incluye individuos con parejas VIH seropositivas, con historial conocido de práctica sexual sin protección, usuarios de drogas intravenosas (UDI) con historia conocida de compartir agujas, trabajadoras sexuales, recién nacidos de madres VIH+ y trabajadores de la salud que se han expuesto a sangre o fluidos biológicos de individuos VIH+ de manera accidental ¹¹. Circunscriben igualmente pacientes hemofílicos que han recibido factores anticoagulantes contaminados con VIH, es decir, en conjunto son un grupo

heterogéneo que comprende individuos provenientes de diferentes áreas, con diversos orígenes étnicos y rutas de exposición ¹². Para un mayor entendimiento de los mecanismos de resistencia innata se han agrupado como se observa en la figura 1.

Figura 1. Clasificación de los HESN



Adaptado de Horton et al., 2010 ¹³

Los individuos HESN presentan una resistencia natural al VIH por lo que han sido considerados modelos de estudio. A pesar que se han identificado varios genes de protección en diferentes cohortes de HESN, ninguno explica por sí solo la resistencia a la infección ¹⁴; probablemente dicha resistencia sea de carácter multifactorial (antecedentes genéticos, inmunidad natural y adquirida) ¹².

Adicionalmente, Biasin *et al.*, en el año 2013 con el fin de poder definir criterios de comparación entre los diferentes grupos de individuos HESN realizaron una caracterización inmuno-virológica de estas cohortes, concluyendo que se considera un individuo HESN si cumple los siguientes criterios ¹⁵:

- Conteo de células T CD4+ (células/mm³): >500
- Carga viral (copias/ml): negativo
- IgG específico para VIH-1: negativo
- Terapia antirretroviral: negativo

Otros dos criterios que no se determinan en todos los casos y que se consideraron para la definición de HESN son: IgA específico para VIH-1 (positivo) y Células T específicas del VIH-1 (positivo)

En cuanto a la detección de IgA específica para VIH-1 en las secreciones mucosas de los individuos HESN en ausencia de IgG específica del VIH-1 detectable en el suero se considera enigmática, esencialmente desde la óptica convencional del cambio de clase de anticuerpos. No obstante, se han observado fuertes respuestas de IgA antivirales con actividades neutralizantes en ausencia de IgM e IgG específicas de virus en condiciones experimentales ⁶.

En la tabla 2 se presentan varias de estas cohortes y algunos de los factores o genes que se han estudiado en cada una de ellas.

Tabla 2. Cohortes de HESN, factores y genes estudiados en el mundo

Cohorte	Región/ país	Gen/Factor	Factor protector	Ref.
Trabajadoras sexuales comerciales (TSC) – denominada cohorte Pumwani	Distrito de Pumwani Nairobi, Kenia (Africa)	Inmunidad quiescente	Estado de baja activación inmune de base	¹⁶
Hombres que tienen sexo con hombres, coito anal sin protección	Helsinki (Finlandia)	Inmunidad celular	Activación de células T VIH específicas	¹⁷
Estudio Multicéntrico de Cohortes del SIDA (MACS) que incluye hombres que practican sexo con hombres (HSH) y hombres bisexuales	Baltimore, Chicago, Los Angeles, Pittsburgh, (Estados Unidos)	Cohorte ampliamente caracterizada		¹⁸
Hombres homosexuales seronegativos que asistían a clínicas reclutados desde 1985 hasta 1996	Copenhague (Dinamarca)	<i>CKR-5</i> (<i>CCR5</i>)	<i>CCR5Δ32</i>	¹⁹
Individuos VIH-1 seronegativos que tenían parejas infectadas	Seattle (Estados Unidos)	Inmunidad celular	Activación de células T VIH específicas	²⁰

Cohorte	Región/ país	Gen/Factor	Factor protector	Ref.
UDI reclutados del Centro de desintoxicación de drogadictos en Binh Trieu	Ciudad Ho Chi Minh (Vietnam)	Inmunidad celular	Aumento de la actividad de las células NK	²¹
Estudio Interagencial de Mujeres sobre el VIH (Cohorte WIHS), incluye mujeres seronegativas con exposición por vía parenteral y sexual	Chicago, Bahía de San Francisco, Los Ángeles, Washington DC, Nueva York (Estados Unidos)	<i>CCR5</i>	<i>CCR5Δ32</i>	²²
Trabajadoras sexuales altamente expuestas persistentemente seronegativas	Chiang Rai (Tailandia)	<i>DEFT</i>	Codón de parada	²³
Parejas serodiscordantes reclutadas en el Centro Anónimos, Asesoramiento gratuito y pruebas voluntarias del Instituto Pasteur	Camboya (Asia)	<i>Inmunidad celular</i>	Activación de células T VIH específicas	²⁴
Parejas serodiscordantes de la Clínica de Inmunodeficiencia en el Instituto de Postgrado de Educación e Investigación Médica	Chandigarh, (India)	<i>Inmunidad celular</i>	Actividad de los CTL VIH-específicas	²⁵

Cohorte	Región/ país	Gen/Factor	Factor protector	Ref.
UDI VIH-negativos activos Individuos VIH-negativos de parejas serodiscordantes	Montreal (Canadá)	<i>KIR3DS1</i>	<i>KIR3DL1</i> homocigotos	²⁶
Pacientes con enfermedades de transmisión sexual de alto riesgo seronegativos para el VIH-1	Hospital de Nueva Delhi (India)	<i>CXCL12</i> (<i>SDF1</i>) <i>DC-SIGN</i> <i>DC-SIGNR</i>	<i>SDF1-3 A</i> , G>A <i>SDF1-3 A</i> en homocigosis	²⁷
Hombres que tienen sexo con hombres que acuden a la Clínica de Salud para hombres homosexuales	Estocolmo (Suecia)	Actividad neutralizante en la saliva	IgA1	²⁸
Parejas serodiscordantes que asisten al Centro Sandoval, una clínica de enfermedades de transmisión sexual	Madrid (España)	Inmunidad celular	Activación de células T VIH específicas	²⁹
UDI no infectados y expuestos al VIH-1	Filadelfia – Pensilvania (Estados Unidos)	Inmunidad celular	Aumento de la actividad de las células NK	³⁰
HESN italianos (historia de múltiples episodios de relaciones sexuales sin protección)	Hospital Annunziata, Florencia (Italia)	<i>ERAP1</i> <i>ERAP2</i>	rs2549782 - <i>ERAP2</i> (Asn392Lys)	³¹

Cohorte	Región/ país	Gen/Factor	Factor protector	Ref.
VIH-1 positivos y seronegativos con comportamientos de alto riesgo relacionados con el VIH, como UDI, exposiciones repetidas a relaciones sexuales sin protección con personas que eran VIH-1 positivas	Región Autónoma Uigur de Xinjiang de (China)	<i>CCR5</i> <i>CCR2</i> <i>CXCL12</i> (<i>SDF1</i>)	<i>CCR5Δ32</i> <i>CCR5m303A</i> <i>CCR2-64I</i> <i>SDF1-3'A</i>	32
Sujetos reclutados entre 2006 y 2007 de los programas de intercambio de jeringas y tres prisiones	Estonia	<i>CCL3L1</i>	Variación en el número de copias	33
		<i>IFNL4</i>	rs12979860	34
Parejas serodiscordantes inscritas en el Proyecto de investigación del VIH Emory de Zambia (ZEHRP)	Lusaka, Zambia (Africa)	Inmunidad celular	Activación de células T VIH específicas	35
Parejas serodiscordantes reclutadas a través del estudio Partners HSV-2	Kenya Uganda Tanzania Sur Africa Zambia Botswana (Africa)	Varios SNPs	rs2437935– <i>CXCL12</i>	36
		<i>TLR3</i>	rs3775291 - Leu412Phe	37

Cohorte	Región/ país	Gen/Factor	Factor protector	Ref.
UDI VIH-negativos activos – grupo de caucásicos que habían compartido agujas durante más de 3 meses	Hospital Arnau de Vilanova (Lleida), Hospital Valme (Sevilla), Hospital Reina Sofía (Córdoba),	<i>ERAP2</i>	ERAP2 hapA	38
		<i>BST2</i>	rs3217318 rs10415893	39
		<i>VDR</i>		
		<i>CR2</i>	<i>rs1567190</i>	40
		<i>DC-SIGN (CD209)</i>	Expresión del nivel del ARNm	41
UDI provenientes de centros de rehabilitación y tratamiento	Provincia de Yunnan (China)	<i>CXCL12 (SDF1)</i>	<i>rs175405465</i> alelo A tenía efecto protector	42
HESN expuestos a través de relaciones sexuales sin protección VIH-1 seropositivos y VIH-1 seronegativos (historia de múltiples episodios de relaciones sexuales sin protección)	Milan (Italia) Medellín Santa Marta (Colombia) Lima (Perú)	<i>CYP7B1</i>	No se encontró asociación	43

Cohorte	Región/ país	Gen/Factor	Factor protector	Ref.
HESN expuestos a través de relaciones sexuales – parejas serodiscordantes	Medellín Santa Marta (Colombia) Hospital	9 genes de la ruta de vitamina D	Asociaciones específicas no se reprodujeron en todas las cohortes	⁴⁴
UDI de diferentes hospitales de España que habían compartido agujas por más de 2 años	Annunziata, Florencia (Italia) Hospitales de Lleida, Valme y Córdoba	14 genes de las vías antivirales		

Abreviaturas: ARNm, ARN mensajero; *BST2*, bone marrow stromal cell antigen 2; *CCL3L1*, C-C Motif Chemokine Ligand 3 Like 1; *CR2*, *complement C3d receptor 2*; *CCR2*, C-C motif chemokine receptor 2; *CCR5*, C-C motif chemokine receptor 5; CTL, Linfocitos T citotóxicos; *CXCL12*, C-X-C motif chemokine ligand 12; *CYP7B1*, cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1; DC-SIGN, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin también conocido como CD209; *DEFT*, Death effector domain containing; ERAP2, Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2; *KIR3DS1*, Killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and short cytoplasmic tail 1; *TLR3*, toll like receptor 3 (los nombres fueron tomados de HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee))

Los resultados de algunos de los estudios referidos no permitieron establecer asociación entre los genes estudiados y la resistencia natural, esto podría estar relacionado con las diferencias en la historia genética de las poblaciones que fueron parte de cada investigación ⁴⁴. Por otro lado, en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) realizados por Fellay et al., en 2007 ⁴⁵ y McLaren et al., 2013 ⁴⁶, se seleccionaron pacientes provenientes de diferentes cohortes que incluían individuos VIH-1 positivos, individuos controladores de élite, no progresores a largo plazo y expuestos no infectados.

De acuerdo con McLaren y Fellay uno de los puntos clave para la comprensión de como la genética interviene en la susceptibilidad al VIH, radica en el análisis de los polimorfismos raros, la variación en el número de copias de algunos genes y el impacto conjunto de estos polimorfismos en el huésped ⁴⁷. En relación a esta última afirmación, es posible que la protección no se adquiera únicamente con un factor, sino que la combinación de diferentes rasgos puede proporcionar un nivel más alto de protección contra la infección ⁴⁸.

Otro punto clave en el estudio de estas cohortes, es que algunas de ellas consideraron como criterio de inclusión que todos los individuos fueran blancos de ascendencia europea y que vivieran en un mismo lugar, buscando reducir los efectos de confusión por subestructura de la población. Además, esta selección limita los factores étnicos y ambientales, enfatizando en la composición genética de cada individuo, por ejemplo, para la determinación de no progresión a SIDA ⁴⁹. (Tabla 3) .

Tabla 3. Principales características de cohortes de individuos con infección por VIH-1

Nombre de la cohorte	Procedencia	Objetivo	Año(s) de reclutamiento	Número aproximado de integrantes *	Características	Ref.
ALIVE (AIDS Linked to the IntraVenous Experience)	Baltimore (Estados Unidos)	Estudio de historia natural, la incidencia y la progresión de la infección por el VIH	1988 – 1989 1994 – 1995 1997 – 1998 2005 – 2008	3923	Usuarios de drogas intravenosas (UDI)	50
ACS (Amsterdam Cohort Studies)	Amsterdam (Países Bajos)	Factores de riesgo de la infección por el VIH y SIDA	1984-2005	1677	Hombres que practican sexo con hombres. Personas que usan drogas o que se inyectan drogas	46
ANRS18 (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA)	París (Francia)	Estudio de controladores élite	2009	186	Controladores élite	51

Nombre de la cohorte	Procedencia	Objetivo	Año(s) de reclutamiento	Número aproximado de integrantes *	Características	Ref.
ANRS PRIMO	París (Francia)	Estudio multicéntrico	1996-2017	2045	Pacientes con infección primaria por VIH-1	52
DHCS (Danish HIV Cohort Study)	Dinamarca	Crear una base de datos de población a nivel nacional de pacientes con VIH y seguimiento	Desde 1994	6434	Pacientes con infección primaria por VIH-1	46
GRIV (Genomics of Resistance to Immunodeficiency Virus)	Francia	Identificar genes del huésped asociados con una progresión lenta y con una progresión rápida al SIDA	1995	635	Individuos caucásicos de ascendencia europea VIH-1 positivos progresores lentos y rápidos	49

Nombre de la cohorte	Procedencia	Objetivo	Año(s) de reclutamiento	Número aproximado de integrantes *	Características	Ref.
ICONA (Italian cohort of patients naive from antiretrovirals)	Italia	Resultado de la terapia antiretroviral	Desde 1996	6205**	Personas que viven con el VIH atendidas en 52 clínicas de enfermedades infecciosas	46
PHI (Hospital Clinic Acute/Recent HIV Infection Cohort)	Barcelona (España)	Estudios de farmacoresistencia Ensayos clínicos con nuevos medicamentos antirretrovirales y/o inmunomoduladores	1997-2015	346	Individuos con infección reciente/aguda por VIH-1	53
MACS	Baltimore, Chicago, Pittsburgh	Comprender la historia natural	1984	6972	Hombres homosexuales y bisexuales	54

Nombre de la cohorte	Procedencia	Objetivo	Año(s) de reclutamiento	Número aproximado de integrantes *	Características	Ref.
(Multicenter AIDS Cohort Study)	Los Ángeles (Estados Unidos)	del SIDA y sus determinantes			con infección por VIH-1	
PSWC (Pumwani Sex Workers Cohort)	Nairobi (Kenia)	Estudio de factores de riesgo para enfermedades de transmisión sexual	1985 - 2010	3000	Trabajadoras sexuales comerciales	^{55,56}
SFCCC (San Francisco City Clinic Cohort)	San Francisco (Estados Unidos)	Estudio de factores de riesgo para enfermedades de transmisión sexual	1978 – 1984	6875	Hombres homosexuales	⁵⁷
GPC (General Population Cohort)	Oxford, Reino Unido Uganda	Determinar la prevalencia de VIH	1989-1990	10000	Población general	⁵⁸

Nombre de la cohorte	Procedencia	Objetivo	Año(s) de reclutamiento	Número aproximado de integrantes *	Características	Ref.
SHCS (Swiss HIV Cohort Study)	Suiza	Estudio multicéntrico, en curso, que incluye a adultos infectados por el VIH en Suiza	1988	17000	Hombres homosexuales y bisexuales de centros hospitalarios en Suiza	59
WISH (Women's Interagency HIV Study)	Estados Unidos	Estudios de progresión y patogénesis del VIH	1994-1995	3772	Mujeres seropositivas al VIH-1	60

* este número corresponde a datos aproximados de acuerdo con la descripción en algunos estudios.

** dato a septiembre de 2006

Además de las cohortes mencionados, en los estudios realizados por McLaren y Fellay se incluyó información proveniente de:

- Cohorte de Modena en Modena, Italia, recopila información de nuevos casos de adultos infectados por VIH.
- Estudio de cohorte de VIH de Australia Occidental, grupo de pacientes infectados por VIH en Perth, Australia.
- Grupo de Ensayos Clínicos sobre el SIDA (ACTG) en Estados Unidos.
- Grupo de no progresores a largo plazo europeos y africanos sobre el VIH-1 positivos (GISHEAL), en Francia e Italia
- Estudio sobre el crecimiento y el desarrollo de la hemofilia (HGDS) en Estados Unidos, de tipo multicéntrico.
- Estudio internacional sobre controladores del VIH en Boston, Estados Unidos, constituida principalmente por controladores de élite.
- Estudios de cohorte multicéntricos de hemofilia (MHCS).
- Estudio de historia natural del VIH (NHS) del ejército de Estados Unidos (Fuerzas Armadas y departamento de defensa).
- Estudio del Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC3) – Oxford, sobre la genética del huésped en relación al control de la infección por VIH-1 en Gambia, Uganda y Sudáfrica.

El número de cohortes que han sido reclutadas a nivel mundial y las diferentes investigaciones han favorecido el hallazgo de genes

o polimorfismos asociados a la susceptibilidad frente a la infección por VIH, específicamente las cohortes de individuos HESN, agrupadas en varios tipos, los cuales se describen a continuación.

1.1.1 Parejas serodiscordantes

Grupo que hace parte de los HESN y corresponde a parejas monógamas donde uno de los miembros está infectado y el otro no, de ahí el nombre de parejas discordantes o serodiscordantes, las cuales pueden ser homosexuales o heterosexuales. En general, al caracterizar estos individuos se encuentran diferencias que van desde el tipo de coito (receptivo o insertivo), carga viral, estado de progresión de la pareja infectada, estado de circuncisión, hasta la incidencia de exposición positiva, es decir sin protección.

Por lo general son reclutados en clínicas de enfermedades infecciosas y se han caracterizado epidemiológicamente de manera detallada, para identificar acertadamente las personas que son resistentes a la infección ¹³.

1.1.2 Individuos con alto riesgo de transmisión sexual: Trabajadoras sexuales y Hombres que practican sexo con hombres

Dentro de las trabajadoras sexuales comerciales (TSC), una de las primeras cohortes en ser descrita fue la de Nairobi (Kenia), que ha sido de las más grandes y completas en ser estudiada y seguida ⁵⁵. A este grupo pertenecen mujeres que tienen una alta frecuencia de relaciones sexuales sin protección, con hasta 15 clientes por día. Así mismo, se han encontrado hombres que tienen sexo con hombres (HSH), que poseen factores

diferenciadores en relación a los comportamientos sexuales, considerando el sexo anal receptivo, del cual se conoce que tiene un riesgo relativo de 1,43% por evento, 10 veces más alto que el del sexo vaginal receptivo ⁶¹. Estos dos grupos poblacionales son considerados buenos modelos para el desarrollo de vacunas, dada su alta exposición a múltiples cepas virales, además de encontrar correlatos de protección contra la transmisión sexual. Algunas posibles desventajas de estos grupos puede ser su alta movilidad, y la reducción del comportamiento de riesgo debido al continuo asesoramiento ¹³.

1.1.3 Individuos expuestos no sexualmente

Hacen parte de este grupo los usuarios de drogas inyectables (UDI) o IDU por sus siglas en inglés (injection drug use), que son considerados como un grupo de alto riesgo de infección en virtud de que comparten agujas contaminadas, lo que favorece una exposición inicial al sistema inmunitario periférico. Una de las desventajas en este grupo radica en la difícil estimación de la exposición, aunque su riesgo relativo por exposición resulta ser más alto a causa de la naturaleza intravenosa y/o subcutánea de la práctica, si bien los niveles de virus vivo son difíciles de evaluar a causa que algunas de las drogas que se emplean se calientan antes de su uso. Adicionalmente en este grupo se pueden incluir otras conductas de riesgo como las relaciones sexuales sin protección, y son una población de difícil seguimiento debido a que al igual que las TSC son una población transitoria ¹³.

Otros individuos que hacen parte de este grupo son los pacientes hemofílicos, de los cuales solo el 6% de los que recibieron

transfusiones durante la década de los 80's (antes de la introducción del análisis de sangre para detección de IgM e IgG anti VIH) permaneció sin la infección a pesar de haber recibido sangre VIH positiva. Es una cohorte con factores de riesgo conocidos y medibles. En el año 2013 se presentaron los resultados de estudios de GWAS en esta población y se halló que la homocigosidad de la variante *CCR5-Δ32* estaba asociada con la protección frente a la transmisión del VIH, así como los individuos heterocigotos con la delección de 32 pb y una mutación rara m303, la cual introduce una codón de parada prematuro ⁶². Posteriormente se reveló que los genes *HLA clase I* y *KIR* no protegen contra la infección del VIH-1 en este grupo de individuos ⁶³.

A este grupo también pertenecen los niños que nacen de madres infectadas y los trabajadores de la salud que han sufrido lesiones por pinchazos de aguja infectados.

Considerando lo mencionado, existe una heterogeneidad genética del hospedador, es decir una variabilidad interindividual, que está directamente relacionada con la progresión de la enfermedad y la susceptibilidad a la infección por VIH-1.

De otra parte, es significativo señalar que el riesgo de contagio del VIH y los factores relacionados varían según la vía de transmisión, también puede ser afectado por el entorno hormonal y factores desconocidos que conllevan a que esta protección se pierda en algunos momentos ⁴⁸.

1.2 Principales grupos de genes asociados a la infección por VIH-1

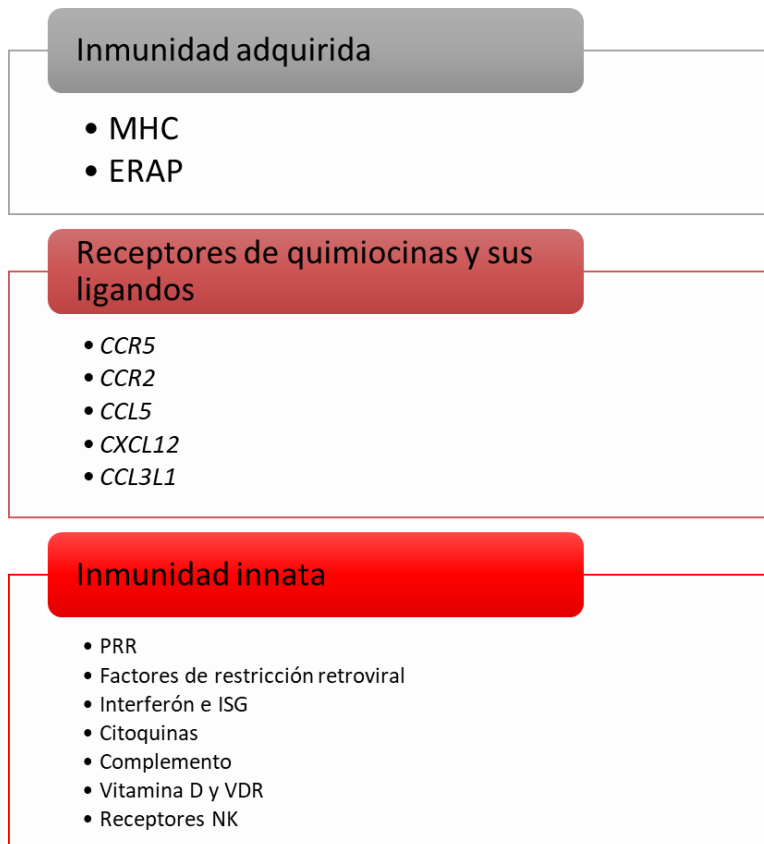
Una amplia variación se ha observado en relación a la susceptibilidad, la resistencia a la infección por VIH-1 y la progresión de la enfermedad en individuos infectados. Es posible que esta variación sea consecuencia de factores que trabajan en conjunto, incluyendo las respuestas inmune innata y adaptativa, la inmunidad humoral y mediada por células y adicionalmente factores genéticos y fenotípicos.

En seguida, se mencionarán algunos de los factores genéticos que se han descrito hasta el momento, que incluyen polimorfismos genéticos como deleciones, sustituciones de nucleótidos, duplicaciones, variaciones en el número de copias en los genes que codifican principalmente (Figura 2):

- Receptores de quimiocinas y sus ligandos
- Componentes de la inmunidad innata a saber:
 - Receptores de patógenos (tipo *TLR*, *DC-SIGN*, Lectinas, etc), proteínas accesorias implicadas en la traducción de señal mediada por el receptor
 - Factores de restricción retroviral: *APOBEG*, *SAMHD1*, *MX2*, *Tetherin*, *TRIM5*, *TIM3*, *Ciclofilina A*
 - Citoquinas
 - Defensinas, vitamina D y grupo ABO
 - Interferón e ISGs
 - Complemento
 - Receptores de células natural Killer (KIR)

- Componentes que actúan en la inmunidad adquirida (MHC, ERAP, etc)

Figura 2. Factores genéticos relacionados a la infección por el VIH-1



Ratificando lo referido, el VIH/SIDA está controlado por variantes en los genes que moderan la replicación y la inmunidad del virus, lo cual hace que esta patología presente una heterogeneidad dentro de los individuos infectados, quienes manifiestan diferencias en los niveles de respuesta inmune innata, humoral y

mediada por células y de otra parte en la respuesta al tratamiento antirretroviral ⁶⁴.

Esta búsqueda de genes y sus variantes que limiten el SIDA, denominados como genes de restricción del SIDA (ARG, por sus siglas en inglés, AIDS restriction genes), se ha dado desde la década de los 80's.

En la tabla 4 se presentan los genes implicados en la patogénesis del VIH/SIDA⁶⁴, muchos de los cuales han sido estudiados en diferentes poblaciones y cohortes hallando resultados no concluyentes en la mayoría de los casos, debido a que para un grupo una variante señalada puede ser protectora y en otro grupo no posee ninguna relación estadísticamente significativa. Incluso, los análisis de asociación entre los diferentes polimorfismos y la susceptibilidad o resistencia se llevan a cabo considerando cinco modelos: dominante, codominante, sobredominante, recesivo y aditivo, que también resultan en diferentes conclusiones dependiendo de la población.

Es factible que este fenómeno se deba a las interacciones que se puedan presentar entre las variantes que tienen una frecuencia poblacional diferente, por la diversidad étnica de los sujetos incluidos en los estudios, a las discrepancias inmunológicas, las diferentes rutas de transmisión del VIH-1 e incluso a las poblaciones de virus circulantes. Adicionalmente, algunos estudios publicados no cuentan con el ajuste por sexo, edad y estratificación de la población, exhiben un tamaño limitado de muestras e incluso la falta de poder estadístico, lo que hace que los datos sean controvertidos.

Tabla 4. Genes y polimorfismos implicados en la patogénesis del VIH/SIDA, riesgo, adquisición y progresión

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
Receptores de quimiocinas y sus ligandos						
<i>CCR5</i> (<i>CKR5</i>)	3p21.31	Receptor 5 de quimiocina cisteína-cisteína	$\Delta 32$	Resistencia a la infección	Knockout expresión de CCR5	65
			59029 A/G	Progresión de la infección (retraso) Resistencia a la infección	Afección en los niveles de expresión de CCR5	66
<i>CCR2</i> (<i>CKR2</i>)	3p21.31	Receptor 2 de quimiocina cisteína-cisteína	<i>64I</i> (<i>V64I</i>) rs1799864	Progresión de la infección	Disminución de la función de CXCR4	67
<i>CCL5</i> (<i>RANTES</i>)	17q12	Ligando de CCR5	<i>In1.1C</i>	Progresión de la infección	Regulación negativa de la transcripción	68
<i>CXCL12</i> (<i>SDF1</i>)	10q11.21	Ligando CXC 12 (factor derivado del estroma)	3'UTR-801G-A rs1801157	Progresión de la infección Resistencia a la infección	Disminución de la expresión de CXCR4	69

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
<i>CCL3L1</i> (<i>G0S19-2</i>)	17q11.2	Receptor 3 de quimiocina cisteína-cisteína	CNV	Resistencia a la infección	Alto número de copias ejercen un papel protector	33
<i>CXCR6</i> (<i>CD186</i>)	3p21.31	Receptor 6 de quimiocina C-X-C.	rs2234358	Progresión de la infección	Posible modulación de la expresión de CXCR6	70
<i>CX3CR1</i> (<i>CCRL1</i>)	3p22.2	Receptor de quimiocina CX3C	249I (V249I) rs3732379	Progresión de la infección	Posible modulación	71
Receptores de patógenos						
<i>TLR3</i> (<i>CD283</i>)	4q35.1	Receptor 3 tipo Toll	L412F rs3775291	Resistencia a la infección	Aumento en la expresión de CD69 y mayor producción de citoquinas proinflamatorias	37
<i>TLR4</i> (<i>CD284</i>)	9q33.1	Receptor 4 tipo Toll	D299G rs4986790	Susceptibilidad a la infección	Alteración funcional del receptor	72

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
<i>TLR7</i>	Xp22.2	Receptor 7 tipo Toll	rs2074109	Progresión de la infección	Alteración en el nivel y/o tiempo de expresión del receptor	73
<i>TLR8 (CD288)</i>	Xp22.2	Receptor 8 tipo Toll	A1G (+1G>A) rs3764880	Progresión de la infección	Modulación de los perfiles de citoquinas	74
<i>TLR9 (CD289)</i>	3p21.2	Receptor 9 tipo Toll	1635A / G rs352140	Progresión de la infección	Posible modulación de los perfiles de citoquinas	73
<i>DDX58 (RIG-I)</i>	9p21.1	ARN helicasa	No aplica	Resistencia a la infección	Estimula el sistema inmune innato	75
<i>CD209 (DC-SIGN)</i>	19p13.2	Molécula de adhesión intercelular específica de la célula dendrítica	Repeticiones en tandem	Resistencia a la infección	Menor expresión de ARNm de CD209	41,76,77
<i>MBL2 (COLEC1)</i>	10q21.1	Lectina 2 de unión a manosa	+4C>T	Susceptibilidad a la infección	Reducción del nivel de proteína	78,79

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
Factores de restricción retroviral						
<i>APOBEC3G</i> (<i>CEM15</i>)	22q13.1	Polipéptido catalítico de la enzima editora del ARNm de la apolipoproteína B subunidad 3G	C40693T	Susceptibilidad a la infección	Actividad citidina deaminasa	⁸⁰
<i>APOBEC3C</i> (<i>ARP5</i>)	22q13.1	Polipéptido catalítico de la enzima editora del ARNm de la apolipoproteína B subunidad 3C	I188	Susceptibilidad a la infección	Aumento de la actividad enzimática	⁸¹
<i>SAMHD1</i> (<i>AGS5</i>)	20q11.23	Desoxinucleósido Trifosfato Trifosfohidrolasa dNTPasa	rs1291142	Progresión de la infección	Regulación de la expresión de ARNm en células B	⁸²
<i>MX2</i> (<i>MXB</i>)	21q22.3	Dinamina MX (GTPasa)	rs2074560	Resistencia a la infección	Aumenta los niveles de expresión de MX2 en	⁸³

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
<i>TETHERIN</i> (<i>BST2</i>)	19p13.11	Teterina o antígeno celular 2 del estroma de la médula ósea	rs113189798 rs12609479	Resistencia a la infección	respuesta al IFN- α Alteración de los sitios de unión del factor de transcripción y otros motivos reguladores	84
<i>TRIM5</i> (<i>TRIM5alpha</i>)	11p15.4	Motivo tripartita contenedor de 5 α	R136Q rs10838525	Progresión de la infección	Alteración en la multimerización de la proteína	85–87
<i>HAVCR2</i> (<i>TIM3</i>)	5q33.3	Receptor celular 2 del virus de la hepatitis A	rs4704846	Resistencia a la infección	Incremento de la expresión de TIM3	88
<i>PPIA</i> (<i>Ciclofilina A</i>)	7p13	Peptidil-prolil isomerasa A	A1650G	Resistencia a la infección	Niveles de expresión de la proteína	89
Citoquinas						
<i>IL4</i> (<i>BSF1</i>)	5q31.1	Interleuquina 4	-589T (-589/90 C>T) rs2243250	Progresión de la infección	Aumento de la actividad promotora	90

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
<i>IL10</i> (<i>TGIF</i>)	1q32.1	Interleuquina 10	5'A	Limita la infección	Inhibición de la replicación de macrófagos y linfocitos T	91
<i>IL27</i> (<i>IL27A</i>)	16p12.1- p11.2	Interleuquina 27	rs40837 A/G	Progresión de la infección Resistencia a la infección	Regulación del nivel de IL-27 sérica o la cantidad de Linfocitos T CD4+.	92
Defensinas, Vitamina D, grupos sanguíneos						
<i>VDR</i> (<i>NR111</i>)	12q13.11	Receptor de la vitamina D	Haplotipo SNPs	Resistencia a la infección	Menor eficiencia a la vía de la vitamina D	93
			rs1544410	Progresión de la infección Resistencia a la infección	Regulación de la expresión de la vitamina D	94
Interferón e ISGs						
<i>IFNL4</i> (<i>IL28B</i>)	19q13.2	Interferon lambda 4	rs368234815	Resistencia a la infección	Ausencia del interferón	95,96

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
<i>IFITM3</i> (<i>DSPA2b</i>)	11p15.5	Proteína transmembrana inducida por interferón 3	rs12252-C	Progresión de la infección	Expresión de <i>IFITM3</i> truncado	97
Complemento						
<i>CR2</i> (<i>CD21</i>)	1q32.2	Receptor del complemento 2	rs1567190	Resistencia a la infección y respuesta a vacunas	Niveles más bajos de ARNm	40
Receptores de células natural Killer						
<i>KIR3DS1</i> (<i>nkat10</i>)	19q13.4	Receptor de células NK de la familia de las inmunoglobulinas	<i>KIR3DS1+</i> <i>HLA-Bw4-</i> <i>I80</i>	Progresión de la infección	Células NK con mayor capacidad citotóxica	98
Inmunidad adquirida						
<i>HLA-B</i>	6p21.31	Antígeno leucocitario humano	<i>B*27</i>	Progresión de la infección		99
<i>HLA-B</i>	6p21.31	Antígeno leucocitario humano	<i>B*57</i>	Progresión de la infección	Restricción de la replicación del VIH	100

Gen (Alias)	Locus	Nombre aprobado	Variante	Efecto	Mecanismo de acción	Ref.
<i>HLA-C</i> (<i>PSORS1</i>)	6p21.33	Antígeno leucocitario humano, clase I, C	-35C/T	Progresión de la infección	Aumento de la expresión de HLA-C	¹⁰¹

** HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Abreviaturas: CNV, variaciones en el número de copias; SNP, polimorfismos de un solo nucleótido

A continuación, se elabora una breve descripción de cada uno de los factores genéticos referidos en la tabla 4.

1.2.1 Receptores de quimiocinas y sus ligandos

En este grupo se hallan los receptores de quimiocinas y sus ligandos, encargados de mediar la entrada del virus del VIH en las células huésped, a través del receptor CC de quimiocina 5 o receptor CXC de quimiocina 4 (CXCR4).

Entre los polimorfismos estudiados de los genes que codifican los receptores de quimiocinas y las quimiocinas se pueden mencionar: *CCR5Δ32*, *CCR5m303*, *CCR5 59029A/G*, *CCR2-64I*, *SDF1-3'A*, *RANTES (CCL5) In1.1C*, *RANTES 403A/G*, *RANTES 28C/G* observándose diferentes prevalencias en poblaciones según el lugar de procedencia.

Un metaanálisis realizado en el año 2010, en el cual incluyeron 13 estudios con 2421 casos y 3283 controles, sugirió que el genotipo *CXCL12* podría tener un efecto limitado sobre la susceptibilidad al VIH-1⁶⁹. Sin embargo, su estudio se ha continuado en otras poblaciones como Papua Nueva Guinea¹⁰², India¹⁰³, Camerún¹⁰⁴, Jordán¹⁰⁵, en cada una de las cuales se ha determinado la frecuencia de los polimorfismos de *CXCL12*, con conclusiones aún en debate. Cabe destacar que, en la población de Camerún, todos los participantes fueron heterocigotos (G/A), para la variante *CXCL12-3'A*, tanto los individuos VIH-1 positivos como los VIH-1 negativos. Adicionalmente en las poblaciones mencionadas también se estudiaron las variantes de los genes *CCR5* y *CCR1*. En ninguna de las tres poblaciones referidas se

pudo establecer el papel protector de *CCR5* Δ 32 dado que estuvo ausente o casi ausente ¹⁰²⁻¹⁰⁵.

De otra parte, se ha definido que la variante *CXCL12-3'A* está asociada con el aumento de la transmisión perinatal del VIH-1 (RR 1.8; IC 95% 1.0 – 3.3) y en la transmisión postnatal a través de la leche materna (RR 3.1; IC 95% 1.1 – 8.6) en mujeres embarazadas heterocigotas (G/A)¹⁰⁶.

En relación al efecto de los polimorfismos de *CCL5* (-403G / A, -28C / G en la región promotora e In1.1T/C, en el primer intrón) sobre la susceptibilidad a la infección por VIH-1 y a la progresión de la enfermedad, un metaanálisis reciente que incluyó 24 estudios y 10000 sujetos, sugiere que los polimorfismos -403G/A, -28C/G confieren una protección contra VIH-1 posiblemente porque los alelos -403A y -28G pueden incrementar la actividad del promotor, lo cual conduce a una mayor producción de proteína *RANTES*, que se une a *CCR5*, inhibiendo la entrada y replicación del VIH-1 a las células. Por el contrario, el polimorfismo In1.1T/C puede aumentar el riesgo de infección por VIH-1, en individuos asiáticos, debido a que el alelo In1.1C regula negativamente la actividad transcripcional de *RANTES*, disminuyendo en tres veces la expresión génica en relación con el alelo In1.1T ¹⁰⁷.

Respecto a los polimorfismos del gen *CXC3R1* y la posible asociación con la historia natural de la infección por VIH-1 aún hay discrepancias, dado los resultados no concluyentes obtenidos en diversos estudios. Uno de los estudios en el cual se evaluaron las variantes V249I (G>A) y T280M (C>T) en un grupo

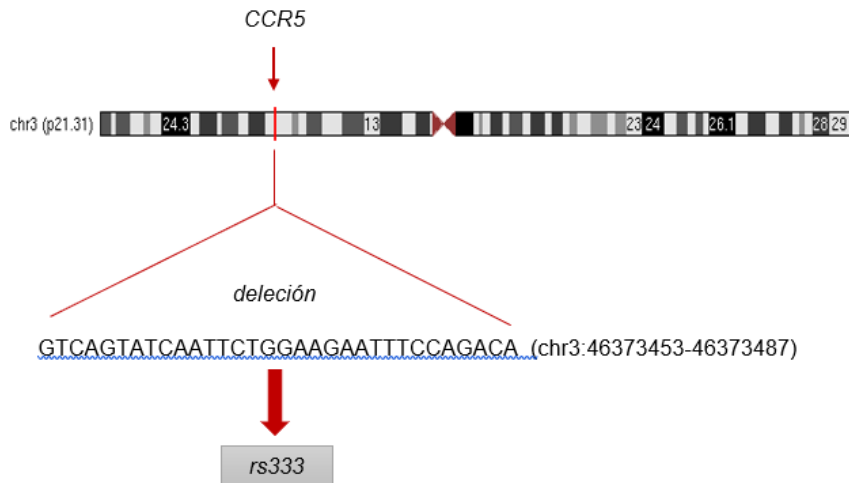
de individuos no progresores a largo plazo y otro de pacientes infectados por VIH-1 progresores habituales provenientes de España, se reportó que la variante 249I estaba presente con mayor frecuencia en los individuos no progresores a largo plazo infectados por el VIH-1 hace más de 15 años. Incluso, los autores proponen que se realicen estudios encaminados a reproducir y validar estos datos en cohortes más grandes de pacientes LNTP infectados por VIH-1. Además, mencionan que los receptores de quimiocinas podrían ser considerados un posible objetivo para futuros medicamentos antirretrovirales ⁷¹.

En este grupo, es de interés particular para nuestra investigación el gen *CCR5*, del cual se presentará una descripción más detallada.

1.2.1.1 *CCR5 - Δ32 y la resistencia al VIH*

Desde el año de 1996 cuando se determinó el papel que cumplía la proteína CCR5 frente a la infección por VIH-1 como co-receptor y que además la delección de 32 pares de bases en la región codificante del gen *CCR5* estaba asociada con la resistencia a la infección causada por este virus, diversos estudios se han realizado en torno al papel que cumple esta molécula frente a las infecciones y a otras patologías ¹⁰⁸. La interacción entre el VIH-1 y el alelo de resistencia *CCR5-Δ32*, ha sido posible comprenderla con ayuda de la combinación de disciplinas como la biología molecular, epidemiología, virología, genética evolutiva y de poblaciones (Figura 3) ¹⁰⁹.

Figura 3. *CCR5* – locus y mutación *CCR5-Δ32*



Fuente:

https://genome.ucsc.edu/trash/hgtIdeo/hgtIdeo_genome_30db5_4826e0.png

El gen *CCR5* se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 3, en la posición 3p21.31, codifica para una quimiocina que cumple una función relevante en el sistema inmunológico, se expresa en gran medida en macrófagos y células T CD4+. Específicamente codifica para el correceptor del VIH-1, *CCR5*, el cual está involucrado en el ingreso del virus del VIH y su propagación de célula a célula, por lo tanto, polimorfismos en *CCR5* pueden influir en este proceso, dado que modulan su expresión. Las quimiocinas por lo general reclutan y activan leucocitos hacia y en los sitios de infección.

Existen al menos 23 alelos en la región codificante de *CCR5*, predominantemente raros. La mayoría de las mutaciones en

CCR5 son no sinónimas (alteración de aminoácidos) que implican presiones de selección pasadas ¹⁰⁹.

Hasta el momento se han identificado nueve haplogrupos *CCR5*, denominados A, B, C, D, E, F*1, F*2, G*1 y G*2 (G*2 es el alelo *CCR5-Δ32*) ¹⁰⁹

La deleción de 32 nucleótidos del gen *CCR5* conduce a que la maquinaria de traducción encuentre un codón de parada demasiado pronto, derivando en la fabricación de una versión truncada del péptido, lo que lleva a que no presente los últimos tres dominios transmembrana y carezca de bucles extracelulares e intracelulares y en consecuencia hace que esta proteína mutada permanezca en el citoplasma, incapaz de migrar a la superficie celular.

El interés por estudiar esta mutación aumentó por primera vez con su descubrimiento en individuos resistentes a la infección por VIH-1 ¹⁰⁹, es decir, individuos homocigotos para dicha mutación que no desarrollaban la infección por el virus VIH-1 e individuos VIH-1 positivos heterocigotos que tenían una aparición tardía del SIDA de 2 a 3 años. La homocigosidad de *CCR5-Δ32* en caucásicos se midió en alrededor del 1%, con heterocigosidad de hasta el 20% ¹⁰⁹.

La frecuencia de esta mutación depende de la etnia, por ejemplo, en un grupo de 148 seropositivos al VIH-1 (casos) y 342 marroquíes sanos (controles) que fueron reclutados en el Hospital de Entrenamiento Militar Mohammed V en Rabat (Marruecos), ninguno de los individuos analizados tenía el genotipo homocigoto

CCR5-Δ32, 7 de 148 (4,73%) VIH-1 seropositivos fueron heterocigotos para el alelo *CCR5-Δ32* al igual que 6 de 342 (1,75%) individuos seronegativos al VIH-1 ¹¹⁰.

Un aspecto para destacar en relación con la cohorte WIHS (Estudio de VIH interinstitucional de mujeres), es que ha sido ampliamente caracterizada desde 1994, cuyo reclutamiento inicial fue descrito por Barkan et al. ⁶⁰, cuenta en la actualidad con 3772 mujeres seropositivas para VIH-1 o en riesgo de contraer la infección ¹¹¹. Uno de los polimorfismos que se ha genotipado en esta cohorte es el *CCR5 Δ32*, refiriendo una frecuencia de 0.026 para las mujeres seropositivas y de 0.040 para las mujeres seronegativas al VIH-1, hallando que las mujeres heterocigotas tenían una menor probabilidad de estar infectadas (OR 0.63 [IC 95%, 0.44–0.90]), es decir, que en este grupo el heterocigoto confiere protección parcial ²².

Otro polimorfismo que ha sido caracterizado es el -2459G / A, rs1799987 (también conocido como 59029G> A y 303G> A), que se encuentra en el promotor del gen *CCR5* y está asociado con la progresión de la enfermedad, el cual debería ser incorporado en los estudios que evalúan nuevas estrategias inmunológicas y quimioterapéuticas ¹¹².

1.2.2 Inmunidad innata

La primera línea de defensa contra los patógenos que invaden al huésped está dada por el sistema inmunológico innato. En relación a la infección por VIH-1 aún falta esclarecer la función exacta de las diferentes células inmunitarias innatas y si la interacción entre éstas y el virus resultan benéficas para el

huésped o para el virus ¹¹³. Dentro de este grupo de factores que hacen parte de la inmunidad innata se pueden citar: receptores de patógenos, factores de restricción de huésped retrovirales, interferones, citoquinas, complemento, defensinas, entre otros, los cuales cumplen un papel en la infección por VIH al bloquear o restringir la replicación del virus en diferentes etapas del ciclo de vida de este. Algunos se han asociado con la resistencia innata a la infección y otros con la progresión VIH/SIDA, ya sea de manera rápida o lenta⁷³.

A continuación, se mencionarán algunas de las principales características de los factores que hacen parte de la inmunidad innata y su relación con la infección por VIH-1.

1.2.2.1 *Receptores de reconocimiento de patrones*

En los tejidos de las mucosas susceptibles a la infección por VIH-1 residen células del sistema inmune innato tales como las células dendríticas, las células de Langerhans y los macrófagos. Cada una de estas células cumplen un papel distinto en el inicio de la infección por VIH-1, además de inducir la inmunidad antiviral. Las diferencias en su función están dadas por la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) específicos, los cuales influyen en el resultado de las interacciones del virus ¹¹³.

En este sentido, una amplia variedad de PRR es expresada por el sistema de la inmunidad innata, los cuales se encargan de mediar el reconocimiento de patógenos y conducen a la producción de citoquinas, destrucción de patógenos y a la activación de la respuesta inmune adaptativa, que finalmente

elimina el patógeno del huésped, restringiendo su replicación y propagación ¹¹⁴. Estos PRR fueron identificados inicialmente como sensores moleculares que transducen señales de patrones estructurales específicos derivados de patógenos, que son altamente conservados.

Los PRR se ubican por toda la célula, desde endosomas hasta membranas celulares. Este grupo comprende los receptores tipo Toll (TLR), tipo RIG-I (RLR), tipo NOD (NLR) y de lectinas tipo C (CLR) que reconocen un patrón de invasores externos relacionado con patógenos y activan el sistema inmunológico del huésped a través de reguladores posteriores, inclusive el factor nuclear kappa-cadena ligera-potenciador de células B activadas (NF-κB), la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y el interferón tipo I ⁷².

En relación al grupo de proteínas transmembrana tipo I codificadas por los genes *TLR*, con la ayuda de un dominio extracelular identifican una amplia gama de motivos moleculares conservados en una variedad de patógenos (PAMP), entre ellos los virus. De otra parte, por intermedio de los dominios intracelulares, los TLR interactúan con proteínas adaptadoras e impulsan vías de señalización, es decir, factores de transcripción que conducen a la generación de citosinas inflamatorias y a la activación de la inmunidad adaptativa.^{73,115} Estas respuestas desencadenan el reclutamiento de neutrófilos, activación de macrófagos, inducción de genes estimulados por IFN, originando la muerte directa de patógenos. Han sido identificados hasta el

momento 10 y 12 TLR funcionales en humanos y ratones respectivamente ¹¹⁵.

En un metanálisis realizado entre pacientes caucásicos infectados con VIH previamente analizados en otros estudios y una población control obtenida del proyecto 1000 genomas, el SNP rs4986790 (D299G) del gen *TLR4* fue asociado con la susceptibilidad a la infección por VIH-1⁷².

Por su parte, TLR7 reconoce el ARN monocatenario viral. Su estimulación induce la secreción de citosinas proinflamatorias e IFN tipo I ¹¹⁶. En cuanto al SNP rs2074109 del gen *TLR7* no genera alteraciones en la cadena de aminoácidos del receptor, pero es posible que como este cambio ocurre en el sitio de unión del factor de transcripción, se pueda alterar el nivel y/o tiempo de expresión del *TLR7*, originando una diferencia en la producción de citosinas posteriores como IFN- α ⁷³.

En referencia al polimorfismo -336T en el promotor de la lectina tipo C (*DC-SIGN*) al parecer protege contra infección VIH adquirida por vía parenteral y no por mucosas, además esta protección podría estar asociada a la presencia de otra variante que está en desequilibrio de ligamiento con -336C en caucásicos pero no en afroamericanos ⁷⁷.

Por otra parte, el virus del VIH en su genoma contiene información que codifica para 6 proteínas denominadas accesorias/regulatorias, las cuales son Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef, que se encargan de regular la infección, la producción del virus y su patogenicidad ¹¹⁷. En relación a la proteína Nef, modula

la expresión del receptor de la superficie celular en la célula diana, es decir, altera la señalización del receptor de antígeno de las células T (TCR) ¹¹⁸ .

1.2.2.2 Factores de restricción retrovirales

Otro grupo de moléculas que protegen a las células de los patógenos virales son los factores de restricción antivirales, que hacen parte del sistema inmunológico innato del huésped. Estudios recientes han demostrado que algunos de estos factores bloquean la infección del VIH a lo largo del ciclo replicativo del virus: eliminación de la cápside (TRIM5), transcripción inversa (APOBEC3 y SAMHD1), la importación e integración nuclear (MxB), la traducción (Schlafen 11) y en la fusión y entrada (BST2 / Tetherin) ¹¹⁹ .

En relación con la familia de citidina deaminasas APOBEC3, existen 7 genes responsables de codificar estas proteínas ubicados en tándem en el cromosoma 22: *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3DE*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G*, y *APOBEC3H*. Éstas actúan sobre los motivos de dinucleótidos CC o TC en el ADN monocatenario del VIH-1 y causan hipermutación de G-a-A, lo cual conduce a una restricción en la replicación viral. Los genes más estudiados y reconocidos en relación la inhibición de la replicación del VIH-1 son *APOBEC3G* y *APOBEC3F* ¹²⁰ .

Adicionalmente, en este grupo también se han estudiado polimorfismos del gen *SAMHD1* en poblaciones europeas y afroamericanas, sin llegar a resultados concluyentes ⁸² . *SAMHD1* es una enzima inducible por interferón en las células mieloides

que inhibe el ciclo viral en etapas tempranas, debido al agotamiento de dNTPs necesarios para la transcripción inversa

¹²¹.

1.2.2.3 Citoquinas

Recientemente se presentaron los resultados de un metaanálisis en el cual se obtuvo evidencia sobre ocho SNPs presentes en los genes que codifican para interleucinas, encontrando que la variante IL1B +3953/4 C> T (rs1143634), parece incrementar el riesgo de infección por VIH-1 bajo un modelo genético recesivo (OR: 4,47, IC del 95%: 2,35-8,52) y además que la variante IL28B C> T (rs12979860) se asoció con una disminución en el 27% del riesgo de infección por VIH-1, particularmente en poblaciones infectadas por el virus de la hepatitis C (VHC) (OR: 0,73, IC del 95%: 0,57 0,95), concluyendo que la señalización de interleucina es un factor de interés en la infección por VIH ¹²².

Otro metaanálisis en el cual se estudiaron los polimorfismos presentes en el gen *IL10*, concluyó que no encontró una asociación marcada entre el polimorfismo *IL-10-1082G / A* y la susceptibilidad al VIH-1; de otra parte el polimorfismo *IL-10-529C / A* podría conducir a una reducción del riesgo de infección por VIH-1, y el polimorfismo *IL-10-819C / T* podría conducir a un mayor riesgo de infección por VIH-1 (IC del 95% = 0,72-1,19, p = 0,537) ¹²³.

En relación al gen *IL-27* se analizaron 3 polimorfismos rs17855750, rs181206, rs40837, encontrando que el polimorfismo *IL-27 rs40837* podría influir en la susceptibilidad a la infección por

VIH y la progresión de la enfermedad probablemente regulando el nivel de IL-27 en suero o la cantidad de T CD4 + ⁹².

1.2.2.4 Defensinas, Vitamina D, grupos sanguíneos

Se ha descrito que la vitamina D es un regulador de la defensa del huésped contra las infecciones actuando a nivel de la inmunidad innata y adaptativa. En relación al gen *VRD*, un estudio realizado por Sánchez de la Torre reportó que el haplotipo conformado por los polimorfismos rs11568820, rs4516035, rs10735810, rs1544410 y rs17878969 estaba asociado con la protección contra la infección por VIH-1. Este estudio fue realizado en una población de 460 hombres expuestos al VIH-1 por el uso de drogas inyectables (335 infectados y 125 no infectados) y 124 sujetos sanos seronegativos ⁹³.

Adicionalmente se ha reportado una relación entre la resistencia natural a la infección por VIH-1 y los niveles elevados de la expresión de vitamina D y *VRD*, incluso se ha descrito la relación entre la deficiencia de esta vitamina y la progresión rápida a la enfermedad ¹²⁴.

Otro grupo de péptidos corresponde a las defensinas, las cuales poseen propiedades antimicrobianas e inmunorreguladoras. Tanto las defensinas α como las β tienen actividad anti_VIH, por lo que los genes que codifican para estos péptidos se incluyen dentro del grupo de genes asociados a la susceptibilidad frente a la infección por VIH-1 y a la progresión de la enfermedad ¹²⁵.

1.2.2.5 Interferón e ISGs

Los interferones son un grupo de citoquinas que actúan como la primera línea de defensa contra los virus. Se dividen en tres familias, tipo I, tipo II y tipo III, con base en sus características estructurales, homología de secuencias, receptores y actividades biológicas. Los IFN de tipo I y III median la respuesta inmune innata y el IFN de tipo II interviene en la respuesta inmune adaptativa. Estos cumplen funciones adicionales relacionadas con el crecimiento celular y la vigilancia inmunitaria contra las células tumorales y funciones inmunomoduladoras en enfermedades autoinmunes ^{126,127}.

Los interferones se caracterizan por la habilidad que poseen para estimular la actividad antiviral en las células diana que expresan los complejos de receptores afines. Reciben su nombre porque “interfieren” con la replicación viral en las células huésped ¹²⁸. Los individuos que carecen de IFN específicos pueden ser más susceptibles a enfermedades infecciosas ¹²⁹.

La producción de los interferones ocurre después de que los virus generan infección en el ser humano, lo cual conduce a un estado antiviral en las células infectadas y aún no infectadas que bloquea la replicación viral y por lo tanto la propagación de la infección. Los interferones tipo II tienen efectos pleiotrópicos limitados sobre un grupo de células inmunes que promueven respuestas adaptativas e innatas. Por su parte, los interferones tipo I y III inducen un estado antiviral ¹³⁰. Los IFN tipo III (IFNL) cumplen su función considerablemente en los sitios de barrera anatómica, con

efectos únicos sobre las células hematopoyéticas, principalmente en neutrófilos ¹³¹.

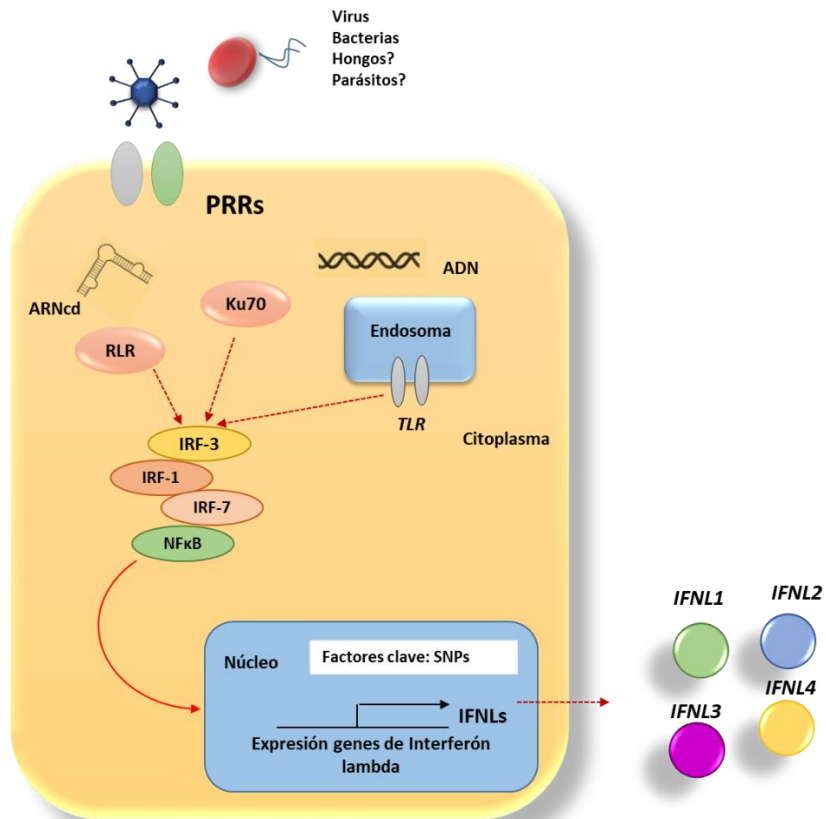
A pesar de las diferencias genéticas que existen entre los IFN tipo I y tipo III, así como el uso de receptores diferentes, ambos son inducidos por vías de detección de patógenos similares y activan programas de expresión de genes antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores relacionados ¹³¹. La expresión de los IFNLs se induce en una amplia gama de tipos de células mediante PRRs, incluidos los TLR, Ku70 y RLR (Figura 4).

En la figura 4, se observa los RLR, que comprenden los sensores citoplasmáticos de los ácidos nucleicos virales. Tanto RLR como TLR3 pueden reconocer ARN bicatenario (ARNdc) del genoma viral o el intermedio de replicación de los virus de ARN. La activación de la señalización de RLR y TLR3 conduce a la activación de los factores reguladores de interferón, IRF-3, IRF-7 y NF-κB. Estos factores de transcripción se trasladan al núcleo y dan como resultado la inducción de IFNLs ¹³³. Otra de las vías de inducción de los IFNL que se presenta en la figura 4 corresponde al sensor de ADN citosólico, Ku70. En resumen, los PRR por medio de señales activan la transcripción de la familia de factores IRF, los cuales junto con NF-Kb promueven la expresión de los IFNL ¹³¹.

Los IFNL regulan un conjunto de genes similar al de los IFN de tipo I, pero mientras que los IFN de tipo I actúan de forma global, los IFNL se dirigen primordialmente a las células epiteliales de la mucosa y las protegen contra los frecuentes ataques víricos característicos de los tejidos de barrera. Es así como, los IFNL

ayudan a conservar sanas las superficies de las mucosas mediante la protección inmunitaria ¹³⁰.

Figura 4. Ruta de activación de los IFN tipo III



ARNcd, ARN de doble cadena, RLR, receptor similar a RIG-1; TLR, receptores tipo toll; NF-κB, factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de células B activadas; IRF, factor regulador de interferón.

Adaptado de Lazear et al., (2019) y Syedbasha & Egli, (2017) ^{131,132}

Los principales tejidos sensibles a la acción de los IFNL son las células hepáticas, epiteliales y mieloides, lo que indica que los IFNL tienen un patrón de activación temporal y tisular específico¹³⁴. Adicionalmente los receptores de los IFNL se expresan primordialmente en las células epiteliales que hacen parte de las barreras mucosas del intestino y del tracto respiratorio, lo que deriva en que los IFNL sean primordiales para la defensa innata de patógenos en el pulmón y el intestino¹³⁵.

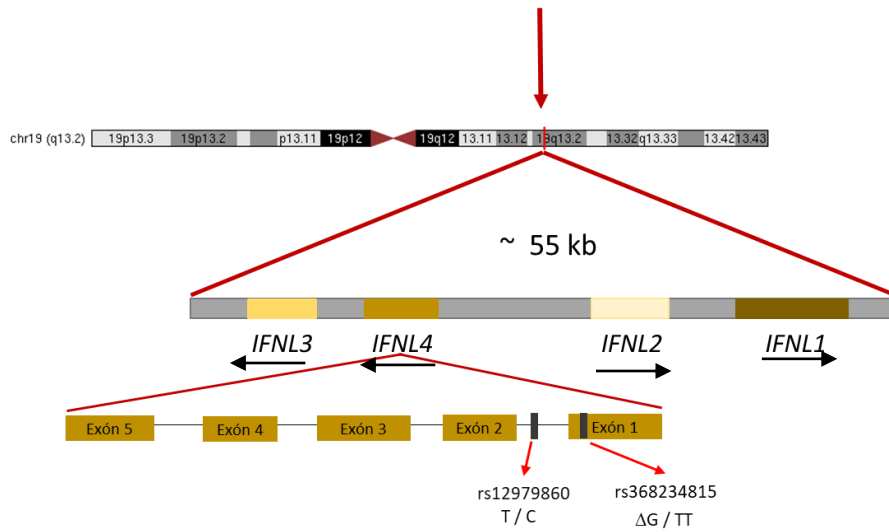
Los genes del *IFNL* se encuentran en una región cromosómica de aproximadamente 55kb en el locus 19q13.13 e incluye 4 genes paralogos *IFNL1-4* (interferones de tipo III) (Figura 5).

Diferentes nomenclaturas han sido empleadas para nombrar este grupo de genes, especialmente los tres primeros, que fueron descubiertos por dos grupos de investigación independientes. De manera oficial los símbolos reconocidos en este momento para los cuatro genes son *IFNL1* (antes *IL29*), *IFNL2* (antes *IL28A*), *IFNL3* (antes *IL28B*) e *IFNL4*. Esta nomenclatura fue definida por el Comité de Nomenclatura Genética de la Organización del Genoma Humano¹³⁶.

En relación con su producción la mayoría de los individuos son polimórficos, es así que los de ascendencia africana generan los 4 interferones, mientras que los de ascendencia europea y asiática tienen un polimorfismo de tipo INDEL que genera un codón de parada prematuro y un defecto en la producción de la proteína de *IFNL4*, variante que es muy frecuente en poblaciones europeas y asiáticas. Este grupo de genes ha suscitado el interés debido a la asociación entre las polimorfismos de esta región y la

curación espontánea o tras el tratamiento con IFNa más ribavirina de la infección por el virus de la hepatitis C ¹³⁷.

Figura 5. Gen *IFNL4* – locus



En la figura 5 se representa la región 19q13.2, que incluye los genes *IFNL1*, *IFNL2*, *IFNL3* e *IFNL4*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Exones representados en barras de color amarillo y los intrones representados con líneas.

De manera más detallada, el interferón lambda 4 (*IFNL4*) fue reportado por primera vez en 2013, es uno de los genes humanos descubiertos más recientemente y la última incorporación a la familia del interferón lambda. El gen *IFNL4* contiene cinco exones y la proteína *IFNL4* completa consta de 179 aminoácidos ¹³⁶. *IFNL4* es similar a tres genes vecinos (*IFNL1*, *IFNL2* e *IFNL3*) en que las proteínas codificadas por estos genes se unen a un complejo de correceptor compartido, esto conduce a la activación de la vía de señalización JAK-STAT y a la regulación positiva de

numerosos genes estimulados por interferón. Varios polimorfismos dentro o cerca de *IFNL4* se asocian fuertemente con la eliminación de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) y otros fenotipos ^{136,138}.

La proteína interferón lambda 4 (IFN- λ 4 ó *IFNL4*) puede ser generada por individuos que portan el alelo Δ G de la variante rs368234815 (*IFNL4*- Δ G) y no es producido por individuos que son homocigotos para el alelo *IFNL4*-TT debido a un desplazamiento del marco de lectura en el exón 1 causado por la inserción TT, la cual es considerada un knockout natural.

La variante rs12979860, asociada con la eliminación espontánea del VHC en estudios anteriores, conocida como *IL28B*, en realidad se encuentra dentro del intrón 1 de *IFNL4* ¹³⁹. Este polimorfismo no es el causal de las asociaciones detectadas, pero está en desequilibrio de ligamiento con el INDEL rs368234815 que es el realmente importante, ya que como se ha comentado determina la correcta traducción de la proteína. Es una asociación genética que resulta paradójica porque el alelo protector frente al VHC no produce *IFNL4*, una potente proteína antiviral ¹⁴⁰.

Varios estudios han explorado el papel potencial de los polimorfismos *IFNL4*-*IFNL3* en el curso de la infección por VIH-1, siendo este controvertido. Machmach et al ¹⁴¹ encontraron que la variante *IFNL4*- Δ G se asocia con estados clínicos e inmunológicos desfavorables independientemente de la viremia del VIH. Domínguez-Molina et al ¹⁴² encontraron que las variantes de *IFNL4* están asociadas con el fenotipo controlador de progresión a largo plazo. De otra parte, Real et al., (2015)

analizaron la asociación de esta variante con la adquisición del VIH-1 en una población de UDI conformada por 401 hombres blancos, 213 eran seropositivos para VIH-1 y 188 eran HESN. Como resultado se halló que el alelo *IFNL4-TT* que actuaba como protector del VHC se asoció con una menor probabilidad de infección por VIH-1 en la muestra analizada [OR: 0,3; P = 0,006], lo que sugiere que la susceptibilidad genética a la infección por VHC y VIH-1 comparte vías moleculares comunes ⁹⁵.

Lo que se puede deducir de estos hallazgos es que el papel de este polimorfismo depende de diferentes factores como el tipo de infección, la vía de transmisión del VIH-1, posiblemente el origen de la población, entre otros.

1.2.2.6 Complemento

Antes de referirnos al gen *C4*, se presentará una breve introducción en relación al sistema del complemento, que pasó de ser una cascada lítica cuya finalidad era eliminar a una variedad de patógenos invasores (bacterias, hongos, virus) que infectan al organismo huésped, a un sistema de vigilancia inmunológico innato complejo que desempeña un rol fundamental en la homeostasis del huésped, la inflamación y la defensa contra patógenos ^{143,144}. Al proporcionar la defensa de primera línea contra patógenos invasores, el sistema del complemento une la inmunidad innata y la adaptativa ¹⁴⁵. Está constituido por más de 50 proteínas que circulan por el plasma y una pequeña porción de proteínas unidas a membrana que actúan como reguladoras, con moléculas efectoras que existen principalmente en un estado proenzimático y que se movilizan en forma de cascada tras la

activación del sistema, que puede suceder a través de tres vías distintas: la vía clásica, la lectina y la vía alternativa ¹⁴⁴.

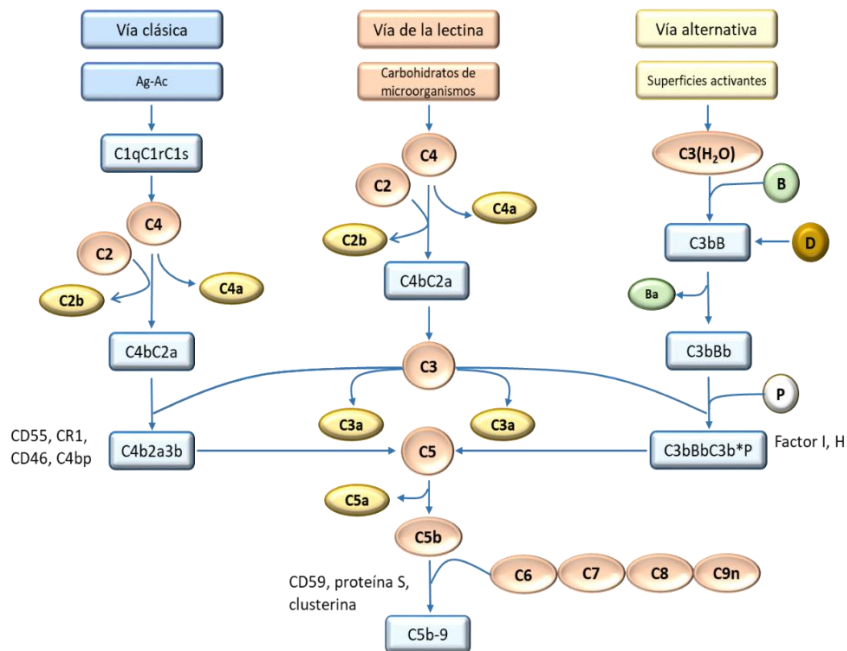
En relación a la vía clásica, como se observa en la figura 6, C1 es un complejo de proteínas compuesto por C1q, C1r, C1s; estas dos últimas subunidades actúan como proteasas y escinden C4 y C2. C4, es dividida en C4a y C4b y C2 en C2a y C2b. C4a y C2b desaparecen, mientras que C4b se une a C2a y forman un complejo enzimático C4bC2a, conocido como C3 convertasa. Cuando C3b se une a C4b2a, forman la C5 convertasa, que se encarga de activar a C5.

En la vía de la lectina, existe una similitud con la vía clásica, dado que conduce a la integración del complejo C4bC2a. Esta vía es activada por estructuras de carbohidratos complejos y mediada a través de moléculas de reconocimiento como la lectina de unión a manano (MBL), ficolinas y colectina, lo que lleva a la activación de la serina proteasa asociada a manano 2 (MASP-2), que finalmente interviene en la unión eficiente y escisión de C4 ¹⁴⁶.

Por último, en la vía alternativa, el C3b se une a la superficie de la célula extraña, y posteriormente se une a una proteína sérica denominada factor B, formando el complejo C3bB. El factor B expone el sitio que sirve como sustrato para la proteína D sérica. Luego, el factor D escinde B en Ba y Bb formando C3 convertasa (C3bBb). C3 convertasa luego forma C5 convertasa que finalmente forma el complejo de ataque de membrana terminal (MAC) como en la ruta clásica.

En general, estas tres rutas convergen en la activación y escisión de C3, lo cual conduce a la activación de la ruta del complemento terminal, es decir, C5 activado (C5b) se asocia con C6, C7, C8 y C9, que conforman el MAC cuya creación estimula opsonización, reclutamiento y activación de fagocitos, la lisis de las células infectadas o patógenos y eliminación de los inmunocomplejos 145,147.

Figura 6. Sistema del complemento. Vías de activación y proteínas



Adaptado de Tegla et al., (2011) ¹⁴⁸

Respecto a la susceptibilidad a las infecciones el sistema de complemento es determinante por su papel en la defensa contra estas, por ello cuando existen deficiencias primarias o secundarias del sistema del complemento hay predisposición

tanto a infecciones como a enfermedades autoinmunes (Tabla 5). Por su lado, las deficiencias primarias son desórdenes raros que predisponen tanto a infecciones como a enfermedades autoinmunes y las deficiencias secundarias son un sello característico de enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico y las vasculitis ¹⁴⁹.

Tabla 5. Genes, deficiencias del complemento, base genética y su asociación con infecciones

Gen	Locus	Enfermedad	Base genética	OMIM.
<i>C1Q</i>	1p36	Infecciones recurrentes	SNP	61352
<i>C1R/C1S</i>	12p13	Infecciones recurrentes	SNP	21695 0
<i>C4 (C4A, C4B)</i>	6p21	Infecciones recurrentes	Indels	61438 0
<i>C2</i>	6p21	Infecciones (neumonía) – <i>Neisseria</i>	SNP, delección parcial del gen	21700 0
<i>C3</i>	19p13	Infecciones pirogénicas severas	SNP, delección parcial del gen	61377 9
<i>C5</i>	9q33-34	Meningitis (<i>Neisseria</i>)	SNP	60953 6
<i>C6</i>	5p13	Meningitis (<i>Neisseria</i>)	SNP	61244 6
<i>C7</i>	5p13	Meningitis (<i>Neisseria</i>)	SNP, delección parcial del gen	61010 2

Gen	Locus	Enfermedad	Base genética	OMIM.
C8	α/β : 1p32 γ : 9q34	Meningitis (<i>Neisseria</i>)	SNP	61379
				0
				61378
	9			
C9	5p14- p12	Infecciones por <i>Neisseria</i>	SNP	61382
				5
CFD (Factor D)	19p13	Infecciones por <i>Neisseria</i>	-	13435
				0
CFP (Properdina)	Xp11.3- p11.23	<i>N. meningitidis</i> , infecciones fulminantes sepsis meningococci ca	SNP y polimorfismos genéticos	31206
				0
MBL2	10q11. 2-q21	Infecciones recurrentes en niños	SNP y polimorfismos genéticos	61437
				2
CD46	1q32	Síndrome hemolítico urémico atípico (SHUa)	-	12092
				0

Adaptado de Mayilyan K (2012) y J. Schröder-Braunstein and M. Kirschfink (2019) ^{150,151}

De otra parte, el estudio del componente C4 del complemento es importante debido a que es una molécula clave en el sistema del complemento, es considerado como uno de los componentes primordiales de la inmunidad innata para el reconocimiento y la eliminación inmediatos de microorganismos invasores, juega un papel relevante en la activación de las vías clásica y de la lectina y, además, en la formación de la convertasa C3, lo que conduce

a la generación del MAC contra los microbios. Uno de los productos de escisión de C4 es C4b, molécula que hace parte de la enzima C4b2a, responsable de la activación de C3 y C5 a C9 por la vía clásica, una vez más demostrando el papel que cumple en las actividades biológicas de los componentes mencionados ¹⁵².

La proteína C4 es la más polimórfica del sistema del complemento. De hecho, diversas investigaciones han demostrado que la deficiencia de esta proteína en los individuos conduce a que sean más propensos a infecciones microbianas y trastornos autoinmunes ¹⁴⁶, como se detallará mas adelante.

En conclusión, C4 es considerado un factor esencial durante la respuesta inmune innata, cumple una función en la activación del sistema del complemento por la vía clásica y la vía de las lectinas, específicamente como una subunidad de las convertasas C3 y C5 ^{153,154}.

Dentro de la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase III se encuentra localizado el gen que codifica este componente, en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.33), posee 41 exones y codifica para una proteína de 5.4kb. Este gen tiene dos parálogos *C4A* y *C4B*, que comparten el 99% de identidad de secuencia, cada uno con polimorfismos en si mismos. En particular, los dos genes difieren en 5 nucleótidos que cambian en el exón 26 y que originan las proteínas C4A y C4B que son funcionalmente diferentes (cambio de secuencia de aminoácidos de PCPVLD para C4A a LSPVIH para C4B) ¹⁵³⁻¹⁵⁵. Las sustituciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de las

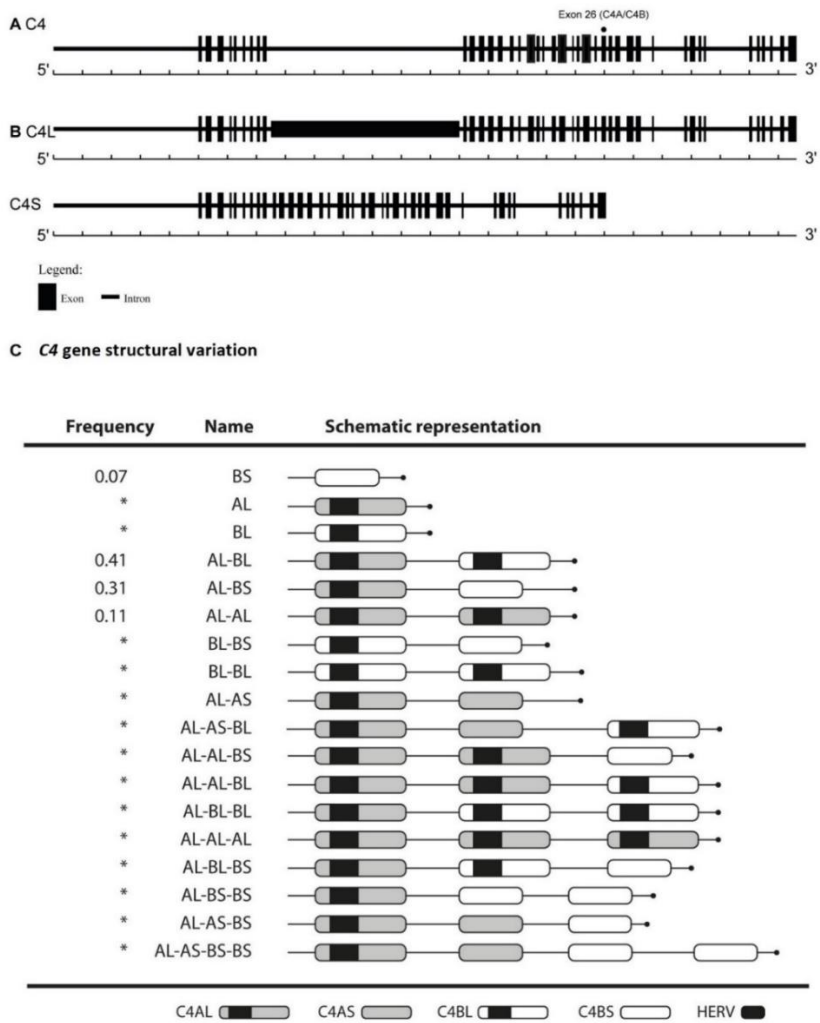
proteínas C4A y C4B conducen a cambios en su función, es decir, para C4A se aumenta su vida media y la afinidad por los grupos amino, lo que posiblemente le permite actuar eliminando los complejos inmunes. Por su parte, para C4B se reduce su vida media y aumenta la afinidad por los grupos hidroxilo, lo que le permite participar en la formación del complejo de ataque de membrana y hacer parte de la línea de defensa contra bacterias patógenas ¹⁵³.

El estudio de estos genes ha identificado diversos polimorfismos, deleciones, duplicaciones, alelos nulos entre la población general. El 35% de la población no expresa el producto génico C4A o C4B. A su vez los genes nulos se encuentran en varios haplotipos, los cuales están asociados con diferentes enfermedades o trastornos como diabetes mellitus, progresión rápida de la infección por VIH, lupus eritematoso sistémico entre otros ¹⁵⁶. De otra parte la producción desbalanceada de estas dos proteínas también está asociada con varias enfermedades como lupus eritematoso sistémico, enfermedades autoinmunes y susceptibilidad a enfermedades infecciosas ¹⁵³⁻¹⁵⁵.

El locus del complemento *C4* exhibe un patrón complejo inusual de diversidad genética, donde los SNP no sinónimos afectan la estructura de la proteína y los polimorfismos de inserción-delección causan cambios en el marco de lectura y codones de parada prematuros. Además, los genes *C4* divergen también en términos de tamaño genético, dado que el 76% albergan un inserto de retrovirus endógeno HERV-K (6364 pb) integrado en el noveno intrón, dando lugar al gen *C4* largo (*C4L*). El 24% restante de los

genes *C4* no tienen este retrovirus y se conocen como genes *C4* cortos (*C4S*) (Figura 7).

Figura 7. Variación estructural del gen *C4*.



(A) Las isoformas C4A y C4B difieren en cuatro aminoácidos en las posiciones 1101-1106 debido a polimorfismos de cinco nucleótidos (exón 26).

(B) La presencia o ausencia de retrovirus endógeno humano — 6.34 kb (HERV) en el intrón 9, da como resultado el gen C4L o C4S largo o C4 corto, respectivamente.

(C) Variación estructural del gen C4. AS haplotipo que lleva sólo la isoforma corta C4A; Haplotipo BS que lleva solo la isoforma corta C4B; Haplotipo AL que lleva solo la isoforma larga C4A; Haplotipo BL que lleva solo la isoforma larga C4B. En la figura, se presentan todos los diferentes haplotipos.

Los marcados con un asterisco (*) son los menos comunes en una población de ascendencia europea.

Tomado de Jaimes-Bernal et al., 2020 ¹⁶¹

También tiene variaciones en el número de copias, es decir CNV, que oscilan de 2 a 8 entre los diferentes individuos, correspondientes a la suma de los genes *C4A* y *C4B*. El gen *C4A* varía en número de copias de cero a cinco y el gen *C4B* de cero a cuatro. La dosis total más alta del gen *C4* reportada es 7 ¹⁵⁷. En la población Caucásica, el 55% de los individuos poseen dos locus para cada uno de los genes, es decir para *C4A* y para *C4B* y el 45% restante tiene un número diferente de copias ¹⁵⁸.

La presencia de alelos nulos de *C4*, *C4A*Q0* y *C4B*Q0*, se infirió a partir de la ausencia de proteínas C4A o C4B en suero o plasma, respectivamente. Hasta la fecha, se sabe que la ausencia y los niveles desiguales de proteína en suero / plasma de C4A y C4B pueden ser causados por la ausencia física o mutaciones sin sentido del gen correspondiente, el número desigual de genes *C4A* y *C4B* en un genoma diploide, y los niveles de expresión de proteínas diferenciales por los genes *C4* largos y cortos ¹⁵⁸.

De otra parte, el gen *C4* junto con sus genes flanqueantes conforman el módulo RCCX del complejo mayor de histocompatibilidad, que toma su nombre por los genes que lo

componen: *RP1* (conocido como STK19) que codifica para una proteína kinasa serina/treonina, *C4* (complemento C4), *CYP21A2* (citocromo P450 esteroide 21-hidroxilasa) y *TNX* (proteína de matrix extracelular) ¹⁵³.

También se presentan duplicaciones en los genes adyacentes, es decir en el módulo RCCX, dando origen a estructuras monomodulares, bimodulares y trimodulares ^{154,159,160}.

Por último, una matriz compleja de CNV en los genes *C4A* y *C4B* en la región como resultado de deleciones (alelos nulos), duplicaciones y triplicaciones, entre otras, da lugar a al menos 22 haplotipos que incluyen una gama diversa de estructuras genómicas.

Por lo referido, la proteína C4 es considerada una de las más polimórficas del sistema del complemento, sus concentraciones varían entre 100 a ~1000 µg/ml, diferencias que están relacionadas con las variantes en la dosis y tamaño de los genes ^{154,159}, así como SNP e INDELS que producen polimorfismos de cambios no sinónimos de aminoácidos como cambios en la pauta de lectura y codones de parada prematuros.

Frecuencias del CNV del gen C4

El número de copias del gen *C4* puede variar de 1 a 3 por haplotipo o de 2 a 6 por genoma diploide. La variación en el número de copias conduce a diferentes rangos de concentraciones de la proteína C4 en plasma.

Diversos estudios realizados han permitido conocer las frecuencias de los genes *C4A* y *C4B* en poblaciones de diferentes regiones como se observa en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Frecuencias del número de copias del gen *C4A* en diferentes poblaciones

Región/ País	Población (n)	CNV <i>C4A</i>						
		0	1	2	3	4	5	6
Reino unido ¹⁵³	719	1	21	52	20	6		
Finlandia ¹⁶²	1618	1	18	51	29	1		
Holanda ¹⁶³	104	6	16	51	23	4		
España ¹⁵³	449	1	12	59	24	4	0.7	0.2
CEU	180	2	16	54	26	2	0.6	
Hungría ¹⁵⁵	118	2	15	55	25	3		
China – grupo étnico Han ¹⁶⁴	1007	0.4	7	70	19	3	1	0.3
China - ¹⁶⁵	1234	0.4	9	64	22	3	-	2
Brasil ¹⁶⁶	301	0.3	6	69	19	3	2	0.3
Caucásicos ¹⁶⁷	1109	1.4	16	55	21	6	0.5	
Estados Unidos ¹⁶⁸	513	1.0	17	56	22	3	0.4	
Bélgica ¹⁶⁹	1000	1.0	13	58	25	2		
Alemania ¹⁵⁸	923	1.1	18	56	22	2	0.1	

A continuación, se presentan los datos de frecuencias del número de copias del gen *C4B* obtenidas en diversos análisis.

Tabla 7. Frecuencias del número de copias del gen *C4B* en diferentes poblaciones

Región/ País	Población (n)	CNV <i>C4B</i>					
		0	1	2	3	4	5
Reino unido ¹⁵³	719	4	26	57	13	0.6	
Finlandia ¹⁶²	1618	7	38	54	1.4	0.1	
Holanda ¹⁶³	104	4	29	60	7	0	

España ¹⁵³	449	3	26	51	14	5	0.2
CEU	180	2	26	67	4.4		
Hungría ¹⁵⁵	118	0.8	20	64	15		
China – grupo étnico Han ¹⁶⁴	1007	1.6	19	66	12	1	0.01
China ¹⁶⁵	1234	1.2	17	65	12	3	0.2
Brasil ¹⁶⁶	301	1.7	19	66	12	1	1
Caucásicos ¹⁶⁷	1109	2	27	63	7	0.4	
Estados Unidos ¹⁶⁸	513	3	27	63	7	0.2	
Bélgica ¹⁶⁹	1000	3	25	67	6		
Alemania ¹⁵⁸	920	2	23	70	4	0.2	

En las poblaciones de americanos de origen europeo sanos analizadas se ha observado que el 60.8% de los individuos poseen 4 copias de los genes *C4*, 27.2% tienen menos de 4 copias y 12% tienen más de 4 copias ¹⁷⁰.

En algunos de los estudios referidos previamente también se realizó la cuantificación del número de copias de las variantes *C4S* y *C4L*, obteniendo las frecuencias que se presentan en las tablas 8 y 9, respectivamente.

Tabla 8. Frecuencias del número de copias del gen *C4S* en diferentes poblaciones

País/Región	Población (n)	CNV <i>C4S</i>					
		0	1	2	3	4	5
CEU	180	36	47	17	1		
China ¹⁶⁴	514	15	34	40	9	1	0.4
Bélgica ¹⁶⁹	1000	36	42	19	2		
Alemania ¹⁵⁸	929	34	47	17	1	0.3	0.1

Tabla 9. Frecuencias del número de copias del gen *C4L* en diferentes poblaciones

País/ Región	Población (n)	CNV <i>C4L</i>							
		0	1	2	3	4	5	6	7
CEU	180		5	20	40	32	3		
China ¹⁶⁴	514	0.2	5	45	32	17	1.5		
Bélgica ¹⁶⁹	1000	1	6	21	37	32	2		
Alemania ¹⁵⁸	899	1	8	23	36	30	1.4	0.1	

Alteraciones en el CNV de C4 y su asociación con enfermedades

Estudios recientes han demostrado que la presencia de CNV en el genoma humano es sustancial y se han identificado miles de estas en poblaciones humanas. Las mutaciones de CNV pueden introducir una inestabilidad genómica sin precedentes tanto en la línea germinal como en las células somáticas, lo que conduciría a enfermedades mendelianas y rasgos complejos, incluidos cánceres. La investigación de la tasa de mutación de la CNV es, por lo tanto, fundamental para desentrañar la inestabilidad del genoma humano y, a su vez, el impacto funcional de las CNV subyacentes a las características y enfermedades humanas ¹⁷¹.

Deficiencia o aumento en el número de copias de los genes *C4A* y *C4B* han sido reportadas como asociadas al riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, entre ellas de tipo autoinmune e infecciosas. En la tabla 10 se presentan algunos de los estudios relacionados con las diferentes alteraciones en *C4A* y *C4B*.

Tabla 10. Mutaciones en el gen *C4* y su asociación con diversas enfermedades y condiciones

Autor y año	Población	Enfermedad	Genotipo asociado
Chapek et al., 1987 ¹⁷²	Un individuo de 28 años de edad (Londres)	Enfermedad meningocócica	Deficiencia combinada de <i>C7</i> y <i>C4B</i>
Cameron et al., 1988 ¹⁷³	26 pacientes VIH positivos 72 individuos homosexuales VIH negativos 185 controles Australia	Infección por VIH	<i>C4B*Q0</i> , es decir alelos nulos para <i>C4B</i> incrementan la linfadenopatía generalizada persistente en infección por VIH
Rowe et al., 1989 ¹⁷⁴	46 individuos: 33 proveniente del Hospital Johns Hopkins (Baltimore) y 13 del hospital de niños LeBonheur (Memphis)	Meningitis bacteriana	Deficiencia homocigótica de <i>C4B</i> podría estar asociada con una mayor susceptibilidad a la infección
Bishop et al., 1990 ¹⁷⁵	50 niños con bacteremia causada por <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , o <i>Neisseria meningitidis</i> Grupo control: plasma de 200 niños con cultivos negativos	Bacteremia con microorganismos encapsulados	Deficiencia de <i>C4B</i>

Autor y año	Población	Enfermedad	Genotipo asociado
	para estos tres microorganismos		
Yang et al., 2007 ¹⁶⁸	1241 europeos americanos: pacientes con LES, parientes en primer grado e individuos sanos	Lupus Eritematoso Sistémico	Alto número de copias de <i>C4</i> es un factor protector y bajo número de copias es un factor de riesgo
Liu et al., 2011 ¹⁷⁶	624 pacientes con Enfermedad de Graves y 160 individuos sanos Hospital de la Universidad Médica de China en Taiwán	Enfermedad de Graves	<4 copias del gen <i>C4</i> se relacionan con la prevención de la Enfermedad de Graves
Boteva et al., 2012 ¹⁵³	2.207 sujetos de ascendencia del norte y sur de Europa (Reino Unido y España): 1.028 casos de LES 1.179 controles	Lupus Eritematoso Sistémico	Deficiencia completa (homocigosis) de <i>C4</i>
Lv et al., 2012 ¹⁶⁴	924 pacientes con LES y 1007 controles de China	Lupus Eritematoso Sistémico	Alto número de copias de <i>C4</i> es un factor protector y bajo número de copias es un factor de riesgo
Flachsbart et al., 2014 ¹⁵⁸	700 casos (94-110 años) 900 controles (19 – 75 años) Alemania	Longevidad	No se observaron diferencias significativas en el número de <i>C4A</i> , <i>C4B</i> y <i>C4S</i> . Además, el estado de

Autor y año	Población	Enfermedad	Genotipo asociado
Cleyne et al., 2016 ¹⁶⁹	770 pacientes con Enfermedad de Crohn no relacionados 345 individuos de control sanos Todos de origen europeo	Enfermedad de Crohn	portador de <i>C4B</i> * Q0 no disminuyó con la edad. Sin embargo, para <i>C4L</i> *Q0 se observó una frecuencia de portadores significativamente diferente en los casos en comparación con los controles Número bajo de copias de <i>C4L</i> o un número alto de copias de <i>C4S</i> , podrían conducir a una respuesta exagerada contra las infecciones, y en consecuencia a una enfermedad (auto) inmunitaria.
Nissilä et al., 2017 ¹⁷⁷	64 pacientes	Enfermedad inflamatoria intestinal pediátrica	Número de genes <i>C4B</i> se asocia positivamente con la inflamación en pacientes con PIBD
Liesmaa et al., 2018 ¹⁷⁸	32 pacientes sin <i>C4A</i> funcional, 87 pacientes sin <i>C4B</i> , 120 con una cantidad normal de genes <i>C4</i> del Hospital Universitario de Helsinki	Linfoma, enfermedad celíaca y Sarcoidosis	Deficiencia homocigota de <i>C4A</i>

1.2.2.7 Receptores de células natural Killer

Las células Natural Killer (NK) constituyen un componente del sistema inmune innato del huésped, las cuales ejercen una labor fundamental en la vigilancia de las infecciones causadas por virus, además de ser reguladoras de la respuesta inmune antiviral, a través de la secreción de citoquinas y quimiocinas. En cuanto a los genes responsables de codificar los receptores de las células NK se dividen en dos grupos:

- Receptores de unión a MHC
 - o Familia *KIR* (CD158). Hasta el momento se han descrito 14 genes *KIR* y 2 pseudogenes, los cuales muestran un polimorfismo alélico amplio. Ubicados en el cromosoma 19q13.4.
 - o Familia de receptores *NKG2/CD94*. Los genes de estos receptores se encuentran en el cromosoma 12p12.3 – p13.2 en una región llamada complejo de genes *NK* (NGC).
 - o Familia *ILT* (CD85). Compuesta por 13 miembros. Los genes *ILT* están presentes en el cromosoma 19 cerca del grupo de genes *KIR*.
 - o *CD160* (BY55) ¹⁷⁹.
- Receptores que no se unen a MHC
 - o Receptor *NKG2D* (*KLR - K1; CD314*)
 - o Receptores de citotoxicidad natural (*NCR*)
 - o *NKR - P1* (*CD161; KLR - B1*)
 - o Receptores relacionados con *SLAM* (*SRR*)

- *KLR - G1* o antígeno asociado a la función de los mastocitos ¹⁷⁹

En el grupo de genes *KIR* (receptores humanos tipo inmunoglobulina asesina) se encuentra el de tres dominios, *KIR3DL1*. Los alotipos *KIR3DL1* altamente expresados se unen a los alotipos HLA - Bw4 - I con alta afinidad, y su herencia en conjunto brinda mayor protección contra el SIDA en las personas infectadas por el VIH ¹⁷⁹.

Después de analizar 25 estudios relacionados con el papel de los genes *KIR* y el control/susceptibilidad al VIH-1 se determinó que la presencia de *KIR2DS4* puede asociarse con un riesgo elevado de infección por VIH-1, mientras que *KIR3DS1* puede asociarse con un riesgo reducido, confiriendo un efecto protector de la infección por VIH-1 entre parejas serodiscordantes ¹⁸⁰. Adicionalmente mostró resultados contradictorios entre las diferentes poblaciones analizadas.

1.2.3 Inmunidad adquirida

1.2.3.1 HLA

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) contiene los loci más polimórficos en humanos, los genes *HLA* (del inglés, *Human Leucocyte Antigens*) de clase I y de clase II.

Además de estudiar la relación del gen *HLA-B57* con la progresión de VIH a SIDA, también se han realizado estudios que miden el impacto que puede tener sobre la replicación del virus al momento de la infección aguda. En 2003 Altfeld et al., encontraron que existe una asociación estadísticamente

significativa entre la expresión del alelo B57 del HLA de clase I y la ausencia de enfermedad sintomática a causa de la infección por VIH-1 ¹⁸¹.

1.3 Principales tecnologías de genotipado

1.3.1 Técnicas empleadas para la genotipación del CNV del gen C4

Dentro de las metodologías empleadas para la determinación del número de copias del gen *C4* se encuentra la técnica de Southern blot, la cual, aunque ha sido considerada como un estándar de oro para la determinación de CNV en el genoma, requiere de ADN en altas concentraciones (10-15 µg por muestra), de buena calidad y consumen mucho más tiempo que otras técnicas (3 a 10 días por lote). También se han reportado otras estrategias que emplean la amplificación por PCR a partir de ADN genómico, en las cuales es posible que ocurra una amplificación desigual de las secuencias de prueba y de referencia que pueda conducir a errores en la determinación del número de copias.

Uno de los métodos desarrollados para determinar el número de copias fue un ensayo que emplea principios basados en la prueba de relación de parálogos (PRT) y la determinación de la relación de variantes de digestión con enzimas de restricción (REDVR), previamente empleada para evaluar el número de copias del gen *FCGR3A* (receptor IIIa del fragmento Fc de la IgG), *FCGR3B* (receptor IIIb del fragmento Fc de la IgG) y el locus beta-defensina ¹⁵³.

En la tabla 11 se resumen algunos de las técnicas desarrolladas y empleadas para la determinación del CNV en el gen *C4*.

Tabla 11. Técnicas empleadas para la genotipificación del CNV del gen *C4*

Autor y año	Técnica empleada
Lee et al., 2008 ¹⁸²	Revisión de técnicas empleadas: RFLP, Southern blot, qPCR, pirosecuenciación, MLPA
Fernando et al., 2010 ¹⁸³	Prueba de relación de parálogos en asociación con dos digestiones con enzimas de restricción (REDVRs)
Paakkanen et al., 2012 ¹⁶²	PCR en tiempo real con SYBR®Green
Flachsbart et al., 2014 ¹⁵⁸	PCR en tiempo real basada en sondas de hidrólisis – TaqMan
Pereira et al., 2016 ¹⁸⁴	PCR en tiempo real usando sondas Taqman, gen normalizador RNase P. Método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Grassmann et al., 2016 ¹⁶⁷	Amplificación de sondas dependiente de <i>C4A</i> y <i>C4B</i>

1.3.2 PCR en Tiempo Real (qPCR)

La PCR en tiempo real es una de las técnicas más empleadas para la cuantificación de ADN, dado que es posible medir la acumulación de producto de PCR durante la reacción, lo que hace que sea una herramienta útil para los análisis de expresión génica y para la determinación de dosis de genes. Los resultados pueden ser expresados de acuerdo al ciclo umbral (C_T), que corresponden

al ciclo en el cual la fluorescencia medida alcanza un umbral determinado, es decir el inicio de la fase exponencial de la amplificación, lo que hace que este valor sea proporcional al número de copias del ADN molde. Para la detección de los productos se puede emplear agentes intercalantes de unión no específicos al ADN de doble cadena (SYBR Green o Eva Green) o secuencias de oligonucleótidos marcados con dos fluoróforos, denominadas sondas Taqman ¹⁵⁵. De otra parte, la implementación de estos agentes intercalantes permitió el desarrollo del análisis de fusión posterior a la PCR en tiempo real, que se introdujo originalmente para determinar la especificidad de la PCR ¹⁸⁵.

El SYBR® Green es un agente intercalante que emite una fluorescencia que es fuerte al excitarse cuando se une al ADN de doble cadena, por lo que la concentración de ADN es proporcional a la fluorescencia, siendo más económico que el análisis con sondas Taqman. Sin embargo, resulta sensible tanto a la calidad como a la concentración de ADN, por lo que es necesario asegurar estos dos parámetros. Así mismo, para eliminar los errores de pipeteo se deben trabajar las muestras y controles por duplicado. De otro lado, es recomendable analizar cada muestra por separado en contraste con los controles, descartar las diluciones de ADN de 5ng/ul cada dos semanas dado que son más sensibles a la degradación y elaborar diluciones de 10ng/ul.

1.3.2.1 PCR en tiempo real con análisis de fusión de alta resolución (HRM)

Esta variante de la PCR en tiempo real permite que se realice la qPCR y luego se someta al análisis de fusión de alta resolución sin añadir un paso de intervención por el investigador. Por otra parte, posterior a que finalice la prueba se puede descartar los productos de PCR sin necesidad de abrir los tubos o la placa y de realizar análisis posteriores. Dentro de las ventajas de emplear esta técnica es que permite realizar la amplificación en un solo tubo del gen de interés y el gen de referencia a partir de una única muestra de ADN, eliminando la variación entre tubos y a través del HRM se pueden diferenciar los amplicones por su T_m . Un punto fundamental para la ejecución de la técnica es la selección adecuada de amplicones que deben tener puntos de fusión diferentes que se puedan distinguir con facilidad ¹⁸⁵.

1.3.2.2 GRACE – PCR y HRM

El análisis podría ejecutarse en el mismo tubo en el que se realizó la amplificación, en este caso programando un análisis de fusión posterior a la PCR ¹⁸⁵.

Este ensayo de PCR de enumeración de copias de análisis de proporción genética (GRACE) se desarrolló inicialmente mediante la amplificación simultánea de dianas en los genes de α -globina (*HBA1* y *HBA2*) y el gen de referencia sensible al voltaje del canal de cloruro 7 (*CLCN7*), es decir, una nueva aplicación del análisis de fusión de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés) permitió la determinación rápida del número de copias del gen de la α -globina ¹⁸⁶.

El ensayo GRACE-PCR detectó un número anormal de copias del gen de la α -globina en 108 de las 167 muestras evaluadas. Se describió como una técnica de tubo cerrado; en consecuencia, el riesgo de contaminación por amplicones es insignificante. La amplificación, la detección y el análisis se pueden completar en una hora, lo que lo hace más rápido, económico y simple que otras pruebas existentes y, por lo tanto, es muy adecuado como un primer paso rápido en un flujo de trabajo de laboratorio clínico ¹⁸⁶.

Previo al trabajo presentado por Turner et al., se había descrito una técnica novedosa fundamentada en la coamplificación de un gen diana y un gen de referencia, seguida de un análisis de fusión de alta resolución para determinar deleciones en el gen *APC* (regulador de la vía de señalización WNT, previamente conocido como poliposis coli adenomatosa) ¹⁸⁷, el cual brindó pautas para el desarrollo de la técnica de GRACE-PCR.

Este método se consideró adecuado para el cribado inicial rápido de un gran número de muestras ya que: [1] a diferencia de los métodos basados en Gap-PCR, DHPLC y electroforesis capilar, no requiere un extenso procesamiento posterior a la amplificación de las muestras (es decir, electroforesis o cromatografía); [2] no requiere el uso de un analizador genético basado en electroforesis capilar; [3] el riesgo de contaminación por amplicón es insignificante; y (4) el análisis de datos es muy simple y permite la identificación visual instantánea de cualquier muestra en un lote con números anormales de copias del gen en estudio ¹⁸⁶.

De acuerdo con Torrezan et al., hay dos principios fundamentales para diseñar los cebadores de qPCR dúplex ¹⁸⁷:

1) La longitud total del amplicón (incluidos los cebadores) debe estar entre 90 y 220 bases.

2) Los amplicones para los genes diana y de referencia deben tener un mínimo de 5°C de diferencia entre sus temperaturas de fusión (T_m), de modo que se pueda lograr una clara individualización de los picos de fusión de los genes diana y de referencia.

Estas consideraciones fueron tenidas en cuenta en la optimización del ensayo presentado.

1.4 Estrategias para el descubrimiento de genes implicados en resistencia a enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas representan la mayoría de la morbilidad y mortalidad en las poblaciones humanas a lo largo de la historia ¹⁸⁸; no obstante, no son en general consideradas como enfermedades genéticas. Sin embargo, existe un componente genético, teniendo en cuenta las variaciones en el genoma humano, que pueden conducir a cambios en la resistencia y la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. Podría decirse, que las enfermedades más comunes son rasgos genéticos complejos, con múltiples componentes hereditarios y ambientales que contribuyen a la susceptibilidad. Por su parte, es importante resaltar, que variantes particulares en el ADN se mantienen en una población humana debido a la presión evolutiva de este grupo de enfermedades y se han descrito algunos polimorfismos

asociados con la susceptibilidad a la infección, muchos de estos aportes generados por estudios realizados en gemelos, apoyados con la epidemiología genética ¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Existen reportes de individuos que, aunque están expuestos a un agente patógeno no desarrollan la enfermedad clínica, lo cual genera muchos interrogantes, entre estos, el papel de la genética en las enfermedades infecciosas y la predisposición a estas, que puede ir desde una herencia monogénica a una poligénica ¹⁹². En la tabla 12 se presentan algunas de las enfermedades monogénicas de las cuales se conoce su asociación con la resistencia a determinadas enfermedades infecciosas. En cuanto a esta asociación, al parecer resulta de presiones de selección en regiones geográficas en las cuales el agente etiológico responsable de la enfermedad es endémico, aunque otros son considerados fortuitos ¹⁹³.

Es así como, cambios en un solo nucleótido, que conducen a patologías, como la anemia de células falciforme están asociados con la protección al *Plasmodium falciparum*, específicamente los individuos heterocigotos (genotipo HbAS, rasgo de células falciforme), portadores de la hemoglobina falciforme. Este grupo de individuos mitigan la parasitemia y evitan el paludismo grave ¹⁹⁴.

Tabla 12. Enfermedades monogénicas que inducen resistencia a enfermedades infecciosas

Enfermedad genética	Gen	Patógenos	Ref
Anemia de células falciforme	<i>HBB</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	195
Anemia hemolítica	<i>G6PD</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	196
Talasemia	<i>HBB, HBA</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	197
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	198
Enfermedad de Tay-Sachs	<i>Hexosaminidasa A</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	199
Hemocromatosis	<i>HFE</i>	<i>Chlamydia, Coxiella, Francisella, Legionella, Mycobacterium, Salmonella, Yersinia</i>	200
Hipercolesterolemia	<i>LDLR</i>	<i>Flavivirus, Filovirus</i>	201
Enfermedad de Niemann-Pick C1	<i>NPC1</i>	Virus del Ébola y Marburg	202

Por su parte, Klebanov destaca cinco asociaciones genéticas con susceptibilidad a enfermedades infecciosas, descubiertas y validadas en diferentes investigaciones, a saber: variantes en el gen del receptor del antígeno Duffy (*DARC*, también conocido como *ACKR1*) como factor de protección ante la infección por *Plasmodium vivax*, las mutaciones homocigotas en la proteína PRiON (PRNP) y la predisposición a la enfermedad Creutzfeldt-²⁰³Jakob, el gen *SLC4A1* (Solute carrier family 4 member 1 (grupo

sanguíneo Diego)) como factor de protección para *Plasmodium falciparum*, la delección de 32 pares de bases en el gen *CCR5* como factor de protección ante la infección por VIH-1 y finalmente variantes en el gen *FUT2* (Fucosyltransferasa) que conducen a un fenotipo no secretor impiden la infección por la cepa de norovirus GII.4 g ²⁰⁴. Adicionalmente Chapman y Hill, reportan asociaciones entre enfermedades infecciosas y algunos polimorfismos genéticos, entre ellas hacen referencia a la eliminación espontánea del VHC y el SNP *rs8099917* localizado en el gen *IL28B*; también presenta algunos SNP relacionados con la susceptibilidad a *Mycobacterium leprae*: *rs3764147* (gen *LACC1*), *rs9302752* (gen *NOD2*), *rs3088362* (gen *CCDC122*), *rs602875* (gen *HLA-DR-DQ*), *rs6478108* (gen *TNFSF15*), *rs42490* (gen *RIPK2*) ²⁰⁵ (Ver información complementaria en tabla 13).

Tabla 13. SNPs asociados con incremento a la susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas específicas

Patógeno	Fenotipo	Posible mecanismo	Gen o genes
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Susceptibilidad a enfermedad invasiva	Señalización TLR-IL-1R deteriorada	<i>IRAK4</i> <i>MYD88</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	Susceptibilidad a enfermedad invasiva	Deficiencia en el MAC	<i>C5 – C9</i>
		Deficiencia de properdina	<i>CFP</i>
		Deficiencia de factor D	<i>CFD</i>

<i>Mycobacteria</i>	Susceptibilidad	Respuesta de IFN γ alterada	<i>IFNGR1</i> , <i>IFNGR2</i> , <i>STAT1</i>
		Producción de IFN γ alterada	<i>IL12B</i> , <i>IL12RB1</i> , <i>NEMO</i>
		Explosión respiratoria deteriorada en macrófagos	<i>CYBB</i>
		Diferenciación alterada de subgrupos de células dendríticas	<i>IRF8</i>
<i>HSV-1</i>	Susceptibilidad a encefalitis HSV	Producción alterada de IFN α , IFN β y / o IFN λ	<i>UNC93B1</i> , <i>TLR3</i> , <i>TRAF3</i>
<i>Herpesvirus humano 8</i>	Sarcoma de Kaposi clásico	Deficiencia de células T	<i>STIM1</i>
<i>Papilomaviruses humano</i>	Epidermodisplasia verruciforme	Desconocido	<i>TMC6</i> , <i>TMC8</i>
<i>Candida albicans</i>	Candidiasis mucocutánea crónica	Inmunidad deteriorada a IL-17	<i>CARD9</i> <i>IL17RA</i> <i>IL17F</i> <i>STAT1</i>

Adaptado de Chapman S & Hill A, (2012) ²⁰⁵

Varias de estas asociaciones fueron halladas a través de estudios de asociación alélica, comparando frecuencias de alelos de marcadores a través de estudios de casos y controles ¹⁹⁰. Adicional a los trastornos de un solo gen, existen más de 300 inmunodeficiencias primarias (IDP) reportadas que afectan la

respuesta inmune, así como también muchos loci que interactúan con factores genéticos ambientales (dieta, estilo de vida, entre otros) y del huésped ¹⁹⁰ contribuyendo a la susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas.

En la tabla 14 se presentan algunas inmunodeficiencias primarias. En países desarrollados se observa una prevalencia de inmunodeficiencias primarias de 1 entre 200.000 nacidos vivos. Un estudio reportó que en Francia la incidencia era de 1 entre 400000 nacidos vivos. En Latinoamérica el registro de estas enfermedades se realiza en el LASID (Latinoamerican Society for Immunodeficiency) ²⁰⁶. Una de las IDP más frecuentes en España es el déficit selectivo de IgA, que afecta a una de cada 600 personas ²⁰⁷.

Tabla 14. Inmunodeficiencias primarias, genes y tipo de herencia

Enfermedad	Gen afectado	Locus	OMIM	Tipo de herencia
Inmunodeficiencia Severa combinada con sensibilidad a la radiación ionizante	<i>DCLRE1C</i>	10p13	60245 0	AR
Agamaglobulinemia	<i>BTK</i>	Xq22.1	30075 5	XLR
Síndrome de DiGeorge	<i>TBX1</i>	22q11.21	18840 0	AD
Ataxia telangiectasia	<i>ATM</i>	11q22.3	20890 0	AR

Síndrome de Wiskott-Aldrich	<i>WAS</i>	Xp11.2 3	30100 0	XLR
Síndrome de hiperinmunoglobulinemia IgM	<i>TNFSF5</i>	Xq26.3	30823 0	XLR
Enfermedad granulomatosa crónica	<i>CYBB</i>	Xp21.1- p11.4	30640 0	XLR
Inmunodeficiencia común variable 1	<i>ICOS</i>	2q33.2	60759 4	AR
Inmunodeficiencia común variable 8	<i>LRBA</i>	4q31.3	61470 0	AR
Inmunodeficiencia común variable 12	<i>NFKB1</i>	4q24	61657 6	AD
Deficit selectivo de IgA	<i>TNFRSF1</i> <i>3B</i>	17p11. 2	60952 9	¿?

AD: autosómica dominante, AR: autosómica recesiva, XLR: Ligado a X recesivo.

En 2012 Chen et al., mencionaron como paradigma en la genética evolutiva el equilibrio que existe entre las variantes genéticas que favorecen el control de las infecciones por el huésped, pero que contrariamente aumentan la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes. En su estudio, hallaron que pacientes con Psoriasis tenían variantes genéticas que limitaban la replicación del virus VIH-1: *HLAB*57*, *HLAB*27* y *KIR3DS1+Bw4*. Los genes fueron seleccionados de un estudio del GWAS de psoriasis, en el cual observaron que los SNP más significativos de esta patología eran idénticos a los de individuos controladores del VIH²⁰³.

De otra parte, debido al avance en nuevas tecnologías, desde el mismo proyecto genoma humano, pasando por el proyecto internacional HapMap, el proyecto 1000 genomas, cuyos

resultados han mostrado la diversidad genética, a través de la identificación de alrededor de 15 millones de variantes de ADN comunes, en su mayoría SNPs e INDELS cortas y desde hace varias décadas con los estudios de asociación genética dependientes de hipótesis (estudios de genes candidatos), estudios de GWAS (expediciones de pesca sin hipótesis) y más recientemente con la secuenciación de nueva generación (NGS), que permite la secuenciación del genoma completo o del exoma, se ha dado inicio a una nueva etapa relacionada con la genética de las enfermedades complejas.

Recientemente, un estudio basado en NGS permitió determinar la presencia de variantes genéticas conocidas en al menos el 3,5% de los pacientes con neumonía COVID-19 potencialmente mortal, con un patrón de herencia autosómica dominante (AD) ó recesivo (AR) (deficiencias AR de *IRF7* e *IFNAR1* o AD de *TLR3*, *TICAM1*, *TBK1* e *IRF3*), y también en genes nuevos (AD *UNC93B1*, *IRF7*, *IFNAR1* e *IFNAR2*) en ocho de los 13 loci candidatos participantes en la inducción y amplificación dependientes de *TLR3* e *IRF7* de los IFN de tipo I ¹²⁹. Estos estudios han permitido establecer una asociación entre la genética del hospedador y la carga de enfermedades infecciosas ^{190,204,208-210}.

Fundamentado en lo anterior, en general para la identificación de genes de susceptibilidad a enfermedades infecciosas en humanos se han empleado principalmente tres enfoques: genes candidatos, estudios libres de hipótesis utilizando técnicas ómicas (GWAS, Whole exome/genome sequencing o RNAseq), y estudios de individuos con enfermedades monogénicas raras

subyacentes a su susceptibilidad a una gama de patógenos ²⁰⁵. Las estrategias mencionadas no pueden generar conclusiones por sí solas, se requiere de enfoques multidisciplinarios que evalúen a aquellas poblaciones de individuos que presentan una respuesta inmune diferencial ¹⁵. Una de las principales limitaciones para poder extraer conclusiones de estudios de asociación entre variantes génicas y las enfermedades infecciosas es el tamaño de muestra reducido.

En relación con GWAS, más de 2800 estudios en humanos están incluidos en el catálogo (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>), los cuales han proporcionado información valiosa al permitir identificar asociaciones con loci de respuesta inmune innata y adaptativa, al igual que factores de riesgo inusuales para la susceptibilidad a infecciones ²⁰⁸.

En las últimas décadas se han reportado avances en la determinación de la base molecular de la respuesta inmune innata y adquirida que han conducido a la identificación de numerosos y diversos genes involucrados en este proceso. Los loci del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, también conocido como HLA), han sido calificados como una región candidata para estudios de susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas, mostrando potentes asociaciones con malaria, tuberculosis, lepra, VIH y virus de la hepatitis B, entre otros ^{204,211}.

En la tabla 15 se incluye un resumen de algunas de los estudios de GWAS realizados en torno a VIH-1, tanto de susceptibilidad a la infección como de progresión, carga viral, respuesta al tratamiento etc. En este aspecto, los resultados de los estudios

referidos en el caso de la susceptibilidad para VIH-1 no han encontrado ningún gen asociado.

Tabla 15. Genome-wide association studies sobre la infección por VIH-1

Fecha publicación	Revista	Fenotipo	Nº pacientes/origen	Cohorte	Ref
19/07/2007	Science	Carga viral "set point"	486 europeos	EuroCHA VI	45
01/01/2000	J Infect Dis	Progresión a SIDA	1627 europeos	GRIV	212
15/09/2009	J Infect Dis	SIDA	2134 europeos	GRIV	213
24/12/2009	PLoS Genet	Control de la infección	2362 europeos	EuroCHA VI	214
15/02/2010	J Infect Dis	Progresión a SIDA	156 europeos	MACS	215
25/02/2011	PLoS One	Replicación del VIH-1	191 europeos	Healthy blood donors	216
01/05/2011	J Infect Dis	Progresión a SIDA	755 europeos	GRIV	217
21/07/2011	PLoS One	Progresión a SIDA	404 europeos	ACS	218
10/02/2013	Hum Mol Genet	Resistencia a la infección	1195 europeos	CHAVI014, MHCS	62
25/07/2013	PLoS Pathog	Resistencia a la infección	13.581 europeos	ACTG; ALIVE; ACS; ANRS	219
12/12/2011	PLoS One	Resistencia a la infección	798 africanos subsaharianos	The Partners in	220

Fecha publicación	Revista	Fenotipo	Nº pacientes/ origen	Cohorte	Ref.
17/06/2015	Sci Rep	Carga viral "set point"	538 asiáticos del este	Prevention Chinese Medical University	221
04/11/2010	Science	Control de la infección	1712 europeos; 1233 africanos, 677 hispanos	International HIV Controllers Study, ACTG	222
18/03/2015	PLoS One	Resistencia a la infección	2004 africanos o caribeños, 1132 europeos	UHS	223
13/06/2019	J Infect Dis	Carga viral antes del tratamiento	572 africanos, 1398 europeos, 418 hispanos	START	224

Adaptado de Gingras et al., (2020) ²²⁵

Uno de los principales problemas de los estudios de GWAS es que existen regiones genómicas que no están representadas, especialmente aquellas que tienen variaciones de número de copias o estructurales (*CR1*, Inmunoglobulinas, *KIR*, etc.).

Dentro de las variantes genéticas estructurales que modulan las enfermedades humanas, se encuentran las CNV que constituyen una fracción sustancial de la variabilidad genética total. Las CNV al ser más grandes que los SNPs, hasta miles de bases, pueden estar inmersas en secuencias de ADN funcionales o reguladoras, alterando

así la función de los genes, a pesar de estar ubicadas a una distancia considerable del gen afectado. También pueden originar una duplicación, triplicación, etc de regiones genómicas completas que incluyen uno o más genes; ocasionando genotipos con una mayor (o menor) dosis génica con las previsible consecuencias funcionales que esto puede tener. Adicionalmente existen variaciones estructurales intragénicas, dando lugar a proteínas con diferente número de módulos funcionales. Debido a los estudios realizados empleando al menos dos poblaciones independientes, se ha podido determinar la existencia de asociaciones entre CNV y enfermedades complejas como VIH/SIDA, artritis reumatoidea, enfermedad sistémica autoinmune, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Crohn, psoriasis, asma entre otras. Estos estudios también han demostrado que los loci que presentan CNV pueden exhibir pleiotropía genética dependiente del número de copias, es decir, la ganancia o pérdida están asociadas a diferentes fenotipos ²²⁶.

En general, tras los diferentes hallazgos se ha podido evidenciar que existe relación entre los factores genéticos del patógeno y los del huésped que influyen en aspectos como la variabilidad de las tasas de infección, respuestas inmunitarias, susceptibilidad a la infección, progresión y gravedad de la enfermedad y respuesta a intervenciones terapéuticas. Por lo tanto, la investigación en la era posgenómica ha ayudado a mejorar la comprensión de la patogénesis de las enfermedades infecciosas y la respuesta inmune y a futuro se convertirán en una guía para el desarrollo de vacunas y estrategias de tratamiento ²²⁷.

2 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

2.1 Hipótesis global

La resistencia genética al VIH-1 en individuos con genotipo silvestre para *CCR5* podría estar determinada por alteraciones en la expresión y función de genes de inmunidad innata, incluido el complemento y sus receptores.

Objetivos

2.2 Objetivo general

Determinar si mutaciones en otros genes que induzcan un déficit de su función influyen en la tasa de infección por VIH en cohortes de expuestos no infectados por vía sexual y parenteral.

2.3 Objetivos específicos

1. Establecer la asociación entre el polimorfismo funcional de *IFNL4* y la infección por VIH-1 de transmisión sexual en poblaciones bien caracterizadas de individuos HESN, donantes sanos e individuos infectados por VIH-1 de España e Italia.
2. Desarrollar una nueva herramienta para la detección del número de copias de *C4A* y *C4B*, así como la detección del

retrovirus endógeno HERV-K del exón 9 de C4, con el fin de utilizar esta técnica para determinar el papel de estas variaciones en la resistencia innata a la infección por VIH.

3. Cuantificar el número de copias del gen C4A en la población del ensayo clínico VAXGEN.

3 Materiales y Métodos

Materiales y métodos

3.1 Diseño del estudio

Para dar cumplimiento a los dos objetivos específicos se emplearon los siguientes diseños de estudio:

- Estudio de asociación genética utilizando el diseño de casos-controles no relacionados para riesgo de infección incluyendo cohortes de transmisión parenteral y sexual.
- Estudio experimental

3.2 Aspectos éticos

Este estudio fue trazado y ejecutado conforme con los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional de los hospitales participantes y la Universidad de Jaén.

Los centros y hospitales participantes fueron: Complejo Hospitalario de Jaén (Jaén), Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba), Centro Sanitario Sandoval (Madrid) y Hospital S. Maria Annunziata (Florencia).

Todos los pacientes, donantes de sangre sanos, cohorte VAXGEN proporcionaron su consentimiento informado por escrito para participar en este estudio.

3.3 Poblaciones de estudio

3.3.1 Muestras empleadas para el genotipado de IFNL4

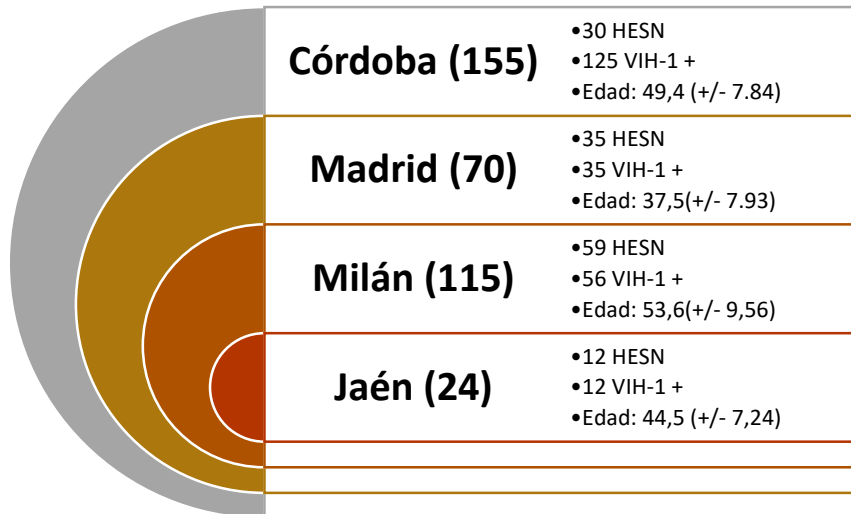
Para el desarrollo del primer objetivo se incluyeron 364 personas expuestas al VIH-1 por vía sexual, tanto del sur de España

(Córdoba y Jaén), centro de España (Madrid) y de Italia (Milán): 228 VIH-1 seropositivos y 136 HESN. Este último grupo incluye parejas discordantes, que mantuvieron relaciones sexuales rutinarias sin protección, así como hombres que tienen sexo con hombres.

Las muestras de los individuos provienen de los siguientes hospitales (Figura 8):

1. Hospital Reina Sofía (Cohorte de Córdoba)
2. Hospital S.M. Annunziata, Milán, Italia
3. Centro Sanitario Sandoval (Madrid)
4. Hospital de Jaén (Centro de infecciosas)

Figura 8. Cohortes de individuos HESN empleadas en el estudio.



Fueron excluidos los individuos homocigotos para la mutación *CCR5Δ32*, considerando que corresponde a un fenotipo de resistencia a la infección por VIH-1.

3.3.1.1 Cohorte de parejas serodiscordantes de Italia

Incluida en este estudio como cohorte de validación. Esta población se encuentra conformada por hombres y mujeres de nacionalidad italiana y de origen europeo (n=115), las cuales tenían las siguientes características:

- Haber mantenido más de 4 relaciones sexuales sin protección
- Un promedio de 30 contactos sexuales no protegidos al año (rango, 18 a >100).

De otra parte, esta cohorte conformada por parejas heterosexuales serodiscordantes ha sido objeto de seguimiento desde el año 1997. La procedencia de estas muestras de ADN fue el Hospital S.M. Annunziata, Florencia, Italia ².

3.3.1.2 Cohorte de usuarios de drogas por vía parenteral de España

Se emplearon los datos de un estudio previo de la cohorte conformada por individuos usuarios de drogas (UDI) infectados por VHC y además VIH-1 positivos, sin relación de parentesco, de origen español y solo está conformada por individuos de sexo masculino: 213 europeos seropositivos expuestos al VIH-1 por el uso de drogas intravenosas, que habían compartido agujas durante más de 3 meses y 188 individuos HESN ⁹⁵.

El estudio se validó empleando ADN de 80 donantes de sangre sanos anónimos provenientes del Banco de Transfusión de Sangre, Tejidos y Células de Jaén (España).

3.3.2 **Muestras empleadas para el análisis de CNV de los genes C4**

Para el desarrollo del objetivo 2 se emplearon 72 muestras de ADN provenientes de donantes de sangre sanos anónimos Banco de Transfusión de Sangre, Tejidos y Células de Jaén (España).

Adicionalmente, se utilizaron ocho muestras de ADN genómico de genotipo *C4* conocido, provenientes de muestras del Banco de ADN del Grupo de Trabajo de Histocompatibilidad Internacional (IHWG). Las muestras se seleccionaron para representar todas las posibles variaciones del número de copias (CNV) de *C4* de 0 a 6 copias y diferentes haplotipos (Tabla 16).

Tabla 16. Líneas celulares humanas seleccionadas con CNV *C4* conocidas

Línea celular	C4A	C4B	C4L	C4S	Haplotipos
COX	0	2	0	2	BS
WT51	4	0	4	0	AL-AL
MADURA	2	2	0	4	AS-AB
CB6B	4	4	6	2	AL-AL-BL-BS
WT8	1	2	3	0	AL-BL-BL
DAUDI	2	1	2	1	AL-BS
MANIKA	2	3	2	3	AL-BS-BS-AL-BS
HOM2	3	2	4	1	AL-AL-BS-AL-BS

Fuente: Wu et al., (2007); Sekar et al., (2016) y Hau (2014) ^{157,160,228}

AS haplotipo que lleva solo la isoforma corta *C4A*. Haplotipo BS que lleva solo la isoforma corta *C4B*. Haplotipo AL que lleva solo el gen *C4A* largo. Haplotipo BL que lleva solo el gen *C4B* largo. El orden no está determinado y se enumeran alfabéticamente.

3.3.3 Cohorte VAXGEN para el análisis de CNV de los genes C4

La cohorte VAXGEN está conformada por individuos que fueron reclutados para la ejecución de un ensayo clínico en fase III de una vacuna profiláctica contra el VIH-1 (VAX004 de la empresa Vaxgen, San Francisco, USA) ²²⁹ que fueron agrupados en individuos vacunados infectados y vacunados no infectados.

Para el desarrollo del objetivo 3 se emplearon 475 muestras de individuos placebos y vacunados, de los cuales 267 correspondían a individuos no infectados y 208 a individuos VIH-1 seropositivos.

3.4 Extracción de ADN en sangre

El ADN genómico de las cohortes de individuos HESN se extrajo empleando los kits de extracción de ADN de NucleoSpin® Blood QuitckPure (Macherey-Nagel, Düren, Germany) o Magna Pure System (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, EE.UU.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes y se diluyó a 100 ng /ul y se almacenó a -20 ° C hasta su uso. Las muestras del ensayo clínico VAXGEN fueron extraídas con el Kit Tripure de Roche. En el laboratorio de inmunogenética de la Universidad de Jaén se dispone tanto de ADN genómico como de ARN total de cada uno de los participantes.

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría. El ADN fue alicuotado y criopreservado hasta su uso. Las muestras que no tenían ADN original suficiente, fueron amplificadas con el kit ilustra GenomiPhi V2 DNA Amplification

Kit (GE Healthcare) y posteriormente se purificaron por cromatografía de afinidad.

3.5 Genotipificación

Los polimorfismos *CCR5* $\Delta 32$ e *IFNL4* *rs368234815* se genotipificaron mediante técnicas de PCR en tiempo real, empleando el sistema Eco Real-Time PCR. Para el control de calidad, se incluyeron muestras duplicadas en el panel; la concordancia de genotipos fue del 100%.

3.6 Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la herramienta en línea de la Universidad de Munchen - Alemania (disponible en línea en <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Los análisis de regresión logística se realizaron utilizando el software PLINK (disponible en línea en <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) y SPSS® versión 19.

Los resultados de las tres cohortes se combinaron con los resultados de la cohorte de UDI mediante un metanálisis de efectos aleatorios. Este metanálisis se calculó con la hoja de cálculo Episheet de Ken Rothman (disponible en línea en <http://www.krothman.org/episheet.xls>). Luego calculamos el OR combinado con IC del 95% para cada modelo genético.

Los ORs de las poblaciones individuales –examinando las formas de transmisión del VIH-1– junto con los ORs del meta-análisis se presentaron mediante el uso de Forest plot. El diagrama de efectos (forest plot) se elaboró utilizando StatsToDo: ForestPlot

Program Page (disponible en línea en https://www.statstodo.com/ForestPlot_Pgm.php).

Para analizar los resultados de la cohorte VAXGEN se compararon los resultados obtenidos en la cuantificación del número de copias del gen *C4A* con el porcentaje de supervivencia de cada uno de los individuos participantes empleando un modelo de análisis de supervivencia de Cox (Software Statgraphics Centurion XVI.I).

3.7 Condiciones para qPCR

3.7.1 *Primers y master mix empleadas*

Las secuencias de los primers empleados para la amplificación de las variantes *CCR5Δ32*, *rs368234815* del *IFNL4*, junto con el protocolo de amplificación se presentan en la tabla 17.

Tabla 17. Método para genotipificación de variantes *rs333* y *rs368234815*.

Gen	Primers y sondas	Master mix	Tm*	Protocolo de amplificación
<i>CCR5</i> Δ 32 <i>rs333</i>	Forward 5'-TTCATTACACCTGCAGCTCTC- 3' Reverse 5'- GACCAGCCCCAAGATGACTATC- 3'	Kit SsoFast Evagreen Supermix de BIO- RAD	63.1	5 min 95°C, 42 ciclos: 20 seg 95°C 1 min 60°C con medida de fluorescencia.
<i>IFNL4</i> <i>rs368234815</i>	Primers Forward 5'-GCCTGCTGCAGAAGCAGAGAT- 3' Reverse 5'-GCTCCAGCGAGCGGTAGTG-3' Sondas Inserción – TT 5'- ATCGCAGAAGGCC-3' Delección - Δ G 5'- ATCGCAG_CGGCCC-3'	Quantimix easy probes kit de Biotools	67.8	2 min 95 °C 50 ciclos: 10 seg 95°C 1 min 56°C Curva HRM: 1 min 95°C 30 seg 55°C hasta 95°C con medida de fluorescencia con cada incremento de 0.1°C

*Tm (temperatura de alineamiento)

3.7.2 Programa de PCR

La qPCR fue realizada en un termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, U.S.). Para cada una de las reacciones se ajustó la concentración de ADN genómico a 10 ng/ul y se empleó agua grado HPLC para completar el volumen restante.

Un control negativo (sin ADN diana), con agua grado HPLC estéril fue incluido en todos los análisis con el fin de detectar background de la fluorescencia y excluir contaminación.

3.7.3 CCR5Δ32 - rs333

En la tabla 18 se presentan las condiciones de reacción para la detección del polimorfismo CCR5Δ32:

Tabla 18. Cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para el genotipado de rs333

Reactivo	Cantidad
Supermix (dNTPs, tampón con MgCl ₂ , taq polimerasa y evagreen)	10 µl
Primer F - D32 + (100 µM)	0.5 µl
Primer R - D32- (100 µM)	0.5 µl
H ₂ O de PCR	8.5 µl
ADN (10 ng/µl)	0.5 µl
Volumen final	20 µl

Para realizar el montaje de cada placa, se hizo el cálculo del volumen de componentes necesario de acuerdo al número de muestras a analizar. Adicionalmente se incluyó un exceso de volumen, por lo general equivalente a dos muestras adicionales, debido a las pérdidas que pueden ocurrir al momento de pipetear. Se recomienda realizar un pequeño vortex al supermix antes de efectuar el montaje de la reacción.

3.7.4 *IFNL4* - rs368234815

En la tabla 19 se presentan las condiciones de reacción para la detección del polimorfismo rs368234815

Tabla 19. Cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para el genotipado de rs368234815

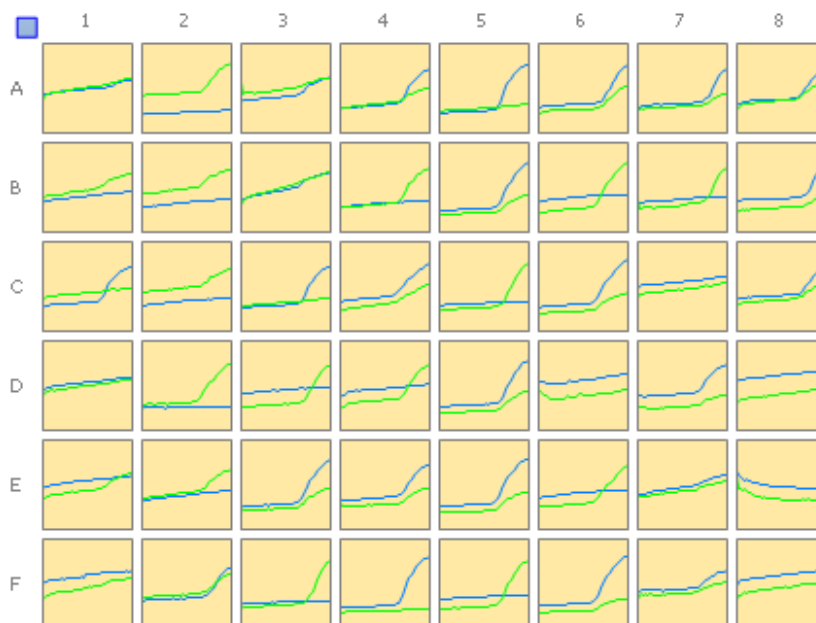
Reactivo	Cantidad
Quantiprobe 2x	6.25 μ l
Cebador + (200 μ mol/ μ l)	0.2 μ l
Cebador – (200 μ mol/ μ l)	0.2 μ l
Sonda HEX (100 μ mol/ μ l)	0.2 μ l
Sonda FAM (100 μ mol/ μ l)	0.1 μ l
H ₂ O de PCR	4.55 μ l
ADN (10 ng/ μ l)	1 μ l
Volumen final	12.5 μ l

Para el montaje de esta reacción se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. Los tubos en los cuales se encuentran las sondas HEX y FAM siempre se mantuvieron alejados de la luz directa, para lo cual se cubrían con papel aluminio
2. Antes de emplear el quantiprobe 2X se realizaba una centrifugación rápida y corta.
3. Para el análisis de los resultados se empleó el software EcoStudy versión 5.0 del sistema de PCR en tiempo real Ecolllumina 48.

Un ejemplo de los patrones de qPCR resultantes en el software se muestran en la figura 9. Si la muestra es homocigota para la variante analizada, se observará solo una de las dos curvas (ya sea la azul o la verde) y si la muestra corresponde a un individuo heterocigoto se observarán las dos curvas.

Figura 9. Resultados de genotipificación de *IFNL4*.



3.7.5 C4A, C4B, C4S y C4L mediante GRACE-PCR

El ensayo de ejecución tenía cuatro HRM-GRACE-PCR, cada uno con dos pares de cebadores, *C4A-RP1*; *C4B-RP1*; *C4S-RP1* y *C4L-RP1* (Tabla 20). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 12 uL, que contenía 10 ng de ADN genómico, 6 uL de Precision Melt Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y se ajustó a 12 uL con agua grado HPLC. Se incluyeron controles negativos (sin ADN diana) en cada reacción de PCR para verificar la contaminación.

Tabla 20. Información de los primers para la genotipificación de CNV de *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L*

Gen	Primers	Tm amplicón	Tamaño (pb) amplicón
<i>C4A</i>	F 5'-CCTTTGTGTTGAAGGTCCTGAGTT-3' R 5'-TCCTGTCTAACACTGGACAGGGGT-3'	84.8 +/-0.1	141
<i>C4B</i>	F 5'-TGCAGGAGACATCTAACTGGCTTCT-3' R 5'-CATGCTCCTATGTATCACTGGAGAGA-3'	81.6 +/-0.1	86
<i>C4S</i>	F 5'-TTGCTCGTTCTGCTCATTCTT-3' R 5'-GGCGCAGGCTGCTGTATT-3'	81.5 +/-0.1	103
<i>C4L</i>	F 5'-TTTATTTCTTTGCTCGTTCTGCTC-3' R 5'-CCCCACTCTTTATGAACTCTTAACC-3'	83.7 +/-0.1	91
<i>RP1</i>	F 5'-GACCAAATGACACAGACCTTTGG-3' R 5'-GACTTTGGTTGGTTCCACAAGTC-3'	77.6 +/-0.1	79

Abreviaturas: F, Forward; R, Reverse.

Fue necesario preparar cuatro mix:

- RP1+ C4A
- RP1+ C4B
- RP1+ C4S
- RP1+ C4L

A continuación, se presentan las cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para los genes *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L*.

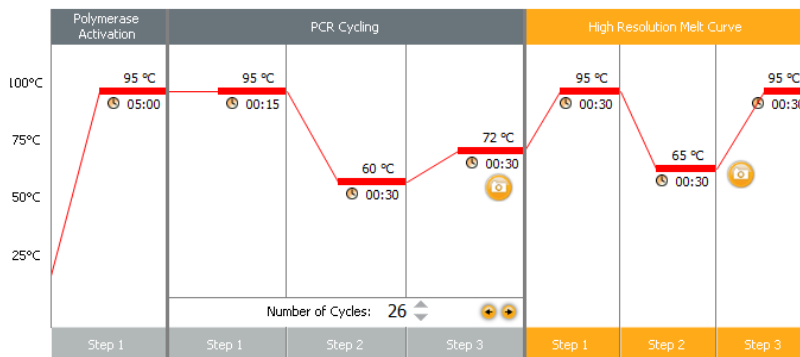
Tabla 21. Cantidades de los componentes de la mezcla de reacción para el genotipado de *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L*

	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4
Componente	C4A	C4B	C4S	C4L
Master mix 2x	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
Cebadores C4	0.6 µl	0.5 µl	0.3 µl	0.6 µl
Cebadores RP1 (10 uM)	0.4 µl	0.2 µl	0.6 µl	0.3 µl
H ₂ O de PCR	3 µl	3.3 µl	3.1 µl	3.1 µl
ADN (10 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Volumen final	12ul			

* 10 uM *C4A*, *C4S*, *C4L* y 5 uM *C4B*

Las condiciones de amplificación de PCR utilizadas fueron: después de un calentamiento inicial de 5 min a 95°C, se realizaron 26 ciclos de PCR de la siguiente manera, 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, para *C4A*, *C4B* y *C4S*, y se realizaron 24 ciclos de PCR como sigue, 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C para el gen *C4L*. La fusión se realizó a una velocidad de 0,2°C / segundo en el rango de temperatura de 65°C a 95°C, con adquisición de datos en el canal HRM. Para cada ejecución, se realizó una curva estándar y se calculó R² (> 0,9) para describir el rango lineal del ensayo.

Figura 10. Parámetros de la qPCR - HRM para la determinación de CNV de los genes *C4*



3.8 Proceso para la optimización de la técnica de GRACE PCR para la determinación de CNV de *C4*

3.8.1 Concentración de primers

Inicialmente, se ensayaron cebadores a diferentes concentraciones. Para los pares de cebadores *C4A* / *RP1*, *C4B* / *RP1* y *C4L* / *RP1*, la amplificación del gen de referencia *RP1* fue muy eficiente; por tanto, era necesario aumentar la concentración de los cebadores *C4A*, *C4B* y *C4L*. Por el contrario, para el gen *C4S*, fue necesario duplicar la concentración del cebador *RP1* en relación con los cebadores *C4S*. Se emplearon muestras de ADN con número de copias conocidas para el gen *C4* (Tabla 16) para validar el número de copias y determinar la temperatura de fusión de cada amplificación.

Los cinco pares de cebadores amplificaron con éxito los genes correspondientes con la disociación de un solo pico. El control negativo no produjo pico de disociación. El ensayo HRM dió como

resultado dos picos distinguibles con temperaturas de fusión descritas en la tabla 20. Las temperaturas máximas de fusión oscilaron 0,1 ° C.

Tabla 22. Concentración final de cada cebador requerida para HRM-PCR / GRACE-PCR.

Gene	Final Concentration	Tube
<i>C4A</i>	0.5 µM	Tube 1
<i>RP1</i>	0.33 µM	
<i>C4B</i>	0.21 µM	Tube 2
<i>RP1</i>	0.16 µM	
<i>C4S</i>	0.25 µM	Tube 3
<i>RP1</i>	0.5 µM	
<i>C4L</i>	0.5 µM	Tube 4
<i>RP1</i>	0.25 µM	

3.8.2 Número de ciclos para la qPCR

Para limitar la saturación de la amplificación durante la fase exponencial de la PCR, se realizaron reacciones de 24, 26, 28 y 30 ciclos. Por lo tanto, garantizar que la cantidad de cada producto de PCR coincida con la presente en la muestra analizada para evitar un aumento en el número de copias iniciales.

3.8.3 Concentraciones de ADN molde

Se analizaron diferentes concentraciones de ADN diana de 5 a 25 ng de ADN genómico. La concentración de ADN diana se optimizó para garantizar la máxima especificidad. El mejor resultado se observó a 10 ng / ul en comparación con concentraciones más altas (Anexo A).

Esta concentración de ADN se empleó tanto para los controles como para las muestras de número de copias desconocidas con el fin de prevenir la interpretación de falsos positivos de CNV.

3.8.4 Cálculo del número de copias

La adquisición y el análisis de datos se realizaron utilizando el software EcoStudy versión 5.0 del sistema de PCR en tiempo real Eco de Illumina y Microsoft Office Excel.

La cantidad de amplificación por PCR de los genes *C4* y *RP1* es proporcional a la altura del pico en los gráficos $-dF / dT$ (Primera derivada negativa de la fluorescencia normalizada / primera derivada de la temperatura) frente a la temperatura.

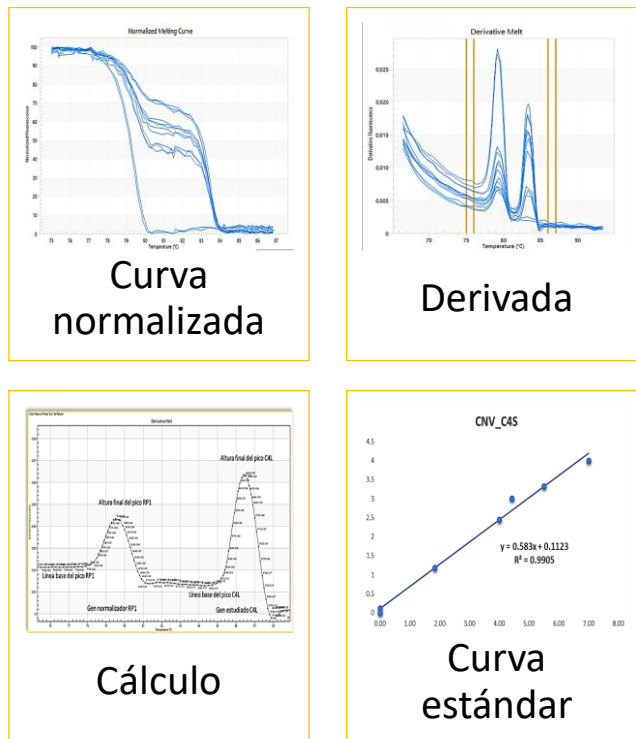
Las funciones lineales se calcularon representando la relación $-dF/dT$ *C4/RP1* frente a números de copias del gen *C4* diana conocido. Para todas las reacciones, los coeficientes de correlación fueron siempre superiores a 0,90. El número de copias de *C4* de donantes de sangre sanos se estableció a partir de la ecuación aplicada para cada isoforma.

La proporción se calculó dividiendo el gen *C4* y el valor de altura máxima del pico *RP1*. Esto dió como resultado un gráfico en el que las alturas de los picos entre las regiones de fusión de *RP1* y *C4* dependían de la proporción del número de copias del gen *C4: RP1*. Para muestras de genotipos desconocidos se realizó el mismo procedimiento de normalización para obtener la proporción y el número de copias.

Cada gen *C4* diana (*C4A*, *C4B*, *C4S*, *C4L*) se genotipificó en una placa de 48 pocillos, incluidas 19 muestras desconocidas, cuatro

muestras de control con haplotipos *C4* conocidos y un control negativo, todas las muestras se analizaron por duplicado. Se realizó un control interno para cada muestra de un individuo, donde la suma de las copias *C4A* más las copias *C4B* debe ser igual a la suma de las copias *C4L* más las copias *C4S*. El coeficiente de variación intraensayo se determinó mediante pruebas por triplicado de las muestras de control y donante. En este ensayo fue necesario utilizar estándares porque el cambio en las alturas de los picos no era lineal. En la figura 11 se resumen los pasos que se siguieron para la determinación del número de copias.

Figura 11. Pasos para el análisis y cálculo del número de copias



Finalmente, el rango de CNV para cada uno de los genes obtenidos en los donantes de sangre fueron comparados con datos previamente reportados en otros estudios.

3.9 Proceso para la cuantificación de copias del gen C4A en placebos y vacunados de la cohorte VAXGEN

Para el genotipado de la cohorte VAXGEN se empleó la técnica estandarizada previamente.

4 Resultados

4.1 Artículo 1.

A Knockout *IFNL4* variant is associated with protection from sexually transmitted hiv-1 infection.

Jaimes-Bernal C, Rallón N, Benito JM, Omar M, Gómez-Vidal MA, Márquez FJ, Sánchez-Arcas B, Trujillo M, Royo JL, Saulle I, Biasin M, Rivero-Juárez A, Caruz A.

The Journal of Infectious Diseases. 2019 Feb 15;219(5):772-776.

DOI: 10.1093/infdis/jiy584.

Factor de impacto: 5.02 (2019)

Q1 (especialidad "Infectious Diseases")

Resumen

El alelo inactivo de *IFNL4* (rs368234815-TT) está asociado con la curación espontánea y dependiente de *IFNA* del VHC. El rol de esta variante genética en la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 es aún controvertido. Este estudio tiene como objetivo evaluar la asociación de esta variante del gen *IFNL4* y la infección por VIH-1 de transmisión sexual. Se investigó la asociación de 228 seropositivos al VIH-1 y 136 seronegativos expuestos al VIH con los genotipos de *IFNL4* rs368234815. El alelo funcional *IFNL4G* se asocia a una mayor susceptibilidad a la infección por VIH-1 por vía sexual OR: 2,1 IC 95% (1,2-3,6), P=0,004. De otra parte, al realizar un meta-análisis que incluye una población de UDI sugiere un modo de herencia codominante de este factor de riesgo (OR: 2,0 IC 95% (1,3-3,2), P=0,001).

4.2 Artículo 2

Complement C4 Gene Copy Number Variation Genotyping by
High Resolution Melting PCR.

Jaimes-Bernal CP, Trujillo M, Márquez FJ, Caruz A.

International Journal of Molecular Sciences. 2020 Aug
31;21(17):6309.

DOI: 10.3390/ijms21176309.

Factor de impacto: 5,92 (2020)

Q1 especialidad "Biochemistry and Molecular Biology"

Resumen

Objetivos: Las variantes del número de copias de los genes del complemento C4 juegan un papel importante como determinantes de la susceptibilidad genética a enfermedades comunes como el lupus eritematoso sistémico, la esquizofrenia, la artritis reumatoide y las enfermedades infecciosas. Este estudio tiene como objetivo desarrollar un ensayo para la cuantificación de variaciones en el número de copias en el locus C4.

Métodos: El ensayo se basa en una enumeración de copias de análisis de relación genética (GRACE) combinada con PCR de fusión de alta resolución. La prueba se optimizó utilizando muestras de genotipo conocido y se validó con 72 muestras de ADN de donantes de sangre sanos.

Resultados: Se generaron curvas estándar trazando los valores de la relación (C4 / RP1) frente a la variación del número de

copias (CNV) para cada gen, utilizando ADN genómico con CNV C4 conocida, para garantizar la validez de la ejecución. Observamos que el rango de números de copias en los individuos de control era comparable a las distribuciones observadas en estudios previos de ascendencia europea.

Conclusiones: El método aquí descrito simplifica significativamente el diagnóstico de CNV C4.

4.3 Cuantificación del número de copias del gen C4A en la población del ensayo clínico VAXGEN

En total se genotiparon 475 individuos (vacunados y placebos), de los cuales 267 pertenecían al grupo de no infectados y 208 al grupo de individuos VIH-1 seropositivos.

En la tabla 23 se presenta la tabla de frecuencias de los individuos genotipados, agrupados en 0 a 3 copias y 4 a 5 copias del gen C4A.

Tabla 23. Frecuencias del número de copias del gen C4A en la población del ensayo clínico VAXGEN

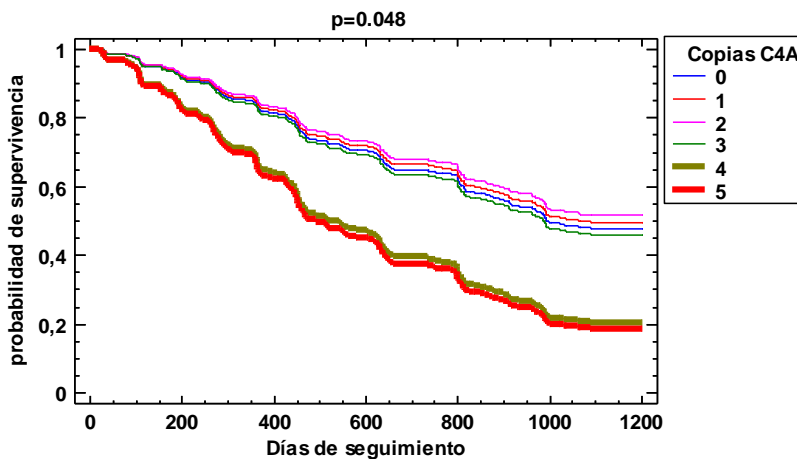
CNV	0 a 3 copias de C4A	4-5 copias de C4A	Total
No infectados	260 54,74%	7 1,47%	267 56,21%
VIH-1 seropositivos	187 39,37%	21 4,42%	208 43,79%
Total	447 94,11%	28 5,89%	475 100%

Se realizó una prueba de chi cuadrado para establecer si existe asociación entre el número de copias del gen C4A y el estado de no infectados o VIH seropositivos y se obtuvo un valor de $P=0,0006$ (con un grado de libertad), lo que demuestra que existe una relación estadísticamente significativa entre el número de copias y la susceptibilidad a la infección. Se observa que en los individuos VIH-1 seropositivos se presenta un mayor número de

copias (4 a 5) del gen *C4A* que, en los no infectados, donde el 54,74% (n=260) de estos poseen entre 0 a 3 copias.

Así mismo, en relación a los resultados del análisis de comparación de supervivencia de Cox se observa en la figura 12 que a medida que avanzan los días hasta el momento de la infección (se realizó seguimiento durante 1200 días) la probabilidad de supervivencia va disminuyendo en relación al número de copias del gen *C4A*, agrupándose con comportamientos muy similares los individuos que poseen entre 0 y 3 copias y los que poseen entre 4 y 5 copias. En este sentido, la probabilidad de supervivencia es menor para los individuos con un número de copias entre 4 y 5 que para los que tienen entre 0 y 3 copias ($p= 0,048$).

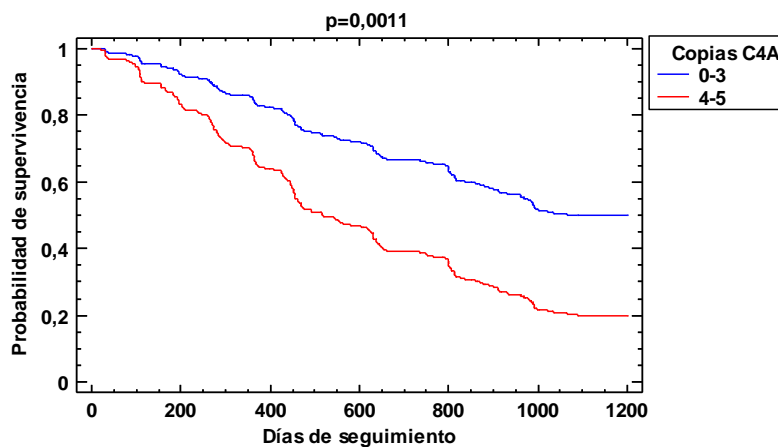
Figura 12. Gráfica de función de supervivencia estimada para el número de copias del gen *C4A*



Considerando el comportamiento observado en la figura 12 se decide realizar un nuevo análisis agrupando a los individuos que

tenían 4 y 5 copias en una categoría y a los demás en otra categoría y se obtienen los resultados que se presentan en la figura 13, lo cual confirma la asociación entre el número de copias del gen *C4A* y la probabilidad de supervivencia ($p=0,0011$). Esto permitiría pensar que un número de copias entre 4 y 5 sería un riesgo de infección tanto para individuos vacunados como placebos y así mismo, tener un número de copias menor a 4 sería un factor protector.

Figura 13. Porcentaje de supervivencia para el número de copias del gen *C4A* agrupados en categorías



5 Discusión

De acuerdo con las teorías de la evolución, el *IFNL4*, que al parecer está ampliamente conservado en los animales, sufre una evolución hacia su inactivación en un amplio rango de poblaciones humanas no africanas. Ello indica que ha existido una presión selectiva para su inactivación, probablemente porque este hecho ha conferido una ventaja selectiva frente algún patógeno en el pasado. En este sentido, diversos estudios han demostrado que variantes genéticas de inactivación de *IFNL4* están asociadas con la curación espontánea de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) y otras enfermedades ^{137,244}.

Uno de los INDELS que se encuentra ubicado en el gen del *IFNL4* es el polimorfismo de dinucleótidos, rs368234815, con los alelos combinados TT / -G (también conocidos como TT / dG o TT / ΔG). En un principio este polimorfismo se había notificado con un número de acceso preliminar ss469415590, que luego fue reemplazado por el número de acceso dbSNP rs368234815. En el proyecto Genotype-Tissue Expression (GTEx) y en otros estudios que utilizan los datos del Proyecto 1000 Genomes, rs368234815 está representado por los SNP rs11322783 y rs74597329 ¹³⁷. Debido a su ubicación dentro del primer exón de *IFNL4*, rs368234815 resulta en un cambio funcional significativo: el alelo ΔG produce un marco de lectura abierto para la proteína IFNL4, mientras que el alelo TT introduce un cambio de marco que anula la proteína debido a la aparición de un codón de parada prematuro ¹³⁷.

Conforme con Key et al., quienes realizaron alineación de múltiples secuencias de *IFNL4* de diferentes especies,

encontraron que ΔG es un alelo ancestral conservado y que TT es un alelo derivado específico algunas poblaciones humanas. Esta selección positiva de ΔG a TT en humanos no tiene una explicación clara. Además, se observa una variación considerable en la frecuencia del alelo TT entre los grupos humanos. Los datos del Proyecto 1000 genomas revelan un gradiente de frecuencia que se eleva desde África (0,29-0,44) a Europa (0,58-0,77) y el Nuevo Mundo (0,51-0,65), y alcanza casi la fijación en el este de Asia (0,94-0,97) ²⁴⁵.

Diversas hipótesis han sido propuestas en relación a la razón por la cual el alelo TT resulta en una ventaja para quienes lo poseen por la menor susceptibilidad a ciertas infecciones en los tractos respiratorios y gastrointestinal. Un estudio reciente, publicado por Rugwizangoga et al., refiere que uno de los mecanismos que podría explicar esta aparente desventaja es el hallazgo de que las células pueden ser refractarias a los interferones de tipo I como consecuencia de la inducción de los genes *ISG* (genes estimulantes de interferones). Por lo anterior, al producirse *IFNL4*, esta actuaría como una fuerte inductora de *ISG*, lo que finalmente comprometería la defensa antiviral ejercida por los IFN de tipo I ²⁴⁶.

IFNL4 rs368234815 influye en la vía de señalización entre el receptor 1 del *IFNL3* y el elemento de respuesta sensible a interferón (ISRE). En este caso, la inducción de *IFNL3* y la activación del promotor se suprimen debido a la sobreexpresión de *IFNL4* ²⁴⁴. Al comparar la secuencia de la proteína *IFNL4* en humanos con otras especies se ha encontrado un alto grado de

homología, especialmente entre mamíferos, lo que sugiere un papel importante en la evolución por su grado de conservación entre estos homólogos ²⁴⁷.

En cuanto al *IFNL4* y el papel que cumple en relación con la resistencia innata a la infección por VIH-1 es controvertido. Un amplio estudio reportado en el año 2010 no informó de ninguna asociación del polimorfismo del *IFNL4* *rs12979860* con la resistencia a la infección por VIH-1, en el cual se analizaron 1221 pacientes VIH-1 positivos y 291 personas HESN de varias cohortes en los Estados Unidos (es decir, hombres que tienen relaciones sexuales con hombres, usuarios de drogas inyectables y hemofílicos) ²⁴⁸. Sin embargo, este estudio no genotipó el polimorfismo funcional del *IFNL4* y no se evaluaron los factores de confusión debidos a la mezcla de la población, esto considerando que las frecuencias alélicas de los polimorfismos de *IFNL4* dependen del origen de la población, siendo el alelo ΔG significativamente más frecuente en individuos de ascendencia africana (78%), en comparación con los de ascendencia europea (32%) y asiática (10%) ¹⁴⁰.

No obstante, hemos descrito previamente la asociación del alelo funcional de *IFNL4* con un mayor riesgo de infección por VIH-1 en una población bien caracterizada de usuarios de drogas inyectables en España ⁹⁵, incluidos 213 individuos VIH-1 positivos y 188 HESN individuos. Debido a estas discrepancias, en este trabajo evaluamos si el polimorfismo funcional en *IFNL4* estaba asociado a la infección por VIH-1 de transmisión sexual en dos poblaciones europeas.

El principal hallazgo de este estudio es que, en una población independiente en riesgo de adquirir el VIH-1 por vía sexual, replicamos los resultados de un estudio anterior de usuarios de drogas inyectables. Debido a que el alelo ΔG se asoció significativamente con un mayor riesgo de infección por VIH-1, podemos deducir que la presencia de *IFNL4* es un factor de riesgo para la infección por VIH-1 independientemente de la ruta de infección.

El papel de *IFNL4* en la respuesta inmune innata es un asunto de considerable interés. La expresión del ARN mensajero (ARNm) de *IFNL4* después de la inducción con ácido policitídilico (un agonista del ARN bicatenario) o la infección experimental con el virus de la hepatitis C o el virus Sendai es muy rápida y transitoria, en comparación con la expresión de ARNm de *IFNL3* o *IFNA*^{140,249}. El *IFNL4* apareció antes que otros *IFNL* en la inducción de genes antivirales, así como genes que regulan negativamente la respuesta al *IFN*, como *USP18* y *SOCS1*²⁴⁹. El tratamiento transitorio de los hepatocitos con *IFNL4*, pero no con *IFNL3*, provocó una inducción duradera y sostenida de *SOCS1* y refractariedad a la estimulación adicional con *IFNL3*²⁴⁹. Los niveles de *IFN* que inhiben *ISG15* y *USP18* están aumentados en las células tratadas o que expresan *IFNL4* y median la insensibilidad a *IFNA* de una manera dependiente de *IFNL4*²⁵⁰. Además, el genotipo del *IFNL4* se correlaciona con la expresión de ARNm de *ISG15* o *USP18*, los genotipos que contienen el alelo ΔG muestran niveles más altos de ARNm de *ISG15* en comparación con los que contienen el alelo *TT*²⁵¹. De otra parte,

IFNL4 inhibe la vía de señalización JAK-STAT induciendo la desensibilización de *IFNAR2* mediada por *USP18*²⁵⁰ y reduciendo los niveles de ARNm de *IFNAR1*; esto también depende del genotipo *IFNL4*, con el alelo ΔG asociado con un nivel significativamente más bajo de ARNm de *IFNAR1*²⁵². El tándem *USP18-ISG15* parece ser el principal efector en el control de la retroalimentación negativa de la señalización de IFN. Las mutaciones de *USP18* que conducen a la pérdida de función subyacen a las interferonopatías que conducen a una inflamación inducida por IFN severamente inducida²⁵³. La activación crónica de *IFN* es altamente tóxica²⁵³, y es probable que *IFNL4*, a través de la regulación positiva de *USP18-ISG15*, contribuya a reprimir la respuesta celular a la estimulación prolongada de *IFN*²⁴⁹. Predecimos que el alelo *IFNL4* ΔG podría ser un factor genético protector en patologías relacionadas con la activación mejorada de IFN, como la diabetes tipo I; y en interferonopatías, como el síndrome de Aicardi-Goutieres o el lupus eritematoso sistémico, donde las mutaciones en las enzimas que metabolizan los ácidos nucleicos conducen a la acumulación de ácidos nucleicos y a la producción de IFN patógeno²⁵³. Además, los individuos que albergan el alelo funcional *IFNL4* muestran respuestas clínicas más deficientes al tratamiento con IFNA en la infección crónica por el virus de la hepatitis C. Este hecho sugiere fuertemente que *IFNL4* actúa como un potente antagonista o factor desensibilizante de IFNA in vivo¹⁴⁰.

Con respecto a la evaluación de una asociación entre las rutas de transmisión del VIH-1 y el *IFNL4* *rs368234815*, encontramos que

el alelo ΔG parece seguir un modelo recesivo de herencia en el caso de la transmisión parenteral⁹⁵ pero un modelo dominante en el caso de la transmisión sexual. Estas discrepancias podrían deberse al pequeño tamaño de las cohortes incluidas en este estudio. Sin embargo, el metanálisis sugiere un modo de herencia codominante, que se ajusta mejor a un modelo en el que un mayor riesgo de infección por VIH-1 se correlaciona con el aumento de los niveles acumulativos de IFNL4. Estas diferencias en el patrón de susceptibilidad a la infección por VIH-1 podrían estar relacionadas con la expresión del receptor IFNL4. En la mucosa sexual, niveles más bajos de IFNL4 podrían crear un entorno favorable para el escape viral, en contraste con la vía parenteral, en la que podrían ser necesarios niveles más altos de IFNL4 para tal efecto. No ha pasado desapercibido que los resultados presentados aquí sugieren inmediatamente que la señalización dependiente de IFN es una defensa central contra la infección por VIH-1.

No obstante, la principal limitación de nuestra investigación es el reducido número de poblaciones incluidas en el metaanálisis y el posible sesgo asociado a la combinación de las poblaciones de España e Italia. El genotipo $\Delta G / \Delta G$ tiene una frecuencia baja (entre el 5% y el 14%), y pequeñas desviaciones aleatorias podrían influir en la asociación estadística. Se necesitan más investigaciones para resolver esta compleja relación genotipo-fenotipo y la aparente paradoja del IFNL4 y su papel en la inmunidad innata contra las infecciones virales. Además, la heterogeneidad genética de los polimorfismos del *IFNL4* es

significativa entre poblaciones étnicas, por lo que algunos autores también sugieren que se realicen estudios regionales para evaluar la respuesta a infecciones virales, tratamiento y recaídas.

Por otro lado, en relación con la optimización de una técnica para la cuantificación de la variación en el número de copias de los genes *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L*, nosotros describimos un procedimiento ampliamente accesible para estudiar el polimorfismo de variación del número de copias de *C4*, donde el tiempo total de análisis es de aproximadamente 2 horas. El sistema consiste en una combinación de HRM con métodos GRACE-PCR, que permiten la detección y cuantificación del número de copias del gen *C4* para las isoformas *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L*, utilizando la relación de picos entre los genes *C4* y un gen de referencia que se correlaciona con la variación en el número de copias. Un análisis concurrente de la curva estándar con muestras de genotipo conocido aumenta la confiabilidad del resultado con la cuantificación exacta del número de copias del gen *C4*. Además, debido a que el cambio en las alturas de los picos no fue lineal, fueron necesarios los estándares intraensayo¹⁸⁵. Los donantes sanos analizados (n = 76) mostraron un patrón de distribución de CNV *C4* normal que oscilaba entre 1 y 6 copias totales, como se ha descrito previamente en otros estudios. Se encontró un control sano con deficiencia completa de los componentes *C4A* y *C4B*, lo cual es muy raro en esta población. Estudios anteriores han demostrado que las deficiencias completas o parciales de *C4B* están asociadas con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas²⁴¹. Además, se ha

informado que las variaciones del número de copias de *C4A* y *C4B* están relacionadas con trastornos autoinmunes. Esto ha llevado al desarrollo y validación de una amplia variedad de ensayos para cuantificar el número de copias de estos genes y establecer asociaciones de enfermedades con *C4* CNV en estudios epidemiológicos genéticos.

Turner et al. (2015),¹⁸⁶ desarrollaron una metodología denominada GRACE-PCR, una prueba de cribado para la detección de deleciones y duplicaciones de los genes de la α -globina. Esta es una técnica de tubo cerrado con menor riesgo de contaminación, más rápida, económica y sencilla que otros ensayos. Después de esto, Turner et al. (2016)²⁴² utilizaron el ensayo HRM-PCR / GRACE-PCR para detectar todas las mutaciones puntuales comunes y reordenamientos más grandes del gen de la subunidad beta de la hemoglobina (*HBB*). Hallaron 44 genotipos patológicos distintos, lo que resultó en una prueba de detección primaria, rápida, sensible, específica y rentable. El sistema aquí descrito para el diagnóstico de CNV de *C4* amplía las aplicaciones de HRM para la cuantificación de dosis de genes, aumentando la gama de laboratorios que pueden realizar la dosificación del gen *C4*.

Según Szilagyi et al. (2006)¹⁵⁵ la cuantificación de los genes *C4A* y *C4B* es clínicamente relevante, porque existe una fuerte asociación entre las variaciones en el número de copias y la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Esta técnica está siendo empleada actualmente para determinar el papel de este polimorfismo de variación de número de copias en la

susceptibilidad a la infección por VIH tanto por vía parenteral como sexual.

Wu et al., en el año 2009 refieren una la relación entre el número de copias del gen *C4* y el Lupus Eritematoso Sistémico, considerada una enfermedad autoinmune con una etiología compleja, siendo un factor de riesgo contar con un menor número de copias del gen y un factor protector tener más de cuatro copias en total. En este mismo estudio mencionan que en la población de individuos de Estados Unidos de origen europeo sanos el número total de copias del gen *C4* por genoma diploide varía de 2 a 6: 60,8% de las personas con cuatro copias de *C4*genes, 27,2% con menos de cuatro copias y 12% con más de cuatro copias ¹⁷⁰.

Por su parte, Jüptner et al. (2018) investigaron si la variación del número de copias de *C4* tenía relación con las características clínicas y serológicas en una cohorte de lupus del norte de Europa, hallando que el bajo número de copias del gen del complemento y la deficiencia homocigota de *C4A* predisponían a desarrollar una enfermedad grave y, además, con una aparición más temprana en estos pacientes ²⁵⁴. Con base en lo definido por Jüptner et al., Wang y Liu (2021) en su revisión acerca del gen *C4* concluyen que variaciones del número de copias de este gen están correlacionadas con los niveles séricos de la proteína *C4* y un bajo número de copias predispone a los individuos a padecer diversas enfermedades ¹⁴⁶.

Las deficiencias homocigóticas del complemento *C4A* o *C4B* se detectan en el 1-10% de las poblaciones. Se ha informado de que

la deficiencia homocigótica de *C4A* se asocia con una mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes, mientras que la deficiencia homocigótica de *C4B* se ha asociado con una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas y virales envueltos

255 .

6 Conclusiones

El presente estudio aporta evidencia genética sobre la asociación entre el genotipo *IFNL4* *TT* / *TT* y la resistencia innata a la infección por VIH-1, independientemente de la vía de transmisión (sexual vs parenteral), lo que apoya la importancia de la interacción de IFN tipo I y tipo III en la patogenia de la infección por VIH.

A menos de una década de haber sido descubierto el gen *IFNL4*, no se ha podido avanzar en el entendimiento de la función del mismo, a pesar de las numerosas investigaciones realizadas del gen y el polimorfismo rs368234815 en pacientes con infecciones virales.

El ensayo desarrollado empleando qPCR – HRM en este estudio ofrece una alternativa atractiva para la cuantificación rápida, sensible y específica de las CNV de los genes *C4*.

Diversos factores como la concentración del ADN diana, el agente intercalante con propiedades fluorescentes del master mix y los controles con número de copias definido son importantes al momento de realizar este ensayo para obtener resultados reproducibles y confiables.

La susceptibilidad a la infección esta relacionada con un número de copias del gen *C4A* entre 4 y 5 en individuos tanto vacunados como placebos pertenecientes al ensayo VAXGEN

7 Perspectivas

Consideramos que sería interesante poder estudiar el número de copias de los genes *C4A*, *C4B*, *C4S* y *C4L* de las cohortes de expuestos no infectados tanto por vía sexual como por vía parenteral, así como en otras infecciones virales en las cuales este gen cumpliera un papel relevante.

De igual manera se propone realizar este mismo genotipado de CNV del gen *C4B*, *C4S* y *C4L* para la cohorte de individuos vacunados y para los placebos del ensayo clínico de VAX004 (vacuna recombinante de la subunidad de glicoproteína de la envoltura del VIH-1 (rgp120)).

8 Referencias

Referencias

1. Estadísticas mundiales sobre el VIH y el sida - Ficha informativa de 2020 | ONUSIDA. Available at: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. (Accessed: 27th October 2020)
2. Biasin, M., Clerici, M. & Piacentini, L. Innate immunity in resistance to HIV infection. *J. Infect. Dis.* **202**, 361–365 (2010).
3. Singh, P., Kaur, G., Sharma, G. & Mehra, N. K. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. *Vaccine* **26**, 2966–2980 (2008).
4. Ploquin, M. J. Y., Jacquelin, B., Jochems, S. P., Barré-Sinoussi, F. & Müller-Trutwin, M. C. Innate immunity in the control of HIV/AIDS: Recent advances and open questions. *Aids* **26**, 1269–1279 (2012).
5. Fenizia, C., Rossignol, J.-F., Clerici, M. & Biasin, M. Genetic and immune determinants of immune activation in HIV-exposed seronegative individuals and their role in protection against HIV infection. *Infect. Genet. Evol.* **S1567-1348**, 30439–2. (2017).
6. Miyazawa, M. *et al.* The ‘immunologic advantage’ of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* **23**, 161–175 (2009).
7. Pantaleo, G. & Fauc, A. S. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 825–854 (2003).
8. Deeks, S. G. & Walker, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* **27**, 406–416 (2007).
9. Casado, C. *et al.* Host and Viral Genetic Correlates of Clinical Definitions of HIV-1 Disease Progression. *PLoS One* **5**, (2010).
10. Pereyra, F. *et al.* Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *J. Infect. Dis.* **197**, 563–571 (2008).

11. Shearer, G. M. & Clerici, M. Protective immunity against HIV infection: Has nature done the experiment for us? *Immunol. Today* **17**, 21–24 (1996).
12. Fenizia, C., Saulle, I., Clerici, M. & Biasin, M. Genetic and epigenetic regulation of natural resistance to HIV-1 infection: new approaches to unveil the HESN secret. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **16**, 429–445 (2020).
13. Horton, R. E., McLaren, P. J., Fowke, K., Kimani, J. & Ball, T. B. Cohorts for the Study of HIV-1–Exposed but Uninfected Individuals: Benefits and Limitations. *J. Infect. Dis.* **202**, S377–S381 (2010).
14. Card, C. M., Ball, T. B. & Fowke, K. R. Immune Quiescence: A model of protection against HIV infection. *Retrovirology* **10**, 1–8 (2013).
15. Biasin, M., De Luca, M., Gnudi, F. & Clerici, M. The genetic basis of resistance to HIV infection and disease progression. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **9**, 319–334 (2013).
16. Fowke, K. R. *et al.* Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* **348**, 1347–1351 (1996).
17. Ranki, A. *et al.* T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. *AIDS* **3**, 63–69 (1989).
18. Detels, R. *et al.* Resistance to HIV-1 infection. Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **7**, 1263–1269 (1994).
19. Eugen-Olsen, J. *et al.* Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* **11**, 305–310 (1997).
20. Goh, W. C. *et al.* Protection against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Persons with Repeated Exposure: Evidence for T Cell Immunity in the Absence of Inherited CCR5 Coreceptor Defects. *J. Infect. Dis.* **179**, 548–557 (1999).

21. Scott-Algara, D. *et al.* Cutting Edge: Increased NK Cell Activity in HIV-1-Exposed but Uninfected Vietnamese Intravascular Drug Users. *J. Immunol.* **171**, 5663–5667 (2003).
22. Philpott, S. *et al.* CC chemokine receptor 5 genotype and susceptibility to transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women. *J. Infect. Dis.* **187**, 569–575 (2003).
23. Yang, C. *et al.* θ -defensin pseudogenes in HIV-1-exposed, persistently seronegative female sex-workers from Thailand. *Infect. Genet. Evol.* **5**, 11–15 (2005).
24. Nguyen, M. *et al.* HIV-Specific Antibodies But Not T-Cell Responses Are Associated With Protection in Seronegative Partners of HIV-1-Infected Individuals in Cambodia. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **42**, 412–419 (2006).
25. Pallikkuth, S., Wanchu, A., Bhatnagar, A., Sachdeva, R. K. & Sharma, M. Human Immunodeficiency Virus (HIV) gag Antigen-Specific T-Helper and Granule-Dependent CD8 T-Cell Activities in Exposed but Uninfected Heterosexual Partners of HIV Type 1-Infected Individuals in North India. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1196–1202 (2007).
26. Boulet, S. *et al.* Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS* **22**, 595–599 (2008).
27. Chaudhary, O. *et al.* Polymorphic variants in DC-SIGN, DC-SIGNR and SDF-1 in high risk seronegative and HIV-1 patients in Northern Asian Indians. *J. Clin. Virol.* **43**, 196–201 (2008).
28. Hasselrot, K. *et al.* Oral HIV-exposure elicits mucosal HIV-neutralizing antibodies in uninfected men who have sex with men. *AIDS* **23**, 329–333 (2009).
29. Restrepo, C. *et al.* Low-Level Exposure to HIV Induces Virus-Specific T Cell Responses and Immune Activation in Exposed HIV-Seronegative Individuals. *J. Immunol.* **185**, 982–989 (2010).
30. Tomescu, C. *et al.* Increased plasmacytoid dendritic cell maturation and natural killer cell activation in HIV-1

- exposed, uninfected intravenous drug users. *AIDS* **24**, 2151–2160 (2010).
31. Cagliani, R. *et al.* Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4705–4714 (2010).
 32. Tan, X. hua *et al.* Distribution of CCR5-Δ32, CCR5m303A, CCR2-64I and SDF1-3'A in HIV-1 infected and uninfected high-risk Uighurs in Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 268–272 (2010).
 33. Huik, K. *et al.* CCL3L1 Copy Number Is a Strong Genetic Determinant of HIV Seropositivity in Caucasian Intravenous Drug Users. *J. Infect. Dis.* **201**, 730–739 (2010).
 34. Jögeda, E.-L. *et al.* Association of IFNλ4 rs12979860 polymorphism with the acquisition of HCV and HIV infections among people who inject drugs. *J. Med. Virol.* **90**, 1779–1783 (2018).
 35. Addo, M. M. *et al.* Lack of detectable HIV-1-specific CD8+ T cell responses in Zambian HIV-1-exposed seronegative partners of HIV-1-positive individuals. *J. Infect. Dis.* **203**, 258–262 (2011).
 36. Petrovski, S. *et al.* Common human genetic variants and HIV-1 susceptibility: A genome-wide survey in a homogeneous African population. *AIDS* **25**, 513–518 (2011).
 37. Sironi, M. *et al.* A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J. Immunol.* **188**, 818–23 (2012).
 38. Biasin, M. *et al.* Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 haplotypes play a role in modulating susceptibility to HIV infection. *AIDS* **27**, 1697–1706 (2013).
 39. Laplana, M., Caruz, A., Pineda, J. A., Puig, T. & Fibla, J. Association of BST-2 gene variants with HIV disease progression underscores the role of BST-2 in HIV type 1 infection. *J. Infect. Dis.* **207**, 411–419 (2013).

40. Herrero, R. *et al.* Association of complement receptor 2 polymorphisms with innate resistance to HIV-1 infection. *Genes Immun.* **16**, 134–41 (2015).
41. Herrero, R. *et al.* Common haplotypes in CD209 promoter and susceptibility to HIV-1 infection intravenous drug users. *Infect. Genet. Evol.* **45**, 20–25 (2016).
42. Gong, X. *et al.* A SDF1 genetic variant confers resistance to HIV-1 infection in intravenous drug users in China. *Infect. Genet. Evol.* **34**, 137–142 (2015).
43. Sironi, M. *et al.* Variants in the CYP7B1 gene region do not affect natural resistance to HIV-1 infection. *Retrovirology* **12**, 80 (2015).
44. Aguilar-Jimenez, W. *et al.* Genetic associations of the vitamin D and antiviral pathways with natural resistance to HIV-1 infection are influenced by interpopulation variability. *Infect. Genet. Evol.* **73**, 276–286 (2019).
45. Fellay, J. *et al.* A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science (80-.).* **317**, 944–947 (2007).
46. McLaren, P. J. *et al.* Association Study of Common Genetic Variants and HIV-1 Acquisition in 6,300 Infected Cases and 7,200 Controls. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
47. McLaren, P. J. & Fellay, J. Human genetic variation in HIV disease: Beyond genome-wide association studies. *Current Opinion in HIV and AIDS* **10**, 110–115 (2015).
48. Lederman, M. M. *et al.* Determinants of protection among HIV-exposed seronegative persons: An overview. *J. Infect. Dis.* **202**, (2010).
49. Spadoni, J.-L. *et al.* Identification of Genes Whose Expression Profile Is Associated with Non-Progression towards AIDS Using eQTLs. *PLoS One* **10**, (2015).
50. Genberg, B. L., Astemborski, J., Vlahov, D., Kirk, G. D. & Mehta, S. H. Incarceration and injection drug use in Baltimore, Maryland. *Addiction* **110**, 1152–1159 (2015).

51. Vingert, B. *et al.* HIV controllers maintain a population of highly efficient Th1 effector cells in contrast to patients treated in the long term. *J. Virol.* **86**, 10661–10674 (2012).
52. Novelli, S. *et al.* Enhanced immunovirological response in women compared to men after antiretroviral therapy initiation during acute and early HIV-1 infection: results from a longitudinal study in the French ANRS Primo cohort. *J. Int. AIDS Soc.* **23**, (2020).
53. Nicolás, D. *et al.* Epidemiological changes of acute/recent human immunodeficiency virus type 1 infection in Barcelona, Spain (1997-2015): a prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 878–884 (2019).
54. Detels, R. *et al.* The multicenter AIDS Cohort Study, 1983 to *Public Health* **126**, 196–198 (2012).
55. Fowke, K. R. *et al.* Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* **348**, 1347–1351 (1996).
56. Luo, M. *et al.* A Genetic Polymorphism of *FREM1* Is Associated with Resistance against HIV Infection in the Pumwani Sex Worker Cohort. *J. Virol.* **86**, 11899 (2012).
57. Rapatski, B., Tolosa, J., Rapatski, B. & Tolosa, J. Modeling and analysis of the San Francisco City Clinic Cohort (SFCCC) HIV-epidemic including treatment. *Math. Biosci. Eng.* **2014 3599** **11**, 599–619 (2014).
58. Ssemwanga, D. *et al.* The Molecular Epidemiology and Transmission Dynamics of HIV Type 1 in a General Population Cohort in Uganda. *Viruses* **12**, (2020).
59. Scherrer, A. U. *et al.* Cohort Profile Update: The Swiss HIV Cohort Study (SHCS). *Int. J. Epidemiol.* (2021). doi:10.1093/IJE/DYAB141
60. Barkan, S. E. *et al.* The Women's Interagency HIV Study. WIHS Collaborative Study Group. *Epidemiology* **9**, 117–125 (1998).
61. Templeton, D. J. *et al.* Circumcision and risk of HIV infection in Australian homosexual men. *AIDS* **23**, 2347–2351

(2009).

62. Lane, J. *et al.* A genome-wide association study of resistance to HIV infection in highly exposed uninfected individuals with hemophilia A. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1903–1910 (2013).
63. Vince, N. *et al.* HLA class I and KIR genes do not protect against HIV type 1 infection in highly exposed uninfected individuals with hemophilia A. *J. Infect. Dis.* **210**, 1047–1051 (2014).
64. O'Brien, S. J. & Nelson, G. W. Human genes that limit AIDS. *Nature Genetics* **36**, 565–574 (2004).
65. Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science (80-.)*. **273**, 1856–1862 (1996).
66. Chatterjee, A., Rathore, A., Vidyant, S., Kakkar, K. & Dhole, T. N. Chemokines and Chemokine Receptors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. *Disease Markers* **32**, 143–151 (2012).
67. Anzala, A. O. *et al.* CCR2-641 allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. *Lancet* **351**, 1632–1633 (1998).
68. An, P. *et al.* Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10002–10007 (2002).
69. Liu, S. & Zhu, H. Association Between Polymorphism of SDF1 (CXCL12) Gene and HIV-1 Susceptibility: A Meta-Analysis. *Curr. HIV Res.* **9**, 112–119 (2011).
70. Limou, S. *et al.* Multiple-cohort genetic association study reveals CXCR6 as a new chemokine receptor involved in long-term nonprogression to AIDS. *J. Infect. Dis.* **202**, 908–915 (2010).
71. Vidal, F. *et al.* Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the CX3CR1 249I variant allele. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **40**, 527–531 (2005).

72. Kim, Y. C. & Jeong, B. H. Strong association of the Rs4986790 single nucleotide polymorphism (SNP) of the toll-like receptor 4 (TLR4) gene with human immunodeficiency virus (HIV) infection: A meta-analysis. *Genes (Basel)*. **12**, 1–8 (2021).
73. Shaikh, N., Nirmalkar, A. & Thakar, M. Polymorphisms in Toll-Like Receptors (TLRs)-7 and 9 Genes in Indian Population with Progressive and Nonprogressive HIV-1 Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **35**, 577–582 (2019).
74. Oh, D. -Y. *et al.* A Functional Toll-Like Receptor 8 Variant Is Associated with HIV Disease Restriction. *J. Infect. Dis.* **198**, 701–709 (2008).
75. Berg, R. K. *et al.* Genomic HIV RNA Induces Innate Immune Responses through RIG-I-Dependent Sensing of Secondary-Structured RNA. *PLoS One* **7**, e29291 (2012).
76. Liu, H. *et al.* Repeat-Region Polymorphisms in the Gene for the Dendritic Cell–Specific Intercellular Adhesion Molecule-3–Grabbing Nonintegrin–Related Molecule: Effects on HIV-1 Susceptibility. *J. Infect. Dis.* **193**, 698–702 (2006).
77. Martin, M. P. *et al.* Association of DC-SIGN Promoter Polymorphism with Increased Risk for Parenteral, but Not Mucosal, Acquisition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* **78**, 14053–14056 (2004).
78. Zupin, L., Polesello, V., Segat, L., Kuhn, L. & Crovella, S. MBL2 genetic polymorphisms and HIV-1 mother-to-child transmission in Zambia. *Immunol. Res.* **64**, 775–784 (2016).
79. Mhandire, K. *et al.* How Does mother-to-child transmission of HIV differ among African populations? Lessons from MBL2 genetic variation in Zimbabweans. *Omi. A J. Integr. Biol.* **18**, 454–460 (2014).
80. An, P. *et al.* APOBEC3G Genetic Variants and Their Influence on the Progression to AIDS. *J. Virol.* **78**, 11070–11076 (2004).
81. Wittkopp, C. J., Adolph, M. B., Wu, L. I., Chelico, L. &

- Emerman, M. A Single Nucleotide Polymorphism in Human APOBEC3C Enhances Restriction of Lentiviruses. *PLOS Pathog.* **12**, e1005865 (2016).
82. Coon, S., Wang, D. & Wu, L. Polymorphisms of the SAMHD1 gene are not associated with the infection and natural control of HIV type 1 in Europeans and African-Americans. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**, 1565–1573 (2012).
 83. Sironi, M. *et al.* Evolutionary analysis identifies an MX2 haplotype associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 2402–14 (2014).
 84. Hancock, D. B. *et al.* Associations of common variants in the BST2 region with HIV-1 acquisition in African American and European American people who inject drugs. *AIDS* **29**, 767–777 (2015).
 85. Celerino da Silva, R. *et al.* TRIM5 gene polymorphisms in HIV-1-infected patients and healthy controls from Northeastern Brazil. *Immunol. Res.* **64**, 1237–1242 (2016).
 86. Goldschmidt, V. *et al.* Role of common human TRIM5 α variants in HIV-1 disease progression. *Retrovirology* **3**, (2006).
 87. Nakayama, E. E. *et al.* A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5 α linker region affects its anti-HIV type 1 activity and susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **29**, 919–924 (2013).
 88. Sironi, M. *et al.* A regulatory polymorphism in HAVCR2 modulates susceptibility to HIV-1 infection. *PLoS One* **9**, (2014).
 89. Rits, M. A. N., van Dort, K. A. & Kootstra, N. A. Polymorphisms in the regulatory region of the cyclophilin A gene influence the susceptibility for HIV-1 infection. *PLoS One* **3**, (2008).
 90. Wichukchinda, N. *et al.* Protective Effects of IL4-589T and RANTES-28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *AIDS* **20**, 189–196 (2006).

91. Shin, H. D. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14467–14472 (2000).
92. Pang, X. X. *et al.* Association of interleukin-27 gene polymorphisms with susceptibility to HIV infection and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 2410–2418 (2019).
93. de la Torre, M. S. *et al.* Vitamin D Receptor Gene Haplotypes and Susceptibility to HIV-1 Infection in Injection Drug Users. *J. Infect. Dis.* **197**, 405–410 (2008).
94. Torres, C. *et al.* Immunophenotype of Vitamin D Receptor Polymorphism Associated to Risk of HIV-1 Infection and Rate of Disease Progression. *Curr. HIV Res.* **8**, 487–492 (2010).
95. Real, L. M. *et al.* IFNL4 rs368234815 polymorphism is associated with innate resistance to HIV-1 infection. *AIDS* **29**, 1895–1898 (2015).
96. Jaimes-Bernal, C. *et al.* A Knockout IFNL4 Variant Is Associated with Protection from Sexually Transmitted HIV-1 Infection. *J. Infect. Dis.* **219**, 772–776 (2019).
97. Zhang, Y. *et al.* Interferon-induced transmembrane protein-3 rs12252-C is associated with rapid progression of acute HIV-1 infection in Chinese MSM cohort. *AIDS* **29**, 889–894 (2015).
98. Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **31**, 429–434 (2002).
99. Carrington, M. & O'Brien, S. J. The Influence of HLA Genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med.* **54**, 535–551 (2003).
100. Migueles, S. A. *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2709–2714 (2000).
101. Thomas, R. *et al.* HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C.

- Nat. Genet.* **41**, 1290–1294 (2009).
102. Mehlotra, R. K. *et al.* CCR2, CCR5, and CXCL12 variation and HIV/AIDS in Papua New Guinea. *Infect. Genet. Evol.* **36**, 165–173 (2015).
 103. Gupta, A. & Padh, H. Analysis of CCR5 and SDF-1 genetic variants and HIV infection in Indian population. *Int. J. Immunogenet.* **42**, 270–278 (2015).
 104. Nkenfou, C. N., Mekue, L. C. M., Nana, C. T. & Kuate, J. R. Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the West Region of Cameroon. *BMC Res. Notes* **6**, (2013).
 105. Khabour, O. F., Abu-Haweleh, L. J. & Alzoubi, K. H. Distribution of CCR-5 Δ 32, CCR2-64I, and SDF-1-3'A alleles among Jordanians. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **29**, 151–155 (2013).
 106. John, G. C. *et al.* Maternal SDF1 3'A Polymorphism Is Associated with Increased Perinatal Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *J. Virol.* **74**, 5736–5739 (2000).
 107. Zhao, J. *et al.* The Effects of *RANTES* Polymorphisms on Susceptibility to HIV-1 Infection and Disease Progression: Evidence from an Updated Meta-Analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **32**, 517–528 (2016).
 108. Ellwanger, J. H., Kaminski, V. de L., Rodrigues, A. G., Kulmann-Leal, B. & Chies, J. A. B. CCR5 and CCR5 Δ 32 in bacterial and parasitic infections: Thinking chemokine receptors outside the HIV box. *International Journal of Immunogenetics* **47**, 261–285 (2020).
 109. De Silva, E. & Stumpf, M. P. H. HIV and the CCR5- Δ 32 resistance allele. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**, 1–12 (2004).
 110. Farissi, F. Z. *et al.* Investigation of CCR5- Δ 32 (rs333) genetic polymorphism frequency and its relationship with HIV-1 susceptibility and disease progression: A Moroccan case-control study. *Gene Reports* **15**, 100391 (2019).

111. Bacon, M. C. *et al.* The women's interagency HIV study: An observational cohort brings clinical sciences to the bench. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**, 1013–1019 (2005).
112. Mehlotra, R. K. CCR5 Promoter Polymorphism –2459G > A: Forgotten or Ignored? *Cells* **8**, 651 (2019).
113. Mesman, A. W. & Geijtenbeek, T. B. Pattern recognition receptors in HIV transmission. *Front. Immunol.* **3**, 1–9 (2012).
114. Rich, R. R. *et al.* *Clinical Immunology*. (2013).
115. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).
116. Gutjahr, A. *et al.* New chimeric TLR7/NOD2 agonist is a potent adjuvant to induce mucosal immune responses. *EBioMedicine* **58**, 102922 (2020).
117. Castaño, M. E. & Urcuqui, S. Proteínas celulares cómplices de las proteínas regulatorias y accesorias del VIH-1. *Colomb. Med.* **35**, 112–120 (2004).
118. Abraham, L. & Fackler, O. T. HIV-1 Nef: A multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Communication and Signaling* **10**, 1–11 (2012).
119. Jia, X., Zhao, Q. & Xiong, Y. HIV suppression by host restriction factors and viral immune evasion. *Current Opinion in Structural Biology* **31**, 106–114 (2015).
120. Moreno-Valencia, Y., Xonái Álvarez-García, L. & Armando Vázquez-Pérez, J. Factores celulares que restringen la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH): nuevas esperanzas en la terapia antirretroviral. *Rev. Investig. Clínica* **66**, 359–368 (2014).
121. Zaunders, J. & Van Bockel, D. Innate and adaptive immunity in long-term non-progression in HIV disease. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
122. Tsiara, C. G. *et al.* Interleukin gene polymorphisms and

- susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *J. Genet.* **97**, 235–251 (2018).
123. Jiang, C. *et al.* Association between the Interleukin-10-1082G/A, -592C/A, -819C/T Gene Polymorphism and HIV-1 Susceptibility: A Meta-Analysis. *AIDS Research and Human Retroviruses* **33**, 61–67 (2017).
 124. Jiménez-Sousa, M. Á., Martínez, I., Medrano, L. M., Fernández-Rodríguez, A. & Resino, S. Vitamin D in Human Immunodeficiency Virus Infection: Influence on Immunity and Disease. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 125. Mehlotra, R. K., Zimmerman, P. A. & Weinberg, A. Defensin gene variation and HIV/AIDS: a comprehensive perspective needed. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 687–692 (2016).
 126. Chung, J. H. *et al.* Structure-based glycoengineering of interferon lambda 4 enhances its productivity and anti-viral potency. *Cytokine* **125**, 154833 (2020).
 127. Roy, N. *et al.* IFNL4 haplotype, linkage disequilibrium and their influence on virological response to hepatitis C virus infection in Indian population. *VirusDisease* **30**, 344 (2019).
 128. O'Brien, T. R., Prokunina-Olsson, L. & Donnelly, R. P. IFN- λ 4: The paradoxical new member of the interferon lambda family. *J. Interf. Cytokine Res.* **34**, 829–838 (2014).
 129. Zhang, Q. *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science (80-.).* **370**, (2020).
 130. Wack, A., Terczyńska-Dyla, E. & Hartmann, R. Guarding the frontiers: The biology of type III interferons. *Nature Immunology* **16**, 802–809 (2015).
 131. Lazear, H. M., Schoggins, J. W. & Diamond, M. S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* **50**, 907–923 (2019).
 132. Syedbasha, M. & Egli, A. Interferon Lambda : Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **8**, 1–13 (2017).

133. Nan, Y., Nan, G. & Zhang, Y. J. Interferon induction by RNA viruses and antagonism by viral pathogens. *Viruses* **6**, 4999–5027 (2014).
134. Hemann, E. A., Gale, M. & Savan, R. Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. *Front. Immunol.* **8**, 1707 (2017).
135. Coto-Llerena, M. *et al.* Interferon lambda 4 can directly activate human CD19+ B cells and CD8+ T cells. *Life Sci. Alliance* **4**, (2021).
136. Fang, M. Z., Jackson, S. S. & O'Brien, T. R. IFNL4: Notable variants and associated phenotypes'. *Gene* **730**, 1–8 (2020).
137. Prokunina-Olsson, L. Genetics of the Human Interferon Lambda Region. *J. Interf. Cytokine Res.* **39**, 599–608 (2019).
138. Da Silveira Alves, C. F. *et al.* Interferon lambda 4 (IFNL4) gene polymorphism is associated with spontaneous clearance of HCV in HIV-1 positive patients. *Genet. Mol. Biol.* **39**, 374–379 (2016).
139. Aka, P. V *et al.* Association of the IFNL4 - Δ G Allele With Impaired Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus. *J. Infect. Dis.* **209**, 350–354 (2014).
140. Prokunina-Olsson, L. *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a novel interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet* **45**, 164–171 (2013).
141. Machmach, K. *et al.* IFNL4 ss469415590 polymorphism is associated with unfavourable clinical and immunological status in HIV-infected individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 289.e1-289.e4 (2015).
142. Dominguez-Molina, B. *et al.* HLA-B*57 and IFNL4-related polymorphisms are associated with protection against HIV-1 disease progression in controllers. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 621–628 (2016).
143. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. &

- Roumenina, L. T. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262 (2015).
144. Le Friec, G. & Kemper, C. Inflammatory Products of the Complement Pathway. *Encycl. Immunobiol.* **2**, 332–336 (2016).
 145. Rus, H., Cudrici, C. & Niculescu, F. The role of the complement system in innate immunity. *Immunol. Res.* **33**, 103–112 (2005).
 146. Wang, H. & Liu, M. Complement C4, Infections, and Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **0**, 2682 (2021).
 147. Stoiber, H., Banki, Z., Wilflingseder, D. & Dierich, M. P. Complement-HIV interactions during all steps of viral pathogenesis. *Vaccine* **26**, 3046–3054 (2008).
 148. Tegla, C. A. *et al.* Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol. Res.* **51**, 45–60 (2011).
 149. Conigliaro, P. *et al.* Complement, infection, and autoimmunity. *Curr. Opin. Rheumatol.* **31**, 532–541 (2019).
 150. Schröder-Braunstein, J. & Kirschfink, M. Complement deficiencies and dysregulation: Pathophysiological consequences, modern analysis, and clinical management. *Molecular Immunology* **114**, 299–311 (2019).
 151. Mayilyan, K. R. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein and Cell* **3**, 487–496 (2012).
 152. Sullivan, K. E. Complement Deficiencies. *Pediatr. Allergy Princ. Pract. Third Ed.* 90-100.e4 (2016). doi:10.1016/B978-0-323-29875-9.00010-0
 153. Boteva, L. *et al.* Genetically determined partial complement C4 deficiency states are not independent risk factors for SLE in UK and Spanish populations. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 445–456 (2012).
 154. Blanchong, C. A. *et al.* Genetic, structural and functional diversities of human complement components C4A and

- C4B and their mouse homologues, Slp and C4. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 365–92 (2001).
155. Szilagyi, A. *et al.* Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes. *BMC Genet.* **7**, 1 (2006).
 156. Colten, H. R. Navigating the maze of complement genetics: a guide for clinicians. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2**, 379–384 (2002).
 157. Wu, Y. L. *et al.* Sensitive and Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays to Accurately Determine Copy Number Variations (CNVs) of Human Complement C4A, C4B, C4-Long, C4-Short, and RCCX Modules: Elucidation of C4 CNVs in 50 Consanguineous Subjects with Defined HL. *J. Immunol.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.179.5.3012
 158. Flachsbart, F. *et al.* Investigation of Complement Component C4 Copy Number Variation in Human Longevity. *PLoS One* **9**, e86188 (2014).
 159. Yu, C. Y. *et al.* Dancing with complement C4 and the RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules of the major histocompatibility complex. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**, 217–92 (2003).
 160. Sekar, A. *et al.* Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* **530**, 177–183 (2016).
 161. Jaimes-Bernal, C. P., Trujillo, M., Márquez, F. J. & Caruz, A. Complement C4 Gene Copy Number Variation Genotyping by High Resolution Melting PCR. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6309 (2020).
 162. Paakkanen, R. *et al.* Copy Number Analysis of Complement C4A, C4B and C4A Silencing Mutation by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *PLoS One* **7**, e38813 (2012).
 163. Wouters, D. *et al.* High-throughput analysis of the C4 polymorphism by a combination of MLPA and isotype-specific ELISA's. *Mol. Immunol.* **46**, 592–600 (2009).
 164. Lv, Y. *et al.* Confirmation of C4 gene copy number variation

and the association with systemic lupus erythematosus in Chinese Han population. *Rheumatol. Int.* **32**, 3047–3053 (2012).

165. Hou, S. *et al.* Copy number variations of complement component c4 are associated with Behçet's disease but not with ankylosing spondylitis associated with acute anterior uveitis. *Arthritis Rheum.* **65**, 2963–2970 (2013).
166. Costa Pereira, K. M. *et al.* Impact of C4, C4A and C4B gene copy number variation in the susceptibility, phenotype and progression of systemic lupus erythematosus. *Adv. Rheumatol. (London, England)* **59**, 36 (2019).
167. Grassmann, F. *et al.* Multiallelic copy number variation in the complement component 4A (C4A) gene is associated with late-stage age-related macular degeneration (AMD). *J. Neuroinflammation* **13**, 1–9 (2016).
168. Yang, Y. *et al.* Gene Copy-Number Variation and Associated Polymorphisms of Complement Component C4 in Human Systemic Lupus Erythematosus (SLE): Low Copy Number Is a Risk Factor for and High Copy Number Is a Protective Factor against SLE Susceptibility in European America. *Am. J. Hum. Genet.* (2007). doi:10.1086/518257
169. Cleynen, I. *et al.* Genome-Wide Copy Number Variation Scan Identifies Complement Component C4 as Novel Susceptibility Gene for Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 505–15 (2016).
170. Wu, Y. L. *et al.* Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: Complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus. *Cytogenetic and Genome Research* **123**, 131–141 (2009).
171. Fu, W., Zhang, F., Wang, Y., Gu, X. & Jin, L. Identification of copy number variation hotspots in human populations. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 494–504 (2010).
172. Chapek, H. *et al.* Combined familial C7 and C4B deficiency in an adult with meningococcal disease. *Clin. Exp. Immunol.* **67**, 55–58 (1987).

173. Cameron, P. U., Cobain, T. J., Zhang, W. J., Kay, P. H. & Dawkins, R. L. Influence of C4 null genes on infection with human immunodeficiency virus. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*. **296**, 1627–8 (1988).
174. Rowe, P. C., McLean, R. H., Wood, R. A., Leggiadro, R. J. & Winkelstein, J. A. Association of Homozygous C4B Deficiency with Bacterial Meningitis. *J. Infect. Dis.* **160**, 448–451 (1989).
175. Bishof, N. A., Welch, T. R. & Beischel, L. S. C4B Deficiency: A Risk Factor for Bacteremia with Encapsulated Organisms. *J. Infect. Dis.* **162**, 248–250 (1990).
176. Liu, Y. H. *et al.* Association between copy number variation of complement component C4 and Graves' disease. *J. Biomed. Sci.* **18**, 71 (2011).
177. Nissilä, E. *et al.* C4B gene influences intestinal microbiota through complement activation in patients with paediatric-onset inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* **190**, 394–405 (2017).
178. Liesmaa, I., Paakkanen, R., Järvinen, A., Valtonen, V. & Lokki, M. L. Clinical features of patients with homozygous complement C4A or C4B deficiency. *PLoS One* **13**, (2018).
179. Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S. & Ahmad, A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1–26 (2008).
180. Zhao, J. *et al.* The Role of Killer Immunoglobulin-Like Receptor Genes in Susceptibility to HIV-1 Infection and Disease Progression: A Meta-Analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **35**, 948–959 (2019).
181. Altfeld, M. *et al.* Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* **17**, 2581–2591 (2003).
182. Lee, J. H. & Jeon, J. T. Methods to detect and analyze copy number variations at the genome-wide and locus-specific levels. *Cytogenet. Genome Res.* **123**, 333–342 (2008).

183. Fernando, M. M. A. *et al.* Assessment of complement C4 gene copy number using the paralog ratio test. *Hum. Mutat.* **31**, 866–874 (2010).
184. Pereira, K. M. C. *et al.* Low C4, C4A and C4B gene copy numbers are stronger risk factors for juvenile-onset than for adult-onset systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **55**, 869–873 (2016).
185. Dobrovic, A. High-resolution assessment of copy number variation. *Clin. Chem.* **61**, 684–5 (2015).
186. Turner, A., Sasse, J. & Varadi, A. Development and validation of a high throughput, closed tube method for the determination of haemoglobin alpha gene (HBA1 and HBA2) numbers by gene ratio assay copy enumeration-PCR (GRACE-PCR). *BMC Med. Genet.* **16**, 1–10 (2015).
187. Torrezan, G. T. *et al.* A novel SYBR-based duplex qPCR for the detection of gene dosage: detection of an APC large deletion in a familial adenomatous polyposis patient with an unusual phenotype. *BMC Med. Genet.* **13**, 55 (2012).
188. Karlsson, E. K., Kwiatkowski, D. P. & Sabeti, P. C. Natural selection and infectious disease in human populations. *Nature Reviews Genetics* **15**, 379–393 (2014).
189. Donaldson, P., Daly, A., Ermini, L. & Bevitt, D. *Genetics of complex disease.* (2016).
190. Burgner, D., Jamieson, S. E. & Blackwell, J. M. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect. Dis.* **6**, 653–663 (2006).
191. Hirschhorn, J. N., Lohmueller, K., Byrne, E. & Hirschhorn, K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet. Med.* **4**, 45–61 (2002).
192. Alcaïs, A., Abel, L. & Casanova, J.-L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J. Clin. Invest.* **119**, 2506–2514 (2009).
193. Withrock, I. C. *et al.* Genetic diseases conferring resistance to infectious diseases. *Genes and Diseases* **2**, 247–254

(2015).

194. Hebbel, R. P. Sickle hemoglobin instability: A mechanism for martial protection. *Redox Rep.* **8**, 238–240 (2003).
195. Aluoch, J. R. Higher resistance to Plasmodium falciparum infection in patients with homozygous sickle cell disease in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Heal.* **2**, 568–571 (1997).
196. Preuss, J., Jortzik, E. & Becker, K. Glucose-6-phosphate metabolism in Plasmodium falciparum. *IUBMB Life* **64**, 603–611 (2012).
197. Luzzi, G. A. *et al.* Surface antigen expression on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is modified in α - and β -thalassemia. *J. Exp. Med.* **173**, 785–791 (1991).
198. Gabriel, S. E., Brigman, K. N., Koller, B. H., Boucher, R. C. & Stutts, M. J. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science (80-)*. **266**, 107–109 (1994).
199. Petersen, G. M. *et al.* The Tay-Sachs disease gene in North American Jewish populations: Geographic variations and origin. *Am. J. Hum. Genet.* **35**, 1258–1269 (1983).
200. Moalem, S., Weinberg, E. D. & Percy, M. E. Hemochromatosis and the enigma of misplaced iron: Implications for infectious disease and survival. *BioMetals* **17**, 135–139 (2004).
201. Osuna-Ramos, J. F., Reyes-Ruiz, J. M. & Del Ángel, R. M. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **8**, 388 (2018).
202. Carette, J. E. *et al.* Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**, 340–343 (2011).
203. Chen, H. *et al.* Psoriasis patients are enriched for genetic variants that protect against hiv-1 disease. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
204. Klebanov, N. Genetic Predisposition to Infectious Disease.

- Cureus* **10**, 1–8 (2018).
205. Chapman, S. J. & Hill, A. V. S. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 175–188 (2012).
 206. Hernández-Martínez, C. *et al.* Conceptos básicos de las inmunodeficiencias primarias. *Rev Alerg Méx* **63**, 180–189 (2016).
 207. de la Calle, V. G., Pérez-Andrés, M. & Puig Morón, N. Inmunodeficiencias primarias. *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado* **12**, 1191–1200 (2016).
 208. Mozzi, A., Pontremoli, C. & Sironi, M. Genetic susceptibility to infectious diseases: Current status and future perspectives from genome-wide approaches. *Infect. Genet. Evol.* **66**, 286–307 (2018).
 209. Hill, A. V. Evolution, revolution and heresy in the genetics of infectious disease susceptibility. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 840–9 (2012).
 210. Manry, J. & Quintana-Murci, L. A genome-wide perspective of human diversity and its implications in infectious disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, (2013).
 211. Blackwell, J. M., Jamieson, S. E. & Burgner, D. HLA and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 370–385 (2009).
 212. Limou, S. *et al.* Multicohort genomewide association study reveals a new signal of protection against HIV-1 acquisition. *J. Infect. Dis.* **205**, 1155–1162 (2012).
 213. Clerc, S. Le *et al.* Genomewide Association Study of a Rapid Progression Cohort Identifies New Susceptibility Alleles for AIDS (ANRS Genomewide Association Study 03). *J. Infect. Dis.* **200**, 1194–1201 (2009).
 214. Fellay, J. *et al.* Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet.* **5**, (2009).
 215. Herbeck, J. T. *et al.* Multistage genomewide association study identifies a locus at 1q41 associated with rate of HIV-1 disease progression to clinical AIDS. *J. Infect. Dis.* **201**,

618–626 (2010).

216. Bol, S. M. *et al.* Genome-wide association study identifies single nucleotide polymorphism in *DYRK1A* associated with replication of HIV-1 in monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **6**, (2011).
217. Troyer, J. L. *et al.* Genome-wide association study implicates *PARD3B*-based AIDS restriction. *J. Infect. Dis.* **203**, 1491–1502 (2011).
218. van Manen, D. *et al.* Genome-Wide association scan in HIV-1-infected individuals identifying variants influencing disease course. *PLoS One* **6**, (2011).
219. McLaren, P. J. *et al.* Association study of common genetic variants and HIV-1 acquisition in 6,300 infected cases and 7,200 controls. *PLoS Pathog.* **9**, e1003515 (2013).
220. Lingappa, J. R. *et al.* Genomewide association study for determinants of HIV-1 acquisition and viral set point in HIV-1 serodiscordant couples with quantified virus exposure. *PLoS One* **6**, e28632 (2011).
221. Wei, Z. *et al.* Genome-Wide Association Studies of HIV-1 Host Control in Ethnically Diverse Chinese Populations. *Sci. Rep.* **5**, 10879 (2015).
222. Pereyra, F. *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science (80-.).* **330**, 1551–1557 (2010).
223. Johnson, E. O. *et al.* Novel genetic locus implicated for HIV-1 acquisition with putative regulatory links to HIV replication and infectivity: A genome-wide association study. *PLoS One* **10**, (2015).
224. Ekenberg, C. *et al.* Association between Single-Nucleotide Polymorphisms in HLA Alleles and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Load in Demographically Diverse, Antiretroviral Therapy-Naive Participants from the Strategic Timing of AntiRetroviral Treatment Trial. *J. Infect. Dis.* **220**, 1325–1334 (2019).
225. Gingras, S. N., Tang, D., Tuff, J. & McLaren, P. J. Minding

the gap in HIV host genetics: opportunities and challenges. *Human Genetics* **139**, 865–875 (2020).

226. Ionita-Laza, I., Rogers, A. J., Lange, C., Raby, B. A. & Lee, C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics* **93**, 22–26 (2009).
227. Geller, G. *et al.* Genomics and infectious disease: A call to identify the ethical, legal and social implications for public health and clinical practice. *Genome Med.* **6**, 1–13 (2014).
228. Hau, L. T. Conserved extended haplotypes in MHC of Singaporean Chinese. (National University of Singapore. ScholarBank@NUS Repository., 2014).
229. Flynn, N. M. *et al.* Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**, 654–65 (2005).
230. Blanchong, C. A. *et al.* Genetic, structural and functional diversities of human complement components C4A and C4B and their mouse homologues, Slp and C4. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 365–392 (2001).
231. Nowakowska, B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J. Appl. Genet.* **58**, 449–457 (2017).
232. Li, N. *et al.* Association between C4, C4A, and C4B copy number variations and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
233. Gilliam, B. E., Wolff, A. E. & Moore, T. L. Partial C4 Deficiency in Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. *JCR J. Clin. Rheumatol.* **13**, 256–260 (2007).
234. Zorzetto, M. *et al.* Complement C4A and C4B gene copy number study in Alzheimer's disease patients. *Curr. Alzheimer Res.* **13**, 1–1 (2016).
235. Milich, D. R. Influence of C4A deficiency on nonresponse to HBsAg vaccination: a new immune response gene. *J. Hepatol.* **37**, 396–399 (2002).

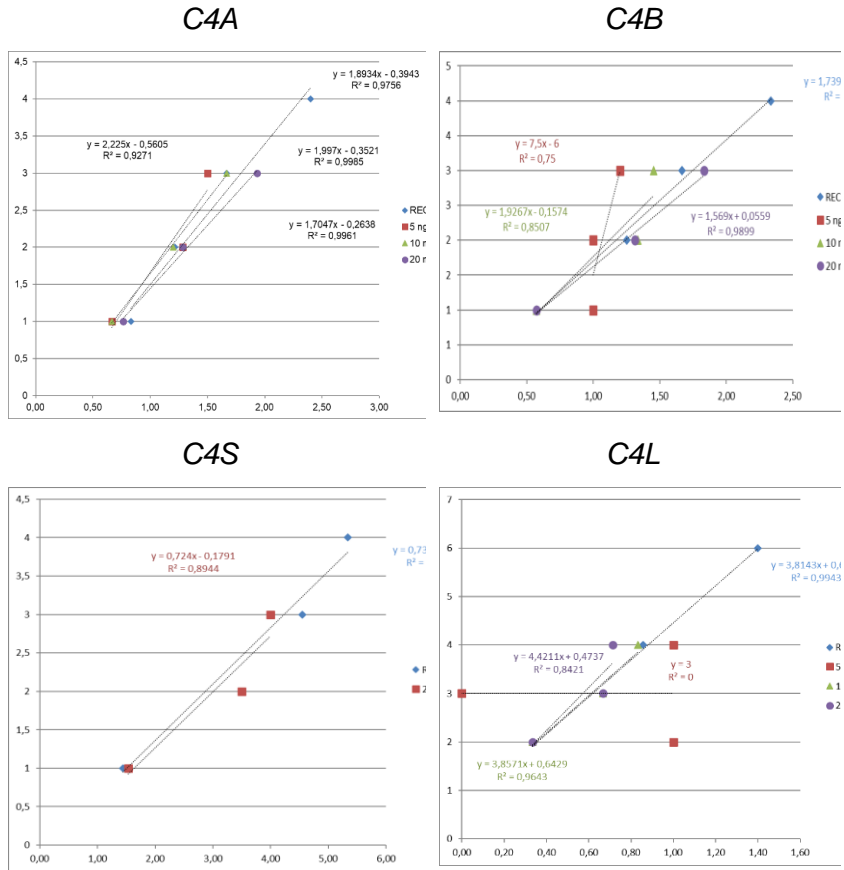
236. Höhler, T. *et al.* C4A deficiency and nonresponse to hepatitis B vaccination. *J. Hepatol.* **37**, 387–92 (2002).
237. Kainulainen, L. *et al.* C4A deficiency in children and adolescents with recurrent respiratory infections. *Hum. Immunol.* **73**, 498–501 (2012).
238. Wu, Y. L. *et al.* Sensitive and Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays to Accurately Determine Copy Number Variations (CNVs) of Human Complement C4A, C4B, C4-Long, C4-Short, and RCCX Modules: Elucidation of C4 CNVs in 50 Consanguineous Subjects with Defined HLA Genotypes. *J. Immunol.* **179**, 3012–3025 (2007).
239. Hollox, E. J. & Hoh, B.-P. Human gene copy number variation and infectious disease. *Hum. Genet.* **133**, 1217–1233 (2014).
240. Cassinari, K. *et al.* A Simple, Universal, and Cost-Efficient Digital PCR Method for the Targeted Analysis of Copy Number Variations. *Clin. Chem.* **65**, 1153–1160 (2019).
241. Yang, Y. *et al.* Diversity in Intrinsic Strengths of the Human Complement System: Serum C4 Protein Concentrations Correlate with C4 Gene Size and Polygenic Variations, Hemolytic Activities, and Body Mass Index . *J. Immunol.* **171**, 2734–2745 (2003).
242. Turner, A., Sasse, J. & Varadi, A. Rapid detection of pathological mutations and deletions of the haemoglobin beta gene (HBB) by High Resolution Melting (HRM) analysis and Gene Ratio Analysis Copy Enumeration PCR (GRACE-PCR). *BMC Med. Genet.* **17**, 75 (2016).
243. Real, L. M. *et al.* IFNL4 ss469415590 Variant Shows Similar Performance to rs12979860 as Predictor of Response to Treatment against Hepatitis C Virus Genotype 1 or 4 in Caucasians. *PLoS One* **9**, e95515 (2014).
244. Grzegorzewska, A. E. *et al.* Polymorphism rs368234815 of interferon lambda 4 gene and spontaneous clearance of hepatitis C virus in haemodialysis patients: a case-control study. *BMC Infect. Dis.* 2021 211 **21**, 1–12 (2021).

245. Key, F. M. *et al.* Selection on a Variant Associated with Improved Viral Clearance Drives Local, Adaptive Pseudogenization of Interferon Lambda 4 (IFNL4). *PLoS Genet.* **10**, (2014).
246. Rugwizangoga, B. *et al.* IFNL4 Genotypes Predict Clearance of RNA Viruses in Rwandan Children With Upper Respiratory Tract Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 340 (2019).
247. Onabajo, O. O., Muchmore, B. & Prokunina-Olsson, L. The IFN- λ 4 Conundrum: When a Good Interferon Goes Bad. *J. Interf. Cytokine Res.* **39**, 636 (2019).
248. Martin, M. P. *et al.* IL28B Polymorphism Does Not Determine Outcomes of Hepatitis B Virus or HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **202**, 1749–1753 (2010).
249. Obajemu, A. A. *et al.* IFN- λ 4 Attenuates Antiviral Responses by Enhancing Negative Regulation of IFN Signaling. *J. Immunol.* **199**, 3808–3820 (2017).
250. Fan, W. *et al.* IFN- λ 4 desensitizes the response to IFN- α treatment in chronic hepatitis C through long-term induction of USP18. *J. Gen. Virol.* **97**, 2210–20 (2016).
251. Terczyńska-Dyła, E. *et al.* Reduced IFNL4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat. Commun.* **5**, 5699 (2014).
252. Bordi, L. *et al.* IFNL4 and IFNL3 Associated Polymorphisms Strongly Influence the Spontaneous IFN-Alpha Receptor-1 Expression in HCV-Infected Patients. *PLoS One* **10**, e0117397 (2015).
253. Crow, Y. J. Type I interferonopathies: Mendelian type I interferon up-regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 7–12 (2015).
254. Jüptner, M. *et al.* Low copy numbers of complement C4 and homozygous deficiency of C4A may predispose to severe disease and earlier disease onset in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **27**, 600–609 (2018).

255. Carrozza, C., Foca, L., De Paolis, E. & Concolino, P. Genes and Pseudogenes: Complexity of the RCCX Locus and Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **12**, 941 (2021).

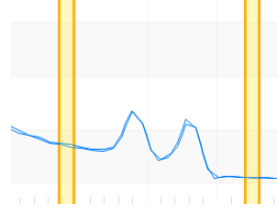
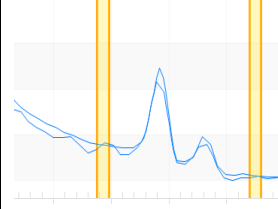
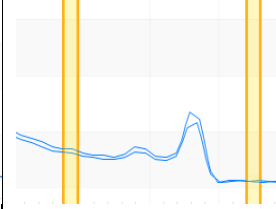
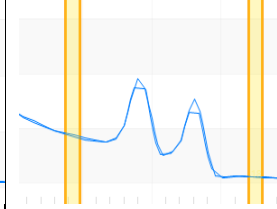
9 Anexos

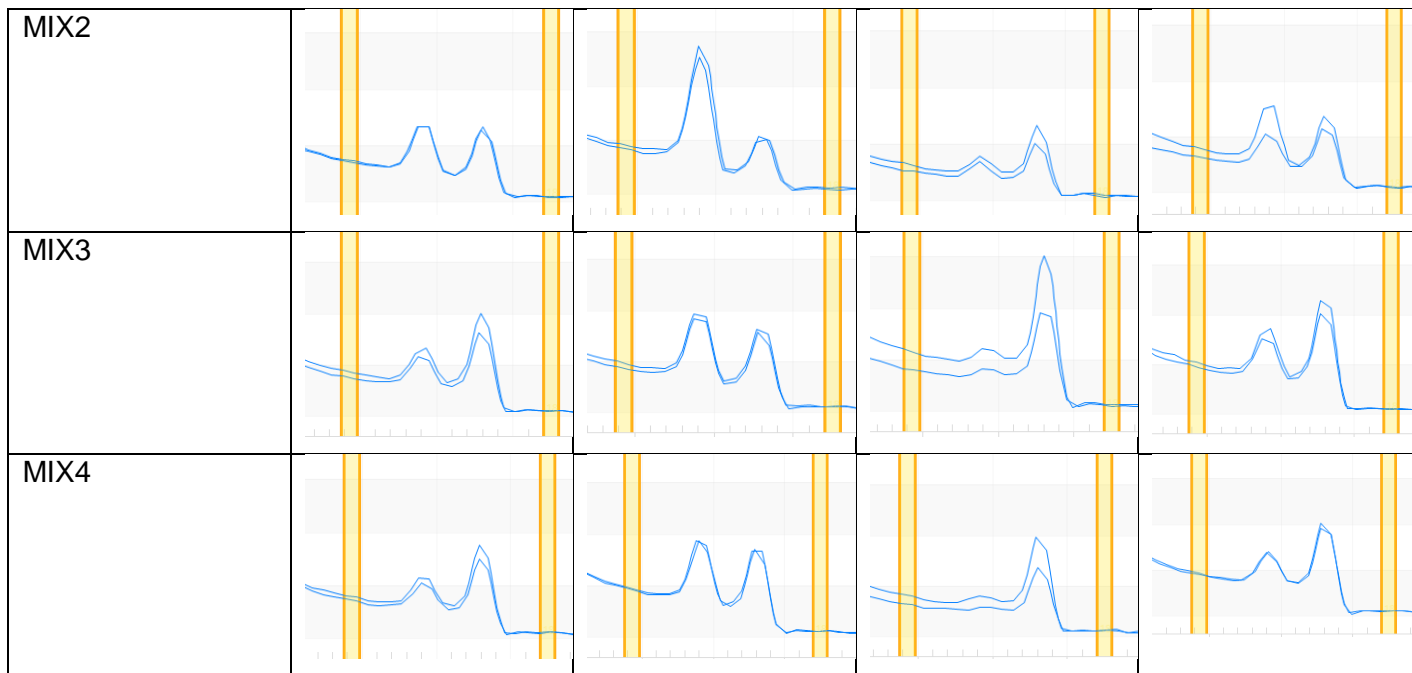
Anexo A. Ensayo con diferentes concentraciones de ADN molde



Anexo B

Comparación de picos obtenidos con los diferentes mix

Mezcla	MIX1	MIX2	MIX3	MIX4
MM (luminaris)	10	10	10	10
C4B primers	0,5	0,5	0,6	0,8
RP1 primers	0,6	1,0	0,4	0,7
Agua miliq	4,9	4,5	5,0	4,5
ADN (5ng/ul)	4	4	4	4
Vol. Final por reacción	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
	1C	2C	3C	4C
MIX1				



10 Curriculum vitae

Claudia Patricia Jaimes Bernal

Datos de contacto:

Email. cpjaimes@uniboyaca.edu.co
ORCID 0000-0002-8034-190X
Linkedin <https://www.linkedin.com/in/claudia-p-jaimes-bernal-b086074b/>
Google scholar [Claudia Patricia Jaimes-Bernal - Google Académico](https://scholar.google.com/citations?hl=es&user=CPJaimes)
ID Scopus <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57205595798>
CvLAC <https://n9.cl/qiad85>

Formación académica

Magister Scientiae Genética Humana (01 de agosto de 2000 - 01 de abril de 2004)

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Adquisición de destrezas en procesos de biología molecular: extracción de ácidos nucleicos, electroforesis y reacción en cadena de la polimerasa.

Ejecución de Tesis de grado titulado: “Contribución a la caracterización de cepas nativas de *Clostridium spp* solventogénicos incrementando la capacidad de tipificación de AFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción amplificados)”

Bacterióloga y laboratorista clínico (enero de 1994 - 29 de julio de 1997)

Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Participé en la ejecución del trabajo de investigación titulado: “Hongos aislados de los conductos de aire acondicionado de las salas de Dialisis, Oncología del Hospital Ramón González Valencia durante el segundo semestre de 1995”

Adquirí los conocimientos, habilidades y destrezas para laborar como bacterióloga en un laboratorio clínico y realizar análisis en las áreas de hematología, bioquímica clínica, parasitología, microbiología e inmunología.

Experiencia laboral

Julio 2004 a la fecha **Docente – administrativa e investigadora**
Universidad de Boyacá, Tunja (Boyacá – Colombia)

Docente de los programas de Bacteriología y laboratorio clínico y Medicina (2004 a la fecha).

Investigadora adscrita al grupo de investigación del programa de Bacteriología y laboratorio clínico (2006 a la fecha).

Directora de la división de formación y capacitación docente (Desde junio de 2016)

Directora del programa de Postgrados de la Facultad de Ciencias de la Salud (marzo 2010 a enero 2011; enero 2014 a junio de 2016).

Directora de investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud (septiembre 2012 a enero 2014).

Encargada del proceso de autoevaluación con fines de acreditación del programa de Medicina (enero 2011 a septiembre 2012).

Jefe del departamento de Ciencias básicas de la Facultad de Ciencias de la Salud (febrero 2009 a marzo de 2010).

Jefe del laboratorio de Biología molecular (julio 2008 a febrero 2009).

- Marzo 2012 **Docente hora cátedra.**
- Junio **Universidad Pedagógica y Tecnológica de**
2014 **Colombia**
Asignatura: Genética Humana. Intensidad horaria: 4 horas semanales. Escuela de Medicina.
- Octubre **Jefe de Laboratorio clínico de Hospital de**
1997 – **primer nivel**
- Septiembre **Hospital Integrado Caicedo y Flórez de Suaita**
1998 **(Suaita – Santander, Colombia)**

Realizar exámenes clínicos de primer nivel:
hematología, parasitología, química sanguínea,
inmunología.

Control de calidad en las diferentes secciones del
laboratorio.

Producción científica

Publicaciones científicas:

Complement *C4* Gene Copy Number Variation Genotyping by High Resolution Melting PCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6309.

Autores: Jaimes-Bernal, C. P., Trujillo, M., Márquez, F. J., & Caruz, A. (2020).

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21176309>

Knock-out *IFNL4* gene variant is associated with protection from sexually transmitted HIV-1 infection.

Autores: Jaimes-Bernal, C., Rallón, N., Benito, J., Mohamed-Balghata, M. O., Gómez-Vidal, M. A., Márquez, F. J., ... & Caruz, A. (2019).

DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy584>

Evaluación de la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en poblaciones de riesgo: una revisión narrativa. *Revista Salud Bosque*, 11(1), 1-13.

Autorres: Monroy Díaz, A. L., Rojas Dimaté, L. L., Jaimes-Bernal, C. P., & Cortes Paredes, P. A. (2021).

DOI: <https://doi.org/10.18270/rsb.v11i1.3337>

Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 16(1), 7-20.

Autores: Giraldo Aristizábal, A., Aguilera Becerra, A. M., Urbano Cáceres, E. X., Pedraza Bernal, A. M., & Jaimes-Bernal, C. P. (2020).

DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.5012>

Comportamiento epidemiológico de la leptospirosis humana en Colombia, 2012-2016. Revista Cubana de Medicina Tropical, 71(2), 1-13.

Autores: Calderón-Sierra, D. M., Jaimes-Bernal, C. P., & Pedraza-Bernal, A. M. (2019).

URL:

<http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/364/246>

Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em distribuidores de carne na cidade de Tunja, Boyacá, Colômbia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 55, 122-135.

Autores: Ataya, G. E., Pedraza-Bernal, A. M., Vargas, D. C., Romero, L. Y., Jaimes-Bernal, C. P., & Merchán-Castellanos, N. A. (2019).

DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190013>

Listeria spp., in churn storage of raw cow's milk in Tunja-Boyacá. *Revista MVZ Córdoba*, 23(3), 6871-6877.

Autores: Urbano-Cáceres, E., Aguilera-Becerra, A., Jaimes-Bernal, C., & Pulido-Medellín, M. (2018).

DOI: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1375>

Seroprevalencia de anticuerpos IgG antirubéola y anticitomegalovirus en mujeres entre 16 y 40 años residentes en Tunja, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 20, 479-483.

Autores: Salamanca-Rojas, S., Barahona-López, N. M., Marín-Valcárcel, A., Vidal-Camargo, P. A., Pedraza-Bernal, A. M., Ramírez-Rueda, R. Y., & Jaimes-Bernal, C. P. (2018).

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rsap.v20n4.53677>

Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos de *Listeria sp.* aisladas de leche cruda de vaca en Tunja. Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá, 4(1), 38-52.

Autores: Urbano-Cáceres, E. X., Aguilera-Becerra, A. M., & Jaimes-Bernal, C. P. (2017).

DOI: <https://doi.org/10.24267/23897325.195>

Norovirus y coinfección con parásitos intestinales en pacientes con diarrea en el Hospital San Rafael de Tunja, Colombia. Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá, 1(2), 146-159.

Autores: Jaimes-Bernal, C. P., Ramírez-Rueda, R. Y., & Rodríguez-Mesa, M. B. (2014).

DOI: <https://doi.org/10.24267/23897325.119>

Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. Ciencia y Agricultura, 11(2), 83-93.

Autores: Aguilera-Becerra, A. M., Urbano-Cáceres, E. X., & Jaimes-Bernal, C. P. (2014).

DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>

AFLP fingerprinting of Colombian *Clostridium spp* strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. Journal of Microbiological Methods, 67(1), 64-69.

Autores: Jaimes, C. P., Bernal, M., Suárez, Z. R., & Montoya, D. (2006).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.03.002>

Aportes en congresos

Evento: 14° Congreso Internacional de Químicos Farmacobiólogos y XXIX Jornadas Científicas – diciembre de 2021 (Universidad Autónoma de Chiapas – Ciudad de México)

Ponencia: Genes de resistencia innata al VIH

Autor: Cladua Patricia Jaimes Bernal

Evento: VII Jornadas Doctorales Internacionales: Avances en la investigación biomédica y Biotecnológica – noviembre de 2020 (Jaén, España)

Ponencia: Variación en el número de copias del gen C4 del complemento genotipado por medio de qPCR-HRM

Autores: Jaimes-Bernal, C.P.

Evento: VI Seminario Internacional y VII Nacional de investigadores en Salud y Producción Animal SENISPA – octubre de 2020 (Tunja, Colombia)

Ponencia: Calidad microbiológica de quesos artesanales molidos (de hoja) distribuidos en la hoya del río Suárez y caracterización molecular de los microorganismos aislados

Memorias: <http://www.acovez.org/images/memorias-SENISPA-2020.pdf>

Autores: Jaimes Bernal Claudia Patricia; Aguilera Becerra Astrid Maribel; Pulido-Medellín Martin Orlando; Borrás Sandoval Luis Miguel.

Evento: XVII Congreso Latinoamericano de Genética, XLVII Congreso Argentino de Genética, LII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, VI Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética, V Congreso Latinoamericano de Genética Humana y V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución – octubre 2019 (Mendoza, Argentina)

Poster: Interferón Lambda 4 (IFNL4) y resistencia a la infección por VIH-1

https://sag.org.ar/jbag/wp-content/uploads/2019/09/VXXX_Suppl1_GH.pdf

Autores: Jaimes-Bernal C.P., N. Rallón, J.M. Benito, O. Mohamed, M.A. Gómez-Vidal, F.J. Márquez, B. Sánchez-Arcas, M. Trujillo, J.L. Royo, I. Saulle, M. Biasin, A. Rivero-Juárez, A. Caruz

Evento: V Seminario Internacional y VI Nacional de Investigadores en Salud y Producción Animal – septiembre de 2018

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

Ponencia: Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*

Autores: Aguilera B, A.M., Urbano-Cáceres, E.X., Jaimes-Bernal, C.P.

Evento: XLVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas - octubre de 2011

Ponencia: Herramientas utilizadas para la enseñanza de las Ciencias Forenses a estudiantes del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Boyacá

Memorias: Revista de la Asociación de Ciencias Biológicas, 2011

Autores: Claudia Patricia Jaimes Bernal

Evento: III Congreso Internacional de la REDBIOÉTICA UNESCO para América Latina y el Caribe – 2010

Ponencia: Biología Sintética: aplicaciones y dilemas éticos.

Libro: Memorias del III Congreso Internacional de la REDBIOÉTICA UNESCO para América Latina y el Caribe y el IV

Encuentro del programa de Educación Permanente de Bioética de la REDBIOÉTICA UNESCO

Autores: Claudia Jaimes Bernal, Ximena Johana Nino Salazar, Jhon Edison Barrera Oliveros.

Evento: XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas - octubre de 2009

Ponencia: Estudio de la prevalencia del daño en el ADN de individuos expuestos a plaguicidas en cultivos de tomate del municipio de Villa de Leyva

Memorias: Revista de la Asociación de Ciencias Biológicas, 2009

Autores: Carolina Camargo Buritica, Claudia Jaimes Bernal

Libros

Prácticas de Laboratorio de Virología para profesionales de Ciencias de la Salud. En: Colombia 2018. Ediciones Universidad de Boyacá. ISBN: 978-958-8642-89-5.

Autores: Claudia Patricia Jaimes Bernal, Angela Liliana Monroy Diaz

Manejo de laboratorios forenses para estudiantes de Bacteriología. En: Colombia 2014. Editorial Universidad de Boyacá. ISBN: 978-958-8642-50-5.

Autores: Claudia Patricia Jaimes Bernal