

## **Actualización sobre la glicoproteína gp41 del VIH y sus dominios implicados en la infectividad viral.**

**Investigadores:** Frank Garnica Pacheco<sup>(1)</sup>, Nicholas P. Menzione Gutiérrez de Piñeres<sup>(1)</sup>, Leczy M. Pacheco Escorcia<sup>(1)</sup>, Diana C. Rodríguez Vera<sup>(1)</sup>, Alejandra V. Villalba Sit<sup>(1)</sup>.

**Asesores:** Luz Marina Alonso Palacio<sup>(2)</sup>, Guillermo Cervantes Acosta<sup>(3)</sup>.

### **Resumen**

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), es un lentivirus que contiene genes que codifican para diferentes glicoproteínas que son responsables de la interacción del virus con la célula humana. La glicoproteína 120 (gp120) determina el tropismo viral, mientras que la gp41 media la unión y fusión entre el virus y la célula. La gp41 tiene tres porciones, un ectodominio que a su vez contiene distintos dominios funcionales, como lo son: el péptido fusión (FP), la región de repetición N terminal (NHR), la región de repetición C terminal (CHR) y la región extracelular membrana proximal (MPER); un dominio transmembranal el cual participa en el anclaje del complejo de glicoproteína de la envoltura en la membrana viral y uno intracitoplasmático o endodominio. La importancia de esta última porción ha sido mostrada en diferentes estudios realizados en modelos animales en los que se inducen acortamientos o deleciones en ciertas secuencias de aminoácidos de la región llevando a una disminución o supresión de la replicación viral. Esta cola intracitoplasmática a su vez presenta diferentes secuencias de aminoácidos o motivos que desempeñan funciones específicas; los motivos péptidos líticos de lentivirus (LLP), se ha relacionado con la actividad citolítica del virus y la expresión de glicoproteínas de superficie y su incorporación en los viriones. El motivo de tirosina (YXXL) tiene como función la determinación de la dirección exacta de la salida de los nuevos viriones así como de la efectividad de este proceso y, el motivo diaromático (YW) es el responsable del tránsito intracelular de las glicoproteínas de la envoltura. Es por esto que las glicoproteínas del VIH juegan un papel importante en la patogénesis de la infección por el virus, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas líneas de tratamiento que se enfocan en bloquear la fusión y entrada viral a la célula huésped, teniendo como blanco estas macromoléculas.

(1). Estudiantes de medicina

(2). Economista, Maestría en Salud Pública con énfasis en Bioestadística, Maestría en Demografía, Doctorado en comunicación con énfasis en salud y calidad de vida.

(3). Químico y farmacéuta, Maestría en microbiología, Doctorado en virología e inmunología.

## **Abstract**

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a lentivirus which contains genes that codify for different glycoproteins which are responsible for the viral interaction with human cells. Two of these important glycoproteins are glycoprotein 120 (gp120) which determines viral tropism and glycoprotein 41 (gp41) which mediates the fusion of the virus with the human cell. Gp41 has three portions, an ectodomain which is composed of various functional domains such as fusion peptide (FP), N-terminal heptad repeat (NHR), C-terminal heptad repeat (CHR) and the membrane proximal extracellular region (MPER), a transmembrane domain which participates in the anchoring of the glycoprotein complex of the viral membrane envelope and an intracytoplasmic domain. The importance of the intracytoplasmic domain has been demonstrated in various studies utilizing animal models where deletions in certain amino acid sequences results in a suppression of viral replication. This intracytoplasmic tail contains various motifs or conserved sequences of amino acids which carry out specific vital functions. The motif lentivirus lytic peptides (LLPs) have been associated with the virus cytolytic ability, the expression of surface based glycoproteins and the incorporation of important viral proteins in newly created virions. A tyrosine motif (YXXL) plays an important role by determining how new virion exit the infected human cell as well as the effectiveness of this process. Lastly, the diaromatic motif (YW) is responsible for the intracellular trafficking of the envelope glycoproteins. The role with which HIV glycoproteins play in the pathogenesis of HIV infection is therefore extremely important, this has led to a search for new avenues of treatment which focus on blocking viral fusion and entry in the host cell by targeting these important macromolecules.

## **Palabras clave**

VIH, Env, Intracitoplasmático, Glicoproteína gp41, Motivo funcional, Secuencias, Aminoácidos.

## Introducción

El VIH contiene tres cuadros de lectura abierta (ORF) que codifican para las poliproteínas *gag*, *pol* y *env*, las cuales componen la estructura del virus. Los lentivirus, a diferencia de los otros retrovirus, se caracterizan por tener ORF complementarios que codifican para proteínas accesorias del virus (*nef*, *vpr*, *vif* y *vpu*). Estas proteínas auxiliares no son esenciales para la replicación del virus, debido a que alteraciones que afectan su expresión no intervienen en la cinética de replicación viral. Sin embargo, estas son capaces de controlar eventos importantes de la fisiopatología viral in vitro. <sup>1</sup>

La proteína *nef* se expresa de manera excesiva en las primeras etapas de la infección, participa en la multiplicación del virus y la patogénesis. Virus cuyo gen *nef* se encuentra defectuoso han revelado un retardo considerable en el crecimiento de la enfermedad en los individuos infectados. El objetivo de *nef* sobre la infectividad viral parece actuar en sinergia con otra proteína viral; *vpu*. Virus producidos en ausencia de ambas proteínas presentan una disminución de 20 a 30 veces su infectividad comparada con la del virus circulante. <sup>2, 3, 4, 5</sup>

Por otro lado, *vpr* se encuentra en el núcleo de la célula y hace parte del complejo de preintegración que introduce el ADN viral recientemente sintetizado hacia el núcleo, junto con la integrasa, la transcriptasa inversa, y otras proteínas celulares. <sup>6, 7</sup>

La proteína *vpu* tiene dos funciones establecidas, inducción de la degradación de la molécula CD4 a nivel del retículo endoplásmico e incremento de la salida viral a partir de la membrana plasmática de las células infectadas. <sup>8</sup>

La proteína *vif* es necesaria para mantener la infectividad en las partículas virales libres. Se ha demostrado que los viriones que no manifiestan *vif* son incapaces de llevar a cabo la síntesis de ADN después de la infección de las células blanco, dañando como consecuencia la transcripción inversa. <sup>9, 10</sup>

Hace más de 30 años, el centro de control y la prevención de enfermedades (CDC) reportó el 5 de junio de 1981 cinco casos de neumonía por *pneumocitis jirovecci* en hombres previamente sanos. Desde entonces las características epidemiológicas del virus han cambiado y hoy día a medida que las muertes por VIH disminuyen, las

personas que conviven con la enfermedad aumentan. Se estima que a nivel mundial en el año 2014 hubo 36,9 millones de personas infectadas con VIH. A su vez su incidencia fue de 2,0 millones y 1,2 millones de personas murieron de SIDA en el mismo año. La región con mayor prevalencia e incidencia de casos de VIH es África sub-sahariana con 25,8 y 1,4 millones respectivamente. En Latino América para el año 2014 habían 1.7 millones de adultos y niños viviendo con VIH/SIDA, con una prevalencia en adultos de 0.4%. <sup>11</sup>

En Colombia entre los años 1985 y 2011 se reportaron un total de 129.630 casos de infección por VIH/SIDA y una tasa de incidencia de 0.5% con una población de 76.314 personas infectadas en las edades de 15 a 49 años. A nivel nacional se notificaron 9315 casos hasta la semana epidemiológica 43. Existe un aumento entre el 2014 y 2015 de 9,55%, lo cual corresponde a 812 casos. Se estima una población de 140.000 pacientes infectados con VIH en el año 2015. Estas cifras indican el ascenso de la enfermedad y representan un reto para las políticas de salud pública del país. <sup>12, 13</sup>

Esta revisión abarca la descripción de puntos claves sobre la función de las proteínas de envoltura del virus, principalmente la gp41.

### **Estructura y función de las glicoproteínas de envoltura**

La entrada del VIH a la célula huésped es mediado por las glicoproteínas de envoltura que se encuentran en la superficie de la membrana viral, son inicialmente sintetizadas como un precursor denominado gp160 que es escindido en las gp120 y gp41. La gp120 determina el tropismo viral a través de los receptores de superficie de las células y la gp41 es responsable de los procesos de fusión membranal. El mecanismo de entrada del virus inicia con la interacción de la gp120 con el receptor CD4 y los co-receptores CCR5/CXCR4, que induce un cambio conformacional en la porción extracitoplasmática de la gp41, resultando en la exposición del péptido fusión y la consecuente unión de la membrana viral y celular. <sup>14, 15, 16, 17</sup>

Una vez el virus entra a la célula, el objetivo es la integración de su material genético al de la célula huésped y la replicación viral. El VIH cuenta con una transcriptasa reversa capaz de sintetizar ADN tomando como modelo el ARN viral.

Este ADN proviral a través de una integrasa, es transportado al núcleo e integrado al genoma de la célula huésped. La activación de la célula huésped infectada comienza la producción de ARN mensajero viral, que codificará para proteínas virales, las cuales servirán para la replicación, incorporación y ensamblaje de nuevos viriones. <sup>18, 19</sup>

Gp120 es una proteína altamente glicosilada. Está compuesta por 5 regiones constantes (C1-C5) y 5 regiones variables (V1-V5). Estudios sugieren que las regiones conservadas se unen para formar un core, mientras que las regiones variables con excepción de V5 forman 4 asas que salen de la superficie de la proteína. La gp120 tiene como función la iniciación y modulación de las interacciones entre el virus y la célula a través del receptor CD4 y los co-receptores CCR5 o CXCR4. El reconocimiento del CD4 por parte de gp120 induce cambios estructurales que llevan al aumento de la afinidad con los sitios de unión de los co-receptores conduciendo a la activación de la gp41. <sup>20, 21, 22, 23, 24</sup>

Gp41 se encuentra en estado nativo, se piensa que es activada por gp120 para llevar a cabo su función que es la fusión de las membranas e introducción del contenido viral a la célula. <sup>25, 26, 27</sup>

### **Estructura de la glicoproteína gp41**

La cola extracitoplasmática de gp41 contiene distintos dominios funcionales y son el dominio pretransmembranal rico en triptófano (PTD), el péptido fusión (FP), región de repetición N terminal (NHR), región de repetición C terminal (CHR) y la región extracelular membrana proximal (MPER). El péptido fusión desestabiliza la membrana celular para la fusión del virus con la célula, mientras que NHR y CHR están conectados por un asa disulfuro que aproxima la membrana celular y así facilita la fusión. <sup>16, 28, 29, 30</sup>

El dominio transmembranal está dado por un intervalo de 25 aminoácidos hidrofóbicos que se prolongan desde los residuos 683 a 707, participando en el anclaje del complejo de glicoproteína de la envoltura en la membrana viral. Se ha postulado que el motivo GGXXG donde los residuos de glicina son altamente conservados forma la estructura clásica de TM para que se pueda lograr la

asociación entre hélice y hélice. Las investigaciones sobre la función del dominio transmembranal son limitadas. <sup>31, 32, 33, 34</sup>

De los tres dominios de gp41, la porción intracitoplasmática es la menos entendida. Resultados de estudios basados en su topografía proponen que tiene 150 aminoácidos, una longitud considerable teniendo en cuenta que otros retrovirus tienen entre 20 y 50. La presencia de una cola larga sugiere un rol funcional importante. Se demostró que una disminución de esta CTT resulta en la supresión in vivo de la replicación viral en modelos animales. A pesar de estos hallazgos, hay poca información y no hay modelos para las secuencias completas de CTT. Estos estudios mutacionales en los cuales se indujeron deleciones y/o acortamientos en CTT de gp41 mostraron su utilidad para el virus en el proceso de regular la función de las glicoproteínas de envoltura y de la replicación viral. <sup>35, 36, 37</sup>

La región CTT tiene un rol funcional en la incorporación de la proteína *env* en la superficie del virión. Cuando la secuencia de CTT fue reducida a 7 o 47 residuos aumentaron la incorporación de *env*, a pesar de que el *gag* estaba defectuoso. Posteriormente se concluyó que si la CTT tenía más de 57 aminoácidos la incorporación de la proteína *env* no se llevaba a cabo. Otros estudios muestran que CTT es importante en la maduración del virión y que puede modular la capacidad que tiene este de fusionarse y por ende infectar. Además del antes mencionado rol de CTT en la incorporación del *env*, es posible que la CTT cumpla un papel en la entrada del virus. <sup>22</sup>

### **Motivos de la cola intracitoplasmática implicados en la infección viral**

CTT tiene la capacidad de interactuar por medio de los LLP con la calmodulina humana, llevando a la inhibición de la actividad de esta última. Determinadas mutaciones de arginina en los dominios LLP-1 están asociadas a una disminución de la interacción entre LLP y la calmodulina, terminando en un daño de la actividad citolítica. Se cree que esta función de CTT contribuye con el efecto citopático del VIH-1 en las células T. <sup>38, 39, 40</sup>

La replicación viral se ve afectada por algunos motivos dominantes, tres de esos motivos (Y768XXL, L774LLI y L784L) mantienen la hidrofobicidad del endodominio

de Env, especialmente de la región LLP-2, la cual es crítica para la replicación en linfocitos T. <sup>41</sup>

Bhakta et al. estudiaron el rol de los motivos altamente conservados de Y- y LL- en el dominio intracitoplasmático de gp41 en el ciclo vital del VIH-1 a través de la mutagénesis secuencial a lo largo de CTT, la incorporación de Env disminuyó a medida que más motivos eran alterados. <sup>42</sup>

Se ha demostrado que este dominio tiene un rol en la sensibilidad de neutralización por parte del sistema inmune del huésped. Con el bloqueo del dominio intracitoplasmático se ha visto que aumenta la sensibilidad de neutralización de la proteína *env*, evidente mediante la exposición a epítopes neutralizantes. Normalmente serían completamente invisibles al reconocimiento por parte de anticuerpos, sugiriendo un importante papel de dicho dominio en la evasión inmune.

<sup>43, 44, 45</sup>

Estudios han intentado identificar los motivos involucrados en las funciones de CTT, un primer grupo de estos dominios y el más estudiado son los denominados péptidos líticos de lentivirus (LLP-1, LLP-2, LLP-3) los cuales consisten en alfa hélices anfífilas estructuralmente conservadas, lo que sugiere que estas regiones participan en el anclaje de CTT a la membrana viral y/o celular. Los dominios LLP están implicados en la expresión de las glicoproteínas de envoltura en la superficie y además en la incorporación de estas en las partículas virales. La alta cantidad de argininas en LLP es inusual. Lo cual sugiere un papel adicional en la regulación de la interacción de la región CTT con la membrana. <sup>46, 47, 48, 49</sup>

Determinadas mutaciones de arginina en los dominios LLP-1 están asociadas a una disminución de la interacción entre LLP y la calmodulina, terminando en un daño sobre la actividad citolítica. Se cree que esta función de CTT contribuye con el efecto citopático del VIH-1 en las células T. <sup>38, 39, 40</sup>

El motivo de tirosina es una secuencia conservada de cuatro aminoácidos que se repiten dos veces en la CTT de algunas proteínas, recibiendo su nombre debido a que contiene una tirosina (Y) separada de una leucina o isoleucina (L) por dos otros aminoácidos de cualquier tipo (XX), dándole una forma de YXXL. La presencia de este motivo de tirosina YXXL y su funcionalidad se comprobó a través de virus

obtenidos a partir de una célula infectada productora de los mismos, donde se cultivaron conjuntamente con linfocitos para obtener linfocitos crónicamente infectados. Así se evidenció que cuando la señal de polarización está intacta el virus sale por un polo de la célula, mientras que cuando se cambia la tirosina por una serina se pierde la polarización y la salida del virus no es efectiva. <sup>50, 51</sup>

En el mismo estudio también se concluyó que el motivo YXXL está involucrado en la determinación exacta del sitio donde el virión será liberado en la superficie de células mononucleares infectadas y demostró también, que la sustitución del motivo YXXL aumentó la cantidad de las proteínas *env* en la superficie celular, lo cual da soporte a la idea de que este motivo de tirosina puede promover la endocitosis. Además, se demostró una habilidad reducida de transmitir el virus mutante a líneas celulares cultivadas con linfocitos crónicamente infectados cuando el motivo de YXXL era sustituido. Esta asociación indica que el motivo YXXL juega un papel importante en la propagación del VIH cuando se trata de infección célula a célula. <sup>50, 51</sup>

Encontramos también que un motivo diaromático (YW802/803) en la CTT de gp41 ha sido descrito como mediador del tránsito de *env* uniéndose a TIP47, una proteína requerida para el transporte retrógrado de proteínas de los endosomas hacia la red *trans*-golgi. En células HeLa, donde *env* contenía una señal YW mutada, las vesículas se encontraban dispersas por el citoplasma, en lugar de estar concentradas en la región yuxtannuclear. Se postula que la carencia del motivo hace que haya eliminación de la interacción entre TIP47 y Env. Debido a estos hallazgos se concluyó que el motivo diaromático es necesario para incorporar Env en los viriones. <sup>43</sup>

### **Terapia inhibidora de la fusión y entrada viral**

Los recientes tratamientos antirretrovirales, en vista de la gran resistencia que hay hacia los inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa reversa, se ha optado por buscar tratamientos enfocados en detener la fusión y entrada del virus a la célula diana. <sup>52</sup>

Fostemsavir (BMS-663068) es un inhibidor de la fusión del VIH que se acopla a la gp120 evitando la unión y entrada a la célula diana. A diferencia de otros inhibidores



de la fusión como el maraviroc y el enfuvirtide, este interviene en la interacción inicial del virus con la célula, y es activo independientemente de que la célula huésped exprese en su membrana citoplasmática CCR5 o CXCR4 como correceptor. Debido al éxito de este medicamento en ensayos clínicos de fase II, la FDA dio el aval para el inicio de la fase III el 23 de febrero del 2016 con pacientes con resistencia a los antirretrovirales, que no toleran los efectos adversos o que presenten contraindicaciones para el uso de los mismos. <sup>53, 54</sup>

Ibalizumab (TMB-355) es un anticuerpo monoclonal humano que se acopla al receptor CD4 cuyo mecanismo de acción es inhibir la entrada viral. Se une a CD4 interfiriendo con la interacción y penetración del virus a la célula diana. Es el primer anticuerpo monoclonal humano que bloquea la entrada viral para el tratamiento de VIH. Durante el estudio clínico ha sido bien tolerado y no muestra evidencia de efectos adversos sobre los linfocitos T CD4 contrario a los otros tratamientos antirretrovirales aprobados, está comprobado que este medicamento es capaz de disminuir la carga viral y aumentar la cantidad de linfocitos T CD4 de una manera estadística y clínicamente significativa. <sup>55</sup>

La investigación del tratamiento del VIH en cuanto a gp41 como blanco se enfoca en tres métodos específicos de la inhibición de la fusión: anticuerpos neutralizantes, pequeñas moléculas inhibitoras y péptidos inhibidores. De los tres métodos, se ha llegado a mayores avances con los péptidos inhibidores, incluyendo la introducción de tratamientos en el ámbito clínico. Los tratamientos dirigidos a evitar la fusión y entrada viral están basados en detener procesos llevados a cabo por péptidos ubicados en los dominios FP, CHR, NHR y MPER los cuales pertenecen al dominio extracitoplasmático y transmembranal de gp41. <sup>56</sup>

El descubrimiento de péptidos que puedan inhibir la entrada del virus a las células humanas se dio por primera vez a inicios de los años 90. Sin embargo no fue hasta el año 2003 que el péptido T20, también conocido como Enfuvirtide, derivado del ectodominio de la región CHR fue aprobado por la FDA como forma aceptable de tratamiento para pacientes VIH positivo. El péptido T20 funciona uniéndose a la región HR1 y a la membrana lipídica causando la inhibición de la fusión del virión con la célula. A pesar de que esta novedosa terapia ha tenido cierto éxito, también

ha presentado ciertas limitaciones tales como la falta de biodisponibilidad oral, altos costos de producción y resistencia por parte de ciertas cepas del VIH. <sup>57, 58, 59</sup>

El más reciente péptido inhibidor, Sifuvirtide, es un derivado de la región HR2 la cual se encuentra localizada más lejos de la membrana viral, en comparación con el péptido T20. En oposición al Enfuvirtide, Sifuvirtide tiene la capacidad de unirse de manera más específica tanto a HF1 como a HF2, tiene una mayor efectividad contra cepas del VIH resistentes a T20 y son menos susceptibles a crear resistencia. Hasta ahora solo hay terapias en fase clínica que tienen como blanco terapéutico el ectodominio de gp41. Sin embargo está comprobado que los dominios LLP localizados en la región intracitoplasmática son capaces de interactuar con la membrana lipídica del VIH y juega un papel fundamental en la fusión mediado por gp41. Al modificar estos dominios, investigaciones han mostrado que se puede lograr desestabilizar la membrana viral y causar redistribución de los lípidos de esta. Estos hallazgos hacen que este dominio representa un blanco novedoso para interrumpir la fusión del VIH. <sup>56, 60, 61</sup>

## Conclusión

Dentro de la biología del virus de la inmunodeficiencia humana, gp120 tiene como función la iniciación y modulación de las interacciones entre virus y la célula a través del receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4. La gp41 activada por gp120 lleva a cabo su función de fusión de las membranas e introducción del contenido viral a la célula.

La gp41 tiene tres porciones, dominio extracitoplasmático, transmembranal e intracitoplasmático. De los tres dominios de gp41, la porción intracitoplasmática es la menos entendida, sin embargo la presencia de esta cola sugiere un rol funcional importante en la maduración del virión y capacidad de fusionarse, y por ende infectar.

Dentro de de CTT se identifican secuencias de aminoácidos correspondientes a motivos funcionales como los péptidos líticos de lentivirus (LLP-1, LLP-2, LLP-3) que están implicados en la expresión de las glicoproteínas de envoltura en la superficie y además en la incorporación de estas en las partículas virales. El motivo diarimático (YW802/803) y el motivo de tirosina (YXXL), son responsables del tráfico intracelular de las glicoproteínas de envoltura y el direccionamiento de la salida de los nuevos viriones respectivamente.

*Fostemsavir* e *Ibalizumab* son nuevas opciones terapéuticas dirigidas a inhibir la fusión a través de la gp120 y CD4 respectivamente. Estudios que se encuentran en fase clínica han demostrado disminución de la carga viral, aumento del conteo de los linfocitos CD4 y menores efectos adversos con respecto al grupo control que se encuentra en tratamiento con medicamentos antirretrovirales convencionales, convirtiéndolos en alternativas para el control de la enfermedad, incluso en pacientes que presentan contraindicaciones para el uso de la terapia antirretroviral de elección.

Enfuvirtide es un medicamento aprobado por la FDA en el 2003 para el tratamiento de la infección por VIH que inhibe la fusión viral mediante su acople a la región HF1 de la porción extracitoplasmática de la gp41. Mientras que Sifuvirtide tiene la capacidad de unirse de manera más específica tanto a HF1 como a HF2, reflejándose en una mayor efectividad contra cepas del VIH resistentes a Enfuvirtide, y al mismo tiempo son menos susceptibles a crear resistencia.

El tratamiento antirretroviral si bien no ha sido efectivo en la erradicación de la infección contra el VIH, mantiene suprimida la replicación viral y disminuye la morbimortalidad relacionada con patologías asociadas a la enfermedad. Debido al aumento de la expectativa de vida de los pacientes crónicamente infectados, la aparición de efectos adversos, contraindicaciones e interacciones medicamentosas, comorbilidades, y aumento de resistencia contra los antirretrovirales como son los inhibidores de la proteasas y de la transcriptasa reversa, se hace necesario el desarrollo de tratamientos alternos. Considerando la importancia de la función de la glicoproteína en la patogénesis del virus, es ineludible direccionar todos los esfuerzos hacia la continuación de su estudio en todo su potencial como blanco terapéutico. La introducción de *Enfuvirtide*, demuestra que tratamientos dirigidos hacia la gp41 pueden tener un impacto importante en el ámbito clínico.

## Referencia bibliográficas:

1. Subbramanian R, Cohen E. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *JVirol.*1994;68(11):6831-6835.
2. Goldsmith M, Warmerdam M, Atchison R, Miller M, Greene W. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement function of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *JVirol.*1995; 69(7):4112-4121.
3. Kestler III H, Ringler D, Mori K, Panicali D, Sehgal P, Daniel M, Desrosiers R. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.*1991;65(4):651-662.
4. Learmont J, Geczy A, Mills J, Ashton L, Raynes-Greenow C, Garsia R, Dyer W, McIntyre L, Oelrichs R, Rhodes D, Deacon N, Sullivan J. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sidney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med* 1999;340:1715-1722.
5. Gratton S, Yao X, Sundararajan S, Cohen É, Sékaly R. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4. Overlapping but noncompetitive requirement for Ick association and down-regulation by Nef. *JImmunol* 1996;157:3305-3311.
6. Paxton W, Connor R, Landau N. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *JVirol.* 1993; 67(12):7229-7237.
7. Nie Z, Bergeron D, Subbramanian R, Yao X, Checroune F, Rougeau N, Cohen É. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *JVirol.* 1998;72(5):4104-4115.
8. Cohen É, Subbramanian R, Gottlinger H. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996;214:219-235.

9. Fan L, Peden K. Cell free transmission of vif-mutants of HIV-1. *JVirol.* 1992;190(1):19-29.
10. Sova P, Volsky D. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and non permissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *JVirol.* 1993; 67(10):6322-6326.
11. UNAIDS/World Health Organization. Core Epidemiology Slides, July 2015. [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20150714\\_epi\\_core\\_en.ppt](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150714_epi_core_en.ppt) (Fecha de acceso 6 de Noviembre 2015)
12. UNAIDS. Epidemiology Fact Sheet on HIV and AIDS. <http://www.unaids.org/sites/default/files/epidocuments/COL.pdf> (Fecha de acceso 6 de Noviembre 2015)
13. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semana 43. 2015. <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx> (Fecha de acceso 7 de Noviembre 2015)
14. Yang X, Kurteva S, Ren X, Lee S, and Sodroski J. Stoichiometry of Envelope Glycoprotein Trimers in the Entry of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *JVirol* 2005; 79(19): 12132-12147.
15. Finzi A, Shi-Hua X, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, Danek B, Pancera M, Kwong P, Sodroski J.. Topological Layers in the HIV-1 gp120 Inner Domain Regulate gp41 Interaction and CD4-Triggered Conformational Transitions. *Mol Cell.* 2010; 37(5): 656-667.
16. Moreno M, Giudici M, Villalaín J. The membranotropic regions of the endo and ecto domains of HIV gp41 envelope glycoprotein. *Bio. et Bio. Act.* 2006;1758(1):111-123.
17. Wilen C, Tilton J, Doms R. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006866

18. Craigie R, Bushman F. HIV DNA Integration Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a006890.
19. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super. Sanità* 2010; 46(1): 5-14.
20. Leonard C, Spellman N, Riddle L, Harris R, Thomas J, Gregory T. Assignment of intrachain disulphide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1990; 265:10373–82.
21. Burton D, Montefiori D. The antibody response in HIV-1 infection. *AIDS.* 1997; 11(Suppl A):S87–S98.
22. Steckbeck J, Kuhlmann, A, Montelaro R. C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic. *Journal of General Virology.* 2013; 94(Pt 1), 1-19.
23. Rizzuto C, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong P, Hendrickson W, Sodroski J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science.* 1998; 280:1949–53.
24. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* 1998; 280:1884–88
25. Feng Y., Broder C., Kennedy P., Berger E. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science.* 1996; 272(5263): 872-877.
26. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton R, Hill C, Davis C, Peiper S, Schall T, Littman D, Landau N.

Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381(6584): 661-666.

27. Jones P, Korte T, Blumenthal R. Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptor. *J. Biol. Chem.* 1998;273(1):404-409.

28. Cail L, Gochin M, Liu K. Biochemistry and Biophysics of HIV-1 gp41 – membrane interactions: Implications for HIV-1 Envelope Protein Mediated Viral-Cell Fusion and Fusion Inhibitor Design. *Curr Top Med Chem.* 2011; 11(24): 2959–2984.

29. Crespillo S, Artiagas A, Casares S, Morel B, Cobos E, Mateo P, Mouz N, Martin C, Roger M, El Habib R, Su B, Moog C, Conejero F. Single-chain protein mimetics of the N-terminal heptad-repeat region of gp41 with potential as anti-HIV-1 drugs. *Pnas.* 2014; 111(51): 18207–18212.

30. Korazim O, Sackett K, Shai Y. Functional and structural characterization of HIV-1 gp41 ectodomain regions in phospholipid membranes suggests that the fusion-active conformation is extended. *J. Mol. Bio.* 2006; 364(5): 1103-1117.

31. Yue L, Shang L, Hunter E. Truncation of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein defines elements required for fusion, incorporation, and infectivity. *J Virol.* 2009 Nov; 83(22):11588-98.

32. Shang L, Hunter E. Residues in the membrane-spanning domain core modulate conformation and fusogenicity of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology.* 2010;404:158–167.

33. Shang L, Yue L, Hunter E. Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J Virol.* 2008;82:5417–5428.



34. Senes A, Gerstein M, Engelman D. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J. Mol. Biol.* 2000;296:921-936.
35. Hunter E, Swanstrom R. Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990;157:187-253.
36. Dubay J, Roberts S, Hahn B, Hunter E. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J Virol.* 1992;66(11): 6616-6625
37. Gabuzda D, Lever A, Terwilliger E, Sodroski J. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol.* 1992;66(6):3306–3315.
38. Miller M, Mietzner T, Cloyd M, Robey W, Montelaro R. Identification of a Calmodulin-Binding and Inhibitory Peptide Domain in the HIV-1 Transmembrane Glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2009; 9(11):1057-1066.
39. Tencza S, Miller M, Islam K, Mietzner T, Montelaro R. Effect of amino acid substitutions on calmodulin binding and cytolytic properties of the LLP-1 peptide segment of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein. *J Virol* 1995; 69(8): 5199–5202.
40. Srinivas S, Srinivas R, Anantharamaiah G, Compans R, Segrest J. Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(30): 22895–22899.
41. Lu L, Zhu Y, Huang J, Chen X, Yang H, Jiang S, Chen Y. Surface exposure of the HIV-1 env cytoplasmic tail LLP2 domain during the membrane fusion process: interaction with gp41 fusion core. *J Biol Chem.* 2008,283:16723-16731.

42. Bhakta S, Shang L, Prince J, Claiborne D, Hunter E. Mutagenesis of tyrosine and di-leucine motifs in the HIV-1 envelope cytoplasmic domain results in a loss of Env-mediated fusion and infectivity. *Retrovirology*. 2011.
43. Blot G, Janvier K, Le Panse S, Benarous R, Berlioz-Torrent C. Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. *JVirol*. 2003; 77(12):6931-945.
44. Edwards T, Hoffman T, Baribaud F, Wyss S, LaBranche C, Romano J, Adkinson J, Sharron M, Hoxie J, Doms R. Relationships between CD4 Independence, Neutralization Sensitivity, and Exposure of a CD4-Induced Epitope in a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *JVirol*. 2001; 75(11): 5230-5239.
45. Edwards T, Wyss S, Reeves J, Zolla-Pazner S, Hoxie J, Doms R, Baribaud F. Truncation of the Cytoplasmic Domain Induces Exposure of Conserved Regions in the Ectodomain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *JVirol*. 2002; 76(6): 2683-2691.
46. Kalia V, Sarkar S, Gupta P, Montelaro R. Rational Site-Directed Mutations of the LLP-1 and LLP-2 Lentivirus Lytic Peptide Domains in the Intracytoplasmic Tail of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Indicate Common Functions in Cell-Cell Fusion but Distinct Roles in Virion Envelope Incorporation. *JVirol*. 2003;77(6):3634-46.
47. Bultmann A, Muranyi W, Seed B, Haas J. Identification of Two Sequences in the Cytoplasmic Tail of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein That Inhibit Cell Surface Expression. *JVirol*. 2001;75(11):5263-5276.
48. Chen S, Lee S, Wang C. Cellular Membrane-Binding Ability of the C-Terminal Cytoplasmic Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Transmembrane Protein gp41. *JVirol*. 2001;75(20): 9925-9938.

49. Eisenberg D, Wesson M. The most highly amphiphilic  $\alpha$ -helices include two amino acid segments in human immunodeficiency virus glycoprotein 41. *Biopolymers* 1990; 29(1):171-177.
50. Deschambeault J, Lalonde J, Cervantes-Acosta G, Lodge R, Cohen E, Lemay. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *JVirol.* 1999;73(6):5010-17.
51. Lambelé M, Labrosse B, Roch E, Moreau A, Verrier B, Barin F, Roingear P, Mammano F, Brand D. Impact of natural polymorphism within the gp41 cytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 on the intracellular distribution of envelope glycoproteins and viral assembly. *JVirol.* 2007;81(1):125-140
52. Pan C, Liu S, Jiang S. HIV-1 gp41 Fusion Intermediate: A Target for HIV Therapeutics. *J Formos Med Assoc.* 2010;109(2):95-105
53. Thompson M, Lalezari J, Kaplan R, Pinedo Y, Sussman O, Cahn P, Stock D, Joshi S, Hanna G, Latadillade M. Attachment inhibitor prodrug BMS–663068 in ARV-experienced subjects: week 48 analysis. CROI, 23-26 February 2015, Seattle. Poster abstract 545.
54. Lalezari J, Latiff G, Brinson C, Echevarría J, Treviño-Pérez S, Bogner J. Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug BMS-663068 in treatment-experienced individuals: 24 week results of AI438011, a phase 2b, randomised controlled trial. *The Lancet HIV.* 2015;2(10), e427-e437.
55. Bruno C, Jacobson M. Ibalizumab: an anti-CD4 monoclonal antibody for the treatment of HIV-1 infection. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2010;65(9), 1839-1841.
56. Garg H, Viard M, Jacobs A, Blumenthal R. Targeting HIV-1 gp41-induced fusion and pathogenesis for antiviral therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011;11(24):2947-958

57. Fuzeo. Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ and Trimeris, Inc., Durham, NC; October 31, 2013. Disponible en : [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/021481s027lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021481s027lbl.pdf) (Fecha de acceso 5 de Noviembre 2015)
58. Kilby J, Lalezari J, Eron J, Carlson M, Cohen C, Arduino R. The safety, plasma pharmacokinetics and antiviral activity of subcutaneous T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002; 18:685–694.
59. Liu S, Lu H, Niu J, Xu Y, Wu S, Jiang S. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem*. 2005;280:11259–73.
60. Dwyer J, Wilson K, Davison D. Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(31):12772-12777.
61. He Y, Xiao Y, Song H, Liang Q, Ju D, Chen X, Lu H, Jing W, Jiang S, Zhang L. Design and evaluation of sifuvirtide, a novel HIV-1 fusion inhibitor. *J Biol Chem*. 2008;283:11126–34.