



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE
PREGRADO

**“Desarrollo de sondas acopladas a Quantum dots
para analizar la localización subcelular del ARN
genómico de VIH-1 mediante microscopía
confocal”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería
en Biotecnología Molecular

Alejandra Leyva Gutiérrez

Director:
Dr. Ricardo Soto Rifo

Co-Directora:
Dra. Daniela Toro Ascuy

Patrocinante:
Dra. Claudia Stange Klein

Enero, 2018

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta)**:

Alejandra Leyva Gutiérrez

“DESARROLLO DE SONDAS ACOPLADAS A QUANTUM DOTS PARA ANALIZAR LA LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE ARN GENÓMICO DE VIH-1 MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Dr. Ricardo Soto Rifo

Director Seminario de Título

.....

Dra. Daniela Toro Ascuy

Co-Director Seminario de Título

.....

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión

.....

Evaluador

.....

Santiago de Chile,de 2018.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al Dr. Ricardo Soto sus amplios conocimientos y experiencia científica que ha compartido, además de la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, donde he tenido la oportunidad de conocer a la Dra. Daniela Toro, a quien le agradezco profundamente su inmensa amabilidad, paciencia, guía y apoyo constante durante este proceso. A Alessandra Dellarosa, quien dedicó su tiempo para orientarme y enseñarme los métodos de trabajo en un laboratorio, además de continuamente brindarme su apoyo y amistad. A Camila Pereira, probablemente la persona con quien más risas y buenos momentos he compartido en este lapso de tiempo, le agradezco especialmente por su amistad, generosidad, apoyo y buenos consejos. Y a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Virología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en especial a Francisco García, Bárbara Rojas, Natalia Poblete, Belén Peñailillo, Marcela Cayazzo, Aracelly Gaete, Paulina Aguilera, Felipe Velásquez, Sebastián Riquelme, Fabián Figueroa, Álvaro Thadani y al Dr. Fernando Valiente, por su buena disposición, amabilidad y simpatía.

También agradezco al laboratorio de Bionanotecnología y Microbiología de la Universidad Andrés Bello, en especial al Dr. José Manuel Pérez-Donoso y a Matías Vargas, sin los cuales no hubiera sido posible el desarrollo de mi seminario de título.

Por otra parte, deseo agradecer a mi familia, en especial a mis padres, abuelos y hermana, por su persistente preocupación, cariño, dedicación y sabios consejos. A mi primos, en especial a Cristián Del Canto, por su empatía y bondad infinita. A Soledad del Canto, por sus consejos y cariño constante. A Caterina Hernández, por su sinceridad, confianza y orientación durante este proceso.

Finalmente deseo agradecer a mis amigos, los cuales me permitieron sobrellevar mis crisis vocacionales, especialmente a Diego Hortuvia, por su sabiduría infalible. A Diego Del Canto, mi compañero de viaje, porque no existe nadie más con quien preferiría perderme por el mundo. A Andrés Gómez, por su generosidad, especialmente durante los momentos de estrés. Y un especial agradecimiento a Esteban Valencia, María Ignacia Velásquez, Gustavo Del Canto, Melissa Gómez, Bárbara Rojas S., Francisco Corvalán, Eliana Andahur, Andrés Gómez y Carla Barra.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de contenidos.....	v
Índice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas.....	ix
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	1
1.1.1 Estructura de la partícula viral de VIH-1.....	2
1.1.2 Organización genómica.....	3
1.1.3 Ciclo Replicativo de VIH-1.....	4
1.1.4 Síntesis de los transcritos virales.....	6
1.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	9
1.3 Quantum dots (QDs).....	12
1.3.1 Quantum dots de telurio de cadmio unidos a glutatión (QDs CdTe-GSH).....	15
1.4 Hipótesis.....	17
1.5 Objetivo General.....	17
1.6 Objetivos Específicos.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Generación de sondas de ARN complementarias a la región GagPol de VIH-	

1 mediante transcripción <i>in vitro</i>	18
2.1.1 Digestión del vector pBSK-GagPol.....	18
2.1.2 Trancrición <i>in vitro</i>	18
2.1.3 Tratamiento con DNAsa.....	20
2.1.4 Purificación <i>in vitro</i> de sondas de ARN.....	20
2.1.5 Fragmentación de ARN.....	21
2.1.6 Remoción del fosfato del extremo 5' de la sonda de ARN.....	21
2.1.7 Adición de un grupo sulfhidrilo (SH) al extremo 5' de las sondas de ARN.....	22
2.2. Acoplamiento de QDs CdTe-GSH al extremo 5' de los fragmentos de ARN.....	22
2.2.1 Determinación de la temperatura adecuada para el acoplamiento de QDs CdTe-GSH a la sonda de ARN.....	22
2.2.2 Síntesis y acoplamiento de QDs CdTe-GSH.....	23
2.3 Análisis de la localización sub-celular del ARN genómico de VIH-1 en presencia y ausencia de la proteína Rev mediante RNA FISH.....	24
2.3.1 Transfección de ADN.....	24
2.3.2 RNA FISH.....	25
RESULTADOS.....	27
3.1 Generación de sondas de ARN complementarias a la región GagPol de VIH-1 mediante transcripción <i>in vitro</i>	27
3.2 Determinación de la temperatura adecuada para el acoplamiento de QDs CdTe-GSH a la sonda de ARN.....	30
3.3 Síntesis y acoplamiento de QDs a la sonda de ARN.....	31
3.4 RNA FISH.....	32

3.4.1 Comparación entre sonda acoplada a QDs CdTe-GSH y UTP-digoxigenina.....	36
3.4.2 Evaluación de la penetración de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH al núcleo.....	38
3.4.3 Ensayos de especificidad de QDs CdTe-GSH.....	40
DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....	42
4.1 Comparación entre sondas acopladas a QDs CdTe-GSH.....	43
4.2 Estandarización y caracterización de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH..	45
CONCLUSIONES.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un virión maduro de VIH-1.....	2
Figura 2. Representación esquemática del ADN proviral de VIH-1 y VIH-2.....	3
Figura 3. Ciclo replicativo de VIH.....	5
Figura 4. Representación esquemática de los transcritos virales producidos durante el ciclo replicativo de VIH-1.....	7
Figura 5. Representación esquemática del vector pBSK-GagPol.....	19
Figura 6. Digestión del vector pBSK-GagPol.....	27
Figura 7. Análisis de la cinética de la transcripción <i>in vitro</i>	28
Figura 8. Análisis del tamaño de los fragmentos de ARN.....	29
Figura 9. Análisis del comportamiento de fragmentos de ARN expuestos s QDs CdTe-GSH a diferentes temperturas.....	30
Figura 10. Espectro de absorción de QDs CdTe-GSH.....	31
Figura 11. Espectro de emisión de QDs CdTe-GSH.....	31
Figura 12. Microscopia confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev.....	33
Figura 13. Microscopia confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev.....	35
Figura 14. Comparación RNA FISH utilizando sondas de ARN acoplada a QDs CdTe-GSH y UTP-digoxigenina.....	37
Figura 15. Visualización ortogonal de microscopía confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev.....	39
Figura 16. Microscopia confocal de RNA FISH en células HeLa previamente incubadas con 1 μg de QDs CdTe-GSH.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	Ácido ribonucleico genómico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP- γ -S	<i>Adenosine 5'-[γ-thio] triphosphate tetralithium salt</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
Bórax	Tetraborato de sodio
CCR5	<i>C-X-C chemokine receptor type 5</i> (Receptor de quimiocinas C-C de tipo 5)
CdTe	Cadmio-telurio
CdS	Cadmio-sulfuro
CdSe	Cadmio-selenio
CRM1	<i>Chromosome maintenance 1</i> (Mantenimiento del cromosoma 1)
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (Receptor de quimiocinas C-C de tipo 4)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dispersión dinámica de la luz)
DTT	Ditiotreitol
dUTP	<i>Deoxyuridine Triphosphate</i> (deoxiuridina trifosfato)
Env	<i>Envelope protein</i>
G	Guanina
Gag	<i>Group specific antigen</i> (Antígeno específico de grupo)
GSH	Glutación reducido
IN	Integrasa
IP	Ioduro de Propidio
kb	Kilobases
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (Repetición terminal larga)
MA	Matriz
mM	Milimolar

mg	Miligramos
mL	Mililitros
NC	Nucleocápside
Nef	<i>Negative Regulatory Factor</i> (Factor regulatorio negativo)
ng	Nanogramos
nm	Nanosegundos
NXF1	<i>Nuclear RNA export factor 1</i> (Factor de exportación de ARN nuclear 1)
ONU	Organización de las Naciones Unidas
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Buffer fosfato salino)
Pol	Polimerasa
PR	Proteasa
Rev	<i>Regulator of Virion</i> (Regulador del virión)
RNA FISH	<i>RNA Fluorescent in situ hybridization</i> (Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ARN)
rNTP	<i>Ribonucleoside tri-phosphate</i> (Ribonucleósido trifosfato)
RRE	<i>Rev response element</i> (Elemento de respuesta a Rev)
RT	Retrotranscriptasa
SH	Grupo sulfhidrilo
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i> (Citrato salino de sodio)
Tar	<i>Transactivation response element</i> (Elemento de respuesta a la transactivación)
Tat	<i>Trans-activator of Transcription</i> (Trans-activador de la transcripción)
TAE	Tris base, ácido acético y EDTA
TBE	Buffer Tris-acetato-EDTA
UTP	<i>Uridine-5'-triphosphate</i> (uridina trifosfato)
U	Unidad enzimática
QDs	Quantum dots
Vif	<i>Viral infectivity factor</i> (Factor de infectividad viral)
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

VIH-2	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2
Vpu	<i>Viral Protein U</i> (Proteína Viral U)
Vpr	<i>Viral Protein R</i> (Proteína Viral R)
Vpx	<i>Viral Protein X</i> (Proteína Viral X)
VRC	<i>Vanadyl ribonucleoside complex</i> (Complejo vanadil ribonucleósido)
μg	Microgramos
μL	Microlitros

RESUMEN

Los mecanismos involucrados en el control post-transcripcional del ciclo replicativo del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), específicamente los eventos moleculares que permiten la interacción del ARN genómico (ARNg) viral con la maquinaria celular para su transporte, traducción o empaque dentro de la célula, aún no han sido completamente dilucidados. Actualmente existen diversas técnicas para el estudio de la localización sub-celular de ARNg, entre las que destaca RNA FISH (RNA *Fluorescent in situ hybridization*), método ampliamente utilizado para el estudio de la localización y cambios temporales de ARN y ribonucleoproteínas. Generalmente, en esta técnica se utilizan sondas acopladas a fluoróforos orgánicos que hibridan a regiones específicas para las que han sido diseñadas. No obstante, estas sondas presentan fotoblanqueamiento significativo, y un espectro de emisión amplio (50-100 nm), lo que limita su uso. Es por esto que surge la necesidad de recurrir a nuevas alternativas, tales como sondas acopladas a Quantum dots (QDs), los cuales en contraste con fluoróforos orgánicos poseen una vida fluorescente significativamente más larga, mayor fotoestabilidad y un amplio espectro de absorción. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se propone la construcción de sondas específicas asociadas a QDs compuestos de Cadmio-Telurio recubiertos por Glutatión (QDs CdTe-GSH) que reconocen la región pBSK-GagPol como matriz para la transcripción *in vitro*, obteniendo así fragmentos de ARN, los cuales fueron desfosforilados en su extremo 5', para luego incorporarles en su lugar un fosfato γ unido a un grupo sulfhidrilo (SH). De esta forma, los transcritos de ARN fueron capaces de unirse a QDs CdTe-GSH a través de enlaces disulfuro. Generando así sondas de ARN

acoplada a QDs CdTe-GSH capaces de unirse al ARNg de VIH-1 en presencia y ausencia de la proteína Rev, la cual actúa como un regulador clave en el control post-transcripcional de la expresión génica viral, actuando principalmente en los procesos de exportación nuclear y traducción. De manera que en estas condiciones fue posible validar a través de experimentos de RNA FISH, el ingreso citoplasmático y nuclear de la sonda de ARN acoplada a QDs CdTe-GSH, además de una interacción específica con el ARN genómico de VIH-1. Este hecho representa la prueba de concepto de que es posible generar una sonda acoplada a QDs específica contra el ARN genómico de VIH-1, permitiendo el estudio de la expresión génica del virus, lo que también abre nuevas posibilidades para el estudio de VIH-2 u otros tipos de virus.

ABSTRACT

The mechanisms involved in the post-transcriptional control of the replicative cycle of the Human Immunodeficiency Virus (HIV), specifically the molecular events allowing the interaction between the viral genomic RNA (gRNA) and the cellular machinery for the transport, translation or packaging, have not been elucidated yet. Currently, the study of localization and temporary changes of RNA and ribonucleoproteins relies mainly on RNA FISH (RNA *Fluorescent in situ hybridization*)-based strategies. RNA FISH uses specific hybridization probes coupled to organic fluorophores. However, these fluorescent molecules commonly present limiting characteristics such as significant photobleaching and a wide emission spectrum (50-100 nm). Therefore, a considerable demand arises for new alternatives, such as probes coupled to Quantum dots (QDs), which in contrast to organic fluorophores, exhibit longer fluorescence lifetime, higher photostability and broad absorption spectra. Considering previous facts, the aim of this work was to develop specific probes coupled to glutathione-capped cadmium-telluride quantum dots (QDs CdTe-GSH), able of recognizing and associate with the Gag-Pol region present on the HIV-1 genomic RNA (gRNA). Thus, in order to achieve this objective, the vector pBSK-GagPol was used as a template for *in vitro* transcription of Gag-Pol complementary RNA, which was fragmented and dephosphorylated at the 5' end, with the purpose to incorporate a γ phosphate coupled to a sulfhydryl group (SH) instead. Then, the SH-containing RNA fragments were attached to QDs CdTe-GSH by a disulfide bond. As a result, we generated single-stranded RNA probes coupled to QDs CdTe-GSH capable of hybridizing to HIV-1 gRNA in the presence and absence of the viral protein Rev,

which acts as a key regulator of the post-transcriptional control of viral gene expression acting mainly during nuclear export and translation. Thereby, under these conditions, we validated the cytoplasmic and nuclear entrance of the probe coupled to QDs CdTe-GSH, and specific interaction between the probe and gRNA of HIV-1. This fact represents the proof of concept that it is possible to generate RNA probes coupled to QDs CdTe-GSH to study genetic expression of HIV-1, and also opens up new opportunities for the study of HIV-2 or other virus types.

INTRODUCCIÓN

1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) ha sido clasificado dentro del género *Lentivirus* (Sonigo y col., 1985), perteneciente a la familia *Retroviridae* (Chiu y col., 1985), familia compuesta por virus que se caracterizan por presentar un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva, replicando a través de una forma de ADN bicatenario proviral que se integra en el genoma de la célula hospedera (Temin & Mizutani, 1970). Existen dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2, los cuales están relacionados en términos de morfología, tropismo celular y efecto citopático. Pese a las similitudes en términos de organización genómica y tropismo celular, VIH-1 es más virulento e infeccioso que VIH-2, siendo considerado como el principal responsable de la pandemia VIH/SIDA en el mundo (Arya & Gallo, 1988), esta enfermedad actualmente afecta a 36,9 millones de personas, y ha sido asociada a 40 millones de muertes desde 1981, según el último reporte del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA).

1.1.1 Estructura de la partícula viral de VIH-1

A través de microscopía electrónica, se ha podido determinar que la partícula viral de VIH-1 consiste en una partícula esférica, de aproximadamente 80 a 120 nm de diámetro (Gentile y col., 1994), la cual está compuesta por tres capas concéntricas: La capa más externa, está constituida por una membrana lipídica de origen celular, donde se encuentran embebidas las glicoproteínas de superficie (gp120) y glicoproteínas de transmembrana (gp41) (Turner & Summers, 1999). Por otro lado, la capa intermedia se asocia a la capa interna de la membrana lipídica y está constituida

principalmente por la proteína matriz (p17). Finalmente, la capa interna esta conformada por una cápside icosaédrica de forma cónica, la cual esta compuesta por la proteína Cápside (p24). Esta estructura alberga dos copias de ARNg idénticas de polaridad positiva, las cuales junto a la proteína de la nucleocápside (NC) y las enzimas retrotranscriptasa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR), forman un complejo ribonucleoproteico (Figura 1).

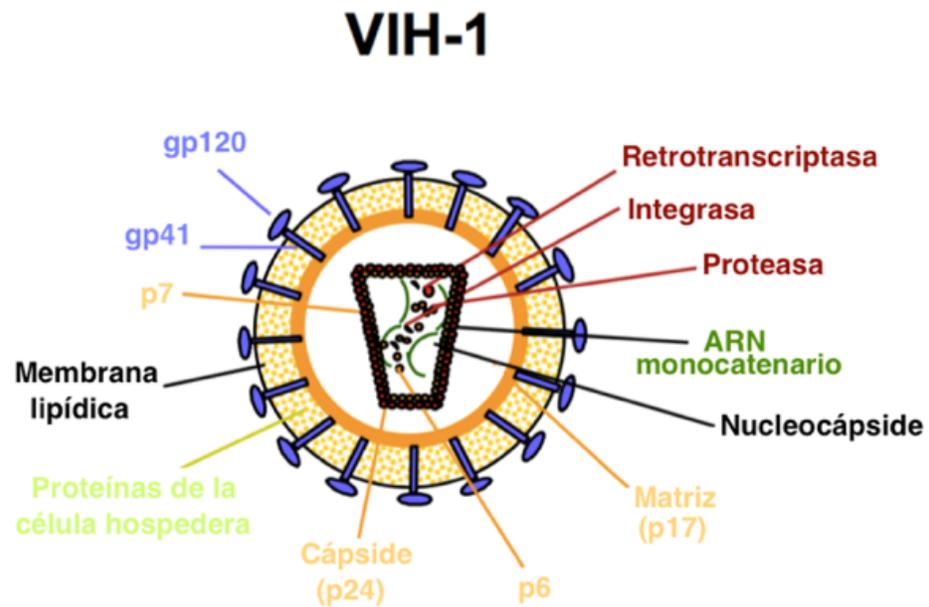


Figura 1. Representación esquemática de un virión maduro de VIH-1

1.1.2 Organización genómica

VIH presenta un genoma viral de ARN monocatenario con un largo aproximado de ~9-10 kb (Muesing y col., 1985), el cual contiene 9 genes (Figura 2) que permiten la síntesis de 16 proteínas víricas. Su organización genómica es similar y única entre retrovirus, debido a que en adición a los genes retrovirales clásicos (*gag*, *pol* y *env*) ambas variantes de VIH contienen los genes regulatorios (*rev*, *tat*) y accesorios (*nef*, *vif* y *vpr*) los cuales codifican productos que desempeñan diferentes funciones a lo largo del ciclo replicativo del virus (Frankel & Young, 1998, Li y col., 2005). Cabe señalar que existe un marco de lectura abierto único en el genoma de VIH-1, el cual codifica para la proteína accesoria Vpu (Strebel y col., 1988) mientras que VIH-2 codifica para la proteína exclusiva Vpx (Guyader y col., 1989) (Figura 2).

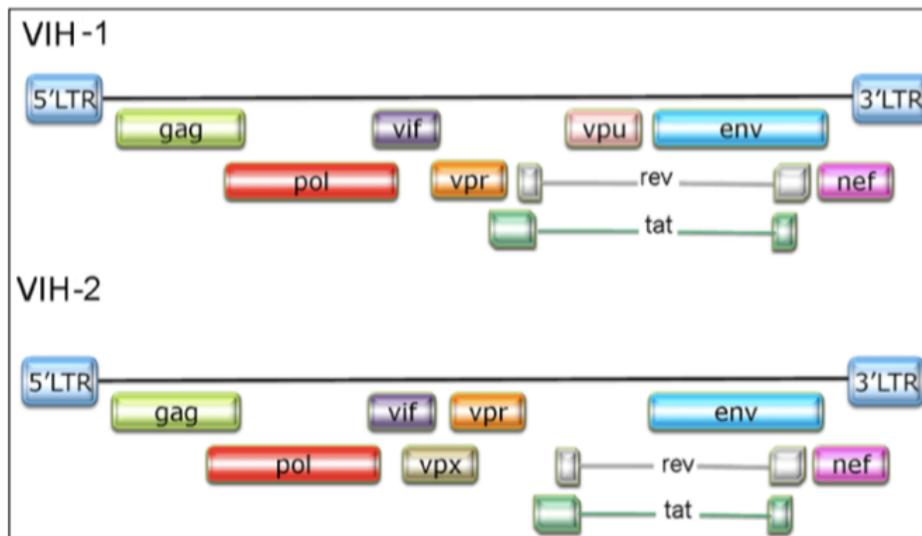


Figura 2. Representación esquemática del ADN proviral de VIH-1 y VIH-2.

1.1.3 Ciclo replicativo de VIH-1

El ciclo replicativo de VIH-1, se inicia con la unión entre la glicoproteína de superficie (gp120) presente en la superficie de la partícula viral, con el receptor CD4, localizado en la superficie de linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Dalglish y col., 1984, Klatzmann y col., 1984, Sattentau & Weiss, 1988) (Figura 3). Esta interacción, provoca la posterior asociación de la partícula viral a los co-receptores de quimiocinas (CXCR4 o CCR5) (Fauci, 1996, Zhang y col., 1997), evento que gatilla la generación de cambios conformacionales en gp120 que facilitan la inserción de gp41 en la membrana celular, generando la fusión entre la membrana viral y celular, proceso que permite la internalización de la cápside y la posterior liberación de su contenido en el citoplasma celular (Grewe y col.,1990) (Figura 3). A continuación, mediante un complejo proceso, la enzima RT convierte el ARN_v viral en ADN de doble hebra (Fields & Knipe, 1990), para luego ser importado al núcleo, donde se integrará en el genoma celular mediante la acción de la enzima IN viral, constituyendo el estado de provirus. Cabe destacar, que los procesos de retrotranscripción e integración también dependen de factores celulares inducidos durante la activación celular. Una vez integrado, el provirus puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva, con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada (Li y col., 2000) (Figura 3).

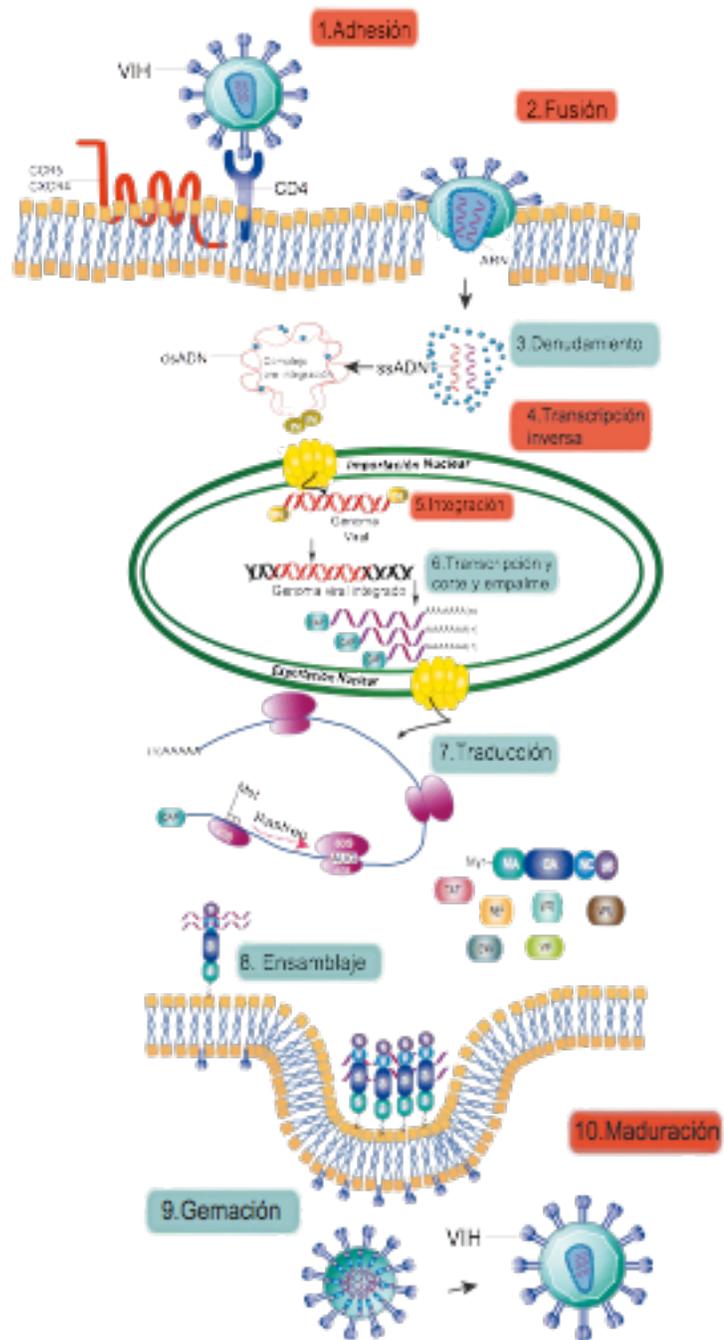


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH. Representación esquemática de las principales etapas del ciclo replicativo del VIH. Los cuadros en rojo indican las etapas del ciclo que actualmente son utilizadas como blanco terapéuticos por las drogas antirretrovirales aprobadas por la FDA. Imagen extraída de Pereira y cols., 2016.

1.1.4 Síntesis de transcritos virales

Una vez que el ADN proviral de VIH ha sido integrado en un cromosoma de la célula hospedera comienza la expresión génica viral, un proceso complejo que depende de la maquinaria celular para la transcripción, el procesamiento de ARN, la exportación nuclear y la traducción. La transcripción de VIH comienza con el reclutamiento de la ARN polimerasa II celular en el promotor presente en la región 5' LTR del provirus integrado. En este proceso, regulado por la función trans-activadora de la proteína viral Tat junto con varias proteínas del hospedero, la ARN polimerasa II sintetiza un transcrito único de 9-10 kb de largo idéntico al genoma viral presente en la partícula, el cual posee una estructura m⁷-metil-guanosina (*cap*) en su extremo 5' y una cola de poliadenosinas en su extremo 3' (Purcell & Martin, 1993). En etapas tempranas, este transcrito es utilizado como precursor (pre-ARNm) para la formación de distintos ARNm virales a través de corte y empalme (*splicing*) alternativo. Este proceso genera patrones complejos de ARNm los cuales son clasificados según su tamaño en ARNm virales totalmente procesados (2 kb), parcialmente procesados (4 kb) y no procesados (9 kb) (Figura 4). Durante las primeras etapas de la infección, los transcritos virales completamente procesados codifican para Tat, Rev y Nef (Bogerd y col., 1998). Sin embargo, a medida que transcurre el ciclo replicativo, las tasas de transcripción aumentan de manera abrupta gracias a la función trans-activadora de la proteína Tat (Gatignol y col., 2007). Además, la acumulación de la proteína Rev en el núcleo favorece la generación de los ARNm parcialmente procesados, los que codifican para la glicoproteína de superficie Env, las proteínas accesorias Vif, Vpr y Vpu, y del ARNm completo de 9 kb que codifica para Gag y Gag-Pol.

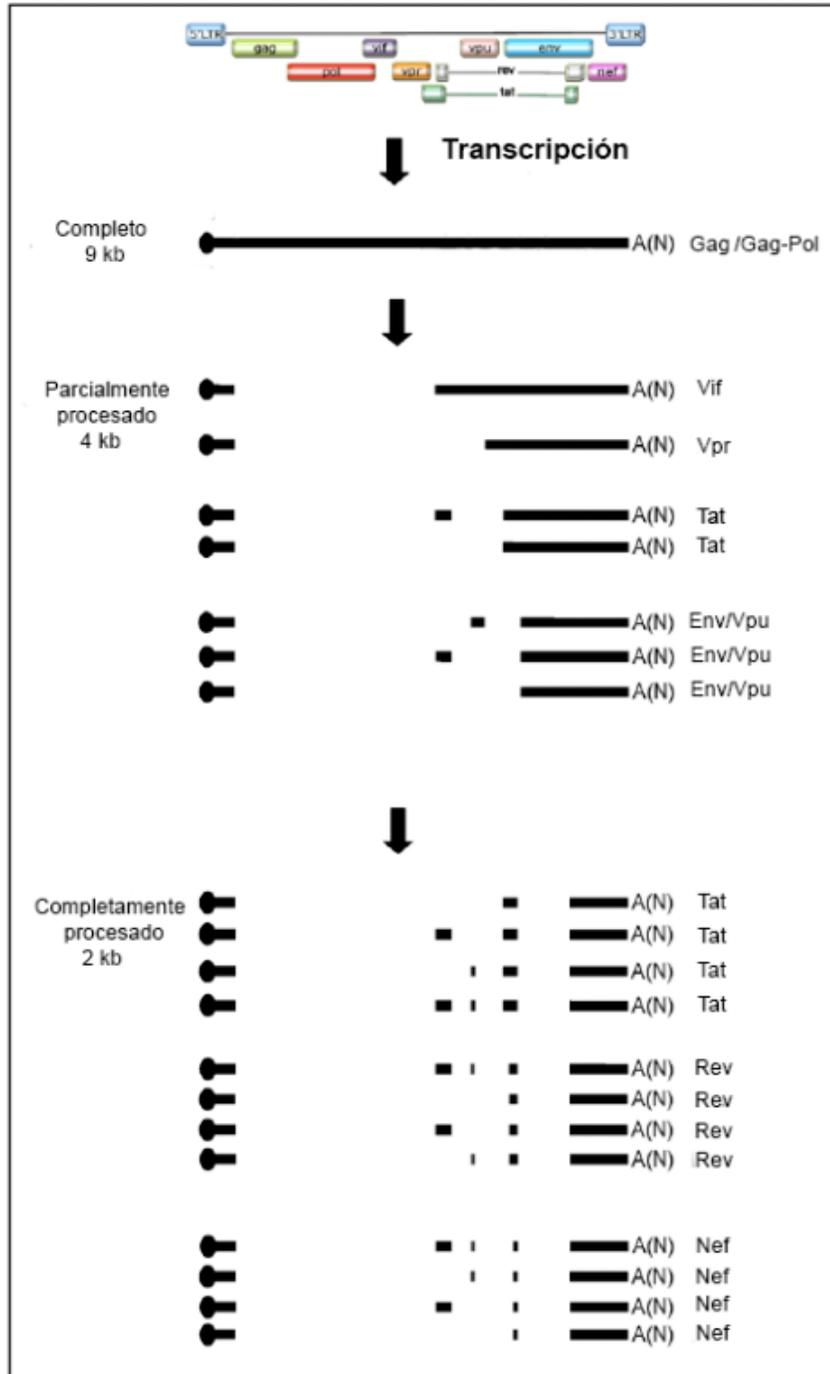


Figura 4. Representación esquemática de los transcritos virales producidos durante el ciclo replicativo de VIH-1. Transcritos no procesados son utilizados para la síntesis de Gag y Gag-Pol. Transcritos parcialmente procesados, codifican para Vif, Vpr, Tat y Vpu/Env. Por último, transcritos completamente procesados permiten la expresión de Tat, Rev y Nef.

El destino de los transcritos virales que contienen intrones depende principalmente de la proteína Rev, ya que esta proteína estimula el transporte núcleo-citoplasmático de ARNs virales que poseen intrones a través de la unión específica a una estructura de ARN presente en sus ARNm blanco (elemento de respuesta a Rev, RRE) y del reclutamiento del factor de exportación celular CRM1 (Cullen, 1998, Pollar & Halim, 1998). De esta forma, los transcritos virales que poseen intrones son retenidos y degradados en el núcleo en ausencia de Rev (Arrigo y col., 1992). Por otra parte, los transcritos completamente procesados de 2 kb son exportados bajo la vía canónica de exportación nuclear de ARNm celulares, la cual es mediada por el factor de exportación NXF1 (Cullen, 2003).

Una vez en el citoplasma, los transcritos virales deben reclutar la maquinaria de traducción celular para ser traducidos y así dar lugar a las distintas proteínas virales en el citoplasma, las cuales luego de ensamblarse podrán dar origen a nuevas partículas virales que son liberadas de la célula a través de gemación.

Considerando que la expresión génica de VIH esta sujeta a una serie de pasos regulatorios dependientes de la localización sub-celular del ARNg, el análisis espacial de esta molécula permitirá un mejor entendimiento del funcionamiento del virus y los procesos celulares que implica. Entre las técnicas mayormente empleadas para el estudio de la localización sub-celular de un ARN destaca la hibridación *in situ* fluorescente (RNA FISH), la cual permite la visualización directa de un ARN de interés al interior de los compartimentos sub-celulares mediante la hibridación de sondas específicas, esta metodología será abordada en la próxima sección.

1.2. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* es una técnica que permite visualizar la localización y detección de secuencias específicas de ADN y ARN a través de la hibridación de sondas exógenas de ARN o ADN complementarias a las mismas. Este método fue desarrollado en 1969, por dos grupos independientes, Gall y Pardue (Gall & Pardue, 1969) y H.A. John (John y cols, 1969), y desde ese entonces ha sido frecuentemente utilizado en biología molecular, específicamente en el estudio de la organización y función génica, diagnóstico de rearrreglos cromosomales, mapeo génico, detección de infecciones virales y análisis de la función génica durante el desarrollo embrionario.

A través del tiempo, esta técnica ha sufrido diversas modificaciones, principalmente a nivel estructural y de marcaje de la sonda utilizada, puesto que es un elemento determinante para la hibridación, y por ende, para la sensibilidad y especificidad de la técnica. Es por ello que en la elección de la sonda empleada deben considerarse factores estructurales tales como: el contenido de citosinas y guaninas, la naturaleza del ácido nucleico (ADN, ARN) y la longitud de la sonda empleada. Esto se evidencia en que un mayor largo implica mayor especificidad, aunque también conlleva condiciones de hibridación más estrictas, dado que sondas largas tienden a auto asociarse y formar agregados durante la hibridación, lo que dificulta su penetración en estructuras celulares.

De igual modo, el tipo de marcaje juega un rol fundamental en la elección de la sonda. Inicialmente, las sondas de hibridación utilizaron marcaje radioactivo, a través del uso de nucleótidos trifosfato de isótopos radioactivos (S^{35} , P^{33} , P^{32} , H^3) (Harrison y col., 1973). Sin embargo, esta técnica está sujeta a inconvenientes, tales como baja resolución espacial y dificultades asociadas a la manipulación y estabilidad de los

materiales radioactivos.

Por esta razón, fue necesario buscar nuevas alternativas para el marcaje de sondas, entre las que destaca la adición de moléculas antigénicas a las bases nitrogenadas de nucleótidos de trifosfato de la sonda, estas moléculas pueden ser reconocidas por anticuerpos o moléculas específicas asociadas a fluoróforos orgánicos o enzimas capaces de catalizar la deposición de sustratos fluorescentes. Este tipo de marcaje constituye una variante denominada Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH), la cual presenta diversas variantes, entre las que destaca RNA FISH (Singer & Ward, 1982), método que permite determinar la abundancia y ubicación sub-celular de moléculas de ARN celulares y virales, además de su tasa de transcripción y degradación. Igualmente, ha sido utilizada para el análisis de la actividad transcripcional de genes endógenos (Femino y col., 1998), como también de genes exógenos tales como los pertenecientes a genomas virales integrados (Narimatsu & Patterson, 2005, Popescu y col., 1993) y transgenes (Fan y col., 2001).

Habitualmente, sondas utilizadas para FISH, son marcadas con digoxigenina debido a que esta molécula es capaz de conjugarse con dUTP o UTP a través de una reacción enzimática, donde se une al carbono 5' del uracilo. Su detección esta mediada por su alta afinidad a los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados a la fosfatasa alcalina, peroxidasa, fluoresceína o rodamina (Boehringer, 1992, Beesey, 2001). Sin embargo, su estructura similar a esteroides, puede generar una reacción cruzada con determinados esteroides. Por otro lado, la biotina es otro marcador antigénico ampliamente utilizado, ya que se encuentra en diversas estructuras ricas en mitocondrias (hepatocitos, oncocitos) y puede ser detectada por anticuerpos anti-biotina o por su unión a avidina o estreptavidina. En principio, la biotina puede ser

detectada en la misma longitud de onda que la digoxigenina, dependiendo del fluoróforo acoplado a estreptavidina. Sin embargo, las sondas marcadas con digoxigenina poseen una mayor sensibilidad y menor marcación inespecífica que las biotiniladas (Morel & Cavalier, 2001).

No obstante, recientemente han surgido nuevas alternativas inorgánicas para el marcaje fluorescente de las sondas de hibridación, entre las que destacan los quantum dots (QDs), puesto que ofrecen numerosos beneficios en comparación a las sondas acopladas a fluoróforos orgánicos, debido a que presentan mayor fotoestabilidad y por ende mayor resistencia al fotoblanqueamiento, lo que permite una mayor exposición y provee altos niveles de sensibilidad a ARNs mensajeros blancos. Cabe destacar que los QDs, a diferencia de los marcadores antigénicos tales como digoxigenina o biotina, no necesitan el uso de anticuerpos para su detección, lo que reduce considerablemente los costos de producción. Por lo que, su uso en RNA FISH permitiría la superación de limitantes tales como la superposición de colores, el fotoblanqueamiento y la diferente emisión de intensidad de fluorescencia de los fluoróforos.

1.3. Quantum dots (QDs)

Los Quantum dots (QDs), conocidos también como puntos cuánticos, constituyen un grupo de nanocristales semiconductores, los cuales presentan un diámetro que fluctúa entre los 2 y 10 nm. Inicialmente fueron denominados nanoestructuras semiconductoras cero-dimensionales, debido a su capacidad para confinar el movimiento de los electrones en las tres dimensiones espaciales. Del mismo modo, también han sido llamados átomos artificiales, debido a que sus electrones forman órbitas de manera similar a la de los átomos, y por consiguiente, presentan comportamientos optoelectrónicos similares al de los átomos. Sin embargo, el término más comúnmente utilizado es “quantum dots”, el cual fue acuñado por el físico estadounidense Mark Reed en 1988 (Reed y col., 1988), quien buscaba reflejar el hecho de que son una clase especial de semiconductores, debido a que exhiben propiedades optoelectrónicas especiales, producto del confinamiento cuántico, fenómeno que se caracteriza por la baja movilidad de los electrones, lo que implica que los niveles de energía de los QDs están cuantizados y relacionados con el tamaño físico del mismo, presentando un comportamiento intermedio entre el material a nivel macroscópico y a escala atómica (Norris & Bawendi, 1995, Murray y col., 2000).

Los QDs presentan propiedades espectroscópicas modulables, es decir, el tamaño y composición de QDs determina el espectro de emisión de fluorescencia de la partícula, de manera que la síntesis de QDs con distintos parámetros tales como: soluciones amortiguadoras, pH, temperatura y moléculas precursoras, permiten la generación de QDs de distintos tamaños y características espectroscópicas, de acuerdo a los requerimientos de fluorescencia necesarios.

Esta característica, junto con su tamaño y estabilidad, los convierten en una alternativa atractiva para el estudio de procesos biológicos en organismos, debido a que posibilita

su introducción en células, e incluso el seguimiento de moléculas individuales, permitiendo obtener una información clave de cómo funcionan muchas enfermedades y de esta forma, facilitar la obtención de tratamientos adecuados. Específicamente, los QDs han sido utilizados para el tratamiento de enfermedades como el cáncer (Bagalkot y col., 2007, Gao y col., 2004), como sensores (Zhang & Johnson, 2006, Shi & col., 2006), y biomarcadores (*biolabels*) (Bruchez, y col., 1998, Chan, 1998).

Sin embargo, es importante resaltar su uso en la formación de imágenes biológicas (Hoshino y col., 2007), particularmente el uso de QDs como sondas fluorescentes, ya que además de poseer las ventajas de la detección de fluoróforos tradicionales en términos de sensibilidad y selectividad, dichas nanopartículas podrían minimizar los inconvenientes que se encuentran cuando se trabajan con fluoróforos orgánicos debido a sus propiedades espectroscópicas únicas:

Espectro de absorción: Los QDs presentan un amplio espectro de absorción, es decir, la excitación de un electrón del QDs se puede producir por absorción de luz de varias energías, permitiendo así la excitación de un amplio rango de longitudes de onda. Además, los QDs pueden ser excitados simultáneamente por una única fuente de luz (Alivisatos y col., 2005, Fortina y col., 2005). A diferencia de los fluoróforos orgánicos, los cuales poseen un espectro de absorción estrecho, en otras palabras, sólo pueden ser óptimamente excitados por la luz de una longitud de onda determinada, lo que usualmente hace necesario el uso de varias fuentes de excitación como tipo de fluoróforos.

Espectro de emisión: Los QDs presentan un espectro de emisión luminiscente estrecho (25-30 nm de ancho medio) y simétrico, de manera que absorben luz de un continuo de energía, pero emiten luz de energías discretas (un solo color) (Bruchez,

2005). Esta característica facilita la visualización simultánea de múltiples fluoróforos, lo que los convierte en una alternativa ideal para el monitoreo de varias interacciones intra e intercelulares en células y organismos. A diferencia de los fluoróforos orgánicos, los cuáles presentan un espectro de emisión relativamente amplio (50-100 nm), lo que produce la superposición de las diferentes señales (Ozkan, 2004).

Sensibilidad: Los QDs presentan una extensa separación entre el espectro de excitación y emisión (Desplazamiento de *Stoke*), característica que mejora la sensibilidad de detección, ya que el espectro de emisión completo de QDs puede ser detectado (Jaiswal & Simon, 2004).

Fotoestabilidad: Debido a su naturaleza inorgánica, los QDs poseen mínima interacción con el medio ambiente, lo que les proporciona resistencia a la degradación metabólica y contribuye a su alta fotoestabilidad (Bruchez, 2005), siendo mayor que la de fluoróforos orgánicos tales como rodamina, fluoresceína y *Alexa Fluor* (Bruchez, 1998, Chan, 1998, Dubertret y col., 2002, Hanaki y col., 2003, Jaiswal & Simon, 2004, Wu y col., 2003). Por lo tanto, podemos afirmar que los QDs son menos susceptibles al fotoblanqueamiento que los fluoróforos orgánicos (Michalet y col., 2001, Bruchez y col., 1998). Esta característica les permite ser expuestos a ciclos de excitación más largos, sin provocar pérdida de eficiencia luminiscente. Por consiguiente, los QDs son adecuados para estudios de crecimiento y desarrollo de organismos durante períodos largos.

Fluorescencia: Los QDs presentan tiempos de fluorescencia largos, los cuales se encuentran entre los 10 a 40 ns (Michalet y col., 2001, Dahan y col., 2001) lo que respalda una fluorescencia estable y fuerte siendo significativamente mayor que la de los fluoróforos orgánicos típicos o proteínas autofluorescentes que decaen en el orden de algunos nanosegundos (Michalet y col., 2001). Además, los QDs son altamente

fluorescentes al ser excitados por una fuente de luz ultravioleta (Ozkan y col., 2004).

Rendimiento cuántico: Los QDs poseen elevados rendimientos cuánticos, en otras palabras, la razón entre fotones absorbidos que resulta en fotones emitidos es generalmente mayor al 50%, (Bruchez, 2005) lo que da lugar a señales de emisión fluorescentes muy intensas. Cabe destacar que el rendimiento cuántico de los QDs, depende fuertemente de su recubrimiento, a diferencia de los fluoróforos orgánicos, el cual depende principalmente del medio.

Heteroconjugación: Los QDs poseen excelente estabilidad de sus propiedades ópticas al conjugarse con biomoléculas, de manera que pueden ser heteroconjugados para mayor biocompatibilidad (Portney & Ozkan, 2006). Los QDs se han conjugado con varias moléculas biológicas, tales como biotina (Bruchez y col., 1998), oligonucleótidos (Dubertret y col., 2002, Gerion y col., 2002) y proteínas, incluyendo avidina/estrepavidina (Wu y col., 2003), albúmina (Gao y col., 2002) e inmunoglobulinas (Chan, 1998, Wu y col., 2003, Jaiswal & Simon, 2004, Goldman y col., 2002). Además su relación superficie-volumen les permite conjugarse a múltiples ligandos. En la mayoría de los casos, las funciones biológicas de estas moléculas no son afectadas por su unión a los QDs.

1.3.1 Quantum Dots de telurio de cadmio unidos a glutatión (QDs CdTe-GSH)

Con el fin de mejorar la eficiencia de fotoluminiscencia y compatibilidad de los QDs, se desarrollaron QDs formados por una mezcla de elementos de los grupos II-IV, III-VI de la tabla periódica, en un sistema núcleo-coraza (*core-shell*). QDs *core-shell* se componen de un núcleo semiconductor (*core*), el cual determina las propiedades espectroscópicas y catalítica de los QDs, y por una capa externa (*shell*), la cual modula su toxicidad y protege el núcleo contra la oxidación, de forma que aumenta la

estabilidad de los QDs e incluso es capaz de incrementar la luminiscencia de estas nanopartículas (Hoshino y col.,2004, Gaponik y col., 2002).

Particularmente, QDs de telurio de cadmio (QDs CdTe), constituyen un tipo de QDs *core-shell*, ampliamente utilizados, ya sea en paneles solares (Bang & Kamat, 2009, Kongkanand y col., 2008), dispositivos optoelectrónicos (Faraon y col., 2007) y terapias fotodinámicas (Rakovich y col., 2010). Sin embargo, su uso en sistemas biológicos esta sujeto a limitaciones, debido a que QDs CdTe exhiben poca biocompatibilidad (Hardman y col.,2006, Lovric y col.,2005, Schneider y col., 2009). Es por esto que el laboratorio del Dr. Pérez-Donoso desarrolló el método biomimético de síntesis de QDs CdTe recubiertos con glutatión (GSH), el cual permite la obtención de QDs altamente fluorescentes y biocompatibles, bajo condiciones de pH, temperatura y niveles de oxígeno que permiten el crecimiento de microorganismos (Pérez-Donoso y col., 2012). Además su cubierta de GSH (tripéptido presente en células eucariontes y bacterias Gram negativo) actúa como agente estabilizante y reductor, de manera que aumenta la biocompatibilidad y solubilidad de los diferentes QDs, tales como los compuestos por CdTe, CdSe y CdS (Monrás y col., 2014). No obstante, pese a su amplia posibilidad de uso en sistemas biológicos y a sus características espectroscópicas excepcionales, aún no se ha evaluado el acoplamiento de QDs CdTe-GSH a oligoribonucleótidos, es por estas razones por las que proponemos su uso para el estudio de ARNg viral de VIH-1 en células HeLa transfectadas con el provirus NL4.3 mediante ensayos de RNA FISH.

1.4. Hipótesis

El acoplamiento de quantum dots de cadmio-telurio recubiertos por glutatión (QDs CdTe-GSH) a sondas de ARN específicas a la región GagPol de VIH-1 permite analizar la localización sub-celular del ARN genómico de VIH-1 en presencia y ausencia de la proteína Rev, mediante ensayos de hibridación *in situ* fluorescente y microscopía confocal.

1.5. Objetivo General

Desarrollar sondas acopladas a QDs CdTe-GSH para analizar la localización sub-celular del ARN genómico de VIH-1 mediante ensayos de hibridación *in situ* fluorescente y microscopía confocal.

1.6. Objetivos específicos

- a) Generar sondas de ARN complementarias a la región Gag-Pol de VIH-1 mediante transcripción *in vitro*.
- b) Sintetizar QDs CdTe-GSH, capaces de unirse a la sonda de ARN.
- c) Acoplar QDs CdTe-GSH al extremo 5' de las sondas de ARN.
- d) Validar la sonda a través del análisis de la localización sub-celular del ARN genómico de VIH-1 en presencia y ausencia de la proteína Rev mediante hibridación *in situ* fluorescente y microscopía confocal.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Generación de sondas de ARN complementarias a la región GagPol de VIH-1 mediante transcripción *in vitro*.

2.1.1 Digestión del vector pBSK-GagPol.

La generación de sondas específicas para el ARN genómico (ARNg) de VIH-1 se realizó a partir del vector pBSK-GagPol (Figura 5) (Soto-Rifo y col., 2013) el cual fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* (*New England Biolabs*) durante 2 h a 37°C (Figura 6), para luego ser purificado mediante precipitación con etanol 100% a -20°C durante una noche. Al día siguiente, se centrifugó a 16.060 g a 4°C por 30 min. Secuencialmente, se procedió a eliminar el sobrenadante para luego lavar la muestra con etanol 70%. Nuevamente, se centrifugó a 16.060 g a 4°C por 10 min, para así finalmente descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 20 µL de agua libre de nucleasas. La muestra fue cuantificada mediante Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) con el fin de obtener una concentración final de 1 µg/µL del vector pBSK-GagPol lineal.

2.1.2 Transcripción *in vitro*.

La transcripción *in vitro*, brevemente consiste en la adición de 5 µL de *Transcription Optimized 5X Buffer*, 0,75 µL DTT (100 mM), 0,5 µL de *Recombinant RNasin*® *Ribonuclease Inhibitor*, 4 µL de ribonucleótidos trifosfato (rNTP) (rATP,CTP,rGTP y rUTP, cada uno a 10 mM), 1 µL de pBSK-GagPol (1 µg/µL) y 0,5 µL de RNA Polimerasa T3 (20 U/µL), en un volumen final de 25 µL.

En esta reacción el vector pBSK-GagPol fue utilizado como matriz para la RNA Polimerasa T3, la cual inicia la transcripción debido al promotor T3 presente río abajo de la región Gag-Pol en la hebra antisentido del vector pBSK Gag-Pol. La reacción se incubó 5 h a 37°C, el tiempo de incubación fue previamente determinado a través de la realización de una cinética de transcripción *in vitro* de 6 h, en la cual se tomaron 2 µL cada 1 h (Figura 7).

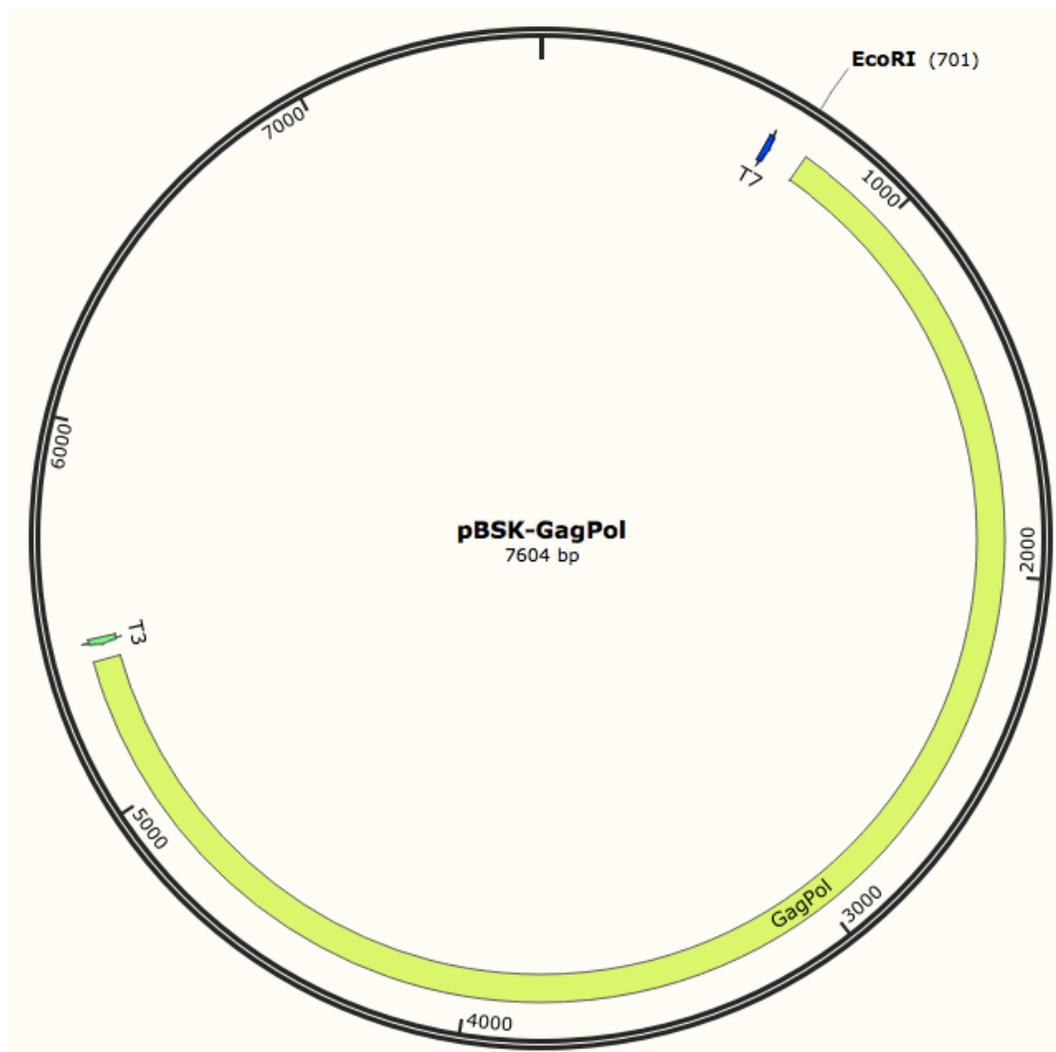


Figura 5. Representación esquemática del vector pBSK-GagPol, se indican la secuencia promotor T3 y T7, región GagPol y sitio de corte de la enzima de restricción EcoRI .

2.1.3 Tratamiento con DNAsa.

Una vez terminada la transcripción *in vitro*, se procedió a realizar la remoción del ADN remanente y cationes divalentes de la muestra (Magnesio y Calcio). Para esto se utilizó el kit *TURBO DNA-free™* (Life Technologies). Específicamente, se añadieron 1 μL de DNAsa, 3 μL *DNAsa Buffer 10X*, 2 μL de agua a 24 μL de la muestra obtenida del paso anterior. Para luego incubar la solución 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 3 μL de solución *Stop*, para luego ser incubado 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó 10 min a 16.060 g y se recuperó el sobrenadante.

2.1.4 Purificación *in vitro* de sondas de ARN.

Con el propósito de remover sales y rNTPs no incorporados, se utilizó el kit *AgenCourt® RNA Clean XP (Beckman Coulter)*. Para esto, se le agregó agua a la solución previamente obtenida, hasta obtener un volumen final de 50 μL , para luego agregar 90 μL de *AMPure RNA Clean XP beads*. La solución se mezcló suavemente y fue incubada 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se ubicó en el *Magnetic Stand* por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se añadió cuidadosamente 180 μL de Etanol 70% por 30 s. El sobrenadante fue extraído y se repitió este último paso. A continuación, se centrifugó la muestra un minuto a 1000 g. Nuevamente, la muestra fue situada en el *Magnetic Stand* por 30 s, y se removió el etanol residual. La muestra se retiró del *Magnetic Stand* y fueron añadidos 12 μL de agua ultra pura a la muestra, se esperó 3 min antes de volver a ubicarlo 3 min más en el *Magnetic Stand*. Finalmente se recuperaron 11 μL , de los cuales 1 μL fue utilizado para la cuantificación de la muestra.

2.1.5 Fragmentación de ARN.

La fragmentación se realizó con el *RNA Fragmentation Buffer* (Ambion, Life Technologies). Se procedió a fragmentar la sonda de ARN esperando obtener fragmentos de aproximadamente 200 nucleótidos según indica el fabricante. Este paso, depende de la cantidad de ARN obtenido, de forma que si se obtienen 2-20 μg de ARN, se agregó agua hasta obtener un volumen final de 9 μL , para luego agregar 1 μL de *RNA Fragmentation Buffer* (Ambion) y se incubó a 70°C por 12 min, para luego agregar 1 μL de solución *Stop*. Finalmente, la muestra nuevamente fue purificada a través del kit *AgenCourt® RNA Clean XP* con el protocolo descrito en la sección 2.1.4.

2.1.6 Remoción del fosfato del extremo 5' de la sonda de ARN.

La sonda de RNA obtenida del paso anterior fue expuesta a la acción de la enzima CIP (New England Biolabs), con el objetivo de desfosforilar su extremo 5'. La cantidad de CIP utilizada depende de la cantidad de ARN obtenido del paso anterior, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se utilizó 0,5 U de CIP para desfosforilar 1 μg de ARN, luego se agregó 2 μL del buffer *CutSmart®* (New England Biolabs) y se añadió agua para obtener una reacción con un volumen final de 20 μL . La reacción se incubó 30 min a 37°C. Una vez finalizado este procedimiento, la muestra nuevamente fue purificada a través del kit *AgenCourt® RNA Clean XP* con el protocolo descrito en la sección 2.1.4.

2.1.7 Adición de un grupo sulfidriilo (SH) al extremo 5' de las sondas de ARN.

Una vez desfosforilado el extremo 5' de la sonda, se procedió a fosforilarlo a través del uso de la enzima *T4 Polynucleotide Kinase* (New England Biolabs), la cual es capaz de catalizar la transferencia del fosfato γ unido a un grupo SH del ATP- γ -S (*Adenosine 5'-[γ -thio] triphosphate tetralithium salt, Sigma Aldrich*) al extremo 5' terminal de la sonda.

Específicamente, se le añadió al ARN obtenido en el pasó anterior, 2 μ L de *Buffer Kinase 10X*, 1,37 μ L de ATP- γ -S (0,01 μ g/ μ L) y 1 μ L de *T4 Polynucleotide Kinase*, (New England Biolabs) en una volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó una hora a 37°C y fue expuesta 2 min a 95°C para asegurar la inactivación de la enzima. Una vez finalizado este procedimiento, la muestra nuevamente fue purificada a través del kit *AgenCourt @ RNA Clean XP* con el protocolo descrito en la sección 2.1.4.

2.2. Acoplamiento de QDs CdTe-GSH al extremo 5' de los fragmentos de ARN.

2.2.1 Determinación de la temperatura adecuada para el acoplamiento de QDs CdTe-GSH a la sonda de ARN.

Previo al acoplamiento de QDs, es necesaria la realización de controles que permitan determinar la temperatura adecuada para la reacción de acoplamiento de los QDs a la sonda de ARN, con el objetivo de evitar su degradación. Para esto fue necesario la elaboración de una sonda de ARN en la que se omite el paso de la fragmentación (sección 2.1.5). De forma, que se realiza una transcripción *in vitro* (sección 2.1.2), tratamiento con DNAsa (sección 2.1.3) y purificación (sección 2.1.4). Posteriormente 1 μ g del ARN obtenido es adicionado a 10 μ L de QDs CdTe-GSH (1 mg/mL), el cual fue expuesto a diferentes condiciones de temperatura (4°C, temperatura ambiente y 37°C), con el fin de evaluar la estabilidad del ARN en presencia de QDs CdTe-GSH.

2.2.2 Síntesis y acoplamiento de QDs CdTe-GSH.

Esta parte de la metodología se realizó en colaboración con el Dr. José Manuel Pérez-Donoso de la Universidad Andrés Bello, el cual desarrolló el método biomimético para la síntesis de QDs CdTe-GSH (Pérez-Donoso 2012), procedimiento que reproduce las condiciones encontradas en sistemas biológicos, tales como el pH, temperatura y niveles de oxígeno que permiten el crecimiento de microorganismos.

Básicamente, para la síntesis biomimética de QDs CdTe-GSH, se preparó una solución de 15 mM de glutatión (GSH), 6mM de cloruro de cadmio (CdCl_2) y 1 mM de telurito de potasio (K_2TeO_3 , >95%) en amortiguador bórax-Citrato, pH 9.5. Una vez homogeneizada la solución, se incubó a 90°C durante 75 min para obtener QDs CdTe-GSH verdes. Para la obtención de QDs CdTe-GSH amarillos, la solución debe ser incubada entre 4 y 6 h, mientras que para los QDs CdTe-GSH rojos es necesario un tiempo de incubación mayor a 12 h. Es necesario agregar que QDs CdTe-GSH verdes presentan un tamaño de 3.3 nm, amarillos de 4,3 y rojos de 5.5 nm (Pérez-Donoso y col., 2012, Gautier y col., 2013). Por ende, a medida que el tamaño de los QDs CdTe-GSH aumenta, su emisión varía de verde a rojo, por lo tanto cada tipo de QDs CdTe-GSH exhibe un espectro de absorción y emisión característico, de forma que una vez sintetizados los QDs CdTe-GSH se procede a verificar su espectro de absorción y emisión a través del análisis de 100 μL de muestra mediante *SynergyTM H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* (Biotek). Una vez que se verifica que los QDs sintetizados cumplen las características requeridas, se procedió a eliminar el exceso de reactivos remanentes en la solución de síntesis (Cd^{+2} , Te^{-4} , GSH, borato), a través diálisis, es decir se filtran a través de membranas de diálisis (*Dialysis tubing cellulose membrane*, Sigma Aldrich), los cuales poseen poros de 14 kDa de tamaño.

Posteriormente los QDs fueron liofilizados, y su concentración fue determinada mediante peso seco, para luego agregar la cantidad de agua libre de nucleasas necesaria para obtener una concentración final igual a 100 mg/mL.

Finalmente, se procedió a acoplar QDs CdTe-GSH a la sonda de ARN, mediante la incubación de 2 mg/mL de QDs CdTe-GSH con 350 ng/mL de la sonda de ARN por 16 h a 4°C en PBS pH 8,0.

2.3. Análisis de la localización sub-celular del ARN genómico de VIH-1 en presencia y ausencia de la proteína Rev mediante RNA FISH.

2.3.1. Transfección de ADN.

Se sembraron 100.000 células HeLa por pocillo de 3,9 cm² (placa de 12 pocillos) mantenidas en medio DMEM (Life Technologies) suplementadas con 10% suero fetal de bovino (Hyclone) más antibióticos (Penicilina (100 U/mL), Estreptomina (0.1 mg/mL), y Anfotericina B (0,25 µg/mL)) las cuales fueron incubadas a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%. A las 24 h, las células fueron transfectadas utilizando el polímero catiónico PEI (*PolyScience*). La proporción de µg ADN/µL PEI utilizada para todas las transfecciones fue de 1:5. (Reed y col., 2006). Se generaron las siguientes condiciones:

- a) Control sin transfectar (Mock)
- b) Células transfectadas con 1 µg del vector proviral pNL4.3 (contiene el genoma completo de VIH-1, con una mutación en el gen *env* generando un cambio en el marco de lectura del gen, con el fin de evitar la expresión de las glicoproteínas de superficie. Esto permite su utilización en laboratorios con nivel de bioseguridad 2) (Adachi y col., 1986).

- c) Células transfectadas con 1 μ g del vector proviral pNL4.3 Δ Rev (presenta una mutación en el gen *rev*, de manera que abole la expresión de la proteína Rev).

2.3.2. RNA FISH

Con el objetivo de validar la sonda acoplada a QDs, se realizaron ensayos de RNA FISH en células previamente transfectadas en el paso anterior, utilizando la sonda acoplada a QDs y la sonda marcada con UTP-digoxigenina (Soto-Rifo y col., 2013) como control. A las 24 h post transfección, las células fueron lavadas dos veces con 1X PBS y fijadas por 10 min a temperatura ambiente con 4% paraformaldehído. Subsecuentemente, las células fueron permeabilizadas con 0.2% Triton X-100 por 5 min a temperatura ambiente y luego hibridadas toda la noche a 37°C en 200 μ l de mix de hibridación (10% sulfato de dextrano, 2 mM complejo vanadil-ribonucleósido [VRC], 0.02% BSA libre de ARNasa, 50% formamida, 300 μ g ARNt y 120 ng de sondas) en una cámara húmeda. Posterior a la hibridación, las células fueron lavadas con solución 50% formamida/0.2X SSC (30 mM NaCl, 3 mM citrato de sodio) durante 30 min a 50°C. A continuación, células expuestas a sondas acopladas a QDs CdTe-GSH, fueron incubadas por 30 min en solución de bloqueo (*DIG Wash and Block Buffer set*, Sigma-Aldrich). Por otro lado, células incubadas con la sonda marcada con UTP-digoxigenina son lavadas tres veces con buffer de dilución de anticuerpos (2X SSC (300 mM NaCl, 30 mM de citrato de sodio), 8% formamida, 2 mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa). Para luego añadirles anticuerpos primarios *sheep anti-digoxin* (Sigma-Aldrich) diluido 1/100 en buffer de dilución de anticuerpos (2x SSC, 8% formamida, 2mM VRC, 0.02% BSA libre de ARNasa) por 2 h a temperatura ambiente. Inmediatamente, las células control fueron lavadas 3 veces con buffer de dilución de anticuerpo e incubadas con *anti-sheep Alexa 488* (Molecular Probes) diluidos a 1/500 por 90 min a temperatura

ambiente.

Por último, tanto las células incubadas con sonda acopladas a QDs CdTe-GSH como las células control fueron lavadas tres veces con 1X PBS, y son incubadas con 10 μ L Ioduro de Propidio (IP) por 2 min a temperatura ambiente, nuevamente fueron lavadas tres veces con 1X PBS, una vez con agua y finalmente montadas con solución de montaje *Fluoromount* (Life Technologies).

Como control de especificidad se realizó RNA FISH, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, pero con la única diferencia que en vez de utilizar 120 ng de sondas, se utilizó 1 μ g de QDs CdTe-GSH, con el objetivo de evaluar el comportamiento de QDs CdTe-GSH no acoplados a sondas en células HeLa.

Finalmente, la localización sub-celular del ARNg en ausencia y presencia de la proteína Rev fue realizada en el Centro de Genómica y Bioinformática de la Universidad Mayor, a través del microscopio confocal TCS SP8 (*Leica Microsystems*), el posterior análisis de imágenes fue llevado a cabo mediante el programa FIJI/ImageJ (NIH).

RESULTADOS

3.1. Generación de sondas de ARN complementarias a la región Gag-Pol de VIH-1 mediante transcripción *in vitro*.

La generación de sondas específicas para reconocer el ARN genómico (ARNg) de VIH-1 se inicia a partir del vector pBSK-GagPol (7,604 kb), el cual fue previamente obtenido a través de la inserción del fragmento Gag-Pol (extraído del vector proviral pNL4.3) en el vector pBluescript previamente digerido con la enzima EcoRV (Soto-Rifo y col., 2013).

Previo a la transcripción *in vitro*, pBSK-GagPol es linealizado a través de la enzima de restricción *EcoRI* (New England Biolabs), y fue verificado a través de electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 6). Debido a que la linealización incorrecta del vector puede originar transcritos incompletos o de un mayor largo al requerido, lo cual afectaría las etapas posteriores de hibridación de la sonda al ARNg de VIH-1.

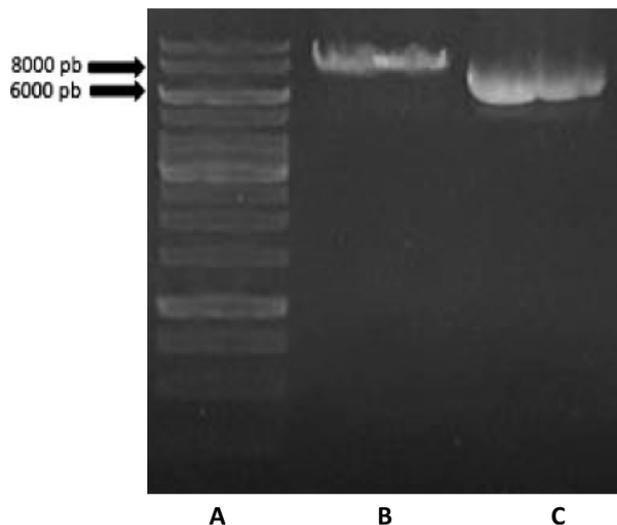


Figura 6. Digestión del vector pBSK-GagPol. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con *MaestroSafe™*. A) *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* B) pBSK-GagPol sin digerir C) pBSK-GagPol digerido con la enzima de restricción *EcoRI*

A continuación, con el fin de establecer el tiempo adecuado de incubación de la transcripción *in vitro*, se procedió a realizar una cinética de la transcripción *in vitro* de 6 h, tomando 2 μ L de la reacción de transcripción *in vitro* cada 1 hora. Posteriormente, los ARN extraídos en cada tiempo de la cinética de transcripción *in vitro* fueron visualizados a través de electroforesis en un gel de agarosa 1% (Figura 7). Inicialmente, a los minutos de haberse iniciado la transcripción *in vitro*, sólo se puede distinguir el vector pBSK-GagPol (Figura 7B). No obstante, a medida que transcurre el tiempo se empieza a reconocer la generación de ARN, pudiendo observar inicialmente fragmentos de menor tamaño, lo que sugiere la generación de productos de transcripción incompleta (Figura 7D,E). Subsecuentemente, se puede apreciar un aumento en el tamaño y cantidad de los transcritos (Figura F,G), pudiendo así concluir que 5 h es el tiempo adecuado de incubación. En vista de que una vez alcanzadas las 6 h de incubación (Figura 7H), es posible distinguir degradación del ARN.

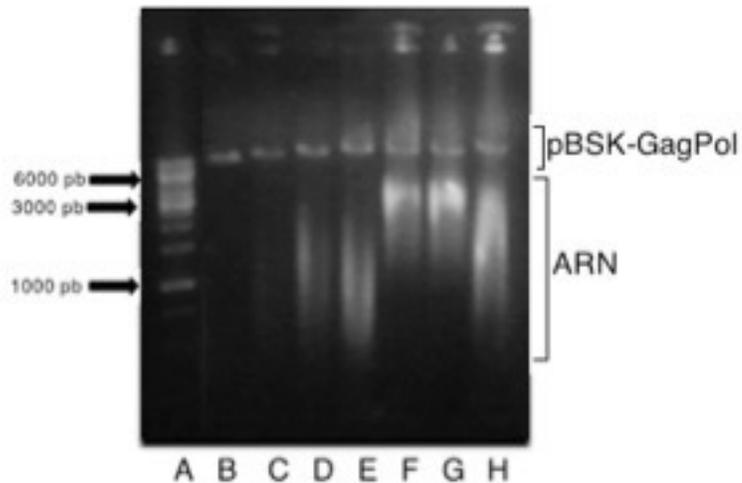


Figura 7. Análisis de la cinética de la transcripción *in vitro*. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con MaestroSafe™. A) GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Transcripción *in vitro* a diferentes tiempos B) 0 h, C) 1 h, D) 2 h, E) 3 h, F) 4 h, G) 5 h, H) 6 h.

Una vez determinado el tiempo de incubación, se procedió a realizar la transcripción *in vitro* a partir del vector pBSKGag-Pol (2.1.2), la remoción del ADN contaminante (2.1.3), la fragmentación de la sonda (2.1.5), para luego desfosforilar su extremo 5' (2.1.6) y finalmente agregar un grupo fosfato unido a un grupo SH (2.1.7). Posteriormente, a través de un gel de poliacrilamida 10% (Figura 8), se comparó el tamaño entre la sonda fragmentada (2.1.5), y la sonda finalizada (2.1.7). En el primer caso, es posible distinguir una población heterogénea de fragmentos de ARN (Figura 8B). Sin embargo, estos fragmentos fueron sometidos nuevamente a purificación *in vitro* (2.1.4), pudiendo así delimitar su tamaño a un menor rango (Figura 8C).

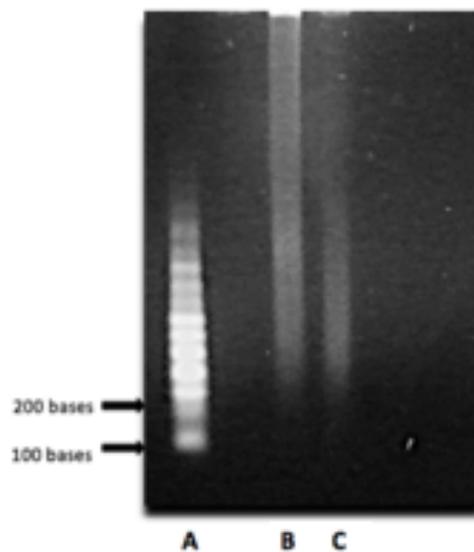


Figura 8. Análisis del tamaño de los fragmentos de ARN. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10%, 8M Urea y 0,5x TBE teñido con MaestroSafe™. A) *RiboRuler Low Range RNA Ladder* B) Sonda de ARN fragmentada C) Sonda de ARN con grupo fosfato unido a un grupo sulfhidrilo en su extremo 5'.

Se debe recalcar que el tamaño de la sonda repercute directamente en las condiciones de hibridación y en la penetración celular de la sonda. Dado que el protocolo utilizado para la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH fue adaptado a partir del de la sonda marcada con UTP-digoxigenina, es necesario señalar que ésta fue sometida a las mismas condiciones de fragmentación y purificación, por lo tanto,

ambas sondas deberían presentar un longitud similar.

3.2. Determinación de la temperatura adecuada para el acoplamiento de QDs CdTe-GSH a sonda de ARN.

Previo al acoplamiento de QDs CdTe-GSH a la sonda de ARN, es necesaria la realización de controles preliminares que permitan determinar la temperatura adecuada para la reacción de acoplamiento de QDs a la sonda de ARN, con el objetivo de evitar su degradación. De forma que al exponer la sonda de ARN a 4°C, temperatura ambiente y 37°C, se pudo determinar que 4°C es la temperatura en donde se genera una menor degradación de la sonda de ARN (Figura 9). En consecuencia, se procedió a acoplar la sonda de ARN a QDs CdTe-GSH a 4°C.

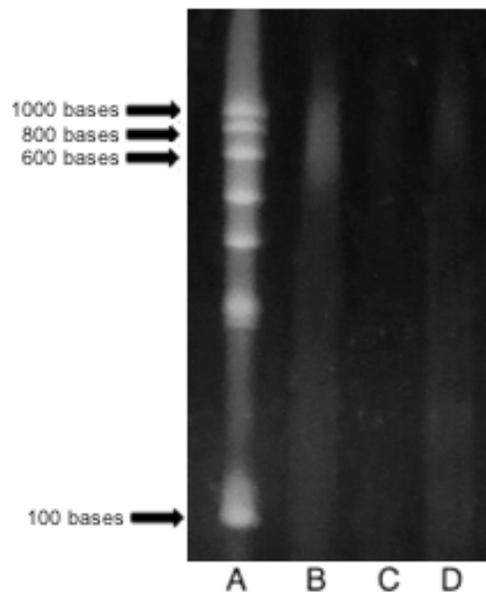


Figura 9. Análisis del comportamiento de fragmentos de ARN expuestos a QDs CdTe-GSH a diferentes temperaturas. Electroforesis en gel de poliacrilamida 10%, 8M Urea y 0,5x TBE. A) *RiboRuler Low Range RNA Ladder* B) Sonda de ARN en solución QDs CdTe-GSH sólo expuesta a 4°C C) Sonda de ARN en solución QDs CdTe-GSH expuesta a temperatura ambiente C) Sonda de ARN en solución QDs CdTe-GSH sólo expuesta a 37°C durante 90 min.

3.3. Síntesis y acoplamiento de QDs CdTe-GSH a la sonda de ARN.

Una vez alcanzado el tiempo de incubación de síntesis de QDs CdTe-GSH se procedió a verificar ópticamente los espectros de absorción y emisión a través de la excitación de los QDs CdTe-GSH a 360 nm mediante el equipo *Synergy™ H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader* de *Biotek*. Obteniendo un espectro de absorción (Figura 10) el cual alcanza un máximo de absorción de 467 nm, mientras que el espectro de emisión (Figura 11) presenta un máximo de emisión de 506 nm, datos que efectivamente corresponden a QDs CdTe-GSH verdes (Pérez-Donoso y col., 2012).

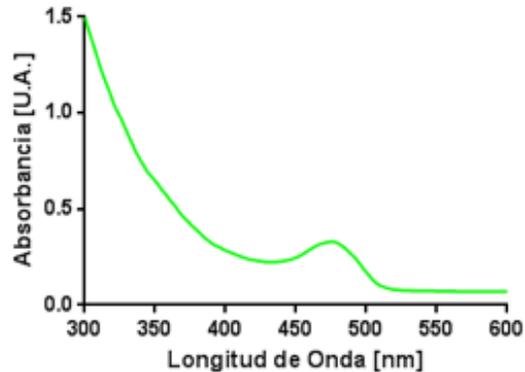


Figura 10. Espectro de absorción de QDs CdTe-GSH verdes. Curva de absorción fluorescente de QDs CdTe-GSH sintetizados mediante el método biomimético. Se puede apreciar un máximo de absorción a los 467 nm

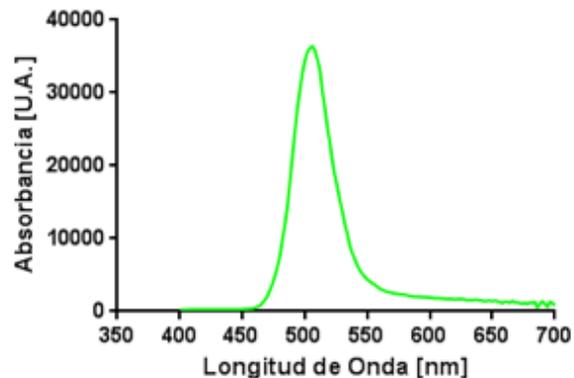


Figura 11. Espectro de emisión de QDs CdTe-GSH. Curva de emisión fluorescente de QDs CdTe-GSH verdes sintetizados mediante el método biomimético y excitados a 360 nm. Se puede apreciar un máximo de emisión a los 506 nm.

3.4. RNA FISH

Ensayos iniciales de RNA FISH demostraron que fue posible el reconocimiento de ARNg de VIH-1 por parte de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH, tanto en células transfectadas con pNL4.3 como con pNL4.3 Δ Rev (Figura 12).

En el primer caso, se puede apreciar una distribución heterogénea del ARNg a lo largo del citoplasma de distintas células, lo que coincide con la localización del ARN genómico de VIH-1 previamente observado (Soto Rifo y col.,2013). No obstante, para el caso de células transfectadas con el vector pNL4.3 Δ Rev se distingue una distribución perinuclear del ARNg, lo que difiere con los resultados esperados, puesto que en ausencia de Rev se espera una retención nuclear del ARNg y por ende, una señal predominante en el núcleo. Por consiguiente, a partir de estos resultados se puede inferir que la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH no fue capaz de ingresar al núcleo, probablemente debido a que se utilizaron las mismas condiciones de permeabilización que se emplean para la sonda acoplada a UTP-digoxigenina.

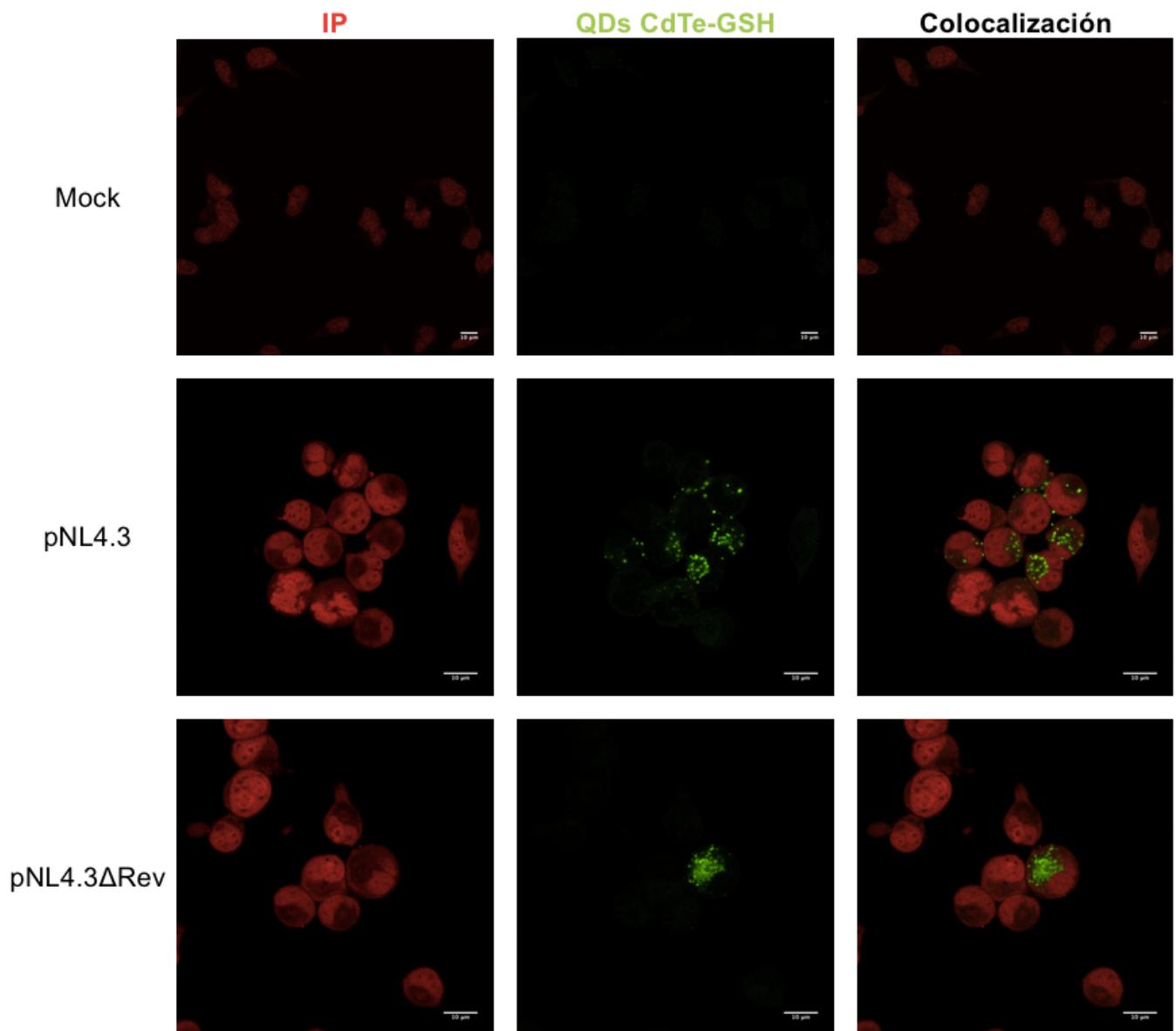


Figura 12. Microscopía confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev. En rojo se observan los núcleos de las células teñidos con Ioduro de Propidio (IP) y en verde se observa la fluorescencia emitida por QDs CdTe-GSH. Mock: Células HeLa sin transfectar. Previo a la hibridación *in situ* células HeLa fueron permeabilizadas durante 5 min. Barra indica 10 μm .

Puesto que QDs CdTe-GSH poseen un mayor tamaño que UTP-digoxigenina, para mejorar las condiciones de uso de la sonda se repitió el RNA FISH aumentando el tiempo de permeabilización con el buffer 0.2% Triton X-100 a 15 min. Este cambio en el protocolo permitió el ingreso de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH al núcleo (Figura 13). Pudiendo así contrastar la localización del ARNg de VIH-1, en presencia y ausencia de la proteína Rev.

En primera instancia, al estar la proteína Rev presente se permite el transporte nucleocitoplasmático de los transcritos virales, por lo tanto se puede apreciar la unión de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH al ARNg de VIH-1 en el citoplasma, como ya fue previamente observado (Figura 12). Cabe destacar que el destino de los ARN virales que contienen intrones depende principalmente de Rev, de manera que en ausencia de esta proteína, los ARN son retenidos en el núcleo. Lo que corresponde a lo observado para la transfección con el vector pNL4.3 Δ Rev, donde fundamentalmente el ARNg de VIH-1 se localiza en el núcleo, hecho que repercutiría en la síntesis de proteínas virales estructurales tales como Gag y Pol (Figura 13).

Finalmente, es necesario destacar que en ningún caso fue posible apreciar el ingreso celular de sondas QDs CdTe-GSH en células sin transfectar (Mock), lo que indicaría la especificidad de la sonda para el estudio de ARNg de VIH-1.

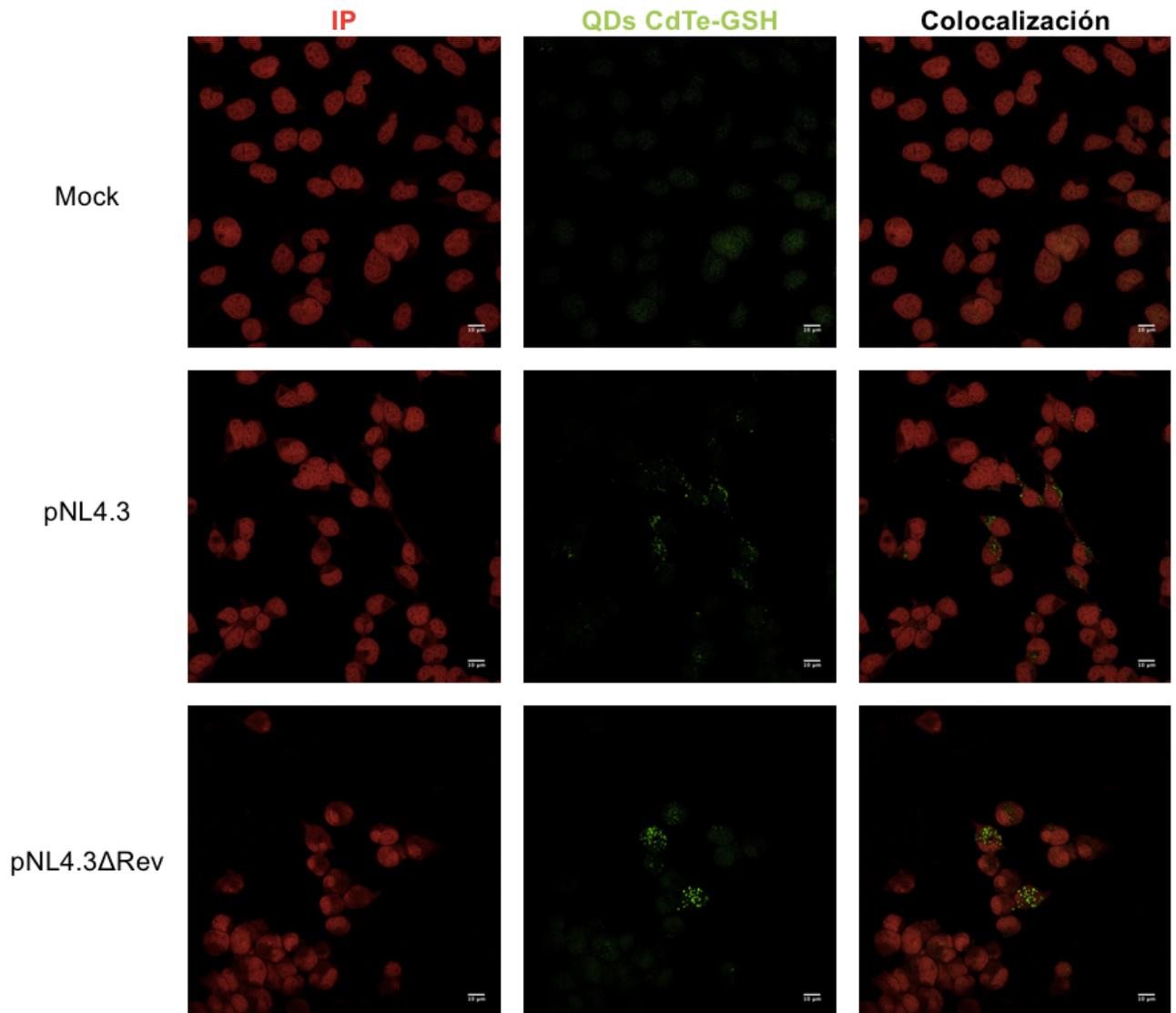


Figura 13. Microscopía confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev. En rojo se observan los núcleos de las células teñidos con Ioduro de Propidio (IP) y en verde se observa la fluorescencia emitida por QDs CdTe-GSH. Mock: Células HeLa sin transfectar. Previo a la hibridación *in situ* células HeLa fueron permeabilizadas durante 15 min. Barra indica 10 μm .

3.4.1 Comparación entre sonda acoplada a QDs CdTe-GSH y UTP-digoxigenina

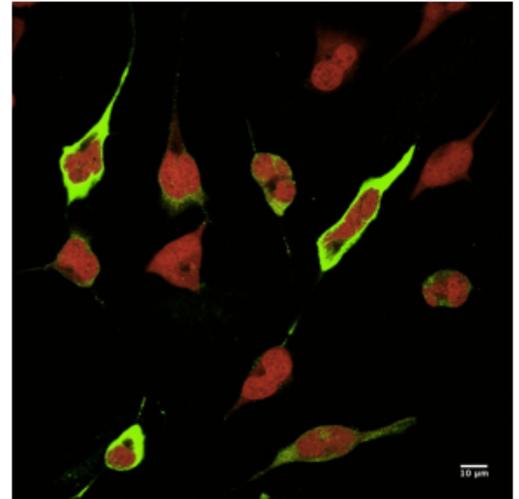
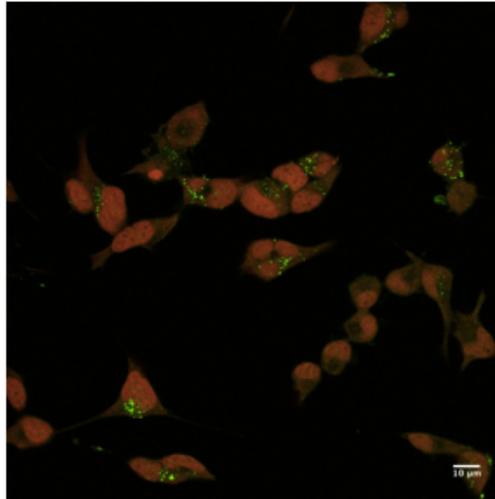
Al comparar la detección de ARNg a través de sondas acoplada a QDs CdTe-GSH y de sondas marcadas con UTP-digoxigenina (Figura 14), podemos apreciar una mayor intensidad de la señal en el último caso. Particularmente, en células transfectadas con el vector pNL4.3 se observa que la señal abarca gran parte del citoplasma, a diferencia de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH, la cual comprende una región bastante menor. Por otro lado en células transfectadas con el vector pNL4.3 Δ Rev, los ARNs blancos se encuentran agrupados en el núcleo en ambas condiciones. Nuevamente, la intensidad de señal producida por la sonda marcada con UTP-digoxigenina es mayor a la generada por la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH. Sin embargo, es posible observar un aumento en la intensidad de la señal proporcionada por la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH, pudiendo así inferir una relación entre la intensidad de señal y la cantidad de ARN detectado, lo que podría correlacionarse con los niveles de expresión génica.

Las diferencia en la intensidad de la señal proporcionada por cada sonda puede ser explicada por la diferencia del marcaje utilizado, debido a que sondas acopladas a UTP-digoxigenina, están marcadas a lo largo (cada 20 a 25 nucleótidos existe una molécula de digoxigenina unido a UTP) a diferencia de la sondas acopladas a QDs CdTe-GSH las cuales sólo están marcadas en su extremo 5'. Además el uso de anticuerpos permite la amplificación de la señal asociada a la sonda marcada con UTP-digoxigenina, lo cual puede facilitar su visualización, pero por otro lado puede impedir la visualización simultánea de otros procesos celulares y la localización específica de un ARN de interés.

Sonda acoplada a QDs CdTe-GSH

Sonda acoplada a UTP-digoxigenina

pNL4.3



pNL4.3ΔRev

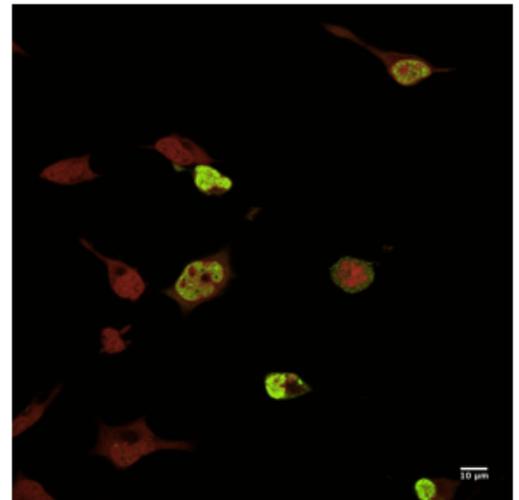
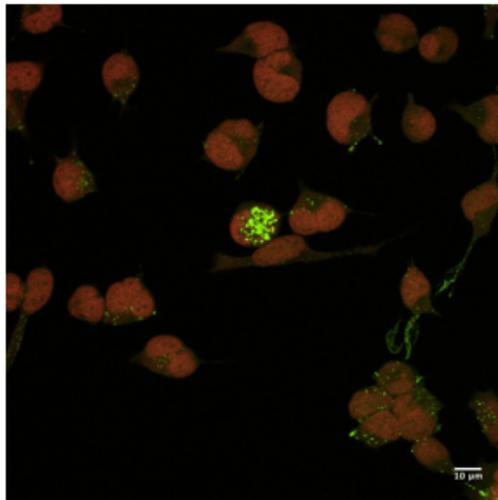


Figura 14. Microscopía confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev utilizando sondas acopladas a QDs CdTe-GSH y sondas acopladas a UTP-digoxigenina. En rojo se observan los núcleos de las células teñidos con Ioduro de Propidio (IP) y en verde se observa la fluorescencia emitida por QDs CdTe-GSH o la sonda marcada con UTP-digoxigenina. Barra indica 10 μm.

3.4.2 Evaluación de la penetración de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH al núcleo.

Debido a los problemas iniciales que presentó la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH para el ingreso al núcleo, se procedió a realizar una visualización ortogonal que permitió corroborar el ingreso de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH.

En presencia de Rev, para sondas acopladas a QDs CdTe-GSH y UTP-digoxigenina, puede distinguirse la presencia de ARNg de VIH-1 cerca del núcleo, pero en ningún caso en su interior. Al igual que observamos anteriormente (Figura 14), la señal generada por la sonda acoplada a UTP-digoxigenina es más intensa, de forma que se puede apreciar mayor fluorescencia alrededor del núcleo, a diferencia de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH (Figura 15).

Por otro lado, en ausencia de Rev, en ambos casos se distingue una distribución nuclear predominante. Sin embargo, al existir una acumulación de ARNg en el núcleo se puede apreciar una señal más intensa al utilizar la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH (Figura 15).

Estos resultados nos llevan a concluir que en términos de visualización, la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH es superior a la sonda marcada con UTP-digoxigenina. Debido a que nos permite observar de una manera más focalizada la localización del ARNg de VIH-1, lo que podría facilitar el estudio de la expresión génica de VIH-1.

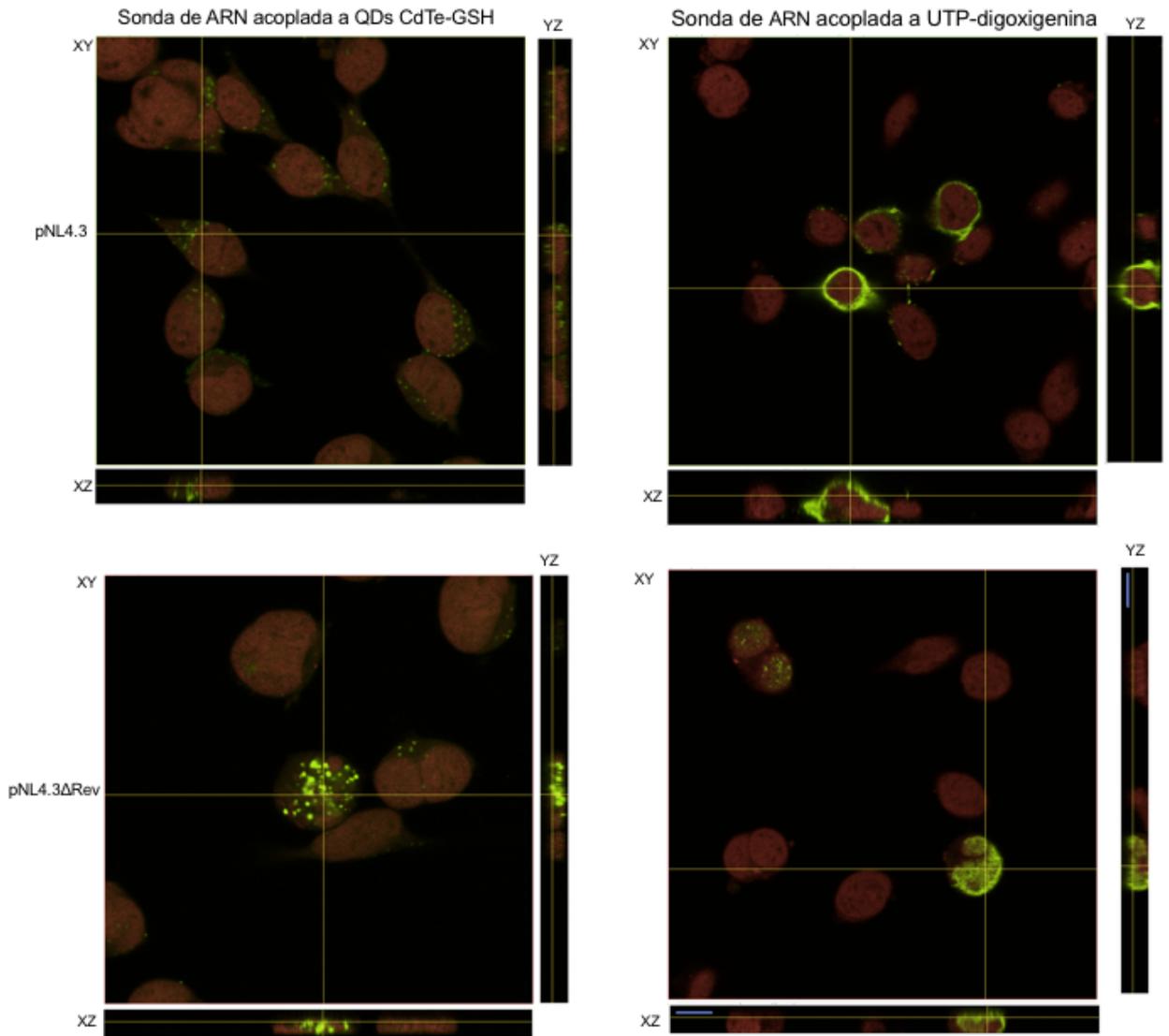


Figura 15. Visualización ortogonal de microscopía confocal de RNA FISH en células HeLa transfectadas con plásmidos pNL4.3 y pNL4.3ΔRev. Se presentan planos celulares observados en el eje XY (imagen central), eje YZ (derecha) y eje XZ (inferior). En rojo se observan los núcleos de las células teñidos con Ioduro de Propidio (IP) y en verde se observa la fluorescencia emitida por QDs CdTe-GSH o la sonda marcada con UTP-digoxigenina. Previo a la hibridación *in situ* células HeLa fueron permeabilizadas durante 15 min.

3.4.3 Ensayos de especificidad de QDs CdTe-GSH

Una vez que se ha verificado el correcto funcionamiento de la sonda de ARN acoplada a QDs CdTe-GSH, se procedió a realizar controles utilizando 1 μg QDs CdTe-GSH en lugar 120 ng de sonda, con el objetivo de evaluar el comportamiento de estos nanocristales en células HeLa (Figura 16). Aunque, se puede apreciar una leve incorporación de QDs CdTe-GSH a la célula, esta marca es difusa y no es similar a la observada cuando los QDs CdTe-GSH están acoplados a la sonda de ARN. Además, no es posible apreciar el ingreso de QDs CdTe-GSH al núcleo, de forma que es más factible asegurar que sólo sondas acopladas a QDs CdTe-GSH son capaces de ingresar al núcleo. Por otro lado, en los controles sin transfectar (Figura 12 y 13), no fue posible divisar la incorporación celular de los QDs CdTe-GSH, de manera que se podría inferir que a concentraciones tan altas como 1 μg de QDs CdTe-GSH, se produce el ingreso inespecífico de QDs CdTe-GSH.

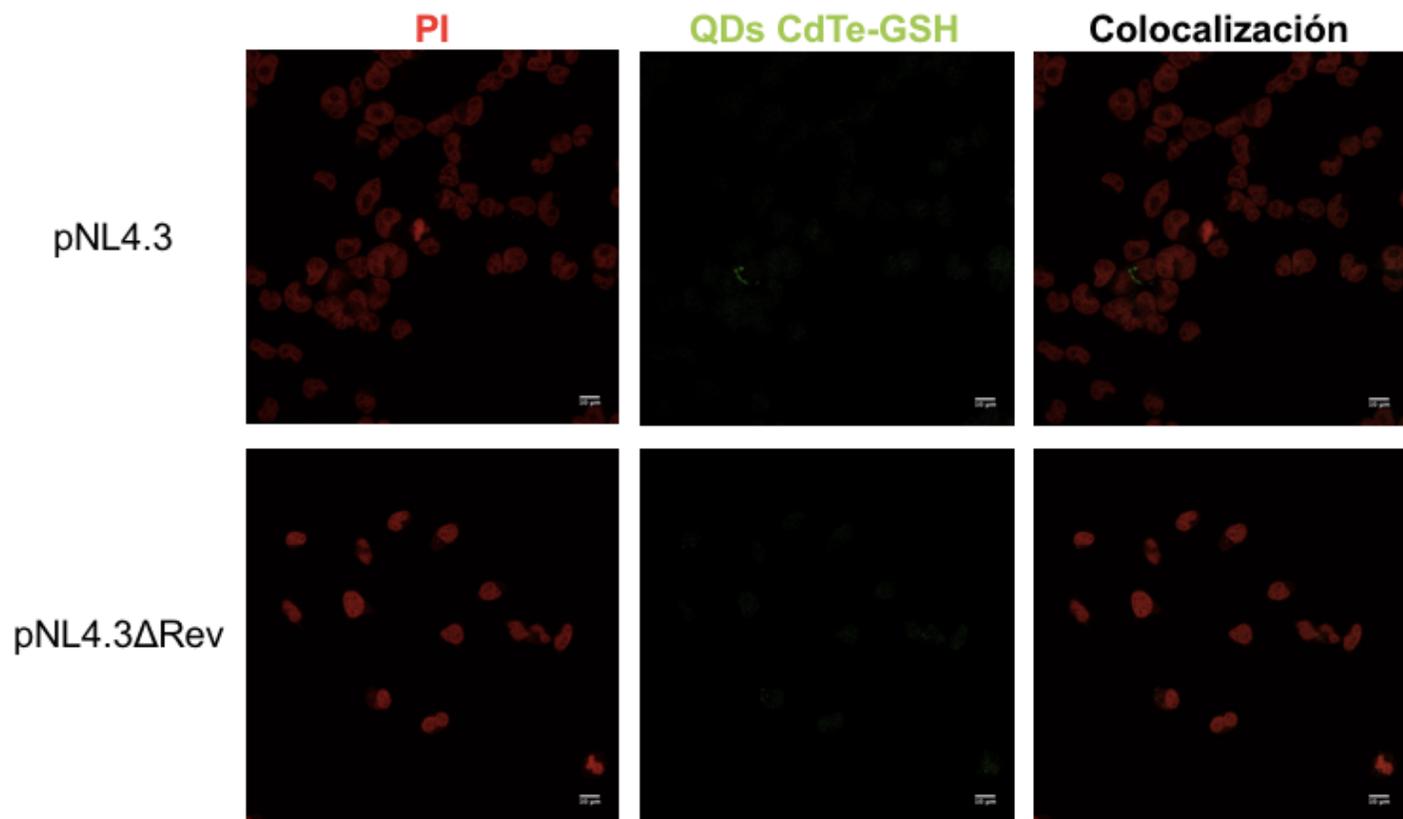


Figura 16. Microscopía confocal de RNA FISH en células HeLa previamente incubadas con 1 μg de QDs CdTe-GSH. En rojo se observan los núcleos de las células teñidos con Ioduro de Propidio (IP) y en verde se observa la fluorescencia emitida por QDs CdTe-GSH.. Previo a la hibridación *in situ* células HeLa fueron permeabilizadas durante 15 min. Barra indica 10 μm .

DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

El uso de QDs para el estudio de VIH, se ha limitado principalmente a la detección de partículas virales (Ming y col., 2009, Kim y col., 2009, Klostranec y col., 2007), subestimando su gran potencial para el estudio de los diferentes pasos implicados en la regulación de la expresión génica, tales como el metabolismo, transcripción, procesamiento y degradación del ARN, los cuales ocurren en diferentes compartimentos celulares.

Es por esto que en esta investigación se buscó dar un nuevo enfoque al estudio del ARNg viral a través de experimentos de hibridación *in situ* fluorescentes utilizando sondas de ARN acopladas a QDs CdTe-GSH. Aunque ya se ha reportado el acoplamiento de QDs a sondas utilizadas en FISH para el estudio de ARN, generalmente ha sido en sondas de ADN y oligonucleótidos. Esto ha permitido el estudio simultáneo de la distribución sub-celular de múltiples ARN blancos (Chan y col., 2005) y el seguimiento de partículas individuales (Ishihama y col., 2009). No obstante, se ha desestimado el acoplamiento directo de QDs a sondas de ARN, probablemente debido a que las sondas de ARN poseen menor estabilidad y son más susceptibles a la degradación que las sondas de oligonucleótidos, ADN mono y bicatenario. Sin embargo, híbridos de ARN-ARN, son más estables que los de ARN-ADN y ADN-ADN (Lesnik & Freier, 1995). Por lo que el uso de sondas de ADN presentan mayor dificultad para unirse a ARN nuclear, de forma que el acoplamiento de QDs a ARN, representaría una alternativa favorable para el estudio de la localización de ARN en la célula, como también su tasa de transcripción y degradación. De igual modo, sondas de oligonucleótidos presentan limitaciones, puesto que constan de 20 a 50 nucleótidos, y deben poseer un contenido de G-C entre 50-55%, ya que un

contenido mayor a 60% producen uniones inespecíficas, además no deben contener secuencias palindrómicas, dado que pueden provocar la formación de bucles intra o intercatenarios que limitarían su hibridación (Mitsubishi y col., 1996).

4.1 Comparación entre sondas acopladas a QDs CdTe-GSH y UTP-digoxigenina

Habitualmente, para el estudio de ARN a través de hibridación *in situ* fluorescente se utilizan sondas de ARN marcadas con UTP-digoxigenina, las cuáles se obtienen por transcripción *in vitro*, técnica que permite la incorporación de nucleótidos marcados con marcadores antigénicos, en este caso digoxigenina, molécula capaz de acoplarse químicamente al carbono 5' del uracilo y posteriormente ser reconocida por anticuerpos que permitirán su reconocimiento a través de microscopía confocal. Su uso para el estudio de la localización de ARN, permite el reconocimiento sub-celular de ARN, obteniendo resultados favorables. Sin embargo, la visualización de UTP-digoxigenina esta sujeta al uso de anticuerpos, lo que representa un costo y tiempo de incubación adicional. Por lo tanto, esta técnica podría ser optimizada mediante el uso de nuevas moléculas fluorescentes, tales como QDs CdTe-GSH sintetizados a través del método biomimético desarrollado por Pérez-Donoso (Pérez-Donoso y col., 2012), el cual permite la obtención de QDs altamente fluorescentes y biocompatibles. Esta última característica es otorgada por su recubrimiento de GSH, tripéptido que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, dado que desempeña un rol fundamental en la defensa contra el estrés oxidativo. De forma que GSH es esencial para el mantenimiento de la actividad celular, específicamente en la síntesis de aminoácidos y vitaminas (Arrigo, 1999). Cabe destacar que las concentraciones intracelulares de GSH están sujetas a la acción de la Glutatió Reductasa, enzima constitutivamente activa e inducible bajo estrés oxidativo.

Por otro lado, es necesario señalar que GSH presenta grupos funcionales en su superficie tales como ácidos carboxílicos, aminas primarias y tioles, los cuales pueden ser utilizados para la conjugación a ligandos blancos a través de químicos tales como carbodiimida, maleimida y succinimida. Esto, facilitaría la asociación de QDs a biomoléculas como anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y aptámeros. Adicionalmente, QDs CdTe-GSH presentan propiedades espectroscópicas sintonizables, es decir presentan la oportunidad de modular su espectro de emisión de fluorescencia, con el propósito de evitar la superposición de espectros de emisión y por consiguiente genera posibilidades de heteroconjugación con oligonucleótidos, proteínas y fluoróforos orgánicos, pudiendo incluso permitir su uso múltiple, sin interferir sus funciones biológicas. De manera que se podría considerar en la conjugación de QDs acoplados a anticuerpos de longitud de onda de emisión distintas, para el estudio simultáneo de ARNs blancos (Chan y col., 2005).

Es necesario agregar, que se ha reportado la interacción funcional entre QDs CdTe-GSH verdes y anticuerpos anti-*Salmonella Typhi* (Gautier y col., 2013), permitiendo la detección de antígenos, de forma que el complejo QDs/anticuerpo es capaz de detectar el antígeno específico en un procedimiento experimental simple que no requiere anticuerpos secundarios, demostrando así que la interacción con moléculas biológicas tales como anticuerpos no afecta la estructura, propiedades ni actividades de este tipo de proteínas.

Considerando estos antecedentes, se procedió a elaborar sondas de ARN acopladas a QDs CdTe-GSH, lo cual pudo ser verificado a través de ensayos de hibridación *in situ* fluorescente, pudiendo así probar su funcionamiento en células HeLa, mediante la modificación del protocolo utilizado para sondas de ARN marcadas con UTP-digoxigenina (Soto-Rifo y col.,2013).

En particular, se optó probar el funcionamiento de la sonda en presencia y ausencia de la proteína Rev, debido a su función esencial en la replicación de VIH-1, puesto que no existe duda de que la síntesis de proteínas virales tales como Gag y Gag-Pol, se ve dramáticamente reducida en su ausencia. Además, nos permite analizar el comportamiento de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH en estructuras sub-celulares como el núcleo.

Al comparar experimentalmente ambas sondas en presencia y ausencia de la proteína Rev, es posible concluir que la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH nos permite observar de una manera más focalizada la localización del ARNg de VIH-1, lo que podría facilitar el estudio de la expresión génica de VIH-1. Sin embargo, presentó algunos inconvenientes tales como mayor dificultad para ingresar al núcleo, debido a su mayor tamaño, por lo que es necesario someterla a mayores análisis.

4.2 Estandarización y caracterización de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH

La biodistribución, biocompatibilidad y propiedades fluorescentes de QDs dependen de varios factores derivados de sus propiedades fisicoquímicas (Lovric y col., 2005). Por ende, factores tales como la polaridad del solvente (región interior de las células, proteínas, membranas y otras estructuras biomoleculares), pH, viscosidad, temperatura, potencial eléctrico y concentración iónica, constituyen elementos relevantes para la hibridación y estabilidad de la sonda. Por lo tanto, es necesario un mayor estudio del comportamiento de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH en diferentes condiciones.

Al respecto, se ha modificado el tiempo de permeabilización, concluyendo que debido a su mayor tamaño la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH requiere un mayor tiempo de permeabilización que la sonda acoplada a UTP-digoxigenina. Sin embargo, diferentes

líneas celulares difieren en la permeabilidad de la membrana, a causa de la interacción entre el detergente (Triton X-100) y los lípidos constitutivos de la membrana (Le Maire y col.,2000). Además, el transporte de QDs a través del citoplasma, y los complejos de los poros nucleares también varían en diferentes tipos celulares, lo que influencia la capacidad de QDs para entrar al núcleo (Terry y col., 2007). Por consiguiente, es posible que un mayor tiempo de permeabilización no funcione de igual manera en distintas líneas celulares. Por otro lado, el tiempo de fijación es un factor importante en el funcionamiento de la sonda puesto que determina su estabilidad y localización dentro de la célula, como también sus propiedades de emisión, por lo que sería interesante analizar su comportamiento con otras alternativas de fijación tales como glutaraldehído, metanol o paraformaldehído a una diferente concentración.

En cuanto al impacto celular que produce QDs CdTe-GSH, se ha evaluado su comportamiento en la línea celular de cáncer gástrico MKN45, para esto se llevaron a cabo ensayos donde células fueron incubadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs CdTe-GSH, en presencia de lipofectamina, lípido catiónico que permite la internalización celular de los QDs CdTe-GSH. Pudiendo así determinar que QDs CdTe-GSH mantienen su fluorescencia asociada en el citoplasma sin producir cambios en la morfología celular, lo que sugiere que no producen efectos tóxicos a la concentración evaluada, ni tampoco generan daños celulares al ser internalizados (Gautier y col., 2013, Pérez-Donoso y col., 2012). Esto reafirma su idoneidad para el rastreo celular y marcaje biológico. Además, vale la pena señalar que a través de ensayos de citometría de flujo se estudió la relación entre la concentración de QDs CdTe-GSH y apoptosis celular, pudiendo concluir que la incorporación de estas nanopartículas, no genera efectos citotóxicos considerables, a diferencia de la mayoría de QDs CdTe sintetizados por métodos tradicionales (Lovric y col., 2005, Fang y col., 2012, Shiohara y col., 2004).

Una posible alternativa para la caracterización de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH sería el uso de *Dynamic Light Scattering* (DLS), el cual ha sido utilizado para estudiar la homogeneidad y agregación de transcritos de ARN, producidos de manera *in vitro* (Stetefeld y col., 2016). DLS es capaz de determinar su tamaño, estabilidad a distintos pH y peso molecular, el cual puede ser comparado con el peso molecular experimental de la secuencia de la proteína o ácido nucleico, pudiendo así proveer información útil tal como estado oligomérico, degradación o cambio en el peso molecular una vez que interacciona con otras moléculas. Debido a que los QDs CdTe-GSH ya han sido previamente caracterizados a través de DLS (Pérez-Donoso y col., 2012), la caracterización de la sonda permitiría generar un contraste entre QDs CdTe-GSH individuales y acoplados a ARN. Esto nos permitiría obtener información significativa para determinar las condiciones óptimas de uso.

De igual manera, son necesarios análisis de fotoestabilidad y fotoblanqueamiento, además de una cinética que permita evaluar la funcionalidad de la sonda acoplada a QDs CdTe-GSH a través del tiempo y determinar sus condiciones de almacenamiento, tales como la temperatura y exposición a la luz. En vista de que realizamos ensayos con sondas mantenidas a -20°C por semanas y perdió su funcionamiento, es por esto que actualmente la sonda es mantenida en oscuridad y a -80°C .

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas del presente trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Este trabajo representa la prueba de concepto de que es posible generar sondas de ARN acopladas a QDs para uso en RNA FISH, las cuáles son capaces de unirse al ARNg de VIH-1 y así poder analizar su localización sub-celular en presencia y ausencia de la proteína Rev, a través de ensayos de hibridación *in situ* fluorescente y microscopía confocal. Esto sienta los precedentes para el uso de QDs CdTe-GSH en el estudio de ARN y amplía alternativas de análisis de la expresión génica de VIH-1 u otros tipos de virus.
- Si bien el uso de QDs presenta ventajas considerables sobre los fluoróforos orgánicos, no se pretende reemplazar a los fluoróforos orgánicos en el estudio de sistema biológicos, sino más bien ofrecer un complemento, ya que ambos presentan beneficios y desventajas. Es por esto que el enfoque de este trabajo radica principalmente en que la combinación de las características de QDs y fluoróforos orgánicos, pueda proporcionar un avance en el estudio de la expresión génica viral.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Martin, M. 1986. Production of Acquired Immunodeficiency Syndrome-Associated Retrovirus in Human and Nonhuman Cells Transfected with an Infectious Molecular Clone. *Journal of Virology*. **59**: 284-291.
- Alivisatos, A. P., Gu, W., Larabell, C. 2005. Quantum dots as cellular probes. *Annual Review of Biomedical Engineering*. **7**: 55-76.
- Arrigo, S., Heaphy, S., Haines, J. 1992. In Vivo Binding of Wild-Type and Mutant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Proteins: Implications for Function. *Journal of Virology*. **66**: 5569-5575.
- Arrigo, A.P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology & Medicine*. **27**: 936-944
- Arya, S. y Gallo, R. 1988. Human immunodeficiency virus type 2 long terminal repeat: Analysis of regulatory elements. *Medical Sciences*. **85**: 9753-9757.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P. W., Langer R., Farokhzad, O. C. 2007. Quantum Dot-Aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Letters*. **7**: 3065-3070.
- Bang, J. H. y P. V. Kamat. 2009. Quantum Dot sensitized solar cells. A tale of two semiconductor nanocrystals: CdSe and CdTe. *ACS Nano*. **3**(6): 1467-1476.
- Beesey, J.E., 2001 *Immunocytochemistry and in situ hybridization in the biomedical sciences*. pp 2617 Birkhäuser Boston, USA
- Boehringer Mannheim Biochemicals. 1992. The Genius System User's Guide for Filter Hybridization. pp.14,15 Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN,
- Boehringer Mannheim GmbH Biochemica 1992. Nonradioactive *in situ* hybridization application manual. Mannheim pp 31, 72
- Bogerd, H.P., Echarri, A., Ross, T.M., Cullen, B.R. 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mazon-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J. Virol*. **72**:8627-8635.
- Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A. P. 1998. Semiconductor nanocrystal as fluorescent biological labels. *Science*. **281**: 2013-2016.
- Bruchez, M. P. 2005. Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays. *Curr Opin Chem Biol*. **9**: 533-537.

- Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-Maeso, J., Sealfon, S. C. 2005. Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Nucleic Acids Res.* **33**: e161.
- Chan, W. C. 1998. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science.* **281**: 2016-2018.
- Chiu, I. M., A. Yaniv, J., Dahlberg, E., Gazit, A., Skuntz, S., Tronick, S., Aaronson, S. 1985. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentivirus. *Nature.* **317**: 366-368.
- Cullen, B. R. 1998. HIV-1 Auxiliary Proteins: Making Connections in a Dying Cell. *Cell.* **93**: 685-692.
- Cullen, B. R. 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 419-424.
- Dahan, M., Laurence, T., Pinaud F., Chemla, D. S. 2001. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Optics Letters.* **26**: 825-827.
- Dagleish, A., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* **312**:763-767.
- Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H., Libchaber, A. 2002. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science.* **298**: 1759-1762.
- Fan, Y., Braut, S. A., Lin, Q., Singer, R. H., Skoultchi, A. I. 2001. Determination of transgenic loci by expression FISH. *Genomics.* **71**: 66-69.
- Fauci, A. S. 1996. Resistance to HIV-1 infection: It's in the genes. *Nature Medicine.* **2**: 966-967.
- Femino, A., Say, F.S., Fogarty, K., Singer, and R. 1998. Visualization of Single RNA Transcripts in situ. *Science* **280**: 585-590.
- Fortina, P., Kricka, L. J., Surrey, S., Grodzinski, P. 2005. Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends Biotechnol.* **23**: 168-173.
- Frankel, A. D. y Young J. A., 1998. HIV-1: fifteen proteins and a RNA. *Annu Rev Biochem.* **67**:1-25.
- Gall, J. G. y Pardue, M. L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Genetics.* **63**: 378-383.
- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung L. W., Nie, S. 2004. In vivo cancer

targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* **22**: 969-976.

Gao, X., Chan, W.C, Nie, N. 2002. Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *Journal of Biomedical Optics.* **7**: 532-537.

Gaponik, N., Talapin, D., Rogach, A., Eychmüller, A., Weller, H. 2002. Efficient phase transfer of luminescent thiol-capped nanocrystals: From water to nonpolar organic solvents. *Nano Letters.* **2**: 803-806.

Gatignol, A., 2007. Transcription of HIV: Tat and Cellular Chromatin. *Advances in Pharmacology* **55**: 137-159

Gautier, J. L., Monrás, J. P., Osorio-Román, I. O., Vásquez, C. C., Bravo, D., Herranz, T., Marco, J. F., Pérez-Donoso, J. M. 2013. Surface characterization of GSH-CdTe quantum dots. *Materials Chemistry and Physics.* **140**:113-118.

Gentile, M., T. Adrian, A. Scheidler, M. Ewald, F. Dianzani, G. Pauli, Gelderblom. H. 1994). Determination of the size of HIV using adenovirus type 2 as an internal length marker. *Journal of Virological Methods.* **48**: 43-52.

Gerion, D., Parak, W. J., Zanchet, D., Woerz, A. S., Pellegrino, T., Michel, C., Williams, S. C., Seitz, M., Bruehl, R. E., Bryant, Z., Bustamante, C., Bertozzi, C. R., Alivisatos, A. P. 2002. Conjugation of DNA to Silanized Colloidal Semiconductor Nanocrystalline Quantum Dots. *Chemistry of Materials.* **14**: 2113-2119.

Goldman, E. R., Balighian, E. D., Mattoussi, H., Kuno, M. K., Mauro, J. M., Tran, P. T., Anderson, G. P. 2002. Avidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 6378-6382.

Grewe, C., Beck, A., Gelderblom, H. 1990. HIV: Early Virus-Cell Interactions. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* **3**: 965-974.

Guyader, M., Emerman, M., Montagnier, L., Peden, K. 1989. VPX mutants of HIV-2 are infectious in established cell lines but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. *The EMBO Journal.* **8**:1169-1175.

Hanaki, K., Momo, A., Oku, T., Komoto, A., Maenosono, S., Yamaguchi, Y. Yamamoto, K. 2003. Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **302**: 496-501.

Hardman, R. 2006. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspectives.* **114**: 165-172.

Harrison, P., Conkie, D., Paul, J., Jones, K. 1973. Localisation of cellular globin

messenger RNA by in situ hybridisation to complementary DNA. *Fers Letters*. **32**:109-112.

Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Nakamura, S., Suga, M., Yamaguchi, Y., Suzuki, K., Yasuhara, M., Yamamoto, K. 2004. Quantum Dots targeted to the assigned organelle in living cells *Microbiol. Immunol.* **48**: 985-994.

Hoshino, A., Manabe, N., Fujioka, K., Suzuki, K., Yasuhara, M., Yamamoto, K. 2007. Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity. *J Artif Organs.* **10**: 149-157.

Ishihama, Y. y Funatsu, T. 2009. Single molecule tracking of quantum dot-labeled mRNAs in a cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* **381**: 33-38.

Kim, Y.G., Moon, S. Kuritzkes, D.R., Demirci, U. 2009. Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel. *Biosens Bioelectron.* **25**: 253-258

Klostranec, J.M., Xiang. Q., Farcas, G.A., Jeongjin, A.L., Rhee, A., Lafferty, E. I., Perrault, S. D., Kain, K. C., Warren, C., Chan, W. 2007. Convergence of Quantum Dot Barcodes with Microfluidics and Signal Processing for Multiplexed High-Throughput Infectious Disease Diagnostics. *Nano Letters.* **7**: 2812-2818.

Jaiswal, J. K. y Simon, S. M. 2004. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol.* **14**: 497-504.

John, H. A., Birnstiel, M. L., Jones, K. W. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature.* **223**: 582-587.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D. Hercend, T., Gluckman, J. C., Montagnier, L. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behave as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* **312**: 767-768.

Kongkanand, A., Tvrdy, K., Takechi, K., Kuno, M. K., Kamat, P. V. 2008. Quantum Dot Solar Cells. Tuning Photoresponse through size and shape contro of CdSe-TiO₂ architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **130**: 4007-4015.

Lesnik, A., y Freier, S. 1995. Relative Thermodynamic Stability of DNA, RNA and DNA:RNA Hybrid Duplexes: Relationship with Base Composition and Structure. *Biochemistry.* **34**: 10807-10815.

Li, L., Li, H. S., Pauza, C. D., Bukrinsky, M., Zhao, R. Y. 2005. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Research.* **15**: 923-934.

Lovric, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R., Winnik, F. M., Maysinger, D. 2005. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med.* **83**: 377-385.

Le Maire, M., Champeil, P., Moller, J.V. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochem Biophys Acta*. **1508**: 86-111.

Michalet, X., Pinaud, F., Lacoste, T., Dahan, M., Bruchez, M., Alivisatos, A. P. Weiss, S. 2001. Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling. *Single Mol*. **2**: 261-276.

Ming, K., Kim, J., Biondi, M. J., Syed, A., Chen, K. Lam, A., Ostrowski, M., Rebbapragada, A., Feld, J. J., Chan, W. C. 2015. Integrated quantum dot barcode smartphone optical device for wireless multiplexed diagnosis of infected patients. *ACS Nano*. **9**: 3060-3074.

Mitsubishi M. 1996. Technical Report: Part 1. Basic Requirements for Designing Optimal Nucleotide Probe Sequences". *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **10**: 277-284.

Monrás, J. P., Collao, B. Molina. R, Pradenas, G.A., Saona, L.A., Durán, V., Órdenes, N., Venegas, F., Loyola, D.E., Bravo, D., Calderón, P.F., Calderón, I.L., Vázquez, C., Chasteen, T., López D.A.,Pérez-Donoso, J. M. 2014. Microarray analysis of the Escherichia coli response to CdTe-GSH Quantum Dots: understanding the bacterial toxicity of semiconductor nanoparticules. *BMC Genomics*. **15**.

Morel G., Cavalier, A., 2001. *In situ* hybridization in light microscopy. pp 327. CRS Press LLC, Boca Raton, FL,USA,

Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A. Capon, D. J. 1985. Nucleic acid structure and expression human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*. **313**: 450-458.

Murray, C. B., Kagan, C. R., Bawendi, and M. G. 2000. Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu Rev Mater Sci*. **30**: 545-610.

Narimatsu, R. y Patterson, B. K. 2005. High-Throughput Cervical Cancer Screening Using Intracellular Human Papillomavirus E6 and E7 mRNA Quantification by Flow Cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*. **123**: 716-723.

Norris, D. J., Bawendi, G., 1995. Measurement and Assignment of the Size-Dependent Optical Spectrum in Cadmium Selenide (CdSe) Quantum Dots. *The American Physical Society* **53**:16338-16346

Ozkan, M. 2004. Quantum dots and other nanoparticles: what can they offer to drug discovery?. *Drug Discovery Today*. **9**: 1065-1071.

Pereira, C., Peñailillo, N., Valiente, F., Soto, R. 2016. ARN genómico de VIH: rutas alternativas para terapias alternativas. *Sociedad Española de Bioquímica y*

Biología Molecular. **187**:9-12.

Pérez-Donoso, J. M., Monras, J. P., Bravo, D., Aguirre, A., Quest, A., Osorio-Roman, I., Aroca, R. F., Chasteen, T. G., Vásquez, C. C. 2012. Biomimetic, mild chemical synthesis of CdTe-GSH quantum dots with improved biocompatibility. *PLoS One*. **7**: e30741.

Pollard, V. W. y Halim, M. H. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**: 491-532.

Popescu, N.C., Chen, M.C., Simpson, S., Solinas, S., DiPaolo, J.A. 1993. A Burkitt Lymphoma Cell Line with Integrated Epstein-Barr Virus at a Stable Chromosome Modification Site. *Virology*. **195**: 248-251.

Portney, N. G. y Ozkan, M. 2006. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal Bioanal Chem*. **384**: 620-630.

Purcell, D.F., y Martin, M. 1993. Alternative Splicing of Human Immunodeficiency Virus Type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication and infectivity. *Journal of Virology*. **67**: 6365-6378.

Rakovich, A., Savateeva, D., Rakovich, T., Donegan, J. F., Rakovich, Y. P., Kelly, V., Lesnyak, V., Eychmuller, A. 2010. CdTe Quantum Dot/Dye Hybrid System as Photosensitizer for Photodynamic Therapy. *Nanoscale Res Lett*. **5**: 753-760.

Reed, M. A., Randall, J. N., Aggarwal, R. J., Matyi, R. J., Moore, T. M., Wetsel, A. E. 1988. Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure. *Physical Review Letters*. **60**: 535-537.

Reed, S. E., Staley, E. M., Mayginnes, J. P., Pintel, D. J., Tullis, and G. E. 2006. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods*. **138**: 85-98.

Sattentau, Q., Weiss, R. A. 1988. The CD4 Antigen: Physiological ligand and HIV receptor. *Cell*. **52**: 631-633.

Schneider, R., Wolpert, C., Guilloteau, H., Balan, L., Lambert, J., Merlin, C., 2009. The exposure of bacteria to CdTe-core quantum dots: the importance of surface chemistry on cytotoxicity. *Nanotechnology*. **20**: 1-10.

Shi, L., De Paoli, V., Rosenzweig, N., Rosenzweig, Z. 2006. Synthesis and Application of Quantum Dots FRET-Based Protease Sensors. *J. Am. Chem. Soc* **128**: 10378-10379.

Shi, L., DePaoli, V., Rosenzweig, N., Rosenzweig, Z. 2006. Synthesis and Application of Quantum Dots FRET- Based Protease Sensors. *J. Am. Chem. Soc*. **128**: 10378-10379

- Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., Yamamoto, K., 2004. On the Cyto-Toxicity caused by Quantum Dots. *Microbiol. Immunol.* **48**: 669-675
- Singer, R. y Ward, D. 1982. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinated nucleotide analog. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 7331-7335.
- Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A. Wain-Hobson, S. 1985. Nucleotide sequence of Visna Lentivirus: Relationship to the AIDS Virus. *Cell* **42**: 369-382.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S. Ohlmann, T. 2013. The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Res* **41**: 6286-6299.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A. Patel, T. R. 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* **8**: 409-427.
- Strebel, K., Klimkait, T. Martin, M. 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**: 1221-1223.
- Temin, H. y Mizutani, S. 1970. RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature.* **226**: 1211-1213.
- Terry, L.J., Shows, E.B., Wentz, S.R. 2007. Crossing the Nuclear Envelope: Hierarchical Regulation of Nucleocytoplasmic Transport. *Science.* **318**: 1412-1416
- Turner, B. y Summers, M. 1999. Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol* **285**: 1-32.
- Weiss, R. A., Clapham, P. R., McClure, M. O., McKeating, J. A., McKnight, A., Dalglish, A., Sattentau, Q., Weber, J. N. 1988. Human Immunodeficiency Viruses: Neutralization and Receptors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **1**: 536-541.
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F., Bruchez, M. P. 2003. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* **21**: 41-46.
- Zhang, C. Y. y Johnson, L. W. 2006. Quantum-dot-based nanosensor for RRE IIB RNA-Rev peptide interaction assay. *J Am Chem Soc.* **128**: 5324-5325.
- Zhang, L., Carruthers, C. D., He, T., Huang, Y., Cao, Y., Wang, G., Hahn, B. Ho, D. 1997. HIV Type 1 subtypes, coreceptor usage and CCR5 polymorphism. *AIDS research and human retroviruses* **13**: 1357-1366.