

03062



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado 6
del C. C. H. *2eje.*
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Estudio Comparativo de Secuencias de la
Región Variable 3 (Dominio Principal de
Neutralización) de Virus HIV-1 en
México

T E S I S
Que para obtener el Grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica
P r e s e n t a
Biol. José Carmen Gudiño Rosales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

Noviembre de 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ
EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN
RETROVIRUS HUMANOS, DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M, EN
EL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS (INDRE),
SSA.**

Deseo expresar mi agradecimiento las siguientes personas:

Abraham Landa, por la síntesis de los primers KSI 5'/3'.

María del Carmen Basualdo, por su amistad y por cultivar los HIV-1.

Carlos Fernández Tomás (q.e.p.d.), **Alejandro García Carrancá** y **Juan Pedro Laclette** quienes fungieron como co-asesores del proyecto enriqueciéndolo con sus comentarios y sugerencias.

Dr. José Luis Valdespino Gómez, director del INDRE., por las facilidades otorgadas en la UIRH para la realización del trabajo.

Nina Valadez González, **Amine Barquet Fuentes** y **María Fernanda Martínez Salazar**, compañeras de infortunio en estos avatares de la ciencia.

Pero, principalmente quiero agradecerte a ti **Carmen Soler**, no solo por la dirección de este trabajo y por jalar las riendas cuando es necesario, sino especialmente por tu amistad y por permitirme trabajar en este grupo tan especial que has y estas formando.

*Deslizar mis manos por entre tu ropa
sentirte vibrar al calor de mi cuerpo
tenerte muy cerca y besar tu boca
caminar contigo a mi lado, solo eso....*

.....me mantenía vivo

INDICE

Capítulo I: INTRODUCCION.	1
Características generales del virus	2
El genoma viral	2
Variabilidad genómica	4
Transmisión de la infección	6
Contacto sexual	6
Vía sanguínea	7
Transmisión perinatal	7
El ciclo infeccioso	8
Expresión del genoma viral	10
Alteraciones inmunológicas por el HIV-1	13
Importancia de la respuesta inmune	14
Importancia biológica de V3	16
Capítulo II: OBJETIVOS.	
Generales	18
Particulares	18
Capítulo III: METODOS.	
Obtención de células mononucleares humanas	19
Aislamiento primario por cocultivo	20
Aislamiento en líneas celulares	20
Obtención del DNA	20
Amplificación de la región V3	21
Purificación de productos amplificados por PCR	21
Cuantificación de productos de PCR	23
Secuenciación	23
Geles de secuenciación	24
Capítulo IV: RESULTADOS.	
Identificación de los productos de PCR	26
Generalidades de las secuencias obtenidas	27
Nomenclatura de los aislados	28
Alineación de las secuencias	29
Homología en la región V3	31
Relaciones entre las secuencias	31
Comparación con los genotipos mundiales	32
Heterogeneidad viral en los cultivos	34
Secuencias alternativas	35
Aislamiento en diferentes líneas celulares	36
Clonación biológica de los virus de un cultivo	36
Variación con el tiempo de cultivo	37
Determinantes antigénicos en las secuencias	38
Capítulo V: DISCUSION.	41
Capítulo VI: CONCLUSIONES.	45
Capítulo VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46

I

INTRODUCCIÓN:

El SIDA es causado por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el cual es un retrovirus perteneciente a la subfamilia *Lentivirinae*. Las características particulares en la organización de su genoma lo hacen el retrovirus con mayor complejidad estructural y funcional que se ha descrito hasta ahora (1, 2).

Los HIV tienen algunas propiedades que les confieren ventajas sobre otros patógenos en su capacidad para producir infección y daño en su hospedero, entre estas podemos mencionar:

1) La propiedad de persistir como infección crónica. Estos virus introducen su material genético en las células a las cuales infectan y lo integran en el DNA genómico, permaneciendo ahí hasta la muerte de la célula. Esta característica provee al virus con un medio de escape a la vigilancia inmune.

2) Los HIV tienen el efecto de minar las funciones de defensa del organismo, ya que infectan directamente a las células encargadas de producir una respuesta inmune ante las infecciones (linfocitos y macrófagos). Ya introducidos en estas células, los HIV hacen uso de por lo menos dos mecanismos para su destrucción: efecto citopático directo, que significa que el virus al reproducirse en la célula infectada la destruye, y un sistema indirecto, el cual permite que la vigilancia inmune del organismo infectado sea dirigida hacia células que sin estar infectadas, tengan adherido algún componente viral (por ejemplo gp120 soluble) y sean destruidas.

3) Finalmente, su capacidad de variar antigénicamente. De hecho, en un individuo infectado existen muchos subtipos genéticos de HIV (*quasi-especies*). Esta gran plasticidad genética le permite su permanencia y diseminación en el organismo hospedero y la selección *in vivo* de clones virales no reconocidas por el sistema inmune, de variantes con mayor velocidad de replicación, o que tengan

un rango de células más amplio a las cuales pueden infectar y que estas sean más sensibles a su efecto citopático.

1) Características generales del virus:

Las partículas del HIV son de forma esférica y están formadas por una membrana lipídica de origen celular, que contiene dos proteínas virales asociadas; una glicoproteína externa (gp120) y una transmembranal (gp41). Por debajo de esta envoltura se encuentra una segunda capa proteica formada por la polimerización de monómeros de la proteína viral p17, dentro de la cual se encuentra la nucleocápside, constituida por la proteína p24 y dos moléculas de RNA viral, que son el material genético del virus. El RNA tiene asociadas moléculas de la enzima transcriptasa reversa (TR) (3,4).

2) El genoma viral:

El material genético del HIV está constituido por 2 moléculas de RNA, de cadena sencilla y con la misma polaridad que los RNA mensajeros (RNAm), esto es que podría funcionar como RNAm para la síntesis de proteínas. Sin embargo, durante el ciclo de replicación, la transcriptasa reversa se encarga de sintetizar una molécula de DNA de doble cadena empleando el RNA viral como molde. Este DNA recién sintetizado, al insertarse en el genoma de la célula constituye lo que se denomina provirus.

El genoma del HIV comparte con todos los retrovirus la disposición básica de los genes para las proteínas estructurales: *gag*, *pol* y *env*. El provirus tiene en sus extremos unas secuencias llamadas "repetidos terminales largos" (LTR), que contienen elementos reguladores de la expresión viral como el promotor y secuencias aumentadoras de la transcripción ("*enhancers*"). También se encuentran diversos sitios de reconocimiento para factores celulares como se observa en la figura 1 (5-12).

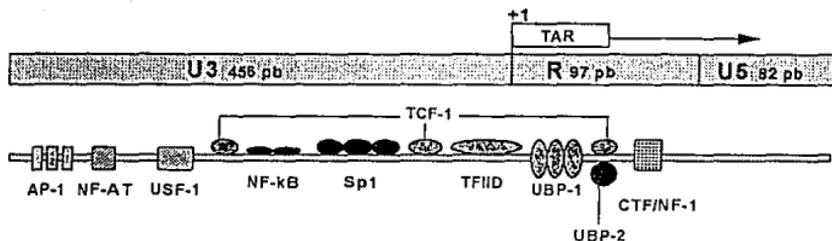


Figura 1. Estructura genética de los repetidos terminales largos del HIV-1. Se indican las regiones que conforman el LTR; U3, R y U5 y la longitud en bases de cada una de estas. También está señalado el sitio de inicio de la transcripción (+1) y la secuencia diana para *tat* (TAR). En la parte inferior se muestra la posición relativa de los sitios de reconocimiento para los diferentes factores celulares que se indican, involucrados en la transcripción de los genes virales.

Los LTR flanquean a los genes que codifican para las diferentes proteínas virales: *gag* (p17, p24 y p15), *pol* (p66/p51, p31) y *env* (gp120 y gp41) además de una proteasa codificada entre los genes *gag* y *pol* (13-17).

A diferencia de otros retrovirus como el virus de la leucemia de murinos (MLV), en el cual solo se han descrito los genes *gag*, *pol* y *env* (2), el genoma del HIV codifica para al menos 6 productos proteicos reguladores: el gene *tat*, formado por dos exones, codifica para una proteína de 86 aminoácidos, aunque el producto de 72 aa, traducción del primer exon es completamente funcional (17). *Tat* es de localización nucleolar (18) y para ejercer su función requiere de una secuencia diana, denominada TAR (por: trans-activating responsive), que se encuentra en el LTR de las moléculas de RNA de origen viral (17, 19-25). El gene *rev*, también formado por dos exones y cuyo producto es una proteína de 27 kd de peso molecular, al igual que *tat* se localiza en el núcleo de la célula infectada y requiere de la secuencia diana RRE (de *rev*-responsive element), presente en el RNAm de las proteínas estructurales y de las accesorias para la morfogénesis viral (26-31). Aparte de estos dos genes, cuyos productos y sus funciones están más o menos bien caracterizadas (ver expresión del genoma viral), el HIV codifica para los genes: *nef* cuya expresión inhibe la replicación de algunas cepas virales; *vif* que es necesario para que el virión sea infeccioso; *vpr* que es necesario para

el ensamblaje de las partículas virales y *vpr* que parece aumentar los niveles de producción de virus (32-37).

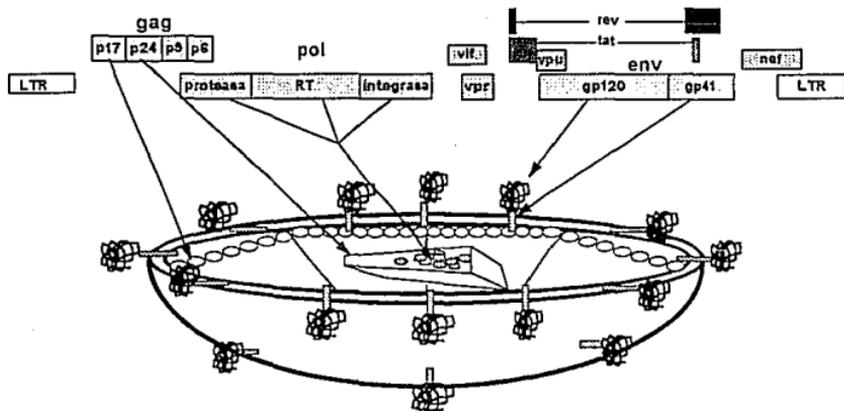


Figura 2. Organización del genoma y estructura del HIV-1. En la parte superior se muestran los diferentes marcos de lectura y las proteínas originadas por cada uno de los genes del virus. En la parte inferior, un esquema de la estructura del virión señalando con flechas la localización de las diferentes proteínas estructurales.

3) Variabilidad genómica:

Poco después del inicio de la epidemia desatada a principios de los años 80 se encontró que al ser cortado el DNA de los HIV aislados en diferentes lugares, con enzimas de restricción, presentaban patrones de corte diferentes, lo cual es un indicador de la variabilidad genética entre ellos (38-41). Mas adelante, estudiando el genoma de diversos aislados virales con técnicas de clonación y secuenciación, se demostró que cada virus aislado es claramente distinguible de cualquier otro, llegándose a encontrar hasta un 10% de diferencias en la secuencia completa de nucleótidos entre 2 aislados (42). Para hacer mas complejo el panorama, pronto fue establecido que un individuo no esta infectado con un solo tipo viral, sino con una población heterogénea de variantes virales muy relacionadas genéticamente entre si, sumado al hecho de que estos virus evolucionan constantemente durante el curso de la infección (43).

La alta variabilidad antigénica de los HIV es el reflejo de una gran plasticidad genética en este virus. Se ha reportado que la enzima viral transcriptasa reversa, tiene una frecuencia de mutación, durante la síntesis del DNA proviral, de 1 error en 1700 a 1 en 4000 nucleótidos polimerizados y aún de 1 en 70 para algunas regiones especialmente mutables ("*hot spots*") (44, 45). Esto es, que teóricamente y en la realidad así parece ser, cada virus existente es genéticamente distinto de todos los demás. Aún cuando con esta elevada frecuencia de mutaciones, la probabilidad de obtener algunos virus deficientes (no infecciosos) es muy alta, muchas de las mutaciones no afectan negativamente la capacidad de reproducción del virus. Por el contrario, gracias a esta tasa de mutación emergen cepas de virus resistentes a las drogas antivirales, o virus que escapan a la vigilancia de un sistema inmune aún competente.

Se ha encontrado variabilidad a lo largo de todo el genoma del HIV, sin embargo, la glicoproteína externa gp120 es la proteína viral que más variaciones presenta en su secuencia de aminoácidos (aa), entre diferentes aislados (tabla I).

REGION	HIV-1: USA/AFR	HIV-1/HIV-2
LTR	85%	30-40%
GAG	90%	58 %
POL	95%	59%
ENV	75-80%	42%
gp120	75-80%	39%
gp41	85%	45%
GENES ACCESORIOS	80-90%	45-55%

Tabla I. Homologías en la secuencia de los HIV. Tomamos como ejemplos los casos extremos de divergencia, por un lado entre 2 HIV-1 de muy diferentes orígenes (un virus africano confrontado contra uno de Estados Unidos) y por otro la divergencia entre el HIV-1 y HIV-2. Se muestran los porcentajes de homología en la secuencia de aminoácidos, excepto en el LTR en donde es el porcentaje de homología en nucleótidos. Se observa que la mayor variabilidad se presenta en los productos del gen *env*, principalmente en la gp120 (57, 58).

4) Transmisión de la infección:

Las vías de transmisión del HIV en esencia son 3 (46). La más frecuente es por contacto sexual con personas infectadas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud el 90% de los casos mundiales son por esta vía. La probabilidad de adquirir la infección por contacto sexual esta determinada por 3 factores: a) El número de eventos de exposición, según el cociente: N° de parejas/N° de relaciones (47-51). b) La probabilidad de que el contacto sexual se de con una persona infectada, que a su vez depende de la seroprevalencia en una región determinada (52). c) La probabilidad de adquirir la infección durante la actividad sexual, lo cual está determinado por factores propios del virus, por ejemplo la capacidad infecciosa de una cepa particular (40) y de factores biológicos del hospedero como la edad, el estado de salud, si hay sangrado durante la relación, etc. (53-57).

Se ha establecido que la presencia de lesiones en genitales, como las originadas por otros patógenos de transmisión sexual (Sífilis, Herpes genital u otros), aumentan el riesgo de adquirir la infección por vía sexual. Sin embargo, el incremento que se ha observado en los casos de SIDA por transmisión heterosexual en individuos sin este tipo de enfermedades sugieren que el HIV puede tener acceso al cuerpo através de mucosas intactas. Esto es teóricamente posible, ya que en los epitelios, tanto de piel, como en las mucosas oral, gastrointestinal y de órganos sexuales se encuentran células de Langerhans, que son derivadas de leucocitos y se ha encontrado expresión del receptor CD4 en ellas, aunque en niveles bajos, comparado con linfocitos T4 y monocitos/macrófagos (58, 59).

En el modelo de infección por el virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) en macacos, se ha encontrado infección al aplicar virus en mucosa vaginal y uretral de hembras y machos respectivamente. En estudios *in vitro* se ha reportado que las células dendríticas, infectadas con cepas de laboratorio de HIV producen partículas virales sin sufrir efecto citopático. A las células de Langerhans, que son leucocitos maduros en los epitelios, se las conoce como células dendríticas pilosas cuando migran hacia los nódulos linfáticos. Aquí se localizan en las áreas

ricas en células T. Estos y muchos otros reportes permiten especular que las células de Langerhans de epitelios pueden ser las primeras en infectarse durante la transmisión sexual y, por su carácter migratorio, pueden diseminar la infección hacia los ganglios linfáticos en donde otras células, como los linfocitos T4, pueden tener contacto con el virus.

La segunda vía de transmisión en importancia es el empleo de sangre, contaminada con virus, o derivados obtenidos de ella. En 1982 se reportaron casos de infecciones oportunistas e inmunosupresión en pacientes hemofílicos, y en un recién nacido que había recibido varias transfusiones (60). Posteriormente se reportaron otros casos de inmunodeficiencia asociados a transfusión sanguínea o por el empleo de hemoderivados contaminados. De ello se originó que desde 1983 se han hecho esfuerzos por tener un control estricto del manejo de los bancos de sangre, así como de la obtención de derivados sanguíneos no contaminados para tratar de erradicar los casos de SIDA asociados a transfusión sanguínea. En este tipo de transmisión, el virus como partícula libre, o bien, las células infectadas de la unidad de sangre empleada, tienen acceso directo a otras células del hospedero.

La tercera vía de infección involucra la transmisión vertical del virus de una madre infectada a su hijo; ya sea durante la gestación, al momento del parto o durante la lactancia (61-65). Los reportes señalan rangos de transmisión que van desde un 11% a un 60%, en recién nacidos de madres infectadas. Aunque los mecanismos no se conocen, hay evidencia de que la infección puede ocurrir *in utero*, ya que se ha encontrado genoma integrado en tejidos placentarios y en el feto; durante el parto, ya que en ocasiones no es posible aislar virus de cordón umbilical, sin embargo sí se le obtiene en bebés 1 mes después del nacimiento, o bien durante la lactancia, en el caso de que la madre pase por un estado de viremia elevada durante las primeras semanas después del parto (66, 67).

El análisis de tendencias de casos de SIDA de acuerdo a las diferentes vías de transmisión en México, de 1983 a 1994, se muestra en la figura 3. Aún cuando se observó un incremento en el porcentaje de individuos infectados por

vía sanguínea en los primeros 4 años en que hubo registro, este incremento se debió a la aparición de casos de SIDA en personas que fueron infectadas antes de establecerse la reglamentación correspondiente para el control de las donaciones de sangre. Desde 1991 comenzó a observarse un descenso en el porcentaje de infectados por esta vía, aunque deberán pasar algunos años más para que podamos notar el efecto importante de la reglamentación y control de las donaciones de sangre, en el abatimiento de la infección por transfusiones sanguíneas. Por otro lado, aunque la transmisión por vía sexual se ha mantenido alrededor de un 70% de los casos reportados, si consideramos las diferentes modalidades de la transmisión sexual por separado encontramos que la transmisión heterosexual ha aumentado de manera muy importante, lo cual ha determinado que la relación hombres/mujeres infectados haya pasado de 1:25 en 1988 a aproximadamente 1:6 en 1993. Este aumento en la transmisión heterosexual, también ha determinado el incremento en el porcentaje de casos de SIDA perinatales, que ha cambiado de 0.6% a 1.4% en 7 años (68-74).

5) El Ciclo infeccioso:

Las manifestaciones de la infección por el HIV que se observan en un individuo, son el resultado de las alteraciones que provoca el virus en las células susceptibles de infectarse y las alteraciones que surgen en otras células por mediación de los productos del virus y de las células infectadas. Entender que es lo que sucede dentro de una célula infectada puede ayudar a explicar la consecuente inmunodeficiencia en el paciente.

El ciclo infeccioso comienza con la exposición del individuo al agente etiológico. Una célula puede infectarse por dos mecanismos diferentes; ya sea con una partícula viral libre o por el contacto con una célula ya infectada. La alta afinidad de la proteína gp120 por la proteína CD4 de la superficie celular, determina el tropismo preferencial del HIV hacia células con este marcador. Los linfocitos T ayudadores presentan una gran cantidad de este marcador, por lo cual son las células que tienen mayor probabilidad de ser infectadas (75-78).

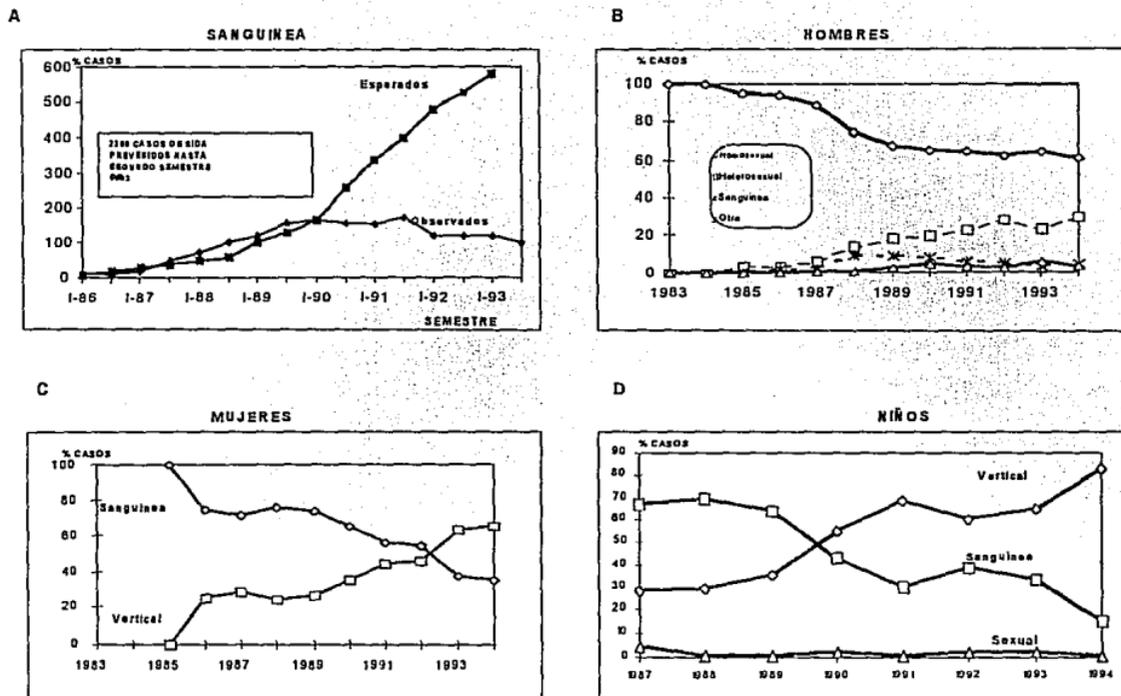


Figura 3. Tendencias de casos de SIDA en México. Panel A: comparación de los casos de SIDA por transfusión sanguínea observados, vs los casos esperados en ausencia de reglamentación para el control de las donaciones de sangre. Paneles B, C, y D: tendencias de los casos de SIDA por vía de transmisión en hombres, mujeres y niños respectivamente

Por cualesquiera de las vías de transmisión, el HIV entra al torrente sanguíneo en donde puede encontrarse con una célula CD4+ y por la interacción entre la proteína gp120 y el receptor CD4, el virus queda unido a la superficie. Más tarde, probablemente mediante la fusión de las membranas viral y celular, la nucleocápside penetra al citoplasma (79-81), en donde se desintegra y son liberados el RNA viral y las enzimas transcriptasa reversa (TR) e integrasa. Utilizando factores celulares, la TR se encarga de copiar la secuencia de nucleótidos del RNA viral, para sintetizar un genoma de DNA de doble cadena. El proceso de la transcripción reversa involucra al menos 3 diferentes actividades realizadas por una misma entidad proteica: la síntesis de DNA dependiente de un molde de RNA; la degradación de la hebra de RNA original y la síntesis de la cadena de DNA complementaria. Después de esto, la integrasa realiza cortes en el DNA viral y celular para permitir que el genoma del provirus sea integrado al de la célula, quedando esta permanentemente infectada (82-84).

Una célula infectada puede permanecer en un estado latente por un tiempo indefinido, durante el cual el virus se expresa en niveles muy bajos (85), o pasar a un estado de expresión activa del virus. Para la transición de un estado de latencia a otro de expresión activa del virus pueden actuar diversos factores, los cuales pueden ser: virales, como la aparición de variantes más patógenas; condiciones del hospedero, por ejemplo su estado inmunocompetente, ó estímulos externos, como la infección con otros patógenos (86).

6) Expresión del genoma viral:

El HIV es un retrovirus muy complejo en su estructura, organización y en los mecanismos de expresión de su genoma. Durante la infección se pueden definir dos etapas por la expresión diferencial de sus genes (Fig. 4). En la fase temprana predominan en el citoplasma RNAm pequeños, de aproximadamente 2 kb, producidos por varios eventos de edición en moléculas de tamaño genómico y que permiten la síntesis de las proteínas reguladoras tat, rev y nef. Un gran número

ro de trabajos han revelado que las proteínas tat y rev tienen un papel importante en la regulación de las dos fases de la expresión viral (2, 17, 19, 87-89).

La proteína tat, de 14 kd de peso, tiene una región que potencialmente permite la interacción con ácidos nucleicos, además de una secuencia que determina su localización en el núcleo. Su función depende de la secuencia diana "TAR" presente en el LTR, aunque se desconoce el mecanismo exacto. Algunos trabajos señalan que puede aumentar el inicio de la transcripción mediante su interacción con el promotor y/o con factores celulares. Otros dan evidencia de que podría estar involucrada en estabilizar el alargamiento de la cadena de RNA, que de otra manera es interrumpida tempranamente originando transcritos incompletos no funcionales (2, 17, 90, 91).

El producto de la expresión del gene *rev* es una proteína de 27 kd. Esta se localiza en el núcleo de la célula infectada y al igual que tat, requiere de una secuencia diana denominada RRE, la cual se encuentra en los RNAm de 4.5 y 9.7 kb para las proteínas estructurales y en los de 2 kb de los cuales se sintetizan las proteínas vif, vpu y vpr (26, 27, 92, 93). A la proteína rev se le atribuye la función de transportar fuera del núcleo los transcritos que contengan la secuencia RRE, para su traducción. Además, se ha encontrado que los RNAm que tienen la secuencia diana para RRE tienen una vida media más larga si también se encuentra presente rev (26, 28-30, 93).

La activación de la división en las células infectadas y la presencia de niveles elevados de rev provocan un cambio en los tipos de RNAm que llegan al citoplasma para la traducción, encontrándose principalmente RNAm para la síntesis de las proteínas estructurales y de aquellas que son necesarias para la morfogénesis de los nuevos viriones, lo cual desencadena la expresión tardía del HIV (87, 93, 94). Durante esta fase hay un aumento en los niveles citoplásmicos del RNAm de 4.5 kb, del cual se sintetizan las proteínas del gene *env* y de 9.7 kb que codifica para las proteínas de los genes *gag* y *pol*, además del RNA genómico.

Del transcrito de 4.5 kb se sintetiza el precursor (gp160) para las proteínas de envoltura, el cual es glicosilado en el aparato de Golgi y después de su ruptura

proteolítica en gp120 y gp41, ambas proteínas son transportadas a la membrana de la célula infectada (95). Del transcrito de tamaño genómico se sintetizan las proteínas de la nucleocápside y las enzimas virales. Este transcrito se traduce como un precursor de 180 kd, el cual contiene ácido mirístico en su extremo amino, que le permite unirse a la cara interna de la membrana celular. Mientras está anclado a ésta, el plegamiento del precursor permite la maduración de la proteasa codificada entre gag-pol, la cual realiza su propio procesamiento (auto catálisis) así como el de las proteínas de la nucleocápside. Ello determina la maduración de las proteínas; p17 que queda unida a la cara interna de la membrana formando la matriz del virión, p24 cuyos monómeros forman la nucleocápside viral y la ruptura de p15 en p7 y p9 que se asocian a dos cadenas de RNA de 9.3 kb y que son acarreadas junto con moléculas de transcriptasa reversa e integrasa hacia el virión, el cual emerge de la célula por gemación (95).

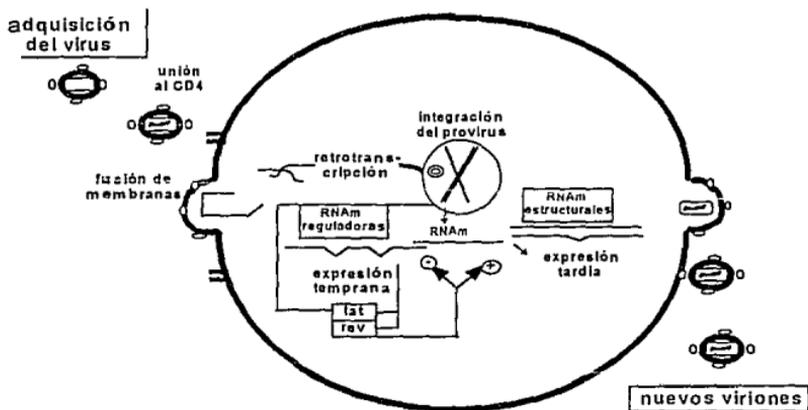


Figura 4. Ciclo viral. Después del encuentro entre una partícula viral y una célula susceptible, y mediante la interacción entre gp120 y el receptor CD4, las membranas de ambas entidades se fusionan. Dentro de la célula se ocurre la transcripción del RNA viral a DNA, el cual se integra al genoma celular. Durante la fase temprana de la expresión del virus solo se producen las proteínas reguladoras y en la fase tardía se construyen los nuevos viriones, mediante la síntesis y el ensamblaje de las proteínas estructurales y las enzimas virales.

7) Alteraciones Inmunológicas por el HIV-1:

Ante cualquier reto antigénico, en el organismo se activa la respuesta inmune, la cual consta de dos componentes que actúan de manera coordinada para la eliminación de una infección; la respuesta humoral, mediada por la activación de células plasmáticas para la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas) contra los diferentes epítopos antigénicos del agente infeccioso y la respuesta celular, que involucra: la activación de células citotóxicas (particularmente linfocitos con el receptor CD8 que se encargan de la lisis de células infectadas, de células cancerosas y células extrañas al organismo); la activación de células presentadoras de antígenos (principalmente monocitos y macrófagos o células derivadas de estos); la activación de células ayudadoras que participan en la coordinación de toda la respuesta inmune y la activación de células supresoras que intervienen terminando esta respuesta cuando ya se ha eliminado una infección.

Una de las primeras observaciones clínicas de la infección por el HIV-1 fue la disminución del número de linfocitos T4 en los pacientes con SIDA. Ello, además de que en cultivo el HIV infecta y destruye células con este marcador en su superficie, pusieron a los linfocitos T4 cooperadores/inductores como el principal grupo de células atacadas por el virus (97-99).

La destrucción de los linfocitos T4 por el virus puede explicar en parte la disfunción global del sistema inmune. Sin embargo, en algunos pacientes se observan anomalías inmunológicas aún teniendo un número normal de linfocitos T4, lo cual sugiere que el fallo en el sistema inmune no puede ser explicado únicamente por la destrucción celular (99). Entre los mecanismos que pueden participar en la alteración de las funciones inmunológicas sin que ocurra la muerte celular encontramos:

- a) Inhibición por la gp120 de la unión del receptor CD4 con sus ligandos naturales, los antígenos mayores de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (100).
- b) Supresión de las funciones de la célula T4 por anticuerpos anti gp41 que reaccionan de manera cruzada con los antígenos MHC-II (101).

- c) Inhibición de la respuesta de proliferación de los linfocitos, por las proteínas virales gp120, gp41, y tat (102-104).
- d) Regulación negativa de la expresión del receptor CD4 por su unión intracelular a gp160 (105, 106).
- e) Regulación negativa de los antígenos MHC (107).
- f) Infección por HIV de células presentadoras de antígeno (108 citado en 143).
- g) Producción de autoanticuerpos.
- h) Disfunción de células no infectadas.

8) Importancia de la respuesta humoral:

Entre los diferentes tipos de anticuerpos que se producen durante una infección viral, algunos tienen capacidad neutralizante, ya que son dirigidos contra epítopos que participan de manera importante en los distintos procesos del ciclo infeccioso. Así, se pueden encontrar anticuerpos que impiden el reconocimiento entre una partícula infecciosa y una célula susceptible. Otros actúan evitando la internalización del material genético y las enzimas virales al interior de la célula, al bloquear ya sea la endocitosis mediada por receptor en el caso de que el virus entre por esta vía, o impidiendo el proceso de fusión de membranas entre el virus y la célula como en el caso de la infección por el HIV. Clínicamente, es muy importante la producción de anticuerpos neutralizantes, ya que estos pueden conferir protección contra las infecciones virales.

En la búsqueda de estrategias para el desarrollo de vacunas contra el HIV y para tener una mejor comprensión de la relación entre la respuesta humoral y el virus, se han realizado un gran número de estudios sobre la capacidad neutralizante de los sueros de individuos infectados. Además, se han buscado los epítopos antigénicos del virus que inducen la producción de estos anticuerpos.

En los individuos seropositivos se detectan anticuerpos contra las enzimas virales p66/51 (transcriptasa reversa) y p31 (integrasa) que deberían tener actividad neutralizante, sin embargo, dichos anticuerpos no afectan la capacidad infectante del virus, probablemente debido a que tales enzimas ejercen su acción den-

tro de la célula y quedan inaccesibles para ser inhibidas por estos anticuerpos. Los principales sitios antigénicos inductores de la respuesta neutralizante se han encontrado en los productos del gene *env*. Diferentes reportes señalan la existencia de epítomos de neutralización en la proteína gp41 (109, 110), principalmente contra el dominio amino-terminal involucrado en la formación de sincicios, conocido como dominio fusogénico (54, 110-112).

Los principales epítomos inductores de respuesta neutralizante se han encontrado en la gp120. El sitio de unión de ésta proteína, con el receptor CD4 está formado por 3 regiones separadas en la secuencia primaria de aminoácidos (112, 113). Los anticuerpos dirigidos contra estas regiones tienen actividad neutralizante ya que impiden el anclaje de la partícula viral a la célula susceptible de ser infectada, sin embargo, estos epítomos no son muy inmunogénicos debido a que en la conformación nativa de la proteína se encuentran ocultos (108-117).

Los estudios de la homología entre secuencias de gp120 obtenidas de diferentes aislados de HIV-1 revelaron la presencia de 4 regiones muy conservadas (C1-C4) intercaladas entre 5 regiones con alta variabilidad (V1-V5) (118).

En 1987 se identificó al dominio principal de neutralización (DPN) del HIV-1, el cual se localiza hacia el extremo carboxilo-terminal de gp120, en la región variable 3 (V3). Esta región, aunque presenta una alta variabilidad en su secuencia de nucleótidos y aminoácidos, tiene una estructura terciaria conservada, en forma de asa, mantenida por puentes disulfuro y su tamaño es entre 34 y 36 aminoácidos de largo. En el centro de esta se localiza el tetrapéptido GPGR altamente conservado entre diferentes aislados, el cual es la parte central del DPN. En estudios de predicción, se determinó que la estructura terciaria más probable para la región V3 es: Cys-hoja β -vuelta tipo II-hoja β -hélice α -Cys (119-121).

Numerosos trabajos señalan que esta región tiene una participación importante durante el ciclo infeccioso, por lo cual, anticuerpos dirigidos contra ella presentan actividad neutralizante. De estos estudios se desprende que V3 puede ser un epítomo de importancia para el desarrollo de vacunas que induzcan una buena respuesta de anticuerpos neutralizantes.

Mediante el empleo de péptidos sintéticos se determinó que la parte central del DPN (GPGR y aminoácidos adyacentes) induce anticuerpos grupo específico, capaces de neutralizar varias cepas virales. Por otro lado, las regiones intermedias entre el GPGR y cada cisteína inducen anticuerpos tipo específico, que neutralizan solamente al virus inductor o cepas muy relacionadas a este (122, 123). Además, se ha encontrado que la región V3 también puede inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos (124, 125).

9) Importancia biológica de V3:

Una forma de caracterizar a los diferentes aislados de HIV-1 es mediante el estudio de las propiedades biológicas de los virus en cultivos celulares. En base a la velocidad de crecimiento y al nivel de producción virales, se puede clasificar a los aislados en dos grupos: uno de crecimiento lento y de baja producción (lentos/bajos) y otro de crecimiento rápido y en altas cantidades (rápidos/altos). También se puede estudiar si inducen o no la formación de sincicios (inductores, no inductores) y su tropismo hacia células monocíticas o solo linfocíticas. Algunas propiedades biológicas recaen en la secuencia de aminoácidos de la región V3. Tal es el caso del tropismo por monocitos y la capacidad de inducir sincicios (126-128).

Al insertar la secuencia correspondiente a la región V3 de aislados con propiedades biológicas determinadas, en clonas moleculares de virus con características distintas, y con la expresión de estos virus quiméricos, se obtienen aislados con el fenotipo correspondiente a aquel del cual se tomó la secuencia V3 (125, 129, 130). Cabe destacar, que estos estudios han permitido establecer que los aa en las posiciones 11 y 28 de V3 (según la secuencia consenso de LaRosa y colaboradores (131) son importantes en la determinación del fenotipo del aislado viral; en donde los virus que presentan un aa con carga positiva en estas posiciones son inductores de sincicios y no infectan monocitos.

En un estudio realizado por Tersmette y colaboradores (132), obtuvieron virus a partir de muestras secuenciales de sangre, caracterizaron los aislados en cuanto a sus propiedades biológicas y posteriormente secuenciaron la región V3 de los mismos, reportan que existe una asociación entre la capacidad de aislar virus inductores de sincicios y la progresión hacia el SIDA en los pacientes. Con esto se observó que conforme progresa la enfermedad se pueden aislar virus inductores de sincicios que en las secuencias V3 tienen diferencias importantes con los virus no inductores, donde los aa 306 y 320 de la gp120 presentan carga positiva y corresponden a las posiciones 11 y 28 de la secuencia consenso.

En vista de la importancia que tiene la región V3 como sitio estratégico para el desarrollo de vacunas contra el HIV-1 debido a su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, a la alta variabilidad de esta región, y al hecho de que la secuencia de aminoácidos del DPN nos proporciona información sobre el fenotipo de los diferentes virus, consideramos de importancia la caracterización de la región V3 en los HIV-1 aislados de pacientes Mexicanos.

II

OBJETIVOS:

GENERALES:

- 1. Estudiar la variabilidad de la región V3 de la proteína gp120 de HIV-1 aislados de pacientes mexicanos.**
- 2. Contribuir a la caracterización molecular de la epidemia de SIDA en México.**

PARTICULARES:

- 1. Obtener la secuencia de aminoácidos del epitopo principal de neutralización de aislados mexicanos de HIV-1.**
- 2. Comparar los niveles de variación entre nuestras secuencias, y con otras secuencias reportadas.**

III

MÉTODOS:

1) Obtención de células mononucleares humanas:

Las células mononucleares periféricas humanas (CMPH) se obtuvieron mediante centrifugación en gradientes de ficoll de la siguiente manera:

-Se colocan 6 ml de medio de separación de linfocitos (Ficoll-Hypaque) en un tubo de centrifuga de 15 ml. La muestra de sangre con anticoagulante, se diluye con un volumen igual de solución salina de fosfatos (PBS) a pH 7.0. Sobre el ficoll se forma una capa con 9 ml de sangre diluida, cuidando de no romper la interfase entre el ficoll y la muestra.

-El tubo se centrifuga durante 30 minutos a 1500 r.p.m. y al final se debe observar un gradiente descendente de la siguiente manera:

- Fase 1 plasma diluido 1:1 con PBS.
- Fase 2 CMPH.
- Fase 3 Ficoll.
- Fase 4 Eritrocitos.

-El plasma se recupera en alícuotas que se congelan a -20°C .

-Con una pipeta estéril se toma la capa de CMPH, se añade a un tubo con 5 ml de PBS y se centrifuga a 1500 r.p.m. por 5 minutos. Si no se forma un botón de células en el fondo del tubo, hay que diluir el exceso de ficoll con 5 ml más de PBS y repetir el proceso. Al observar el botón, se tira el sobrenadante y las células se resuspenden en medio RPMI-1640, con 20% de suero bovino fetal (SBF) y una mezcla (1%) de antibióticos-antimicóticos.

2) Aislamiento primario por cocultivo:

-Se establece un cocultivo de CMPH de pacientes, con CMPH de donadores sanos. Para ello se mezclan en un frasco de cultivo de 25 cm², las CMPH de un paciente con las de un donador sano en proporción 1:1. Las CMPH del donador sano deben estar previamente estimuladas por 48 horas con fitohemaglutinina (5µg/ml) y tratadas 30 minutos con polibreno (5µg/ml).

-Se agrega medio fresco (RPMI-1640, con 20% de SBF, 1% de antibióticos-antimicóticos y 50 U/ml de Interleucina-2 recombinante) dos veces por semana.

-Diariamente se observa al microscopio para determinar la aparición de efecto citopático y semanalmente se realizan ensayos para la detección de antígenos virales con un ELISA comercial, para monitorear la producción de virus.

3) Aislamiento en líneas celulares:

Una vez que un cultivo primario se considera positivo mediante la detección de antígenos virales en el medio de cultivo, se procede a establecer los aislados en líneas celulares inmortalizadas. En el presente estudio se emplearon las líneas de origen linfocitario Molt y SupT1.

-Mezclar 3 x10⁶ células de un cocultivo, con 1 x10⁶ células de la línea elegida, en RPMI-1640 con 10% de SBF y 1% de antibióticos-antimicóticos. Las células se alimentan con medio fresco 2 veces por semana, hasta lograr un 90% de células infectadas, determinadas por ensayos de Inmunofluorescencia.

4) Obtención del DNA:

Las células de un cultivo infectado (1 x10⁷ células) se cosechan por centrifugación a 1500 r.p.m. y se procesan de la siguiente manera:

- Lavar 2-3 veces con 10 ml de PBS, centrifugando 5 minutos a 1500 r.p.m. cada vez. Se tira el PBS y las células se resuspenden en 4 ml de Tris-Cl 10 mM

pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 M, se agregan 50 μ l de Proteínasa K (20mg/ml) y 450 μ l de Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS 10%).

- Incubar a 56°C en baño María durante la noche.

- Agregar 1 volumen igual de una mezcla 1:1 de Fenol-Cloroformo, mezclar por agitación y centrifugar a 4000 r.p.m.

- La fase superior (solución con DNA) se recupera, repitiendo el proceso de extracción 2 o 3 veces, hasta que la interfase quede transparente.

- Recuperar el DNA en un tubo nuevo, se añade Acetato de Sodio (0.3 M concentración final) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar por inversión.

- Si se observan hebras de DNA, este se recupera por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 30 minutos, se tira el etanol, el botón de DNA se lava con 1 ml de alcohol etílico al 70 %. Secar al aire y resuspender en 100-500 μ l de H₂O desionizada estéril.

- Si no se observan hebras de DNA, la muestra se incuba a -20°C de 4 a 24 horas y se recupera mediante el mismo proceso de centrifugación.

5) Amplificación de la región V3:

Los ensayos de PCR se realizaron utilizando como iniciadores los oligonucleótidos; KSI 5' y KSI 3' descritos por Goudsmit y cols. (133). Las condiciones de reacción fueron: 1 μ g de DNA problema en Tris-HCl 10 mM pH 8.3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM; dATP, dGTP, dCTP y dTTP 0.2 mM c/u; 50 pMoles de cada iniciador y 2.5 U de Taq-DNA polimerasa en un volumen final de 100 μ l. Se efectuaron 35 ciclos de amplificación a 95°C 1 minuto, 55°C 1 minuto y 72°C 2 minutos.

6) Purificación de productos amplificados por PCR:

- Se prepara un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% en amortiguador para electroforesis TAE (Tris-base 40 mM; Acetato de Sodio 20 mM; Acido Acético 29 mM; EDTA 2 mM).

- Una vez fundida, la agarosa se vacía en el formador de geles y se coloca un peine con el número adecuado de carriles para hacer pozos de 50 µl de capacidad, dejar solidificar

- A cada muestra de los ensayos de PCR se agrega 1/10 (10 µl) de volumen de colorante para muestras (glicerol 50%; EDTA 100 mM; SDS 1%, Azul de bromofenol 0.1% y Xilen-Cianol 0.1%) y se utilizan 50 µl para llenar un pozo del gel.

- Realizar la electroforesis a 80 V, con el gel sumergido en TAE con Bromuro de etidío (0.5 µg/ml), durante el tiempo adecuado para separar la banda de DNA del producto de la amplificación, del DNA genómico.

- Observar el gel bajo iluminación con luz ultravioleta de longitud de onda larga. Se identifica el producto de amplificación comparando con la migración de un marcador de tamaño molecular de referencia y se corta el fragmento de agarosa que contiene al producto correspondiente.

- El fragmento se coloca en un tubo Eppendorf con 200 µl de agua bidestilada (ddH₂O) y se calienta a 65°C por 5 minutos.

- Enfriar a temperatura ambiente y agregar 300 µl de Fenol Mezclar por agitación y centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 3 minutos.

- Recuperar la fase superior (DNA en solución) en un tubo nuevo y añadir 300 µl de una mezcla 1:1 de Fenol-Cloroformo. Mezclar por agitación y repetir la centrifugación.

- Recuperar la fase acuosa en un tubo con 300 µl de Cloroformo y repetir el proceso.

- Tomar la fase acuosa, añadir 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M pH 5.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), incubar 30 minutos a -20°C y centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 20 minutos, a 4°C.

- Decantar el líquido y lavar la pastilla de DNA con 500 µ de etanol al 70% frío, decantar de nuevo y secar al aire. El DNA se resuspende en 11 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7.4; EDTA 1 mM.

7) Cuantificación de productos de PCR:

- Preparar un gel de agarosa (2.5%), con pozos de 5 µl de capacidad.
- Colocar en un pozo 1µl de la solución de DNA obtenida por el método anterior, mezclado con 3 µl de H₂O desionizada y 0.5 µl de colorante para muestras. En dos carriles del gel se ponen 1.0 y 0.5 µl del estándar de tamaño molecular, que tiene una concentración conocida de DNA de cada una de las bandas de referencia.
- Realizar la electroforesis en presencia de Bromuro de Etidio, a 100 V durante el tiempo necesario para la separación de los fragmentos del estándar de tamaño molecular, observar el gel bajo iluminación con luz UV.
- La cantidad aproximada de DNA en los productos amplificados, se obtiene comparando visualmente la intensidad de la fluorescencia en cada muestra, con la banda de referencia del estándar.

8) Secuenciación:

La secuencia de la región V3 de los diferentes aislados de HIV-1 se obtuvo por el método de terminadores de cadena (144) utilizando [α -³⁵S] dATP como fuente de señal a detectar y con el estuche *Sequenase version 2.0*¹ (USB).

-Entre 150 y 200 ng de DNA de los productos de PCR, purificados y cuantificados con los métodos descritos anteriormente, se someten a la reacción de secuenciación con un protocolo para obtener la secuencia de regiones cercanas al iniciador (como iniciador empleamos el oligonucleótido KSI 5' de los ensayos de PCR). El método es de la siguiente manera:

1) Reacción de alineación: en un tubo eppendorf se mezcla el DNA (150-200 ng en 7.5 µl) con 0.5 µl (5 pmoles) del iniciador y 2.0 µl de amortiguador para secuenciar* Incubar a 95°C, 2 minutos y colocar en baño de hielo.

2) Reacción de marcaje: a la reacción anterior (10 µl) se agrega 1.0 µl de Ditiotreitól (DTT)*, 2.0 µl de mezcla de nucleótidos diluidos 1:10*, 0.5 µl (5.0 µCi)

¹ Los asteriscos indican los reactivos proporcionados por el estuche comercial de Sequenasa

de [α - 35 S]dATP, 1.0 μ l de Mn* y 2.0 μ l de DNA polimerasa (sequenasa)* diluida 1:8. Incubar a 20°C, 2 minutos. Mientras tanto se preparan 4 tubos marcados; G, A, T, C. y se añaden 2.5 μ l del dideoxinnucleótido trifosfato correspondiente a cada tubo. según la tabla:

	G	A	T	C
ddGTP*	2.5			
ddATP*		2.5		
ddTTP*			2.5	
ddCTP*				2.5

3) Reacción de término: añadir 3.5 μ l de la reacción de marcaje a cada uno de los cuatro tubos que contienen dideoxinnucleótidos y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Para terminar la reacción se añaden 4 μ l de solución de paro*. Las muestras se almacenan a -20°C hasta realizar la electroforesis.

9) Geles de secuenciación:

- Se prepara un *sandwich* con un juego de cristales para geles de secuenciación limpios, con separadores de 0.4 mm. Sellar con cinta plastica los lados y la parte inferior.

- Preparar la solución de acrilamida para un gel al 6% según la receta:

Urea (7.5 M final)	30 g
Acrilamida/Bisacrilamida 38/2%	9.47 ml
ddH ₂ O	22.50 ml
*TBE 10x	6.00 ml
Persulfato de Amonio (10%)	534 μ l
TEMED	20 μ l

*TBE: Tris Base 54.0 g; A Bórico 27.5 g; EDTA (0.5 mM pH8.0) 20 ml. Aforar a 500 ml con H₂O.

- Vaciar la solución entre los dos cristales y colocar el peine para formar una superficie lisa en la parte superior.

- Dejar transcurrir la polimerización del gel por lo menos 2 horas y no más de 24 horas.

- Antes de colocar las muestras para realizar la electroforesis, calentar el gel aplicando 1,500 V de corriente en el aparato de electroforesis durante 30 minutos.

- Colocar el peine con el lado formador de carriles hacia el gel.

- Calentar las muestras a 65°C durante 5. Marcar en el cristal externo la posición en que se colocará cada una de las muestras.

- Colocar 3 μ l de muestra en cada carril del gel y realizar la electroforesis a 1500 V durante el tiempo adecuado (hay que determinar por ensayo y error el tiempo de corrida).

- Una vez terminada la electroforesis el gel se trata con una solución fijadora (metanol 10%/Ac acético 10%) durante 15 minutos, se seca a 80°C con vacío, se expone con una placa para radiografía por lo menos durante 48 horas y se revela.

- La lectura de las secuencias se realiza visualmente y los resultados se procesan con programas de computación.

IV

RESULTADOS:

1) Identificación de los productos de PCR:

Utilizamos el método de secuenciación directa de los productos de amplificación por PCR, correspondientes a la región V3 de la glicoproteína gp120 de distintos aislados de HIV-1 de origen mexicano. Se emplearon los oligonucleótidos KSI3'/KSI5' (133), los cuales fueron sintetizados por Abraham Landa en la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard, en Boston. Este par de oligonucleótidos amplifica un segmento de 320 pares de bases, como se observa en la figura 5, el cual está comprendido entre los nucleótidos 7011 al 7330 según la secuencia de la clona HXB2 del HTLVIIIb/LAV (134).

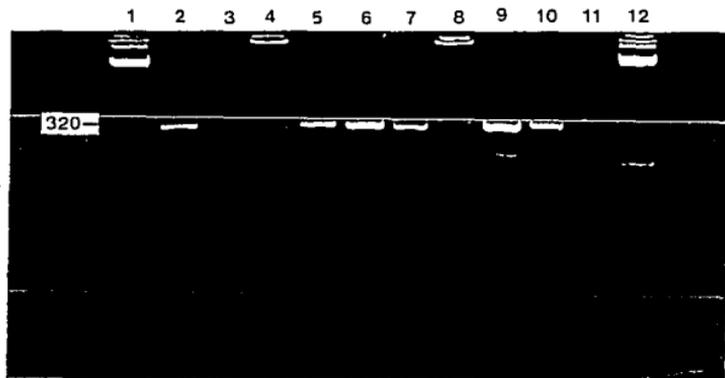


Figura 5. Ensayo de amplificación de la región V3. Carril 1) estandar de tamaño molecular. 2) pBH10. 3) MXC14-1/M. 4) MXC23/S. 5) MXC20-1/S. 6) MXC20-1/M. 7) MXP42m/coc. 8) MXP42p/coc. 9) MXP4/M. 10) MXP4/S. 11) MXP5/M. 12) estandar de tamaño molecular.

2) Generalidades de las secuencias obtenidas:

Aplicando protocolos para obtener la secuencia de regiones cercanas al iniciador, se obtuvieron segmentos de entre 146 y 264 nucleótidos de largo, con una media de 217 pb. Los productos de la traducción tienen longitudes de 43 a 87 aminoácidos, con una media de 71 residuos. En todos los casos se obtuvo la secuencia completa de la región V3, entre las cisteínas 301 y 336 según la secuencia del HTLVIIIb/LAV y un mínimo de 11 residuos antes y 7 después de la misma. En la figura 6 se observa una autorradiografía con los resultados de un ensayo de secuenciación.

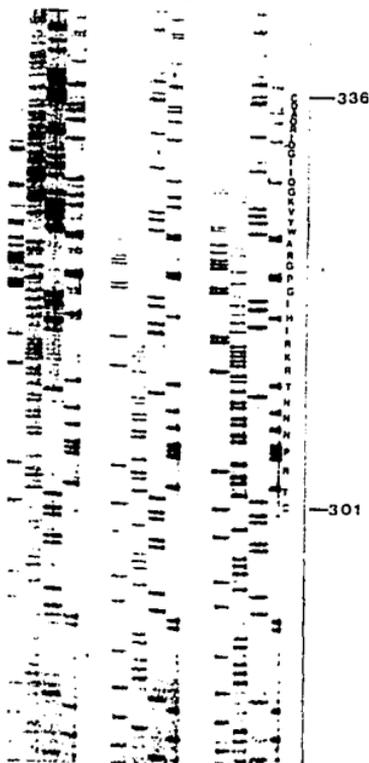


Figura 6. Ensayo de secuenciación de productos de PCR de la región V3. A la derecha de la tercera secuencia se muestra la traducción del segmento correspondiente a V3.

Como control en los ensayos de amplificación y secuenciación se utilizó una clona molecular del virus HTLV-IIIb/LAV, contenida en el plásmido pBH10. Este se obtuvo al insertar el genoma casi completo del HTLVIIIb/LAV (menos 450 pb del LTR 5') dentro del vector pSP64. El pBH10 nos fue proporcionada por el Medical Research Council de Inglaterra. Los resultados obtenidos con nuestros aislados y con la cepa prototipo se compararon entre si y con las secuencias consenso de V3 reportadas para diferentes regiones geográficas, según la base de datos de retrovirus (134).

3) Nomenclatura de los aislados:

Los aislados y variantes virales que se estudiaron fueron obtenidos de siete pacientes, diferentes: P4, P5, C20-1, C14-1, C23, P42m y P42p.

P4 y P5 son pacientes hemofílicos. Los aislados, obtenidos por co-cultivo en CMPH, fueron posteriormente establecidos en líneas celulares linfocitarias. De P4 se secuenciaron 2 variantes, establecidas en células Molt (MXP4/M) y en células Sup T1 (MXP4/S) respectivamente, a partir del co-cultivo original. De P5 se secuenció el cultivo establecido en células Molt (MXP5/M).

El aislado C20-1 proviene de un paciente infectado por vía sexual, aunque debe considerarse que a este paciente le transmitió el virus alguien infectado por transfusión sanguínea. En este caso se secuenció el DNA proveniente de las variantes establecidas en células SupT1 (MXC20-1/S) y Molt (MXC20-1/M).

Los aislados C14-1 y C23 son de pacientes infectados por vía sanguínea. El de C14-1 se estableció en células Molt (MXC14-1/M) y el de C23 en Sup T1 (MXC23/S).

Finalmente P42m y P42p son una pareja infectada. El paciente P42p se infectó por vía sexual y transmitió heteroséxualmente la infección a P42m. los virus secuenciados en este caso son aislados primarios, todavía mantenidos en CMPH (MXP42m/coc y MXP42p/coc).

4) Alineación de las secuencias:

En la tabla 2 se presentan los resultados de la alineación de las secuencias de los 7 aislados obtenidas en este estudio. La comparación se realizó con el menú *CLUSTAL* del programa *PC-GENE* (version 7.5).

Panel A: Región amino terminal.

	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
pBH10	L	A	K	E	L	R	V	V	Q	L	N	C	S	V	E	L	E	N		
MXC14-1/1M	S	K	A	T	I	V	D	R	N	P	S	V	E	L	E	N				
MXC23/S	F	A	D	N	K	A	L	V	V	O	S	T	I	E	L	E	N			
MXC20-1/S					Y	V	L	I	C	K	E	P	V	E	L	E	N			
MXP42m/ccoc					T	G	V	I	N	M	Y	R	L	N	E	V	V	O	I	R
MXP42p/ccoc																				
MXP4/M	S	L	A	K	C	K	N	L	Y	S	T	I	E	P	I	C	R	L	S	
MXP5/M																				

Panel B: Región V3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
pBH10	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	L	R	R	G	R	G	P	G	R	A	V	T	G	K	I	G	N	M	R	C	A	H	C				
MXC14-1/1M	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	L	R	R	G	R	G	P	G	R	A	V	T	G	K	I	G	N	M	R	C	A	H	C				
MXC23/S790	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	L	R	R	G	R	G	P	G	R	A	V	T	G	K	I	G	N	M	R	C	A	H	C				
MXC20-1/S	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	L	R	R	G	R	G	P	G	R	A	V	T	G	K	I	G	N	M	R	C	A	H	C				
MXP42m/ccoc	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	L	R	R	G	R	G	P	G	R	A	V	T	G	K	I	G	N	M	R	C	A	H	C				
MXP42p/ccoc	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	L	R	R	G	R	G	P	G	R	A	V	T	G	K	I	G	N	M	R	C	A	H	C				
MXP4/M	C	T	R	P	N	N	D	I	K	I	R	H	H	I	G	G	R	A	V	T	R	N	T	G	N	E	I	R	P	Y	C							
MXP5/M	C	V	R	P	N	N	T	I	O	I	R	H	H	I	G	G	R	A	V	T	R	N	T	G	N	E	I	R	P	Y	C							

Panel C: Región Carboxilo terminal

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
pBH10	N	A	I	G	R	A	K	W	N	I	T	L	C	Q	L	D	S	N	K	R	H																	
MXC14-1/1M	T	E	S	P	A	N	G	I	H	F	S	S																										
MXC23/S790	K	T	X	Y	R	T	N																															
MXC20-1/S	D	L	S	R	T	R	W	D	V	S	K	C	E	V	I	K	L	D	I	W	N	K	H	T	L	S												
MXP42m/ccoc	D	V	E	H	I	K	A	V	Q	I	H	S	A	Y	Y	S	F	S	I	V	R	V	N	S	T	R	S	L										
MXP42p/ccoc	E	P	C	D	T	Q	G	C	Q	I																												
MXP4/M	H	G	C	K	A	E	M	V	L	R	R	H	Y	L	T	C	Y	L																				
MXP5/M	C	W	D	L	T	Q	V	M	S	Y	D	T	F	S	C	T	I	M	V	L	A	L	S	L	K	L	G	R	A	N	Y	L	L	H				

Tabla 2. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la región V3 de los aislados mexicanos, tomando como referencia la secuencia del prototipo HIV-1 IIB/LAV (pBH10). Las áreas sombreadas indican aminoácidos similares al virus prototipo.

Para fines prácticos, en el presente trabajo se numeraron del 1 al 38 los aminoácidos de V3 entre ambas cisteínas (panel B). En la región anterior (panel A) utilizamos números negativos y en la posterior (panel C) números con signo positivo.

En la parte amino terminal (A) encontramos algunas diferencias en aminoácidos al comparar contra el virus prototipo, sin embargo, podemos considerar a esta como una región semiconservada.

En la región carboxilo terminal (C), después de la segunda cisteína de V3 se observa una mayor cantidad de diferencias en aminoácidos al comparar contra el prototipo, lo que nos indica que esta región es altamente variable en los HIV.

Las longitudes en aminoácidos de la región V3 (B), encontradas para los aislados secuenciados son: 33 residuos en MXC14-1/M, 34 en MXP4/M, 35 en MXC20-1/S, MXC23/S y MXP42m/coc y 36 en MXP42p/coc y pBH10.

En V3 encontramos 2 regiones muy conservadas: una en la parte amino-terminal de V3, que involucra los aminoácidos CTRPNNNTRK. En esta zona, MXP4/M solamente tiene 2 cambios de aminoácidos: N→D y T→I en las posiciones 7 y 8, mientras MXP5 tiene los cambios T→V y T→I en 2 y 8 respectivamente. La segunda región conservada es la parte central de V3, con los aminoácidos GPGRA. Conforme nos desplazamos del extremo amino al extremo carboxilo, se observa un aumento en la variación de la secuencia de aminoácidos. Esto se hace evidente al graficar el número de aislados con aminoácido diferente al prototipo en cada posición de V3 como se observa en la figura 7.

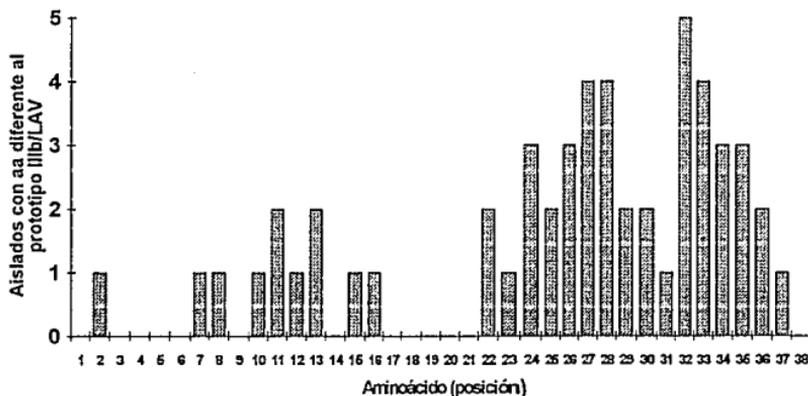


Figura 7. Variabilidad de cada aminoácido de V3 en las secuencias del presente trabajo. Se graficó el número de aislados con aa diferente al virus IIIb/LAV (pBH10) en cada posición.

5) Homología en la región V3:

En la tabla 3 se presentan como porcentajes de similitud en aminoácidos, los resultados del análisis de la homología en la región V3 entre las diferentes secuencias. Este se realizó con el menú *PALIGN* del *PC-GENE*, en el cual se comparan por parejas las diferentes secuencias entre sí y se registran los porcentajes de similitud resultantes.

Entre las secuencias de los aislados, los porcentajes de similitud van desde el 47% (MXP42p/MXP5) al 84.8% (MXC14-1/MXC23). Las similitudes más altas (>85%) se encontraron al comparar las secuencias de MXC14-1 y MXC23 con la del pBH10. En promedio la homología en esta región en los aislados mexicanos fue del 61.4%.

MXC14-1	91.6							
MXC23	85.7	84.8						
MXC20-1	74.3	75.8	62.9					
MXP42m	71.4	72.7	71.4	68.6				
MXP42p	61.6	66.7	68.6	68.6	82.9			
MXP4/M	58.8	51.5	50.0	58.8	52.9	50.0		
MXP5/M	52.9	48.5	50.0	50.0	50.0	47.0	58.8	
	pBH10	MXC14-1	MXC23	MXC20-1	MXP42m	MXP42p	MXP4/M	

Tabla 3. Porcentajes de homología en la secuencia de aminoácidos de V3 entre los diferentes aislados.

6) Relaciones entre las secuencias V3:

Utilizando el menú *CLUSTAL* del *PC-GENE*, realizamos un análisis de las relaciones entre las secuencias de los virus mexicanos. Esto nos permitió la formación de 3 grupos, dependiendo de las similitudes entre ellas. Por un lado, uno formado con la secuencia del pBH10 y las de los aislados MXC14-1/M y MXC23/S. En el segundo grupo están: MXC20-1/S; MXP42m/coc y MXP42p/coc, los tres son virus derivados de infecciones por transmisión sexual. Al tercer grupo

pertencen las secuencias de los dos virus aislados de pacientes hemofílicos; MXP4/M y MXP5/M (figura 8).

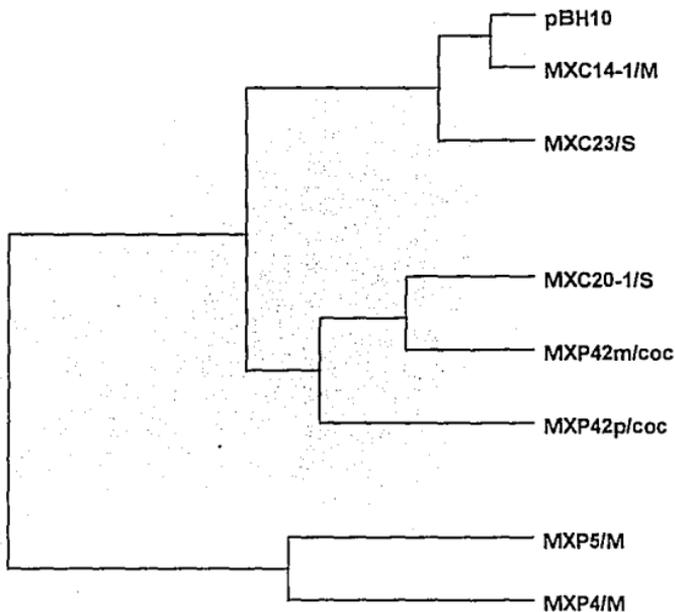


Figura 8. Dendrograma que muestra las relaciones entre las secuencias V3 de nuestro grupo de aislados.

7) Comparacion con los genotipos mundiales:

Los estudios de la filogenia de los distintos aislados virales reportados en la literatura, tanto para secuencias del gene gag, como para env, han revelado la existencia de por lo menos 6 genotipos a nivel mundial según la base de datos de retrovirus humanos (134), aunque el número de secuencias en cada genotipo es muy heterogeneo, ya que el subtipo B esta sobrerrepresentado, debido a que en este subtipo se encuentran las secuencias de virus obtenidos en Europa y Estados Unidos, mientras que el número de secuencias de virus de otras regiones es

mucho menor. Los diferentes subtipos y el número de secuencias de cada uno de ellos son los siguientes:

SUBTIPO	Nº DE SECUENCIAS	ORIGEN
A	71	África central y el Oeste de África
B	186	América, Europa y Asia
C	28	Sur de África, África central y la India
D	64	Tailandia y África central
E	42	África central
F	19	Rumania y Brasil

Cada subtipo está formado por secuencias que presentan diferencias, a nivel nucleotídico, entre el 7 y el 20%. Entre dos subtipos, estas son del 20 al 35%. Con las secuencias que tienen mayor porcentaje de diferencias y con las secuencias que caen entre 2 o más genotipos se ha formado el "Subtipo U", de virus "no clasificables".

Aún con la limitante de que el tamaño de las secuencias obtenidas en el presente estudio no es el óptimo para realizar estudios filogenéticos con alto índice de confiabilidad, se determinó a que subtipos de virus pertenecen las secuencias V3 de estos aislados, considerando que algunos de los subtipos mundiales se definieron utilizando muy pocas secuencias. Los resultados de este análisis se presentan en el dendograma de la figura 9.

Encontramos que el aislado MXC20-1/S está relacionado al genotipo B, al cual pertenecen casi todos los HIV encontrados en América. Otros dos aislados; MXP42m/coc y MXP42p/coc, se distribuyeron entre los subtipos consenso. El MXP42m se colocó en una posición intermedia entre los genotipos D (África central y Tailandia) y E (África central), mientras que MXP42p quedó cercano al genotipo D.

Las secuencias de los otros aislados MXC14-1/M, MXC23/S, que formaron un grupo con la del pBH10, así como las secuencias de MXP4/M, y MXP5/M en

otro grupo, se incluyen dentro de los denominados virus no clasificables (134), ya que no pudieron agruparse con ninguno de los genotipos consenso.

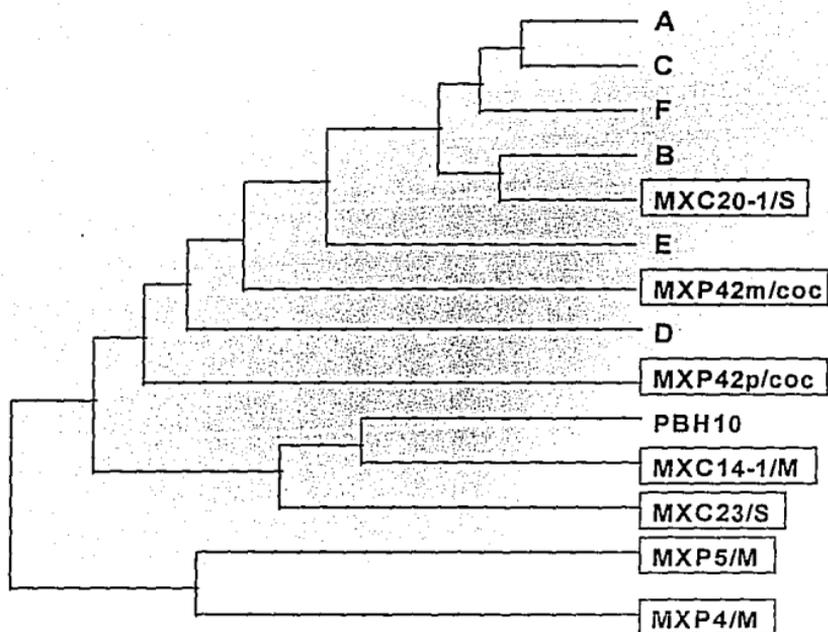


Figura 9. Dendrograma que nos muestra como se ubican las secuencias V3 de los aislados mexicanos con respecto de las secuencias consenso de los distintos genotipos a nivel mundial.

8) Heterogeneidad viral en los cultivos:

En el aislamiento de HIV-1 de un paciente por el método de cocultivo, se obtiene una población heterogénea de virus, ya que un individuo no tiene un solo tipo viral, sino una mezcla, producto de la variabilidad característica de los retrovirus.

Al amplificar secuencias virales a partir del DNA de cultivos que contienen poblaciones mixtas de virus, esperamos tener representadas en el producto de

tenidas, se realizaron ensayos de amplificación y se obtuvieron las secuencias de la región V3 de las variantes: MXP4/S_{ori}, MXP4/S_{c-1}, MXP4/S_{c-2} y MXP4/S_{c-3}. En la tabla 6 se hace una comparación de estas. Solamente en una de las clonas encontramos aminoácidos que se presentaron como alternativos en la secuencia del cultivo original. Como se puede observar, la secuencia de MXP4/S_{c-2} tiene los aminoácidos Isoleucina (I) y Aspártico (D) en las posiciones 25 y 28 respectivamente, mismos que se encuentran como alternativos en la secuencia del cultivo original. Por otro lado, podemos mencionar que existe mucha variación en V3 aún en las clonas, principalmente en la región carboxilo terminal.

	1	10	20	30																											
MXP4/S _{ori}	C	E	R	P	N	N	D	K	I	R	H	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	R	V	R	K	Y	R	P	S	C
MXP4/S _{c-1}	C	E	R	P	N	N	D	K	I	R	H	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	R	V	R	K	Y	R	P	S	C
MXP4/S _{c-2}	C	E	R	P	N	N	D	K	I	R	H	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	R	V	R	K	Y	R	P	S	C
MXP4/S _{c-3}	C	E	R	P	N	N	D	K	I	R	H	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	R	V	R	K	Y	R	P	S	C

Tabla 6. Alineación de las secuencias V3 del aislado MXP4/S original y la de 3 clonas biológicas de este cultivo. De MXP4/S_{ori} obtuvimos una secuencia principal y una alternativa, según se describió anteriormente, de las clonas una sola secuencia. Las áreas sombreadas indican aminoácidos comunes a todas las secuencias.

c) Variación durante el tiempo de cultivo.

Esta reportado que a lo largo del tiempo, los HIV evolucionan genotípica y fenotípicamente *in vivo*. Para probar si estos cambios también se producen en las variantes virales establecidas en cultivo, se determinó la secuencia de DNA a diferentes tiempos en el cultivo MXC20-1/S. De este aislado se tomaron células para realizar extracción de DNA en 3 ocasiones, con 18 meses de tiempo transcurrido entre la primera y la última muestra (MXC20-1/S₉₀, MXC20-1/S₉₁ y MXC20-1/S₉₂). Además el virus que se producía en el cultivo en 1990 se empleó para infectar células de la línea Molt y obtener el aislado MXC20-1/M₉₀, del cual también se extrajo DNA y se realizaron ensayos para obtener la secuencia de V3.

En la alineación de las secuencias V3, de las variantes de este cultivo obtenidas a lo largo de 18 meses (tabla 7), se puede observar que los cambios durante este tiempo son mínimos. En el cultivo establecido en células Sup T1, solamente encontramos un aminoácido diferente, en la posición 25 (Q por K), entre la

secuencia de 1990 y la de 1991, cambio que se "revierte" en la secuencia de 1992.

Al establecer el virus en otra línea celular, se introduce un factor de selección importante, lo cual se refleja en un número mayor de cambios en V3, en los virus que crecen en estas células. Al comparar la secuencia del virus crecido en SupT1, contra la del de células Molt, encontramos que cambian 4 aminoácidos, los cambios son: S→R en posición 11; A→V en 22; T→K en 23 y H→D en 34.

	1	10	20	30																													
MXC201/S ₉₀	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	H	L	G	P	G	R	A	W	Y	A	T	G	Q	L	G	D	R	Q	A	H	C	
MXC201/S ₉₁	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	H	L	G	P	G	R	A	W	Y	A	T	G	K	L	G	D	R	Q	A	H	C	
MXC201/S ₉₂	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	H	L	G	P	G	R	A	W	Y	A	T	G	Q	L	G	D	R	Q	A	H	C	
MXC201/M ₉₀	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	R	L	H	L	G	P	G	R	A	W	Y	V	K	G	Q	L	G	D	R	Q	A	D	C

Tabla 7. Comparación de las secuencias obtenidas del virus aislado del paciente C20-1 a lo largo de 18 meses de cultivo y en 2 líneas celulares.

9) Determinantes antigenicos en las secuencias:

Utilizando el menú *ANTIGEN* del *PC GENE* se realizó el análisis teórico de la presencia de determinantes antigenicos en estas secuencias. El análisis, desarrollado por Hops y Woods (135), está basado en asignar un valor de hidrofiliidad a cada aminoácido, obteniéndose un valor promedio para hexapéptidos a todo lo largo de la secuencia. Los hexapéptidos de mayor valor se comparan con los de los sitios antigenicos de un grupo de 12 proteínas, determinados teórica y experimentalmente. Estos autores reportan que los índices de valor mayor en una secuencia problema correlacionan 100% con determinantes antigenicos conocidos. El análisis con este programa nos permite obtener los 3 principales epítomos de una secuencia particular. Asumimos que los epítomos cuyo índice es mayor que 1.0 tienen una probabilidad del 100% de ser determinantes reales y en los epítomos con valor inferior a 1 esta probabilidad disminuye.

En la tabla 8 se muestran los sitios antigenicos predecibles para las secuencias del presente estudio. En ella se señalan con áreas sombreadas las regiones cuyo índice de hidrofiliidad resultó mayor que 1.0, por lo cual pueden

considerarse epitopos reales. También se muestra una región en las variantes de MXP4 y MXC20-1, alrededor de la primera Cisteína (aminoácidos enmarcados), con epitopos cuyo índice de hidrofiliidad es 0.97, suficientemente alto para considerarlos con probabilidad de ser antigénicos.

Antes de V3 (panel A), solamente encontramos un sitio antigénico en la secuencia de MXP4/S_{C-2}, entre los aminoácidos -18 a -13. En la región posterior a V3 (panel C) encontramos epitopos inmunogénicos en las secuencias de pBH10 (+15 a +20), MXC20-1/S₉₀ y MXC20-1/M₉₀ (+29 a +34) y en MXP4/S_{C-1} (+16 a +21). Dentro de V3 (panel B), el pBH10 y los aislados MXC14-1, MXC23, MXC20 MXP42m y MXP42p comparten el epitopo NNTRK; pBH10, MXC14-1, MXC23 y MXC20 tienen el epitopo sobrelapado NNTRKS, y pBH10, MXC14-1, MXC23 un tercer epitopo sobrelapado con los anteriores, que es TRKSIR, además de el epitopo QRGPR en la parte central de V3.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, V3 es un sitio inmunodominante. En este estudio encontramos que la mayoría de las secuencias presentan epitopos antigénicos en esta región. Observamos que la zona entre la primera cisteína y la secuencia GPGRAF es muy inmunogénica ya que en ella, del total de 15 secuencias, 14 tuvieron epitopos predecibles.

Además de los sitios antigénicos con índices mayores a 1.0, con este análisis se obtuvieron una serie de probables epitopos antigénicos cuyos índices de hidrofiliidad resultaron de menor valor (0.65 a 0.97). Entre estos, se encontró una región (entre los aminoácidos -3 a 3) de las variantes de los aislados MXC20-1 y MXP4, que se observan como aminoácidos enmarcados en la tabla 8 e involucran a la primera cisteína de V3, cuyos índices de hidrofiliidad son 0.97. En base a esto, también esperaríamos 2 patrones de neutralización para estos aislados. Uno de sueros reactivos contra el epitopo EIDCTR de las variantes de MXC20-1 y otro de sueros reactivos con el epitopo DITCER, que neutralizaría a las variantes de MXP4.

En una de las secuencias no encontramos ningún sitio antigénico predecible, esto es, en el aislado MXP5/M el hexapéptido con mayor índice de hidrofiliidad

dad resultado con valor de 0.65, valor que consideramos muy bajo para un sitio antigénico probable.

Panel A: Región anterior a V3.

	-20	-15	-10	-5	-1											
PBH10		A	K	T	I	I	V	Q	L	N	Q	S	V	E	I	N
MXC141/M			S	K	T	T	I	V	Q	R	N	N	P	S	V	E
MXC23/S ₉₀		F	A	D	N	K	T	I	V	Q	L	N	T	S	V	E
MXC201/S								Y	V	L	L	K	E	P	V	E
MXC201/M ₉₀								D	V	K	T	I	V	Q	L	K
MXC201/S ₉₀			S	D	N	A	K	T	I	V	Q	L	K	E	P	V
MXC201/S _{90c}								X	T	I	V	Q	L	K	E	
MXP42m/coc			T	G	V	I	N	M	Y	R	L	N	E	S	V	
MXP42p/coc								K	T	T	I	V	Q	L	K	
MXP5/M								T	I	V	E	L	N	V	S	
MXP4/S _{90c}		K	F	S	D	N	A	K	T	I	V	Q	L	N	V	
MXP4/S _{90c1}								S	D	N	A	K	T	I	V	
MXP4/S _{90c2}			V	G	D	D	A	K	T	I	V	Q	L	N	V	
MXP4/S _{90c3}								Q	C	X	N	H	N	S	T	
MXP4/M		S	L	A	K	C	K	N	L	Y	S	Y	T	I	E	

Panel B: Región V3.

	1	5	10	15	20	25	30	35																										
PBH10	C	T	R	P	N	N	N	R	K	S	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	G	K	I	G	N	M	R	Q	A	H	C
MXC141/M	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	G	K	I	G	N	M	R	Q	A	H
MXC23/S ₉₀	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	V	K	R	G	Y	I	E	Q	A	H
MXC201/S	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	H	I	G	P	G	R	A	W	A	T	G	Q	I	I	G	D	I	R	Q	A	H
MXC201/M ₉₀	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	H	I	G	P	G	R	A	W	A	T	G	Q	I	I	G	D	I	R	Q	A	H
MXC201/S ₉₀	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	H	I	G	P	G	R	A	W	A	T	G	Q	I	I	G	D	I	R	Q	A	H
MXC201/S _{90c}	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	H	I	G	P	G	R	A	W	A	T	G	Q	I	I	G	D	I	R	Q	A	H
MXP42m/coc	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	H	I	G	P	G	R	A	V	T	T	G	R	N	A	R	K	I	L	L	A	H
MXP42p/coc	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	R	I	H	I	G	P	G	R	A	V	T	T	G	R	N	A	R	K	I	L	L	A	H
MXP5/M	C	V	R	P	N	N	N	Q	I	R	H	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	R	L	L	V	D	V	Q	V	L	F	V	H	
MXP4/S _{90c}	C	E	R	P	N	N	D	I	K	I	R	H	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	R	I	V	R	K	Y	R	F	E	
MXP4/S _{90c1}	C	E	R	P	N	N	D	I	K	I	R	H	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	R	I	V	R	K	Y	R	F	E	
MXP4/S _{90c2}	C	E	R	P	N	N	D	I	K	I	R	H	I	H	I	G	P	G	R	A	V	A	T	I	V	D	I	S	H	I	C			
MXP4/S _{90c3}	C	E	R	P	N	N	D	I	K	I	R	H	I	H	I	G	P	G	R	V	L	S	R	Y	Q	M	I	V	Q	T	H	C		
MXP4/M	C	T	R	P	N	N	D	I	K	I	R	H	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	R	N	T	G	N	I	R	P	Y	

Panel C: Región posterior a V3.

	+1	+5	+10	+15	+20	+25	+30	+35										
PBH10	N	I	S	R	A	K	W	T	L	K	Q	I	D	S	N	K	R	S
MXC141/M	T	I	S	R	A	N	G	I	H	F	K	S						
MXC23/S ₉₀	K	T	X	Y	R	T	N											
MXC201/S	N	I	S	R	T	K	W	N	D	T	L	K	Q	I	V	I	K	
MXC201/M ₉₀	N	L	S	R	T	K	W	N	D	T	L	K	Q	I	V	I	K	
MXC201/S ₉₀	N	L	S	R	T	K	W	N	D	T	L	K	Q	I	V	I	K	
MXC201/S _{90c}	N	L	S	R	T	K	W	N	D	T	L	K	Q	I	V	I	K	
MXP42m/coc	D	V	E	H	I	K	A	V	Q	I	H	S	A	Y	Y	S	F	
MXP42p/coc	E	P	C	D	T	O	G	C	Q	I								
MXP5/M	C	W	D	L	T	Q	V	M	S	T	D	T	F	S	C	T		
MXP4/S _{90c}	D	I	K	A	X	G	L	A	H	Y	Y	R						
MXP4/S _{90c1}	N	I	S	K	N	G	I	A	L	Y	N	R	C	L	I			
MXP4/S _{90c2}	N	I	S	N	T	S	L	R										
MXP4/S _{90c3}	N	I	S	N	T	S	L	R										
MXP4/M	N	G	C	K	A	E	M	V	L	R	R	H	L	T				

Tabla 8. Determinantes antigénicos. Las áreas sombreadas indican los sitios antigénicos con índice de hidrofiliidad mayor que 1.0, los aminoácidos enmarcados señalan epítopos con índices de 0.97.

V

DISCUSIÓN:

Este es el primer trabajo en México que aborda el estudio a nivel molecular de los virus de inmunodeficiencia humana. Nuestro interés fue obtener la secuencia de nucleótidos, para inferir y caracterizar la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la gp120 de algunos virus aislados de pacientes mexicanos.

V3 tiene gran importancia funcional durante el ciclo infeccioso, además de que en ella se encuentra el dominio principal de neutralización de estos virus, por lo cual esta siendo objeto de numerosos estudios, ya que puede ser importante para el desarrollo de una vacuna preventiva contra la infección por HIV (121, 122, 136).

Nuestros resultados confirman que hay una gran variabilidad en la secuencia de V3 entre los diferentes aislados, tanto en el número como en el tipo de aminoácidos. El extremo carboxilo de esta región posterior a la parte central, presentó un nivel de variación mayor que el extremo amino. En otros aislados reportados y en las secuencias de la base de datos de Los Alamos también se encuentra mayor variación hacia el extremo carboxilo (134, 137).

Estas variaciones en V3 no afectan de manera aparente la capacidad infectiva de los virus producidos, ya que en el laboratorio se realiza la infección de cultivos celulares, de forma rutinaria, con algunos de estos aislados. Sin embargo, tales variaciones podrían incidir en las diferencias en el patrón de neutralización que se observa al intentar neutralizar los virus con distintos sueros (Amalia Barquet comunicación personal).

La región V3 es un dominio de alta variabilidad, sin embargo existen dos regiones muy conservadas en estos aislados: la zona adyacente a la primera cisteína con los aminoácidos CTRPNNNTRK y la parte central, en donde todos los aislados tienen la secuencia GPGRA. Esta reportado que la región central está muy conservada entre diferentes aislados. También, que las regiones adyacentes a las cisteínas son poco variables (123, 137). Sin embargo, en nuestras secuencias, la región posterior a la secuencia GPGRA, y la segunda cisteína resultó de una gran variación en aminoácidos.

Estudiando los niveles de homología en V3 para establecer relaciones de filogenia entre nuestras secuencias, podemos formar tres grupos. En el primero están las secuencias de los aislados MXC14-1, MXC23 y del prototipo HTLV-IIIb/LAV. En ellas observamos los aminoácidos Glutamina y Arginina (QR), antes de la parte central GPGRA. Estos dos residuos solo se han encontrado a nivel mundial, en esa posición, en el virus prototipo HTLV-IIIb/LAV y en las clonas derivadas de este, por ello pensamos que tal vez los aislados MXC14-1 y MXC23 pudieran haberse contaminado con el cultivo del virus prototipo, el cual utilizamos

de manera rutinaria en el laboratorio. En un segundo grupo se ubicaron los aislados MXC20-1, MXP42m y MXP42p, todos ellos transmitidos sexualmente en los individuos de quienes se aislaron. Al tercer grupo pertenecen; el aislado MXP4 (y sus clones biológicas) y MXP5, estos dos aislados se obtuvieron de pacientes infectados por vía sanguínea.

Comparando las secuencias del presente estudio con las de los subtipos consenso descritos a nivel mundial, el aislado MXC20-1 se agrupó junto con la secuencia consenso del subtipo B, resultado esperable para un virus aislado en México, ya que en este subtipo se encuentran la mayoría de los virus aislados en América. Sin embargo, las secuencias de V3 de los aislados MXP42m y MXP42p, aparentemente están relacionadas con los subtipos D y E característicos de virus aislados de África central y Tailandia. Esta aparente relación y la no agrupación del resto de los aislados con alguno de los subtipos reportados pueden deberse a que en el análisis intentamos establecer relaciones filogenéticas con longitudes de secuencias que no son las óptimas. Para obtener los diferentes subtipos mundiales, se utilizaron secuencias completas del gene *env* o de *gag* (134, 138).

Por otra parte, en todos nuestros aislados encontramos el tetrapéptido GPGR en la parte central de la secuencia de V3. Este péptido es muy común en las secuencias del genotipo B, en cambio en los otros genotipos no lo es tanto. Como se puede observar en la comparación de la tabla 9, mundialmente existen más secuencias con el tetrapéptido GPGQ (164/410) entre todos los genotipos, que secuencias con GPGR (145/410). Estos datos nos hacen pensar que todos los aislados mexicanos podrían pertenecer al subtipo B, pero para establecer con más confiabilidad esta relación, es necesario obtener secuencias de mayor longitud (134).

PEPTÍDO	SUB-A	SUB-B	SUB-C	SUB-D	SUB-E	SUB-F	SUB-U	TOTAL
GPGR	6	118	0	14	4	1	2	145
GPGQ	58	10	28	16	38	9	5	164
OTRO	7	58	0	34	0	0	2	101
TOTAL	71	186	28	64	42	10	9	410

Tabla 9. Distribución de los 2 principales tetrapéptidos de la parte central, entre los diferentes subtipos, en las 410 secuencias V3 de la base de datos de Los Alamos publicadas en el compendio de 1993.

En nuestro estudio también encontramos que los cultivos están formados por numerosas poblaciones de variantes virales genéticamente diferentes. Con el análisis de la presencia de bandas alternativas en los ensayos de secuenciación directa de los productos de PCR y la traducción de estas secuencias alternativas, podemos tener una estimación aproximada del nivel de heterogeneidad en los cultivos virales. Sin embargo el método no nos proporciona información sobre todas las poblaciones virales ni datos suficientes de los virus menos representados en un cultivo heterogéneo.

Al infectar de manera independiente las líneas celulares Molt y SupT1 con los virus del cocultivo del paciente P4, se obtuvieron 2 variantes diferentes en su secuencia V3, sin embargo, ambos tienen características biológicas similares en

cultivo ya que son virus clasificados como altos/rápidos y formadores de sincicios (María del Carmen Basualdo, comunicación personal).

Realizando dilución limitante del cultivo MXP4/S, para obtener clones biológicas, encontramos que el cultivo de la clona 2 (MXP4/S_{CL-2}) tiene en su secuencia algunos aminoácidos que se encontraban como alternativos en el cultivo establecido originalmente. Por estos resultados podemos decir que las secuencias V3 de los virus poco representados en un cultivo, pueden ser expresados en cultivos en condiciones diferentes. Por otra parte, en las secuencias de las clonas encontramos un gran número de aminoácidos que no se observaron en la secuencia alternativa del cultivo original, lo cual hace hizo evidente que en las secuencias alternativas determinadas en este estudio, no están representadas todas las variantes virales que coexisten en un cultivo.

En cuanto a la estabilidad de los virus que se encuentran ya en cultivo, las secuencias del aislado MXC20-1/S nos permitieron estudiar cambios a lo largo del tiempo. Encontramos que los virus ya adaptados a crecer en una línea celular determinada, permanecen muy estables genéticamente. Sin embargo, con una línea celular diferente introducimos una variante más, el tropismo por distintas células, por lo cual podemos obtener distintas variantes virales como primordiales, en diferentes líneas celulares, como en el caso de las variantes MXC20-1/S y MXC20-1/M del presente estudio.

En el presente trabajo se hizo un ensayo de predicción de los epitopos antigénicos en las secuencias V3 de HIV-1 aislados de pacientes mexicanos. Comparando estos epitopos, se puede proponer la clasificación en diversos grupos de los aislados. Por ejemplo; el prototipo HTLV-IIIb/LAV y los aislados MXC14-1 y MXC23, que tienen el epitopo QRGPGR, están relacionados antigenicamente. Además, estas tres secuencias comparten el epitopo de neutralización NNNTRK con los aislados MXC20-1 MXP42m y MXP42p, lo que podría indicar que pertenecen a un mismo subtipo de neutralización. Sin embargo, el aislado MXP4 y sus variantes tienen el epitopo ERPNNND, por lo cual esperaríamos un patrón de neutralización diferente que en el caso de los virus anteriores, y otro más en MXP5, en el cual no encontramos un epitopo predecible.

Los estudios de Laman y cols. (139) y Warren y cols. (140) proporcionan evidencia experimental de la antigenicidad de los epitopos descritos en nuestro trabajo, ya que reportan anticuerpos monoclonales y policlonales humanos reactivos, contra péptidos de la gp120 de algunas cepas de HIV, que involucran dominios dentro de la región V3. En el trabajo de Laman y cols. se mapearon los sitios de unión de estos anticuerpos, los cuales resultaron ser las secuencias INCTPRN, que también se encuentra en algunos de nuestros aislados y RIQRGPGR, compartida por MXC14-1, MXC23 y el pBH10. En el trabajo de Warren y cols. utilizaron péptidos de longitudes de 18 a 24 aminoácidos, pero no definen el sitio exacto de unión de los anticuerpos. Sin embargo, el péptido basado en la secuencia del virus prototipo IIIB/LAV utilizado por estos autores, incluye el dominio TRPNNN, el mismo que fue obtenido por predicción en varias de nuestras secuencias.

Encontramos que las relaciones filogenéticas se reflejan en los perfiles antigénicos teóricos, ya que los virus que formaron un grupo en el análisis filogenético, comparten los sitios antigénicos predecibles.

Un aspecto que no hemos abordado, pero de interés, es el de la búsqueda de sitios inductores de respuesta citotóxica en V3. Warren y Thomas (141) reportaron un epitopo inductor de respuesta citotóxica en murinos, el cual involucra los aminoácidos RQAHCNISRAKWNNT, de la parte carboxilo de la región V3 del virus III_B/LAV. En otro estudio, Sastry y cols. (142) reportaron que el péptido RIQRGPGRAFVTIGK también induce respuesta citotóxica. Sin embargo, al analizar las secuencias de los aislados mexicanos, ninguna de ellas comparte exactamente los mismos aminoácidos que conforman estos epitopos de respuesta celular. por lo cual no sabemos si estos aislados pueden inducir tal respuesta.

Resumiendo la discusión de los resultados, este es el primer trabajo de caracterización a nivel molecular muy fino, de una región del genoma viral de HIV-1 aislados en México, con lo cual intentamos una aproximación a ubicar estos virus en el contexto mundial. Sin embargo, estamos concientes de algunas limitantes para lograr una clasificación muy acertada, como son el hecho de que el número de aislados secuenciados es todavía relativamente pequeño, además de que por la metodología utilizada las secuencias obtenidas son muy cortas, lo cual no es lo óptimo para estudios de relaciones filogenéticas.

Consideramos necesario que de los trabajos futuros en esta area involucren secuencias de mayores longitudes y que se incluyan otras regiones del genoma del virus, tanto variables como constantes para ver si los diferentes aislados se agrupan de la misma manera. Además, sería interesante estudiar la reactividad de sueros de individuos infectados, contra péptidos sintéticos con las secuencias de los distintos epitopos antigénicos predecibles obtenidos en este trabajo, lo cual puede dar una idea de si son muy frecuentes los virus con estos epitopos en la población infectada.

VI

CONCLUSIONES.

1. Aunque V3 es un dominio variable, en el existen aminoácidos conservados y regiones altamente variables.
2. El análisis de las relaciones entre estas secuencias reveló tres grupos de virus:
 - a) El grupo formado por el virus prototipo IIIb/LAV y los aislados MXC14-1/M, MXC23/S.
 - b) El grupo formado por los tres virus aislados de individuos infectados por transmisión sexual; MXC20-1/S, MXP42pS y MXP42m/S.
 - c) El grupo formado por los dos virus aislados de pacientes hemofílicos; MXP4/S y MXP5/S.
3. La secuencia de aminoácidos de la región central (GPGR) en los aislados nos sugiere que todos pertenecen al genotipo B. Sin embargo, por lo corto de nuestras secuencias, esto no se observa en los dendogramas.
4. El análisis de secuencias alternativas y la obtención de clonas biológicas mostraron la alta heterogeneidad genómica de los virus presentes en un cultivo.
5. Los grupos que se forman por el análisis filogenético de las secuencias en general comparten los mismos epitopos antigénicos predecibles.
6. Estos perfiles antigénicos sugieren la existencia de 3 patrones de neutralización teóricos para estos virus, según la reactividad de sueros de pacientes contra los epitopos: a) QRGPR b) NNNTRK c) ERPND. Además de un virus (MXP5/M) sin epitopo de neutralización en V3

VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. -Teich, N. 1984. Taxonomy of retroviruses. In R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin (ed.), RNA tumor viruses, Vol. 2. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. p25-207.
2. -Cullen, B.R. 1991. human immunodeficiency virus is a prototypic complex retrovirus. *J. Virol.* 65:1053-1056.
3. -Gallo, R.C., S.Z. Sallahuddin, M. Popovic, *et al.*, 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 224:500-503.
4. -Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read, *et al.*, 1984. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS, and pre-AIDS. *Science.* 224:497-500.
5. -Jones, K.A., J.T. Kadonaga, P.A. Luciw, and R. Tjian. 1986. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor Sp1. *Science.* 232:755-759.
6. -Garcia, J.A., F.K. Wu, R. Mitsuyasu, and R.B. Gaynor. 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* 6:3761-3770.
7. -Wu, F., J. Garcia, R. Mitsuyasu, and R. Gaynor. 1988. Alterations in binding characteristics of the human immunodeficiency virus enhancer factor. *J. Virology.* 62:155-158.
8. -Fisher, A.G., M.B. Feinberg, S.F. Josephs, *et al.*, 1986. The *trans* activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature (London).* 320:367-371.
9. -Shaw, G.M., B.H. Hahn, S.K. Arya, *et al.*, 1984. Molecular characterization of human T-cell Leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science.* 226:1165-1171
10. -Franza, B.R., Jr, S.F. Josephs, M.Z. Gilman, *et al.*, 1987. Characterization of cellular proteins recognizing the HIV enhancer using a microscale DNA-affinity precipitation assay. *Nature (London).* 330:391-395.
11. -Jones, K.A. 1989. HIV *trans*-activation and transcription control mechanism. *New Biol.* 1:127-135.
12. -Bieleńska, A., S. Krasnow, and G.J. Nabel. 1989. NF- κ B-mediated activation of the human immunodeficiency virus enhancer: sites of transcriptional initiation is independent of the TATA box. *J. Virol.* 63:4097-4100.
13. -Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, *et al.*, 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature.* 313:277-284.
14. -Wain-Hobson, S., P. Sonigo, J.P. Vartanian, *et al.*, 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus LAV. *Cell.* 40:9-17.
15. -Muesing, M.A., D.H. Smith, C.D. Cabradilla, *et al.*, 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature (London).* 313:450-458.
16. -Sanchez-Pezcador, R., M.D. Power, P.J. Barr, *et al.*, 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science.* 227:484-492.

- 17.-Cullen, B.R. 1990. The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? *Cell*. 63:655-657.
- 18.-Jakobovits, A., D.H. Smlth, E.B. Jakobovits, and D.J. Capon. 1988. A discrete element 3' of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-1 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV *trans*-activator. *Mol. Cell. Biol.* 8:2555-2561.
- 19.-Feinberg, M.B., R.F. Jarrett, A. Aldovini, *et al.*, 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*. 46:807-817.
- 20.-Wright, C.M., B.K. Felber, H. Paskalis, and G.N. Pavliakis. 1986. Expression and characterization of the *trans*-activator of HTLV-III/LAV virus. *Science*. 234:988-992.
- 21.-Rosen, C.A., J.G. Sodroski, W.C. Goh, *et al.*, 1986. Post-transcriptional regulation accounts for the *trans*-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature (London)*. 319:555-559.
- 22.-Cullen B.R. 1986. *Trans*-activation of the human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell*. 46:973-982.
- 23.-Hauber, J., A. Perkins, E.P. Helmer, and B.R. Cullen. 1987. *Trans*-activation of the human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6364-6368.
- 24.-Braddock, M., A. Chambers, W. Wilson, *et al.*, 1989. HIV-1 tat "activates" presynthesized RNA in the nucleus. *Cell*. 58:269-279.
- 25.-Braddock, M., A.M. Thorburn, A. Chambers, *et al.*, 1990. A nuclear translational block imposed by the HIV-1 U3 region is relieved by the Tat-TAR interaction. *Cell*. 62:1123-1133.
- 26.-Emerman, M., R. Vazeux, and K. Paden. 1989. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell*. 57:1155-1165.
- 27.-Mallim, M.H., J. Hauber, S.Y. Le, *et al.*, 1989. The HIV-1 rev *trans*-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature (London)*. 338:254-257.
- 28.-Hammariskjöld, M.L., J. Helmer, B. Hammariskjöld, *et al.*, 1989. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *J. Virol.* 63:1959-1966.
- 29.-Felber, B.K., Hadzopoulos-Cladaras, C. Cladaras, *et al.*, 1989. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 86:1495-1499.
- 30.-Chang, D.D., and P.A. Sharp. 1989. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell*. 59:789-795.
- 31.-Garrett, E.D., L.S. Tilley, and B.R. Cullen. 1991. Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products. *J. Virol.* 65:1653-1657.
- 32.-Fisher, A., B. Ensoli, L. Ivanoff, *et al.*, 1987. The sor gene of HIV is essential for efficient virus transmission in vitro. *Science*. 237:888-893.
- 33.-Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, *et al.*, 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 328:728-730.
- 34.-Cohen, E.A., E.F. Terwilliger, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature*. 334:532-534.
- 35.-Strebel, K., T. Klimkait, and M.A. Martin. 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16 kilodalton product. *Science*. 241:1221-1223.
- 36.-Terwilliger, E., E. Cohen, Y. Lu, J. Sodroski, and W. Haseltine. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type-1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:5163-5167.
- 37.-Cohen, E.A., E.F. Terwilliger, Y. Proulx, *et al.*, 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. AIDS*. 3:11-18.
- 38.-Hahn, B.H., G.M. Shaw, S.K. Arya, *et al.*, 1984. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature*. 312:166-169.
- 39.-Shaw, G.M., B.H. Hahn, S.K. Arya, *et al.*, 1984. Molecular characterization of Human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science*. 226:1165-1171.

- 40.-Wong-Staal, F., and R.C. Gallo. 1985. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature*. 317:395-403.
- 41.-Benn, S., R. Rutledge, T. Folks, *et al.*, 1985. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*. 230:949-951.
- 42.-Myers, G., A.B. Rabson, S.F. Josephs, *et al.*, 1989. Human retroviruses and AIDS, a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. In *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos N.M.
- 43.-Hahn, B.H., G.M. Shaw, M.E. Redfield, *et al.*, 1986. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science*. 232:1548-1553.
- 44.-Roberts, J.D., K. Bebenek and T.A. Kunkel. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 242:1171-1173.
- 45.-Preston, B.D., B.J. Poiesz and L.A. Loeb. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 242:1168-1171.
- 46.-Vermund, S.H., A.R. Sheon, S.C. Ebner, and R.D. Fisher. 1991. Transmission of the human immunodeficiency virus. In *AIDS Research Reviews* vol. 1. Koff, W.C., F. Wong-Staal and R.C. Kennedy (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York N. York. p81-136.
- 47.-Van de Perre, P., J.P. Butzler, R.C. Gallo, *et al.*, 1985. Female prostitutes: a risk group for infection with human T-cell lymphotropic virus type III. *Lancet*. 2:524-527.
- 48.-Winkelstein, W. Jr., M. Samuel, N.S. Padian, *et al.*, 1987. The San Francisco Men's Healthy Study: III. Reduction in human immunodeficiency virus transmission among homosexual/bisexual men, 1982-86. *Am. J. Public Health*. 77:685-689.
- 49.-Padian, N., L. Marquis, D.P. Francis, *et al.*, 1987. Male-to-female transmission of human immunodeficiency virus. *JAMA*. 258:788-790.
- 50.-Berkley, S.F., R. Widy-Wirski, S.I. Okware, *et al.*, 1989. Risk factors associated with HIV infection in Uganda. *J. Infect. Dis*. 160:22-30.
- 51.-Laga, M., H. Taelman, P. Van der Stuyft, L. Bonneux, *et al.*, 1989. Advanced immunodeficiency as a risk factor for heterosexual transmission of HIV. *AIDS*. 3:361-366.
- 52.-Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) update-United States. 1983. *MMWR*. 32:309-3011.
- 53.-Simonsen, J.N., D.W. Cameron, M.N. Gakinya, *et al.*, 1988. Human immunodeficiency virus infection among men with sexually transmitted diseases. *N. Eng. J. Med*. 319:274-278.
- 54.-Evans, L.A., and J.A. Levy. 1989. Characteristics of HIV infection and pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 989:237-254.
- 55.-Peterman, T.A., R.L. Stoneburner, J.J.R. Allen, *et al.*, 1988. Risk of human immunodeficiency virus transmission from heterosexual adults with transfusion-associated infections. *JAMA*. 259:55-58.
- 56.-Bouvet, E., I. De Vincenzi, R. Achelle, and F. Vachon. 1989. Defloration as risk factor for heterosexual HIV transmission [letter]. *Lancet*. 1:515.
- 57.-Vermund, S.H., K. Hein, H.D. Gayle, *et al.*, 1989. Acquired immunodeficiency syndrome among adolescents: case surveillance profiles in New York City and the rest of the United States. *Am. J. Dis. Child*. 143:1220-1225.
- 58.-Stamm, W.E., H.H. Handsfield, A.M. Rompalo, *et al.*, 1988. The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection among homosexual men. *JAMA*. 260:1429-1433.
- 59.-Tschachler, E., V. Groh, M. Popovic, *et al.*, 1987. Epidermal Langerhans cells-a target for HTLV-III/LAV infection. *J. Invest. Dermatol*. 88:233-237.
- 60.-Ammann, A.J., M.J. Cowan, D.W. Wara, *et al.*, 1983. Acquired immunodeficiency in infants: possible transmission by means of blood products. *Lancet*. 1:956-958.
- 61.-Sprecher, S., G. Soumenkoff, F. Puissant, and M. Deguilre. 1986. Vertical transmission of HIV in 15-week fetus. *Lancet*. 11:288-289.
- 62.-Rubinstein, A., and L. Bernstein. 1986. The epidemiology of pediatric acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Immunol. Immunopathol*. 40:115-121.
- 63.-Chiodo, F., E. Ricchi, P. Costigliola, *et al.*, 1984. Vertical transmission of HTLV-III [letter]. *Lancet*. 1:739.

- 64.-Mother-to-Child transmission of HIV infection. The European Collaborative Study. 1988. *Lancet*. 2:1039-1043.
- 65.-Fallon, J., J. Eddy, L. Wiener, and P.A. Pizzo. 1989. Human immunodeficiency virus infection in children. *J. Pediatr.* 114:1-30.
- 66.-Courgnaud, V., F. Laure, A. Brossard, *et al.*, 1991. Frequent and early *in utero* HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 7:337-341.
- 67.-Lewis, S.H., C. Reynolds-Kohler, H.E. Fox and J.A. Nelson. 1990. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight weeks fetuses. *Lancet*. 335:565-568.
- 68.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1987. Boletín mensual de SIDA/ETS (México). 1(9)
- 69.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1988. Boletín mensual de SIDA/ETS (México). 2(10):454-494.
- 70.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1989. Boletín mensual de SIDA/ETS (México). 3(8):720-741.
- 71.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1990. Boletín mensual de SIDA/ETS (México). 4(1): 1040-1057.
- 72.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1991. Boletín mensual de SIDA/ETS (México). 5(12):2064-2081
- 73.-Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1992. Boletín mensual de SIDA/ETS (México). 6(11):2296-2313.
- 74.-Epidemiología del SIDA/VIH 1983-1994. Análisis de la distribución geográfica. Secretaría de Coordinación y Desarrollo Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos INDRE. 1994
- 75.-Daigleish, A.G., P.C. Beverly, P.R. Claphman, *et al.*, 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature (London)*. 312:763-767.
- 76.-Klatzmann, D., E. Chanpagne, S. Chambert, *et al.*, 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for the human retrovirus LAV. *Nature (London)*. 312:767-771.
- 77.-Maddon, P.J., A.G. Daigleish, J.S. McDougal, *et al.*, 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and in the brain. *Cell*. 47:333-348.
- 78.-Sattentau, Q.J., and R.A. Weiss. 1988. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV-1 receptor. *Cell*. 52:631-633.
- 79.-Berger, E.A., J.R. Sisler, and P.L. Earl. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein molecules containing membrane fusion-impairing mutations in the V3 region efficiently undergo soluble CD4-stimulated gp120 release. *J. Virol.* 66:6208-6212.
- 80.-Gabuzda, D.H., A. Lever, E. Terwilliger, *et al.*, 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virology*. 66:3306-3315.
- 81.-Shioda, T., J.A. Levy, and C. Cheng-Mayer. 1991. Macrophage and T-cell tropism of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature (London)*. 349:167-169.
- 82.-Bushman, F.D., T. Fujiiwara, and R. Craigie. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein *in vitro*. *Science*. 249:1555-1558.
- 83.-Bushman, F.D., and R. Craigie. 1991. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein *in vitro*: specific cleavage and integration of HIV-1 DNA. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 88:1339-1343.
- 84.-Engelman, A., K. Mizuuchi, and R. Craigie. 1991. HIV-1 DNA integration: Mechanism of viral DNA cleavage and strand transfer. *Cell*. 67:1211-1221.
- 85.-Ho, D.D., T. Moudgil, and M. Alam. 1989. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Eng. J. Med.* 321:1621-1625.
- 86.-McCune, M.J. 1991. HIV-1: the infective process *in vivo*. *Cell* 64:531-563.
- 87.-Kim, S., R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore. 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virology*. 63:3708-3713.
- 88.-Cullen, B.R., and W.C. Greene. 1989. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell*. 58:423-426.

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA 49

- 89.-Cullen, B.R., and W.C. Green. 1990. Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. 178:1-5.
- 90.-Berkhout, B.R., H. Silver, and K.T. Jeang. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*. 59:273-282.
- 91.-Laspla, M.F., A.P. Rice, and Mathews. 1989. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*. 59:283-292.
- 92.-Hadzopoulou-Cladaras, M., B.K. Felber, C. Cladaras, et al., 1989. The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via cis-acting sequence in the env region. *J. Virol.* 63:1265-1274.
- 93.-Garret, E.D., L.S. Tile, and B.R. Cullen. 1991. Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products. *J. Virol.* 65:4288-4294.
- 94.-Pomerantz, R. J., D. Trono, M.B. Feinberg, et al., 1990. Cells non productively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell*. 61:1271-1276.
- 95.-Allen, J.S., J.E. Coligan, T.H. Lee, et al., 1985. A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science*. 230:810-813.
- 96.-Haseltine, W., and F. Wong-Staal. 1989. The molecular biology of the AIDS virus. In *The Science of AIDS*. Readings from Scientific American. W. H. Freeman and Company. p13-25.
- 97.-Masur, H., M.A. Micheis and J.B. Green. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N. Eng. J. Med.* 305:1431-1438.
- 98.-Gottlieb, M.S., R. Schroff, H. Schanker, et al., 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *N. Eng. J. Med.* 305:1425-1430.
- 99.-Harper, M.E., L.Mi Marselle, R.C. Gallo, et al., 1986. Detection and lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:772-776.
- 100.-Clayton, L.K., M. Sieh, D.A. Pious, et al., 1989. Identification of human CD4 residues affecting class II MHC Vs HIV-1 gp120 binding. *Nature*. 339:548-551.
- 101.-Golding, H., G.M. Shearer, K. Hillman, et al., 1989. Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV)-1 gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV-1-infected individuals. *J. Clin. Invest.* 83:1430-1435.
- 102.-Mann, D.L., F. Lasane, M. Popovic, et al., 1987. HTLV-III large envelope protein (gp120) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.* 138:2640-2644.
- 103.-Gurley, R.J., K. Ikeuchi, R.A. Byrn, et al., 1989. CD4+ lymphocyte function with early human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1993-1997.
- 104.-Viscidi, R.P., K. Mayur. M. Lederman, and D. Frankel. 1989. Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by tat protein from HIV. *Science*. 246:1606-1608.
- 105.-Hoxie, J.A., J.D. Alpers, J.L. Rackowski, et al., 1986. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science*. 234:1123-1127.
- 106.-Stevenson, M., X.H. Zhang, and D.J. Volsky. 1987. Down-regulation of cell surface molecules during noncytopathic infection of T cells with human immunodeficiency virus. *J. Virology*. 61:3741-3748.
- 107.-Kerkau, T., R. Schmitt-Landgraf, A. Schimpli, and E. Wecker. 1989. Down-regulation of HLA class I antigens in HIV-1-infected cells. *AIDS Res. Human Retroviruses.* 5:613-620.
- 108.-Macatonia, S.E., S. Peterson, and S.C. Knight. 1989. *Immunology*. 67:285
- 109.-Ho, D.D., M.G. Sarngadharan, M.S. Hirsch, et al., 1987. Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins. *J. Virol.* 61:2024-2028.
- 110.-Chanh, T.C., G.R. Dressman, P. Kanda, et al., 1986. Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO J.* 5:3065-3071.
- 111.-Dalglish, A.G., T.C. Chanh, R.C. Kennedy, et al., 1988. Neutralization of diverse HIV-1 strains by monoclonal antibodies raised against a gp41 synthetic peptide. *Virology*. 165:209--215.

- 112.-Kennedy, R.C., R.D. Henkel, D. Pauletti, *et al.*, 1986. Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope glycoprotein. *Science*. 231:1556-1559.
- 113.-Lasky, L.A., G. Nakamura, D.H. Smith, *et al.*, 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*. 50:975-985.
- 114.-Haseltine, W.A., J. Sodroski, and E. Terwilliger. 1989. Replication and pathogenesis of HIV-1 retrovirus relevant to drug design. Retroviruses and disease. Hanafusa, H. Pinter, A. and Pullman, M.E. (ed.) Sn. Diego, Cal. USA. pp 159-181.
- 115.-Layne, S.P., J.L. Spouge, and M. Dembo. 1989. Quantifying the infectivity of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:4644-4648.
- 116.-Arthos, J., K.C. Deen, M.A. Chaiken, *et al.*, 1989. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell*. 57:469-481.
- 117.-Trauneker, A., W. Luke and K. Karjalainen. 1988. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature (London)*. 331:84-86.
- 118.-Mudrow, S.B., H. Hahn, G.M. Shaw, *et al.*, 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol*. 61:570-578.
- 119.-Rusche, J.R., K. Javaherian, C. McDanal, *et al.*, 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24 aminoacid sequence of the viral envelope gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:3198-3202.
- 120.-Palker, T.J., M.E. Clark, A.J. Langlois, *et al.*, 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:1932-1936.
- 121.-Goudsmit, J., C. Debouck, R.H. Melten, *et al.*, 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicit early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:4478-4482.
- 122.-Javaherian, K., A.J. Langlois, G.J. LaRosa, *et al.*, 1990. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science*. 250:1590-1593.
- 123.-Putney, S.D., G.J. LaRosa, A.T. Prify, *et al.*, 1991. HIV-1 neutralization determinants. AIDS research reviews. Koff, W.C., F. Wong-Staal, R.C. Kennedy (Ed.), New York USA. pp385-402.
- 124.-Takahashi, H., T. Takeshita, B. Morein, *et al.*, 1990. Induction of CD8⁺ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope proteins in ISCOMs. *Nature (London)*. 344:873-875.
- 125.-Takahashi, H., Y. Nakagawa, C.D. Pendleton, *et al.*, 1992. Induction of broadly cross-reactive cytotoxic T cells recognizing an HIV-1 envelope determinant. *Science*. 255:333-336.
- 126.-Cann, A.J., M.J. Churcher, M. Boyd, *et al.*, 1992. The region of the envelope of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J. Virol*. 66:305-309.
- 127.-Ivanoff, L.A., J.W. Dubay, J.F. Morris, *et al.*, 1992. V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology*. 187:423-432.
- 128.-Page, K.A., S.M. Stearns and R.R. Littman. 1992. Analysis of mutations in the V3 domain of gp160 that affects fusion and infectivity. *J. Virol*. 66:524-533.
- 129.-De Jong, J.J., J. Goudsmit, W. Keulen, *et al.*, 1992. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in Syncytium formation and replication capacity. *J. Virol*. 66:757-765.
- 130.-De Jong, J.J., A. de Ronde, W. Keulen, *et al.*, 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single aminoacid substitution. *J. Virology*. 66:6777-6780.
- 131.-LaRosa, G.J., J.P. K. Davide, K. Weinhold, *et al.*, 1990. Conserved sequences and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science*. 249:932-935.
- 132.-Tersmette, M., R.A. Gruters, F. de Wolf, *et al.*, 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J. Virol*. 63:2118-2125.
- 133.-Goudsmit, J., J. Geelen, W. Keulen, *et al.*, 1990. Characterization of the African HIV-1 isolate CBL-4 (RUT) by partial sequence analysis and virus neutralization with peptide antibody and antisense phosphate-methylated DNA. *AIDS*. a:559-564.

- 134.-Myers, G., B. Korber, R. Smith and G. Pavlakis. (Ed.), 1993. Human retroviruses and AIDS. Los Alamos; Los Alamos National Laboratory.
- 135.-Hops, T.P., and K.R. Woods. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:3824-3828.
- 136.-Gorny, M., J.-Y. Xu, V. Gianakakos, *et al.*, 1991. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:3238-3242.
- 137.-Fouchier, R.A., M. Groenink, N.A. Kootstra, *et al.*, 1992. Phenotype-Associated Sequence Variation in the Third Variable Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 molecule. Journal of Virology. 66(5):3183-3187.
- 138.-Lowagie, J., F.E. McCutchan, M. Peters, *et al.*, 1993. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. AIDS. 7:769-780.
- 139.-Laman, J.D., M.C. Schellekens, Y.H. Abacioglu, *et al.*, 1992. Variant-specific monoclonal and group-specific polyclonal human immunodeficiency virus neutralizing antibodies raised with synthetic peptides from the gp120 third variable domain. J. Virology. 66(3):1823-1831.
- 140.-Warren, R.Q., S.A. Anderson, W.M.M. Nkya, *et al.*, 1992. Examination of sera from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals for antibodies reactive with peptides corresponding to the principal neutralizing determinant of HIV-1 gp120 and for *in vitro* neutralizing activity. J. Virology. 6(9):5210-5215.
- 141.-Warren, A.P., and D.B. Thomas. 1992. Class II (I-A^d) restricted T-Cell recognition of the V3 loop region of HIV-1 gp120. AIDS Research and Human Retroviruses. 5(5):559-564.
- 142.-Sastry, K.J., P.N. Nehete, S. Venkatmarayanan, *et al.*, 1992. Rapid *in vivo* induction of HIV-Specific CD8+ lymphocytes by a 15-amino acid unmodified free peptide from the immunodominant V3-loop of gp120. Virology. 118:502-509.
- 143.-Zeda, F. Rosenberg, and Anthony S. Fauci. 1991. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. In AIDS research reviews. Koff, W.C., F. Wong-Staal, R.C. Kennedy (Ed.), New York USA. Vol 1. pp 65-85.
- 144.-Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl. Acad. Sci. USA 74:729.