



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN



Variabilidad Genómica de Cepas de HIV-1 Determinada
por Southern Blot

T E S I S
Que para obtener el Grado Académico de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a
Joel Armando Vázquez Pérez

Asesor: M. en C. Carmen Soles Claudín

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1995

FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 29 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo
Variación genómica de cepas de HIV determinada por Southern Blot.

que presenta el pasante: Joel Armando Vázquez Pérez
con número de cuenta: 8509939-6 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Marzo de 1995

PRESIDENTE	<u>M.en C. Carmen Soler Claudín</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
SECRETARIO	<u>O.F.B. Judith Martínez Zamitiz</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dr. Marco A. Vega López</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M.en C. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	

A mi madre:

**Por tu extraordinaria fuerza y tu
lucha constante por darnos un
porvenir.**

Gracias por tu apoyo.

A mi padre:

**Por tu apoyo, cariño, y paciencia.
Quiero que sepas que el esfuerzo
que hiciste al hacerme leer ese libro
de Julio Veme cuando era niño,
tuvo su recompensa.**

A mis hermanas y primos:

**Susana, Elizabeth, Luis, Angeles y Yolanda.
Por su cariño y confianza en mí.**

A Olga:

**Por ser mi motivación y mi fuerza,
por ser mi compañera de éxitos y
desventuras, por tu amor y
comprensión.**

Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga Ana Laura:

Por tu ayuda incondicional.

A mis compañeros de la Facultad:

**Martha, Norma Colunga, Norma Sánchez, Esther,
Leonardo, Fernando y Julio.
Siempre recordaré su amistad.**

A los compañeros del laboratorio de Retrovirus Humanos:

**Amine, Ma. Carmen, Fernanda, Laura,
Roberto, José, Gerardo y Raúl.
Gracias por la ayuda directa o indirecta en
este trabajo y por darme un lugar en el
laboratorio.**

A la U.N.A.M.:

Por permitirme formarme como profesionista.

**A todos mis maestros, en particular a la maestra
Ma. de Jesús Mendoza:**

**Por brindarme sus conocimientos y sus
experiencias.**

**Al departamento de Biología Molecular
del INDRE
Por la valiosa cooperación, al
proporcionarnos algunos de los reactivos.**

Especialmente.

A Carmen Soler.

**Por brindarme su apoyo, tiempo y dedicación
para la realización de este trabajo. Mil gracias por
darme ánimos en los tiempos difíciles.**

Dedicada al pueblo chiapaneco y a su lucha.

*El hombre verdadero no mira de
qué lado se vive mejor, sino de que
lado esta el deber.*

José Martí.

RESUMEN

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

La variación genómica del HIV se describió por primera vez utilizando la técnica de Southern blot y posteriormente mediante la técnica de PCR. Empleando estas técnicas se ha descrito que cada aislado es único y distinguible de los demás, presentándose esta variación entre aislados secuenciales de un mismo individuo, entre donador-receptor en casos de transfusión y entre aislados de transmisión madre-hijo.

De acuerdo con lo anterior en este trabajo se planteó estudiar la variación presente en cepas aisladas en nuestro país. Para ello se empezó por estandarizar la técnica de Southern blot y además se amplificaron diversas regiones del genoma del HIV por medio de PCR de cuatro aislados mexicanos, tomando como referencia virus prototipo HTLVIIIb. La técnica de Southern blot no resultó reproducible y no logró nuestro objetivo a través de esta metodología. Amplificando con diversos iniciadores diferentes regiones del genoma del HIV (gag, pol, y env) y cortando con enzimas de restricción se encontró que existía entre un 20-50% de heterogeneidad en los sitios de hibridación de los iniciadores empleados y entre un 0-50% de heterogeneidad en los sitios de corte con las enzimas de restricción, con respecto al virus prototipo HTLV IIIb. Esta heterogeneidad se presenta con respecto al virus prototipo y entre cada uno de los aislados, así como en dos aislados secuenciales. Se encontró variabilidad en los sitios estudiados de los tres genes estructurales del HIV-1 (gag, pol y env).

LISTA DE ABREVIATURAS

BPF	Agarosa de bajo punto de fusión.
DNA	Acido desoxi-ribonucleico.
dATP	2'-deoxiadenina 5'-trifosfato.
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifosfato.
dGTP	2'-deoxiguanidina 5' trifosfato.
dTTP	2'-deoxitimidina 5'-trifosfato.
dUTP	2'-deoxiuridina 5'-trifosfato.
EDTA	Acido etilen-diaminotetraacético.
Enzimas	
Ava II	<i>Anabaena variabilis</i>
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
Bgl II	<i>Bacillus globigii</i>
Eco RI	<i>Escherichia coli</i> RY13
Hind III	<i>Haemophilus influenza</i> d
Hae III	<i>Haemophilus aegyptus</i>
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>
Pvu II	<i>Proteus vulgaris</i>
Sau 3A	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sst I	<i>Streptomyces stanford</i>
Xba I	<i>Xanthomonas badrii</i>
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HTLV-I	Virus linfotrópico de células T humanas I.
HTLV-II	Virus linfotrópico de células T humanas II.
IFA	Inmunofluorescencia.
LAV	Virus asociado a linfadenopatía.
NaACO	Acetato de sodio.
pBH10	plásmido constituido por el vector pSP64 y el genoma del HIV.
PEG	Polietilenglicol.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PBS	Amortiguador de Fosfatos salino
RIPA	Radioinmunoprecipitación.
RNA	Acido ribonucleico.
SDS	Duodecil sulfato de sodio.
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
U.V.	Luz ultravioleta.
WB	Western blot.

INDICE

I.- INTRODUCCION.	
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 HISTORIA NATURAL	5
1.3 AGENTE ETIOLOGICO	6
1.4 DIAGNOSTICO	11
1.4.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO	12
1.4.2 DETECCION DEL AGENTE VIRAL O SUS COMPONENTES	14
2.- OBJETIVOS.	23
3.- MATERIALES Y METODOS.	
3.1 PREPARACION DE LA SONDA PARA HIV-1	24
3.2 EXTRACCION DE DNA PROBLEMAS	29
3.3 DETECCION DE DNA VIRAL POR SOUTHERN BLOT	30
3.4 AMPLIFICACION DEL GENOMA DE HIV-1 POR MEDIO DE PCR	32
4.- RESULTADOS	
4.1 MUESTRAS DE DNA PROBLEMAS	35
4.2 CONSTRUCCION DE LA SONDA	35
4.3 DETERMINACION DE VARIABILIDAD GENOMICA POR SOUTHERN BLOT	36
4.4 DETERMINACION DE VARIABILIDAD GENOMICA POR PCR	39
5.- ANALISIS DE RESULTADOS	49
6.- CONCLUSIONES	55
7.- APENDICE	56
8.- BIBLIOGRAFIA	58

1.- INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

HISTORIA

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad infecciosa causada por un retrovirus, este agente ha provocado una de las más grandes epidemias de nuestro tiempo. Los pormenores de esta epidemia se han clarificado paulatinamente, el virus de inmunodeficiencia humana HIV se ha aislado y mostrado como causa de la enfermedad, se han realizado pruebas sanguíneas para su diagnóstico y se ha establecido su célula blanco en el organismo. ¿Cómo se ha podido conocer todo esto?

Los retrovirus y su daño potencial no son nuevos para la ciencia. A principios de este siglo varios investigadores identificaron agentes transmisibles causantes de leucemia en animales, el ciclo de vida de estos retrovirus era desconocido hasta que Howard M. Temin, de la Universidad de Wisconsin y David Baltimore de Massachusetts, descubrieron la transcriptasa reversa, los demás detalles de su replicación se fueron aclarando posteriormente. Mientras tanto hasta mediados de los 70's no se sabía de la existencia de ningún retrovirus que fuera infeccioso para el hombre, pero los estudios de Robert C. Gallo demostraron lo contrario y en 1980 aislaron el primer retrovirus humano; el virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-I). Dos años después el mismo grupo de Gallo descubrió una cepa muy relacionada con HTLV-I y la llamo HTLV-II. Ambos agentes son de latencia larga y ambos infectan linfocitos T causando leucemia, sus formas de transmisión son por medio de transfusiones de sangre, relaciones sexuales y de madre a hijo.

El primer caso de SIDA fue diagnosticado en 1981 en un joven homosexual. Este síndrome era desconocido, pero se observó que el paciente sufría de una depleción de un subtipo de células T (T4) y como consecuencia de esto era presa fácil de agentes oportunistas. El propio Gallo propuso que el agente podría ser un retrovirus, debido a la semejanza de transmisión con el HTLV-I. Un grupo de investigadores franceses a cargo de Luc Montagnier tuvieron contacto con un grupo de Gallo y llevaron a Francia la hipótesis del HTLV-I. Este grupo detectó transcriptasa reversa en muestras de ganglios linfáticos y llamaron a este retrovirus virus asociado a linfadenopatía (LAV), produjeron una prueba para detección de anticuerpos en sangre, encontrando estos en la gran mayoría de pacientes con linfadenopatía, pero en una minoría de casos de SIDA.

Por otro lado el grupo de Gallo se concentró en el crecimiento en masa del patógeno a partir de sangre de pacientes con SIDA en cultivo celular. A finales de 1983 se habían identificado diversas líneas celulares linfocíticas y monocíticas donde era factible la reproducción del nuevo agente y los primeros reactivos específicos contra este virus fueron hechos rápidamente.

Empleando estos reactivos se pudo demostrar que 48 aislados obtenidos de pacientes con SIDA y grupos de alto riesgo en todos era el mismo tipo de vi-

rus, el cual fue llamado HTLV-III. La causa del SIDA se había establecido. Estos resultados confirmaron que el LAV y el HTLV-III eran el mismo virus, y por medio de una comisión internacional se le cambio el nombre llamándolo Virus de la Inmunodeficiencia Humana HIV (1-5).

CLASIFICACION DE LA INFECCION POR HIV

Las personas infectadas con el HIV pueden presentar una variedad de manifestaciones que van desde infección asintomática hasta severa inmunodeficiencia y enfermedades infecciosas secundarias o cáncer. El rápido incremento de este padecimiento ha dado por resultado la necesidad de un sistema de clasificación de los pacientes dentro de este espectro de hallazgos atribuibles a la infección con HIV. En un intento de formular el más apropiado sistema de clasificación, el CDC (Center for Disease Control) presentó el siguiente panel para la definición de las manifestaciones de la infección por HIV (6).

El sistema clasifica las manifestaciones en cuatro grupos designados por números romanos I-IV.

Grupo I incluye pacientes con signos y síntomas pasajeros que aparecen en un periodo corto de tiempo, la infección inicial con HIV es identificada por pruebas de laboratorio. Todos los pacientes pueden ser reclasificados en otro grupo siguiendo la resolución de su periodo agudo.

Grupo II incluye pacientes que no tienen síntomas o signos de infección por HIV. Pacientes en esta categoría pueden ser subclasificados si los resultados hematológicos y/o inmunológicos son anormales en una manera consistente con los efectos de la infección con HIV.

Grupo III incluye pacientes con linfadenopatía generalizada persistente, pero sin hallazgos que lo puedan clasificar en el Grupo IV. Los pacientes en esta categoría pueden ser subclasificados basados en los resultados de laboratorio de la misma manera que los pacientes del Grupo II.

Grupo IV incluye pacientes con signos y síntomas clínicos de infección por HIV en adición a la linfadenopatía. Los pacientes en este grupo son asignados a uno o más subgrupos basados en hallazgos clínicos. Estos subgrupos son:

Subgrupo A. Enfermedad constitucional; definido como presentación de fiebre y diarrea persistente por más de un mes, y pérdida involuntaria de peso.

Subgrupo B. Enfermedad neurológica; definida por demencia, mielopatía o neuropatía periférica.

Subgrupo C. Enfermedades infecciosas secundarias.

C1 incluye pacientes con enfermedad sintomática o invasiva debida a una de 12 enfermedades infecciosas secundarias listadas en la definición de SIDA: neumonía por *Pneumocistis carinii*, criptosporiasis crónica, toxoplasmosis, estrongiloidiasis extra-intestinal, isosporidiasis, candidiasis (esofágica, bronquial, o pulmonar), criptococosis, histoplasmosis, infección con micobacterias, infección con Citomegalovirus, infección con virus de Herpes simple diseminado o crónico mucocutáneo y leucoencefalopatía multifocal progresiva.

C2 incluye pacientes con enfermedad sintomática o invasiva debida a otras enfermedades infecciosas secundarias específicas: leucoplasia oral, herpes zoster, salmonelosis recurrente, nocardiasis, tuberculosis o candidiasis oral.

Subgrupo D. Cáncer Secundario. Definido como el diagnóstico de uno o más tipos de cáncer asociados a la infección por HIV: Sarcoma de Kaposi, linfoma no Hodgkin o linfoma primario de cerebro.

Subgrupo E. Definido como la presencia de otros hallazgos clínicos o enfermedades, que pueden ser atribuibles a la infección por HIV o puede ser indicativo de un defecto en la inmunidad mediada por células (6).

La clasificación de la infección por HIV se resume en la siguiente tabla.

**TABLA 1
CLASIFICACION DE LA INFECCION POR HIV**

Grupo I	Infección aguda
Grupo II	Infección asintomática
Grupo III	linfadenopatía generalizada persistente
Grupo IV	Otras enfermedades
Subgrupo A	Enfermedad constitucional
Subgrupo B	Enfermedad neurológica
Subgrupo C	Enfermedades infecciosas secundarias
Categoría C-1	Enfermedades secundarias específicas
Categoría C-2	Otras enfermedades secundarias específicas
Subgrupo D	Cáncer secundarios
Subgrupo E	Otras condiciones

RUTAS DE TRANSMISION

Las principales vías de transmisión del HIV son la sexual, por transfusión de sangre o uso de productos derivados de esta, así como la transmisión perinatal. Similarmente, como ocurre en otras infecciones transmitidas sexualmente, la probabilidad de infección esta dada por el número de parejas sexuales y por las diferentes prácticas relacionadas con esta actividad. Por otro lado se ha visto que tanto la sangre completa como los componentes celulares de la sangre, plasma y factores de la coagulación transmiten la infección de HIV. Este riesgo de transmisión se ha reducido gracias a las pruebas de detección de anticuerpos en donadores de sangre y al tratamiento de los derivados sanguíneos. Otra forma de transmisión es en usuarios de drogas intravenosas, en las cuales se utilizan agujas no esterilizadas, donde la contaminación con sangre infectada es un factor de riesgo.

La fuente de HIV para un recién nacido es la madre infectada. Esta transmisión se ha mostrado que ocurre a través de la placenta pero también puede ocurrir en el parto, por exposición en el tracto genital, o postnatalmente mediante la alimentación por leche materna. El rango de transmisión perinatal no es claro pero se ha estimado del 30 al 50% de niños infectados si la madre es portadora de HIV (7).

MECANISMOS DE DISEMINACION Y CELULAS BLANCO.

Muy poco se conoce de las etapas tempranas de la infección por HIV en humanos. La célula blanco inicial en circulación sanguínea es el linfocito CD4, mientras que en recto y tracto genital no ha sido identificada, aunque probablemente estén involucradas células de la familia de los monocitos-macrófagos (células de Langerhans) y linfocitos. La diseminación a órganos blanco ocurre probablemente a través de la sangre en asociación con monocitos y linfocitos (7).

Los principales sistemas blanco del HIV son el linforreticular, hematopoyético y nervioso. Las hipótesis de como el HIV daña al sistema linforreticular y hematopoyético son: a) acumulación de DNA proviral no integrado, b) incremento de la permeabilidad celular asociada con la gemación viral, c) diferenciación terminal de células infectadas resultando en acortamiento del tiempo de vida, d) inducción de fusión de células y e) producción de autoinmunidad.

En el sistema nervioso, una vez que ha entrado el HIV, éste infecta a macrófagos que liberan enzimas proteolíticas que son tóxicas para las células neurales o inducen un mayor flujo de células inflamatorias. Otras posibilidades incluyen: a) destrucción viral directa de células gliales o neuronas o b) destrucción indirecta por anticuerpos reactivos contra las glicoproteínas de envoltura en células infectadas (7).

1.2 HISTORIA NATURAL

INFECCION

La infección por el HIV da lugar a un espectro continuo de enfermedad, que va desde infección asintomática hasta SIDA. Como otras infecciones retrovirales, el HIV establece un estado crónico que parece persistir por toda la vida del individuo infectado.

Al primer contacto efectivo con el virus se presenta la infección primaria, la que comúnmente se manifiesta como un cuadro viral agudo, caracterizado por fiebre, mialgias, erupciones, síntomas gastrointestinales y a veces con complicaciones neurológicas. El periodo entre los primeros síntomas y la seroconversión es de 8 días a 3 meses. En esta etapa previa al desarrollo de la respuesta inmunológica, el virus puede encontrarse en células sanguíneas mononucleares, en líquido cefalorraquídeo y en plasma.

Los fenómenos que ocurren en este periodo son poco conocidos, pero hay un modelo general de la historia natural del HIV basado en datos cuantitativos de viremia plasmática, virus asociados a células, antigenemia, anticuerpos anti-HIV y niveles de linfocitos CD4+ circulantes (8), dichos datos se esquematizan en la figura 1.

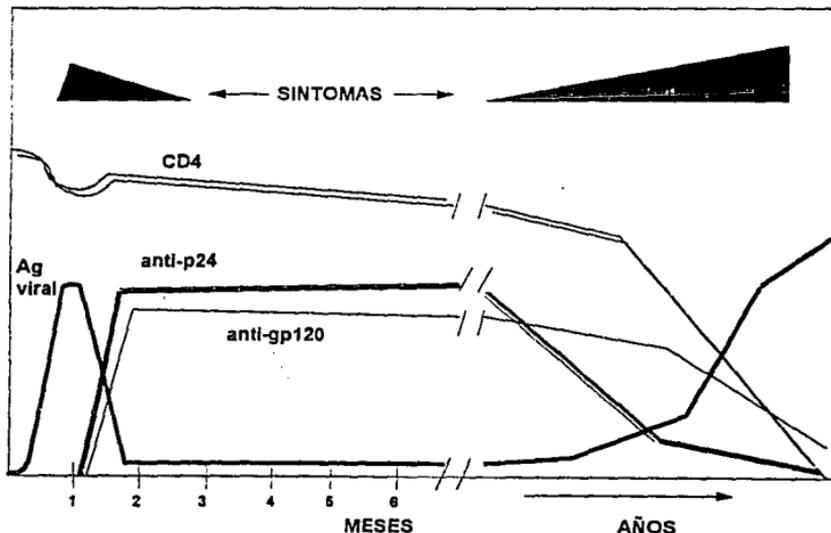


FIGURA 1: HISTORIA NATURAL DEL SINDROME DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.

1.3 AGENTE ETIOLOGICO

BIOLOGIA DEL HIV

Actualmente se conocen dos tipos principales de retrovirus humanos: los virus HTLV-I y II de la subfamilia de los oncovirus y los virus HIV I y II de la subfamilia de los lentivirus. Los HIV contienen dos cadenas de RNA de cadena sencilla, de tipo positivo. Los viriones, que miden aproximadamente 100 nm de diámetro, presentan proteínas de la cápside que envuelven las moléculas de RNA genómico, también se encuentran enzimas como la transcriptasa reversa, la integrasa y la proteasa y circundando la nucleocápside se encuentra la membrana lipídica (figura 2).

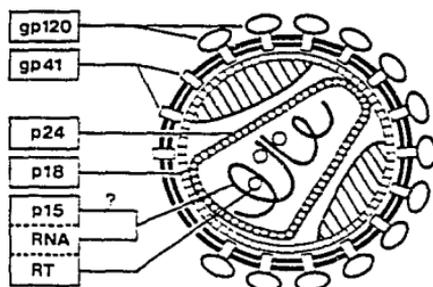


FIGURA 2: ESTRUCTURA DEL HIV.

El HIV está constituido por proteínas de la cápside (p24 y p17) que envuelven a las moléculas de RNA y a enzimas virales (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa) circundando esta nucleocápside se encuentra la membrana lipídica que presenta la glicoproteína transmembranal (gp 41) y la glicoproteína exterior (gp 120).

Como todos los retrovirus el genoma del HIV contiene tres genes estructurales que son esenciales para su replicación *gag*, *pol* y *env*, y en ambos extremos del genoma se encuentran las regiones terminales LTR que tienen funciones reguladoras. El gen *gag* codifica un precursor poliproteico (p55) que es subsecuentemente cortado por la proteasa viral para generar las proteínas p24, p17, y p9 que forman la nucleocápside del virus. El gen *pol* codifica un precursor que da lugar a tres enzimas; transcriptasa reversa, proteasa e integrasa; el gen *env* codifica un precursor polipeptídico glicosilado (gp 160) que es procesado para formar la glicoproteína exterior (gp 120) y la glicoproteína transmembranal (gp 41).

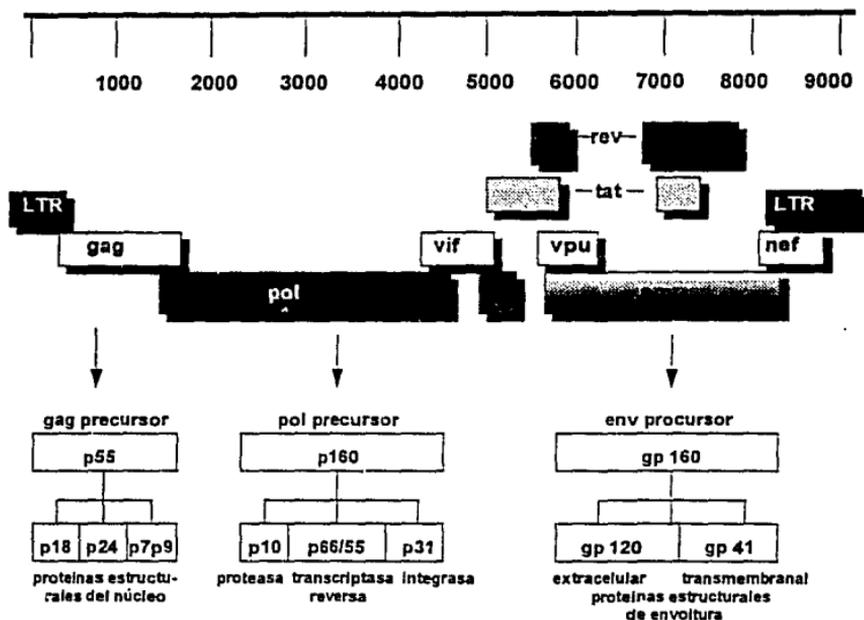


FIGURA 3: ORGANIZACION GENOMICA DEL HIV-1.

El genoma del HIV (aproximadamente 9000 pares de bases) está constituido por tres genes que codifican para proteínas estructurales del virus (*gag*, *pol* y *env*) y al menos seis genes accesorios, (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) que desempeñan funciones reguladoras.

Además de estos elementos genéticos, el HIV contiene al menos seis genes accesorios: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* (HIV I) o *vpx* (HIV II). Tres de estos ge-

nes *tat*, *rev* y *nef* juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión viral. Las proteínas de *tat* y de *rev* regulan la transcripción y/o los fenómenos de postranscripción, y ambos son esenciales para que se lleve a cabo la replicación viral. El gen *nef* codifica para una proteína que ejerce una función de regulador negativo. La proteína producida por el gen *vif* se encuentra en las partículas virales maduras es muy conservada entre distintas cepas y si muta no se afecta la replicación viral, sin embargo se ha probado que la proteína codificada por *vif* controla la infectividad. El producto de *vpu*, que sólo se encuentra en cepas de HIV-1, no interfiere con la expresión de las proteínas del virus pero parece estar involucrado en el fenómeno de liberación de partículas virales de las células infectadas. Con respecto al producto de *vpr* hay muy poca información; se sabe que induce anticuerpos en individuos infectados, pero no se conoce su función (7). Todos estos datos se resumen en la tabla 2.

TABLA 2
GENES REGULADORES DEL HIV-1

GENES	INMUNO-GENICIDAD	PROTEINA	LOCALIZACION CELULAR	FUNCION	REPLICACION
<i>vif</i>	+	p23	Citoplasma/membrana interna	Infectividad	+/-
<i>tat</i>	+	p14	Núcleo/nucleólo	Activador de transcripción	-
<i>rev</i>	+	p19	Núcleo/nucleólo	Modulador de transcripción. Expresión de proteínas estructurales	-
<i>nef</i>	++	p27	Citoplasma	Regulador negativo	++
<i>vpr</i>	+	p18	Desconocida	Desconocida	+
<i>vpu</i>	+	p15	Citoplasma/membrana	Liberación de partículas virales	+

CICLO DE REPLICACION DEL HIV.

El ciclo de vida del HIV empieza con la unión del virus, por medio de su glicoproteína externa gp-120, a un receptor celular (CD4). El HIV es uno de los pocos retrovirus para los que se ha podido definir la naturaleza del receptor celu-

lar, sin embargo el HIV no entra a la célula a través de endocitosis mediada por receptor, proceso mostrado por otros retrovirus, siendo la entrada del HIV al interior de la célula independiente de la acidificación de los endosomas (7). Estos estudios sugieren que el enlace de la envoltura con el CD4 solo es el primer paso y se requiere un evento de fusión subsecuente y otros factores celulares como puede ser el receptor CD26 (9).

Una vez que el virus ha entrado a la célula como una ribonucleocápside, se realizan diversos eventos que culminan en la integración del genoma viral en el cromosoma celular. La nucleocápside viral contiene RNA, así como proteínas y enzimas como la transcriptasa reversa y la ribonucleasa las cuales son responsables de convertir el genoma viral a DNA de doble cadena. La información genética viral en forma de DNA de doble cadena, puede permanecer en el citoplasma o se circulariza en forma no covalente y migra al núcleo celular donde una enzima viral integra el DNA (provirus) al DNA celular. De esta manera el provirus se duplicará junto con los genes de la célula cada vez que la célula se divida, estableciéndose una infección permanente, permaneciendo latente hasta que se active la maquinaria celular para producir nuevas partículas virales.

La segunda mitad del ciclo de vida viral (la producción de nuevas partículas virales), ocurre solo esporádicamente en algunas células infectadas y se cree que cofactores tales como la presencia de otros agentes patógenos, de células extrañas o tensión en el hospedero inducen la activación del virus latente. Esta activación permite que la maquinaria celular produzca, a partir del DNA integrado, RNA que será material genético para una nueva generación de virus, mientras que otras cadenas de RNA servirán como RNAm para producir las proteínas y enzimas del nuevo virus. Estas proteínas virales sufren diversos procesamientos después de traducirse (cortes, glicosilación, miristoilación y fosforilación) y posteriormente, empleando la membrana celular como apoyo, se ensamblan en nuevas partículas virales interaccionando con el RNA viral. Finalmente, adquieren la membrana que los rodea en un proceso de gemación a través de la membrana celular (1).

Una característica del HIV es la capacidad de transmitirse célula a célula sin pasar por la etapa de virus infeccioso libre. Este fenómeno se lleva a cabo debido a que las células infectadas expresan pequeñas cantidades de gp120 que pueden unir con alta afinidad a células que presentan receptor CD4, fusionándose las membranas celulares y permitiendo la transmisión del virus. La importancia de este hecho es que el virus no queda expuesto a los componentes efectores de la respuesta inmune humoral y celular, así como a agentes físico-químicos.(10)

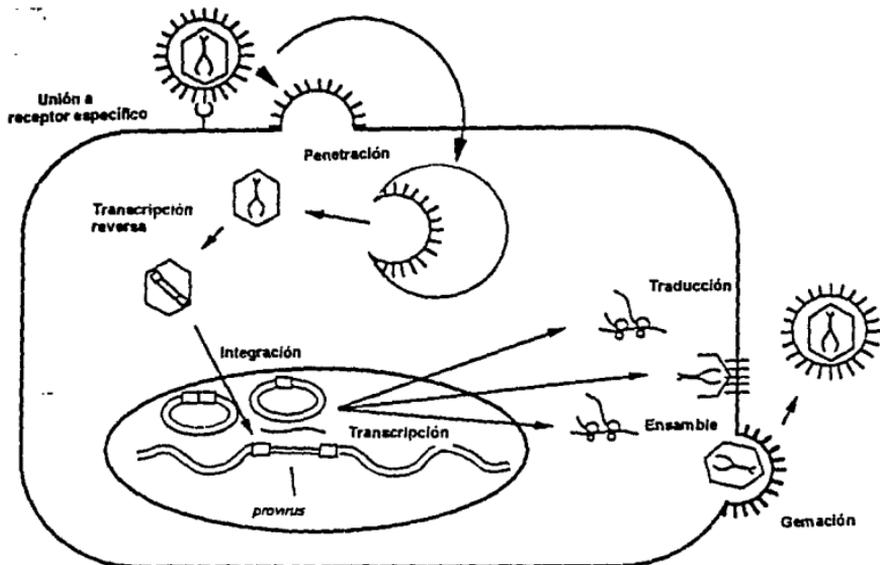


FIGURA 4: CICLO DE REPLICACION DEL HIV

VARIABILIDAD GENOMICA.

La heterogeneidad genómica ha sido firmemente establecida como una característica prominente de los HIV (11). Esto fue primeramente reconocido cuando cultivos de células infectadas con HIV-1 fueron analizados por hibridación usando "Southern Blot" y se encontraron diferencias considerables en sus patrones de corte con enzimas de restricción (12-15). Subsecuentemente, clonaciones moleculares y análisis de secuencias demostraron que cada virus de HIV-1 es único y distinguible de otros, variando arriba del 10% de su secuencia nucleotídica (16). Esta variación genética fue también demostrada entre aislados de HIV-1 obtenidos secuencialmente del mismo individuo a través del tiempo (11), entre virus de HIV-1 de casos de transfusión donador-receptor y entre aislados de transmisión madre e hijo (16-17). Más recientemente, estudios de clonación molecular y mapeo, así como análisis de la secuencia nucleotídica de fragmentos provirales amplificados por PCR demostraron otra dimensión de la variabilidad del HIV: la coexistencia de genotipos distinguiblemente relacionados dentro del mismo individuo infectado, estos estudios han identificado los aislados de HIV como mezclas de virus heterogéneos de una complejidad genética imprevista (17,18).

Debido a que la replicación retroviral es única, los cambios genéticos pueden involucrar uno o varios pasos de este ciclo de replicación viral, entre estos se incluyen la transcripción reversa (RNA a DNA), la replicación proviral (DNA a

DNA) y la transcripción proviral (DNA a RNA). El primer paso en la replicación es realizado por una enzima codificada viralmente, la transcriptasa reversa (RT). A través de varios experimentos se ha llegado a la conclusión que la RT es la polimerasa menos confiable que se ha descrito, ya que se han estimado grandes errores en su transcripción. Estos datos sugieren fuertemente que la RT es en parte al menos responsable de la hipermutabilidad del HIV. Otras posibilidades teóricas pueden ser, la transcripción DNA a RNA, equivocaciones en la lectura del RNA viral y recombinaciones entre diferentes secuencias retrovirales (16).

Una de las preguntas más importantes es saber si los cambios genéticos observados en el HIV son de relevancia biológica y clínica. Existen evidencias preliminares que indican que la variación genotípica en HIV-1 se asocia con propiedades biológicas importantes como son: velocidad de replicación, habilidad para formar sincicios y citotropismo (19-20). Se ha demostrado que algunos aislados de HIV-1 se replican preferencialmente en fagocitos mononucleares, sin embargo otros muestran preferencia por linfocitos T. Similarmente se han encontrado formas virales de HIV-1 genotípicamente distintas en pacientes con disfunción pronunciada del sistema nervioso central, y estos virus pueden ser distinguidos por su actividad de replicación en fagocitos mononucleares y cultivos de glioma cerebral (19).

Por otro lado, la variación genética da como resultado variación antigénica entre los diferentes aislados. Las mutaciones ocurridas en la región variable 3 (V3) de la gp 120, donde se localiza el dominio principal de neutralización, son críticas debido a que puede ser utilizado por el HIV para escapar de la respuesta inmune. De igual manera los epitopos para las células T han sido identificados en proteínas estructurales y la variación en sus secuencias peptídicas es crítica para el reconocimiento por las células T citotóxicas (20).

1.4 DIAGNOSTICO

RESPUESTA INMUNE

Se ha demostrado tanto respuesta inmune humoral como mediada por células contra una gran variedad de proteínas del HIV en pacientes infectados con este virus. Dada la alta mortalidad entre los pacientes infectados con el HIV, es claro que esta respuesta inmune no confiere una protección adecuada, esto es debido parcialmente a que las células T CD4 requeridas para iniciar la respuesta inmune son eliminadas o inactivadas por el virus, comprometiendo así la eliminación de este, además la presencia de variaciones antigénicas características del HIV pueden servir para evadir la respuesta inmune.

Parece ser que las moléculas más inmunogénicas del HIV son las glicoproteínas de envoltura y se encuentran títulos altos de anticuerpos contra estas glicoproteínas (gp120 y gp41) en todas las personas infectadas. Otros anticuerpos encontrados son contra la p24, contra la transcriptasa reversa y contra los demás productos de los genes *gag* y *pol* (21).

Se ha demostrado que un número variable de individuos infectados con el HIV producen anticuerpos capaces de neutralizar *in vitro* la infectividad del virus. La glicoproteína gp120 es la principal inductora de este tipo de anticuerpos en particular la región variable 3 (V3) llamada dominio principal de neutralización. Esta región está comprendida entre dos cisteínas y presenta una secuencia de aminoácidos Glicina-Prolina-Glicina que es conservada entre los diferentes aislados; sin embargo las regiones circundantes son hipervariables. Debido a esto los anticuerpos neutralizantes inducidos por la región V3 son tipo específicos, ya que solo neutralizan la cepa viral por la que fueron inducidos. Existen otros anticuerpos neutralizantes dirigidos contra otras regiones en las proteínas de envoltura, estos anticuerpos no son tipo específico sino grupo específicos con una reactividad más amplia.

También los anticuerpos dirigidos contra las proteínas gp120 y gp41 pueden mediar la citotoxicidad mediada por células (ADCC) (4). En este proceso los anticuerpos unidos a antígenos virales enclavados en la superficie celular son reconocidos y eliminados por células NK o macrófagos que cargan receptor para Fc.

Se han detectado linfocitos T citotóxicos (CTL's) específicos contra productos de los genes *gag*, *pol* y *env*, así como actividad de células NK contra células infectadas con el HIV. La respuesta celular es muy importante como mecanismo protector porque es la única capaz de eliminar a las células infectadas que sirven de almacén del HIV y de prevenir que los virus pasen de una célula a otra (21).

1.4.1 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

El diagnóstico serológico tiene cuatro principales aplicaciones: a) verificar si un paciente que presenta síntomas compatibles con la infección con HIV, realmente está infectado; b) para monitorear un paciente que ha sido expuesto al HIV y evidenciar la infección; c) para realizar pruebas a individuos sanos, los cuales pertenezcan a grupos de riesgo para la infección y d) monitoreo sanguíneo y/o productos derivados de la sangre. Por todas estas razones y por la forma en que el HIV se transmite, se han diseñado una gran cantidad de pruebas para el diagnóstico (22).

Las pruebas serológicas designadas para detectar anticuerpos contra el HIV son muchas en número y variedad. Unas de las técnicas más comunes es el ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) y la inmunoaglutinación, existiendo pruebas suplementarias como Immunoblot o Western blot (WB), Inmunofluorescencia (IFA) y Radioinmunoprecipitación (RIPA).

ELISA

Existe una gran variedad de ELISAs disponibles para la detección de anticuerpos contra HIV: ensayos indirectos, competitivos, "sandwich" y de captura, todos ellos consisten en acoplamiento del antígeno a una fase sólida (soporte) e incorporación de un sistema de detección conjugado-sustrato.

El antígeno viral puede ser lisado viral, proteínas, péptidos recombinantes o sintéticos. En el ensayo más común (indirecto), la adición de la muestra problema de suero permitirá la reacción de los anticuerpos anti-HIV si estos se encuentran presentes. Después de un paso de lavado que remueve los constituyentes del suero no enlazados, se agrega conjugado (anti-Ig humana) y se incuba. El conjugado enlazará a los anticuerpos del paciente si están presentes, removiendo el exceso de conjugado durante otro paso de lavado.

Los conjugados contienen comúnmente enzimas acopladas a los anticuerpos anti-Ig. En el caso de los ensayos de tipo competitivo el anticuerpo conjugado esta dirigido contra los antígenos virales acoplados a la fase sólida. Las enzimas usadas en los inmunoensayos enzimáticos (EIA) usualmente son la fosfatasa alcalina o la peroxidasa. Existen diversos sustratos que pueden reaccionar con estas enzimas, 4-nitrofenilfosfato es el sustrato de la fosfatasa alcalina, mientras que la o-fenilendiamina (OPD) o el 4-cloronaftol son usados para la peroxidasa. Las enzimas utilizadas en los inmunoensayos son capaces de modificar al sustrato para producir un producto colorido que puede ser detectado visualmente o por medio de un espectrofotómetro (23).

PRUEBAS DE AGLUTINACION

La técnica de aglutinación es un sistema que ha sido usado para el diagnóstico de distintas enfermedades infecciosas debido a que presenta buena sensibilidad de detección de anticuerpos, sin embargo su especificidad a veces es comprometida. Las pruebas de aglutinación utilizan acarreadores del antígeno (Ag) como pueden ser eritrocitos, partículas de látex, partículas de gelatina etc., los antígenos del HIV (lisado viral, proteínas, péptidos recombinantes o sintéticos) son adsorbidos sobre el acarreador y estas partículas sensibilizadas son utilizadas para el ensayo con el suero problema.

Durante la reacción de aglutinación, una red es formada entre las partículas sensibilizadas con antígeno y los anticuerpos. Esta reacción trae consigo el agrupamiento (aglutinación) de las partículas. La aglutinación es macroscópica y es leída visualmente (23).

WESTERN BLOT

El WB es probablemente el ensayo suplementario más utilizado para la confirmación de anticuerpos contra retrovirus, es en general tan sensible como los ensayos de tamizaje, es más específico, pero es caro, requiere de trabajo intenso y por lo tanto es inapropiado como prueba tamiz.

La técnica de WB presenta gran especificidad debido a dos factores: separación y concentración de componentes. Como la mezcla de componentes virales es separada en bandas específicas, cada componente se convierte en un componente puro, que permite la identificación de anticuerpos específicos de cada una de las proteínas virales.

La técnica se lleva a cabo en tres pasos:

- 1.- Separación de proteínas virales por su peso molecular, empleando electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE).
- 2.- Transferencia de los antígenos separados a papel de nitrocelulosa.
- 3.- Reacción con la muestra de suero directamente sobre la membrana transferida, usando una técnica similar al ELISA (23).

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia indirecta (IFA) es un ensayo usado como prueba suplementaria en algunos laboratorios. Esta prueba es mucho menos cara, simple de realizar y se requiere de menos tiempo. El principio de la IFA es similar al del ELISA diferenciándose en el soporte sólido y en el sistema indicador que son fluorocromos. El soporte sólido consiste de laminillas de microscopio con pozos individuales conteniendo células (usualmente linfocitos T humanos) que han sido infectadas con HIV, también incluyen un control de células no infectadas. Los dos tipos de células son fijadas sobre los pozos y el suero problema es agregado a cada pozo incubando para que el anticuerpo específico (si esta presente) se una al Ag viral presente en la célula infectada. Se lavan las laminillas y se agrega conjugado el cual es una inmunoglobulina anti-humano marcada con un fluorocromo (FITC).

Los fluorocromos son sustancias que fluorescen cuando son expuestas a luz U.V., siendo positiva una reacción que presente fluorescencia en las células infectadas. Contrariamente a lo que pasa en el WB los anticuerpos identificados no son específicos para un Ag y la reacción positiva solo indica presencia de anticuerpos contra el HIV (23).

RADIOINMUNOPRECIPITACION

La radioinmunoprecipitación (RIPA) es una técnica empleada casi exclusivamente en investigación debido a que utiliza sustancias radiactivas. El RIPA es extremadamente sensible y porque la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en condiciones no reductoras y en solución, haciendo la técnica muy específica.

En el RIPA ciertos aminoácidos radiactivos (por ejemplo cisteína o metionina) son agregados a cultivos de células infectadas, cuando el virus se replica, este incorpora en sus proteínas la marca radiactiva. Subsecuentemente las partículas virales que han sido marcadas son colectadas, lisadas y las proteínas son solubilizadas. El lisado viral resultante se hace reaccionar con el suero problema unido a proteína A y los complejos inmunes que son producidos son separados. El producto marcado se somete a electroforesis por SDS-PAGE y las proteínas marcadas son visualizadas después de exposición a una placa de radiografía (23).

1.4.2. DETECCION DEL AGENTE VIRAL O SUS COMPONENTES

Existen otras técnicas para el diagnóstico de la infección por el HIV, estas técnicas no detectan anticuerpos sino la presencia del virus, o los componentes

proteicos o nucleotídicos del HIV, entre estas se encuentran: cultivo viral, detección de antígenos virales y PCR.

DETECCION DE ANTIGENOS VIRALES

La detección de antígenos virales se puede realizar en muestras de cocultivo para confirmar la infección, pero también se puede hacer directamente en muestras de plasma o suero de pacientes posiblemente infectados. La técnica de detección de Ag viral ofrece algunas ventajas; se ha encontrado que el Ag del HIV-1 puede ser detectado antes que los anticuerpos anti-HIV-1 en la mayoría de las infecciones agudas, además la determinación de Ag puede ser relacionada con el desarrollo de las complicaciones clínicas. Otros usos que han sido reportados para esta metodología son el monitoreo de presencia de Ag de HIV-1 en cocultivos y en estudios de investigación para el tratamiento con fármacos antivirales.

La técnica se basa en un ensayo inmunoenzimático donde los viriones que están presentes en la muestra son disgregados por la adición de solución de muestra que contiene Tritón X-100. La superficie soporte, constituida por pozos de una placa o partículas de poliestireno, a la cual se encuentran acoplados anticuerpos anti-HIV es incubada con la muestra, después de la incubación se aspira lo que no se enlazó y se lava la superficie. Se añaden anticuerpos anti-HIV-1, preparados en una especie diferente a la primera, los cuales se unen al antígeno si éste se encuentra presente, procediendo a otro paso de lavado y se agrega anticuerpo de cabra anti-2a especie conjugado con enzima peroxidasa. Se lava la superficie añadiéndose o-fenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno, desarrollándose coloración amarilla-anaranjada siendo proporcional a la cantidad de antígeno del HIV-1 presente (24).

CULTIVO VIRAL

Un diagnóstico definitivo de la infección por HIV puede ser realizado por el uso de cultivo celular para aislamiento del virus a partir de células, tejidos o fluidos corporales de individuos infectados sintomáticos y asintomáticos. Muy comúnmente se emplea un sistema de cocultivo, en el cual células mononucleares periféricas (PBMC) de donadores seronegativos al HIV, preestimuladas con Fitoheماغlutinina (PHA) son mezcladas con PBMC's aislados de un individuo presumiblemente infectado del cual se quiera llevar a cabo el aislamiento. El cocultivo se mantiene en medio con IL-2 para promover el crecimiento de las células. La presencia del virus se confirma por detección de transcriptasa reversa o de antígenos virales en el sobrenadante del cultivo o por inmunofluorescencia de las células.

Los cultivos celulares no son utilizados de rutina para el diagnóstico de HIV por su alta complejidad técnica y su costo, pero pueden ser utilizados para clarificar resultados serológicos indeterminados y para estudios diversos de los aislados virales (23).

3.- DETECCION DEL GENOMA VIRAL

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

PCR es un método de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro*, por el cual un segmento particular de DNA puede ser replicado. Este método involucra dos oligonucleótidos o iniciadores que flanquean el fragmento de DNA que se desea amplificar y ciclos repetidos de desnaturalización por calor del DNA, alineación de los iniciadores con sus secuencias complementarias y extensión de los oligonucleótidos con DNA polimerasa. Estos iniciadores hibridan en cadenas opuestas de la secuencia blanco, por lo tanto los productos de la extensión son complementarios y son capaces de hibridar con los oligonucleótidos en los ciclos sucesivos de amplificación (figura 5). El resultado es una acumulación exponencial del fragmento específico, 2^n , donde n es el número de ciclos de amplificación realizados (25).

Los productos de la amplificación son detectados por medio de electroforesis en un gel de agarosa tiñendo con bromuro de etidio o por detección con sondas radioactivas o no radioactivas específicas para la secuencia amplificada.

La técnica de PCR debe ser realizada con extremo cuidado para evitar contaminación de muestras con productos de amplificación que puedan dar lugar a falsos positivos. Para evitar estas complicaciones se deben usar pipetas de desplazamiento positivo, preparar reactivos en una área libre de productos de amplificación, esterilizar los reactivos y hacer cambio de guantes frecuentemente. Es importante la cuidadosa selección de los controles negativos y positivos.

La técnica de PCR es muy eficiente para la amplificación de secuencias específicas de DNA proviral de HIV. También se ha implementado exitosamente en la amplificación de RNA viral transcribiendo el RNA a DNA complementario con transcriptasa reversa y amplificando el DNA complementario, sin embargo esta implementación es menos sensible que usando directamente DNA como molde. La técnica de PCR ha sido usada para la demostración de ácidos nucleicos de HIV-1 y 2 y HTLV-I y II en una gran variedad de especímenes de individuos infectados. Las secuencias más comunmente utilizadas para el diagnóstico de HIV son derivadas de los genes *gag* y/o *pol*, debido a que son las regiones más conservadas del genoma viral.

Esta técnica es de gran utilidad en diversas áreas relacionadas a HIV. Estas incluyen:

- 1.- La detección de secuencias del genoma del HIV durante la infección temprana o antes de la seroconversión.
- 2.- Resolución del estado de la infección de individuos con resultados serológicos indeterminados.
- 3.- Resolución del estado de la infección de niños recién nacidos de madres seropositivas.
- 4.- Monitoreo de carga viral en pacientes que reciben agentes terapéuticos.
- 5.- Descripción de variabilidad genética entre los aislados virales de HIV.

6.- Detección de secuencias genómicas en individuos seropositivos quienes son negativos por ensayos en cultivo y/o antígeno viral (23).

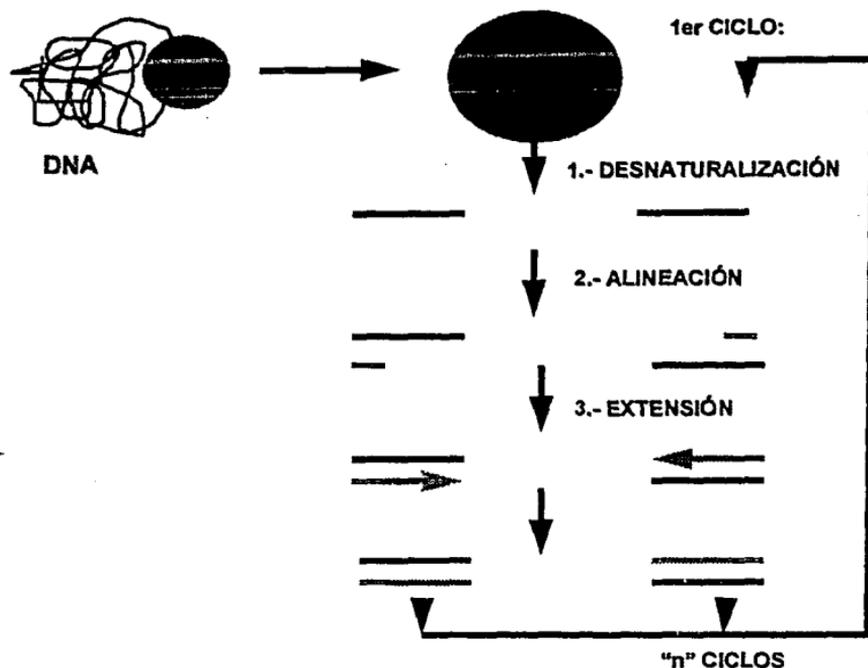


FIGURA 5: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa se lleva cabo cuando dos iniciadores flanquean un fragmento de un DNA blanco y lo amplifican por medio de ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y extensión de los iniciadores utilizando DNA polimerasa.

SOUTHERN BLOT

La primera descripción de la heterogeneidad molecular del HIV se basó en estudios con Southern Blot (11-15). Esta técnica permite localizar la presencia de secuencias particulares de nucleótidos en DNA. El DNA en estudio es digerido con una o varias enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en un gel de agarosa. El DNA es entonces desnaturalizado 'in situ' y transferido del gel a un soporte sólido

(membrana de nylon). Las posiciones de los fragmentos de DNA son preservadas durante su transferencia a la membrana. El DNA fijado a la membrana es hibridado con DNA o RNA marcado radiactiva o no radiativamente y la autorradiografía es usada para localizar las posiciones de las bandas complementarias a la sonda (27).

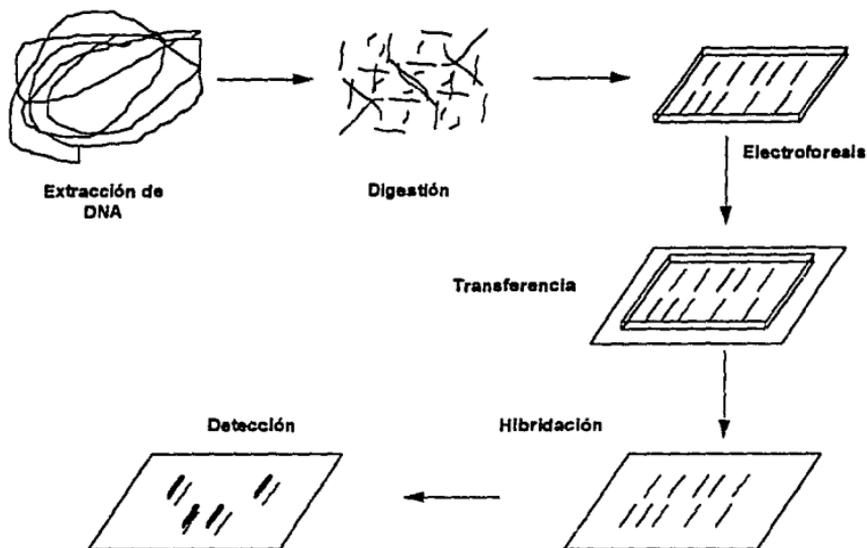


FIGURA 6: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA DE SOUTHERN BLOT.

La técnica de Southern blot consiste en la detección de una secuencia nucleotídica específica mediante la electroforesis y posterior transferencia de fragmentos de DNA digeridos con enzimas de restricción e identificados por medio de una sonda marcada.

Debido a que las técnicas de fijación de DNA, hibridación y detección con sondas radiactivas y no radiactivas son importantes en la realización de Southern blot y en la detección de productos amplificados de PCR, se detallarán algunas de estas metodologías.

1.- Extracción de DNA.

El DNA es usualmente extraído por digestión de las células con proteinasa K en presencia de EDTA y un detergente como duodecil sulfato de sodio (SDS), seguido por extracción con fenol. Este método permite obtener DNA de aproximadamente 100-150 Kb y es óptimo para construcción de bibliotecas de DNA o para análisis genómico por Southern (26).

2.- Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Se realiza la digestión del DNA obtenido, con diferentes enzimas de restricción de las cuales se conozca su sitio de corte en el genoma del HIV. Entre estas enzimas se encuentran Sst I, Hind III, Eco RI, Pst I Bgl II, Pvu II, Xba I y Bam HI (11-16). Las condiciones y el amortiguador son proporcionadas por el proveedor.

3.- Electroforesis de los fragmentos de restricción.

Los fragmentos resultantes de la digestión son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en un gel de agarosa. Los geles de agarosa son preparaciones simples, en las cuales al agar se le agrega amortiguador de electroforesis (Ver apéndice) y se calienta a ebullición, se deja enfriar y se vacía en un molde. Existen diferentes amortiguadores de electroforesis pero el más empleado es Tris-acetato o fosfato 50 mM y pH 7.5-8.0 con 1mM de EDTA, este amortiguador circula entre el ánodo y el cátodo durante la corrida.

Las muestras son colocadas en el gel de agarosa mezcladas con un amortiguador de corrida, este amortiguador contiene un solvente denso como el ficoll o glicerol y colorantes como el azul de bromofenol que sirve como marcador visible de la electroforesis. La separación y la resolución depende del voltaje aplicado, fragmentos de bajo peso molecular difunden y se separan mejor a voltajes altos, sin embargo fragmentos grandes difunden muy lentamente y la mejor resolución es llevada a cabo a menor voltaje.

La detección de los fragmentos de DNA se hace por tinción con bromuro de etidio, colocándolo en la solución acuosa del gel de agarosa (antes que se solidifique) o tiñendo el gel después de haberse concluido la electroforesis. La detección de la fluorescencia del complejo DNA-bromuro de etidio se realiza por exposición del gel a luz U.V. a 254, 300 o 366 nm (27,28).

4.- Transferencia a membranas de nylon.

En el método de transferencia por capilaridad descrita por Southern (27,28) los fragmentos de DNA son acarreados del gel en un fluido líquido y depositados sobre la superficie de un soporte sólido. El líquido es arrastrado a través del gel por capilaridad que es establecida y mantenida por una pila de papeles secos absorbentes. La velocidad de la transferencia del DNA depende del tamaño de sus fragmentos y la concentración del gel de agarosa, siendo los fragmentos de mayor tamaño los que requieren de mayor tiempo (26). Esto se puede controlar por realización de una hidrólisis parcial del DNA antes de la transferencia (depuración con HCl 0.25 M), los fragmentos resultantes de DNA pueden ser

transferidos rápidamente del gel con alta eficiencia. Sin embargo es importante no dejar la reacción de depurinación por mucho tiempo, ya que de otra manera el DNA es cortado en pequeños fragmentos que son ineficientes en enlazarse a los soportes sólidos (29). Después del proceso de depurinación se procede a desnaturizar el DNA presente en el gel y neutralizarlo para posteriormente realizar la transferencia a membranas de nitrocelulosa o nylon. Se encuentran disponibles una gran variedad de membranas de nylon las cuales enlazan a los ácidos nucleicos con más eficiencia que las membranas de nitrocelulosa, son más fáciles de manejar y permiten múltiples rehibridaciones de la membrana (30).

El mecanismo de enlace de los ácidos nucleicos a las membranas no es conocido pero se ha asumido que no es covalente (29), por lo que se necesita unirlos covalentemente por medio de tratamiento a 80°C o por exposición a luz U.V. Este último tratamiento parece aumentar la señal de hibridación sobre membrana de nitrocelulosa y varios tipos de membranas de nylon (30).

5.- Hibridación.

Existen muchos métodos disponibles para hibridar sondas radiactivas y no radiactivas a ácidos nucleicos inmovilizados sobre soportes sólidos como membranas de nitrocelulosa o de nylon. Estos métodos difieren en los siguientes aspectos.

- Solventes y temperatura.

Las reacciones en 50% de formamida a 42°C son menos drásticas para membranas de nitrocelulosa que a 68°C en solución acuosa, pero se ha encontrado que la cinética de hibridación en 80% de formamida es aproximadamente 4 veces más baja que en solución acuosa. Ambos tipos de solventes dan excelentes resultados y ninguno tiene una clara ventaja sobre el otro.

- Volumen del solvente y tiempo de hibridación.

Es mejor pequeños volúmenes, debido a que la cinética de la reasociación de los ácidos nucleicos es más rápida, la cantidad de sonda necesaria puede reducirse y el DNA sobre el filtro puede ser el que dirija la reacción.

- Uso de agentes bloqueadores.

Existen diferentes tipos de agentes que pueden bloquear el enlace inespecífico de la sonda sobre la superficie del filtro, entre estos se incluyen el reactivo de Denhardt (31), la heparina y la leche descremada, estos agentes frecuentemente son combinados con DNA de esperma de salmón desnaturizado y un detergente como SDS.

- Concentración de la sonda y su actividad específica.

Para minimizar problemas de hibridación inespecífica, es mejor utilizar una mínima cantidad de sonda en el menor tiempo posible. Esta reportado que la cantidad óptima de sonda empleada en un gel que contenga 10 µg de DNA por carril es de 10 a 20 ng/ml de sonda de alta actividad específica ($\geq 10^9$ cpm/ug). La hibridación se lleva a cabo por 12-16 horas a 68°C en solución acuosa o por 24 horas a 42°C en 50% de formamida.

-Uso de compuestos que incrementan el coeficiente de reasociación de los ácidos nucleicos.

En la presencia de 10% de dextrán sulfato o 10% de polietilenglicol el coeficiente de hibridación es acelerado aproximadamente 10 veces (32,33) pues los ácidos nucleicos son excluidos del volumen ocupado por el polímero y su concentración efectiva es incrementada.

Astringencia de los lavados después de la hibridación.

Las condiciones de astringencia son debidas a una combinación de la concentración de sal y la temperatura. En general se han descrito tres tipos de astringencia; baja, mediana y alta, estas condiciones deben ser determinadas empíricamente de acuerdo al grado de homología de la sonda con su DNA blanco, recomendándose empezar a baja astringencia y trabajar a astringencias más altas si es necesario (26).

6.- Detección de los fragmentos de restricción.

a) **Sondas radiactivas.** La detección con estos tipos de sondas se realiza simplemente colocando la membrana (previamente lavada) en una bolsa hermética de modo que se mantenga húmeda y se expone a una placa de rayos X el tiempo requerido (26).

b) **Sondas marcadas con Digoxigenina.** Entre las sondas marcadas no radiactivamente unas de las mas comunes son las que incluyen moléculas como la digoxigenina. La digoxigenina (DIG) es un hapteno esteroide que es ligado por medio de un brazo espaciador a su correspondiente nucleótido. El marcaje de sondas se genera con polimerasa Klenow (iniciadores al azar) o por PCR por incorporación de trifosfato-deoxiuridina marcado con digoxigenina. El DNA marcado de esta forma es detectado después de la hibridación, por un ensayo inmunoenzimático usando un anticuerpo conjugado (anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina), posteriormente una reacción colorimétrica producida por el sustrato nitroazul de tetrazolio (NBT) o por un sustrato quimioluminiscente que hace visualizar los híbridos presentes .

Los sustratos quimioluminiscentes son moléculas 1,2-dioxetanos que emiten luz visible cuando estos son descompuestos por medio de una enzima. La detección quimioluminiscente provee de una gran sensibilidad comparada con sistemas colorimétricos y es más rápida y más conveniente como alternativa de sistemas radiactivos de detección (34).

CONSTRUCCION DE SONDAS MARCADAS PARA HIBRIDACION

a) Iniciadores al azar.

Muchas técnicas en biología molecular requieren el uso de sondas marcadas con alta especificidad, estas técnicas incluyen Southern, Northern, hibridaciones en punto, en placa e *in situ*. Existen diversas técnicas de marcado pero la de iniciadores al azar es capaz de marcar fragmentos recobrados de geles de agarosa con una gran actividad específica (35).

Se ha sabido por muchos años que los oligonucleótidos (DNA de esperma de salmón o de timo de ternera digerido con DNAsa) podían servir como primeros

para iniciar la síntesis de DNA por medio de una DNA polimerasa a partir de una cadena sencilla como molde. Si los oligonucleótidos son heterogéneos en su secuencia, estos pueden formar híbridos en muchas posiciones, incorporándose nucleótidos en igual frecuencia para sintetizar sondas de DNA de una gran actividad específica.

Este método es usado para generar sondas de DNA de doble cadena a partir de DNA lineal desnaturalizado que ha sido purificado por geles de agarosa. El DNA purificado es desnaturalizado por ebullición y mezclado con un exceso molar de primers y en presencia de nucleótidos marcados y no marcados (radiactiva o no radiactivamente). La síntesis es llevada a cabo usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de la *E. coli*, esta enzima tiene actividad de exonucleasa 5'-3' por lo que el producto marcado es sintetizado exclusivamente por primera extensión. Esta reacción es realizada a pH 6.6 donde la actividad exonucleasa 3'-5' es reducida (26).

b) Nick translation.

Este método utiliza la habilidad que tiene la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* de catalizar una reacción de "Nick translation". Esta reacción consiste en la adición secuencial de nucleótidos al hidroxilo terminal 3' cuando una cadena de DNA es cortada, con la subsecuente eliminación de los nucleótidos del lado 5'. De esta manera los nucleótidos pre-existentes en el molde de DNA son reemplazados con nucleótidos marcados, permitiendo obtener un DNA con actividad específica de 10^8 cpm/ μ g. El DNA marcado de esta manera es empleado para detectar fragmentos de restricción conteniendo una sola copia de interés mediante hibridación por Southern Blot (36).

c) Marcación por medio de PCR.

Se ha descrito la construcción de sondas para detectar genoma de HIV por medio de PCR, utilizando como primers diferentes oligonucleótidos que amplifican diversas regiones del genoma proviral. Este marcaje puede incorporar nucleótidos radiactivos o nucleótidos no radiactivos como la digoxigenina.

2.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterización de la variabilidad genómica de cuatro cepas de HIV-1 mexicanas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Estandarización de la técnica de Southern Blot con un virus prototipo de HIV-1 en cultivo celular.

Amplificación de fragmentos de genoma del HIV-1 por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y corte con enzimas de restricción.

Caracterización de la variabilidad genómica de diferentes aislados de HIV-1 mexicanos empleando las técnicas de Southern blot y/o PCR.

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1 PREPARACION DE LA SONDA PARA HIV-1.

Con el fin de construir una sonda que detectara provirus integrado en el DNA celular, se purificó el plásmido pBH10 cuya secuencia se muestra en la figura 7. Este plásmido consiste del segmento correspondiente a pSP64 más la secuencia del DNA complementario del HIV-1 (HTLV IIIb), a excepción de una región de 182 pb que corresponde al sitio de unión con el "primer" tRNA y a parte de la secuencia líder localizada en la zona R y U5 del LTR 3' (37). El plásmido pBH10 contiene además el gene de resistencia a ampicilina (gene de β -lactamasa), un origen de replicación, una región denominada polilinker con sitios únicos de corte para diferentes enzimas de restricción y el promotor del bacteriófago Sp6 de *Salmonella typhimurium*, mediante el cual es posible la transcripción de secuencias que se encuentran hacia abajo del promotor (38).

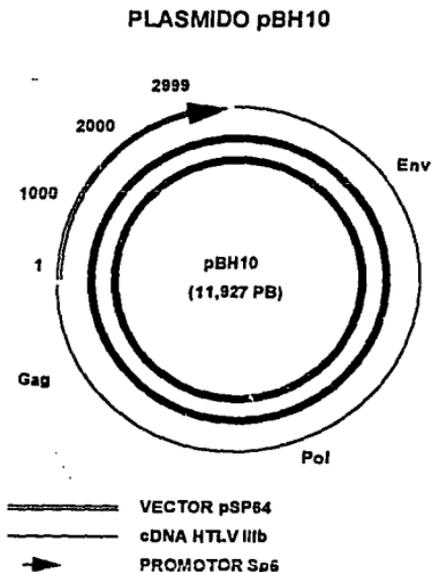


FIGURA 7: Mapa del plásmido pBH10 el cual contiene la secuencia nucleotídica completa del HIV-1 (HTLV IIIb) a excepción de la región R y U5 del LTR 5'.

Propagación del plásmido:

a)Mini-preparación (lisis por álcali).

1. -Una colonia de bacterias *E. coli* DH1 transformadas con el plásmido pBH10, se siembra en 5 ml de caldo Luria-Bertini (Ver apéndice sol. A) con ampicilina (50 µg/ml), se crece en agitación a 37°C hasta obtener una D.O. de 0.8.
2. -Se centrifugan las bacterias en tres tubos eppendorff de 1.5 ml a 12000 g en una microcentrífuga por 5 min. Se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 100 µl de solución I de lisis (ver apéndice sol. B), se agrega 200 µl de solución II de lisis (sol. C), se mezclan y se enfrían 5 min. a -20°C. Se agregan 150 µl de solución III de lisis (sol. D), repitiéndose el mismo procedimiento.
3. -Se centrifugan los tubos a 12000 g durante 5 min y el sobrenadante se extrae con un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1). La parte acuosa se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto, se enfrían los tubos a -20°C y se centrifugan a 12000 g, se retira el sobrenadante y la pastilla se lava con etanol al 70%, secándose y resuspendiéndose en solución de Tris-EDTA (T.E. sol E).

b)Maxi-preparación (lisis por álcali).

1. -Se crecen bacterias *E. coli* DH1 transformadas con el plásmido pBH10 en 100 ml de medio Luria-Bertini con ampicilina (50 µg/ml), a 37°C y en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.8. Se agrega cloranfenicol (170 µg/ml) y se dejan en las mismas condiciones toda la noche.
2. -Se centrifugan las bacterias a 3000 g 10 min. Se resuspende la pastilla en 1.8 ml de solución I de lisis, se añaden 0.2 ml de lisozima (10 mg/ml) y se incuban a -20°C durante 5 min, se agregan 4 ml de solución II de lisis, se mezcla y se incuba a -20°C, posteriormente se añaden 3 ml de solución III de lisis, se mezcla y se incuba a -70°C durante 30 min.
3. -Se descongela la mezcla a 37°C y se centrifuga a 3000 g por 30 min., se extrae el sobrenadante y se agregan 9 ml de isopropanol, se incuba 15 min. a temperatura ambiente y se centrifuga a 3000 g 30 min.
4. -Se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 2 ml de T.E., adicionando 2 ml de LiCl 5M, se incuba 5 min. a -20°C y se centrifuga a 3000 g durante 10 min.
5. -Se extrae el sobrenadante y se añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se centrifuga a 3000 g durante 15 min. Se lava la pastilla con etanol al 80%, se centrifuga a 3000 g durante 10 min., se seca la pastilla y se resuspende en T.E. con RNasa (20 µg/ml), se incuba 15 min. a 37°C.
6. -Se añade 0.5 ml de Polietilenglicol (PEG) 13% más NaCl 1.6M, se centrifuga a 12000 g durante 15 min., se elimina el sobrenadante y se resuspende en 150 µl de T.E.
7. -Se realiza extracción con fenol, fenol cloroformo y cloroformo una vez con cada reactivo y la fase acuosa se precipita agregando 1/10 de NaACO 3M y 2.5 veces el volumen de etanol absoluto, incubando a -20°C durante 20 min.
8. -Se centrifuga a 12000 g durante 30 min., se lava la pastilla con etanol al 80% y se seca, resuspendiéndose con 100 µl de T.E.

9. -Se cuantifica la concentración de plásmido obtenido, realizando una dilución 1:200 y leyendo D.O. a 260 nm con filtro de luz U.V.

Identificación del HIV-1 en el plásmido pBH10.

Se realizan digestiones con las enzimas de restricción Hind III y Sst I, empleando amortiguador proporcionado por el proveedor (Gibco BRL USA). Los productos de digestión se separan por electroforesis (90 V hasta que el colorante corra ¼ del gel) en un gel de agarosa al 1.2%, identificando su tamaño por comparación con un marcador de peso molecular.

Obtención del fragmento correspondiente al genoma del HIV-1.

El plásmido pBH10 se digiere con la enzima de restricción Sst I y se coloca en un gel de agarosa al 1.2%. Se separan por electroforesis los dos fragmentos resultantes (90 V hasta que el colorante corra ¼ del gel), se corta del gel de agarosa el fragmento de 9 Kb y se incluye en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (BPF), y se eluye con corriente. Se corta el fragmento de el BPF que contiene el DNA de interés y se disuelve en 3 volúmenes de una solución de TE, calentando a 65°C. A la solución con la agarosa ya fundida se le realiza una extracción fenólica, precipitando el DNA presente en la fase acuosa, se agrega 1/10 de Acetato de sodio (NaAcO) 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifuga a 12000 g y la pastilla se resuspende en H₂O o solución de TE. Se cuantifica la concentración de DNA por comparación de la fluorescencia en un gel de agarosa tomando como referencia un DNA de concentración conocida. Cada ng de DNA del HIV-1 contiene 6×10^7 moléculas de genoma viral.

Marcaje de sondas.

Técnica A:

Marcación del genoma completo del HIV-1:

El fragmento de 9 Kb del genoma del HIV-1 se marca por el método de iniciadores al azar, utilizando un estuche comercial de Boehringer Mannheim incorporando ³²P-d-ATP. Se desnaturaliza el DNA por ebullición durante 3 min., enfriándose inmediatamente en baño de hielo. Por otro lado se prepara en un tubo eppendorff de 0.5 ml una mezcla de reacción conteniendo:

Hexámeros (3.1 mg/ml)	4 µl
dGTP (25 µmol/l)	2 µl
dCTP (25 µmol/l)	2 µl
dTTP (25 µmol/l)	2 µl
[α- ³² P]-dATP (6000 Ci/mmol)	5 µl
Enzima Klenow (2 U/µl)	2 µl

Se agregan 50 ng de DNA ya desnaturizado en 3 μ l. Esta mezcla se incuba a 37°C durante 1 hora.

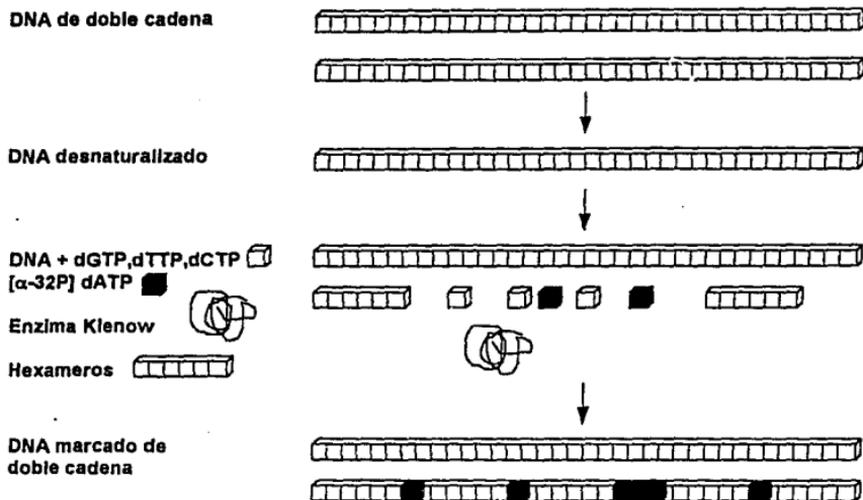


FIGURA 8: MARCACION DE SONDAS RADIATIVAS.

Este tipo de marcación se lleva a cabo mediante la desnaturización de DNA lineal y es mezclado con nucleótidos no marcados y marcados con un isótopo radiactivo (usualmente ^{32}P), en presencia de una DNA polimerasa generando una sonda de doble cadena.

Para obtener el porcentaje de incorporación de la marca radiactiva, la sonda se hace pasar a través de una columna de sephadex (ver apéndice). Se toma una alícuota de 1 μ l de la sonda antes y después de pasarla por la columna y se coloca sobre un filtro de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro (Gelman Science). Los filtros se introducen en recipientes los cuales contienen tolueno y se mide en un contador de centelleo la radiactividad en cuentas por minuto (cpm).

La actividad específica de la sonda se determina de acuerdo a la siguiente fórmula (26):

$$\frac{\text{(cpm)}}{\text{Cantidad total de DNA (ng)}} \times 10^3 = \text{Actividad Específica}$$

Marcación de los productos de la digestión del genoma del HIV-1 con las enzimas de restricción Ava II y Pvu II.

El fragmento purificado por BPF se digiere con la enzima de restricción *Ava* II o *Pvu* II, en cada caso se precipitan con 1/10 de NaACO y 2 volúmenes de Etanol absoluto los productos de esta digestión, resuspendiéndose en TE. El marcaje se realiza de la misma forma que el anterior añadiendo 50 ng del DNA de HIV-1 digerido.

Técnica B:

Incorporación de dUTP-digoxigenina por el método de iniciadores al azar:

Para construir una sonda incorporando dUTP-digoxigenina se utiliza el estuche de Boehringer-Mannheim para marcación con digoxigenina (DIG). Se marcan los fragmentos producidos de la digestión con la enzima *Pvu* II del genoma del HIV-1, se desnaturalizan por calor a 100°C y se enfrían inmediatamente en baño de hielo. Se agrega a un tubo eppendorff una mezcla de reacción que contiene:

Hexámeros (3.1 mg/ml)	2 µl
Mezcla de marcaje DIG 10X*	2 µl
H ₂ O	12 µl
Enzima Klenow (2 U/µl)	1 µl

* dATP 1 mM, dGTP 1 mM, dCTP 1 mM, dTTP 0.65 mM y dUTP-digoxigenina 0.35 mM.

Se agrega a esta mezcla 100 ng de DNA ya desnaturalizado en 3 µl. Se incuba a 37°C durante 2 horas.

Técnica C:

Incorporación de dUTP-digoxigenina por medio de PCR.

Se construye otra sonda utilizando amplificación por PCR con 7 diferentes oligonucleótidos que reconocen diferentes regiones del genoma del HIV-1. Se hace una mezcla de estos y se realiza un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa conteniendo lo siguiente:

Mezcla de oligonucleótidos	1 µl
Taq-polimerasa (5 U/µl)	0.5 µl
Mezcla de marcaje DIG 10X*	2 µl
Amortiguador 10X	1.5 µl
H ₂ O	7 µl

* dATP 1 mM, dGTP 1 mM, dCTP 1 mM, dTTP 0.65 mM y dUTP-digoxigenina 0.35 mM. El amortiguador 10X contiene KCl 500 mM, Tris-HCl, pH = 8.3 100 mM y MgCl₂ 25 mM.

A esta mezcla se le agrega 100 ng de DNA del genoma de HIV-1 digerido con la enzima *Pvu* II. Se utilizan como condiciones de amplificación 10 ciclos de 1 min. a 95°C; 1 min. a 55°C y 2 min. a 72°C.

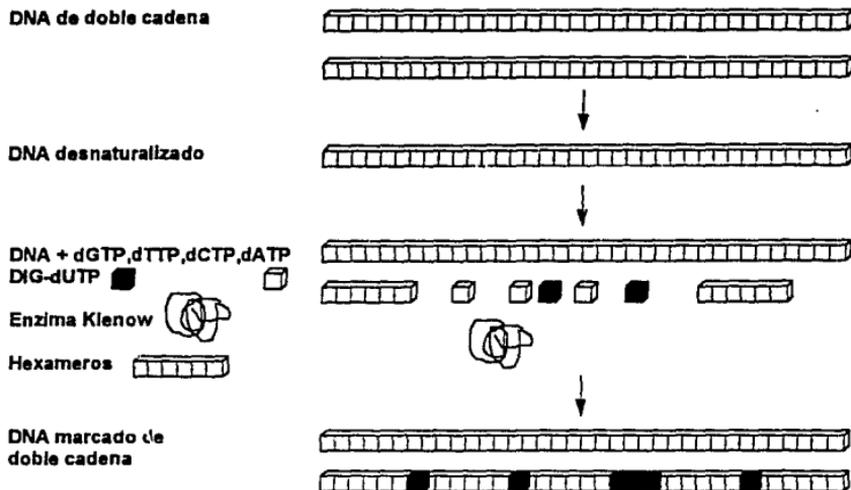


FIGURA 9: MARCACION DE SONDAS CON DIGOXIGENINA.

Este tipo de marcación se lleva a cabo mediante la desnaturalización de DNA lineal y es mezclado con nucleótidos no marcados y marcados con digoxigenina, en presencia de una DNA polimerasa generando una sonda de doble cadena.

3.2 EXTRACCION DE DNA PROBLEMAS

Se utilizaron cultivos de HIV-1 establecidos en líneas celulares, incluyendo el virus prototipo HTLV IIIb/ LAV. Estos cultivos se mantienen en medio RPMI 1640, conteniendo 1% de solución de antibióticos-antimicóticos y 10% suero bovino fetal. El medio se cambia cada tercer día y se subcultiva de acuerdo a la densidad celular. El número de células infectadas en el cultivo se determina por medio de inmunofluorescencia.

Como control negativo se emplea DNA extraído de células Molt no infectadas mantenidas en las mismas condiciones que las infectadas, o bien, DNA obtenido de células mononucleares periféricas (CMP) de individuos donadores no infectados con el virus de inmunodeficiencia humana.

Para la extracción del DNA genómico se cultivan las células deseadas y se lavan con PBS (ver apéndice sol. G) dos veces centrifugando a 12000 rpm 20 seg., se resuspenden en un volumen conocido y se cuenta una alícuota de estas células en un Hematocitómetro. Se toma el volumen necesario, el cual debe contener 10×10^6 células, se centrifugan a 12000 rpm 20 seg y se resuspenden en 500 μ l de amortiguador de lisis A para obtener una concentración de 10,000 células/ μ l.

Se añade 10 µl de Proteínasa K (6 mg/ml) y se incuba a 60°C durante 1 hora, después de pasado el tiempo de incubación se calienta la muestra a 100°C durante 10 min. La cuantificación del DNA se realiza por determinación de su absorbancia en una dilución 1:200 a 260 nm.

3.3 DETECCIÓN DE DNA VIRAL POR SOUTHERN BLOT

Fijación de DNA a membranas de nylon.

Se emplearon los métodos de fijación directa en franja y transferencia por Southern blot.

Técnica de fijación directa en franja.

Esta fijación se realiza con el aparato "Hibri-Slot" Manifold (BRL), que consta de 24 franjas divididas en dos columnas. Se desmonta el aparato y se coloca la membrana de nylon (Zeta-probe Bio Rad) previamente humedecida en H₂O destilada, se monta el aparato y se atornilla adecuadamente. Por otro lado se desnaturalizan las muestras de DNA colocándolas en 0.5 ml de solución de desnaturalización (NaOH 0.4 N y EDTA 10 mM), se calientan a 100°C durante 10 min y se enfrían inmediatamente en baño de hielo. Se colocan las muestras en sus correspondientes franjas, se aplica vacío hasta que quede un poco de la solución, agregando a todas las franjas 0.5 ml de solución de desnaturalización (ver apéndice sol. H), aplicando vacío hasta sequedad. Se desmonta el aparato, se lava la membrana con SSC 2X (ver apéndice) y se fija el DNA por exposición a luz U.V. (U.V. Crosslinker -Hoeffer), durante dos min.

Técnica de transferencia tipo Southern Blot.

a) Digestión de las muestras.

Se digiere el DNA con la enzima de restricción de elección y se precipitan los fragmentos producidos con 1/10 de NaACO 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugan las muestras, se resuspenden en el mínimo volumen de H₂O y se calientan a 60°C durante 10 min.

b) Electroforesis en geles de agarosa.

Se hace un gel de agarosa al 0.8%, utilizando un peine de los requerimientos necesarios. Se coloca una muestra por carril (incluyendo el marcador de peso molecular) y se aplica un voltaje de 90 V, hasta que el colorante de las muestras sobrepase 2/3 del gel. Se tiñe el gel agregando al buffer de electroforesis (ver apéndice sol. I) 10 µl de Bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 5 min. Se observa el gel a luz U.V. y se toma una foto de este.

c) Depurinación y desnaturalización del DNA.

Después de la electroforesis el gel se sumerge en solución de depurinación (HCl 0.25M) durante 15 min. en agitación, se decanta esta solución y se añade solución de desnaturalización, se agita durante 30 min descartando y agregando nueva preparación agitando otros 30 min. Se lava el gel con solución de transferencia en agitación durante 15 min y se procede a transferir.

d) Transferencia alcalina.

Esta transferencia se realiza con el aparato "Turboblotter" (Schleicher & Schuell). Se coloca en la bandeja apiladora 20 papeles absorbentes gruesos secos, encima se colocan 4 papeles absorbentes delgados y un papel absorbente delgado impregnado de solución de transferencia (ver apéndice sol. J). Se coloca la membrana de nylon (Zeta-probe Bio Rad) y encima el gel de agarosa, se cubre con 3 papeles absorbentes delgados y se coloca una bandeja conteniendo solución de transferencia, haciendo un puente con una tira de papel absorbente haciendo contacto con la solución de transferencia y el resto de la pila. Se deja de esta forma 1 hora y se desmonta la transferencia lavando la membrana en solución de neutralización (ver apéndice sol. K) durante 5 min. Se fija el DNA a la membrana por exposición a luz U.V. durante 2 min., se seca en papel absorbente y se congela a -20°C.

Hibridación de membranas de nylon.

Las membranas ya transferidas se colocan en bolsas resistentes a ebullición, se agrega Solución de Hibridación (150 µl sol./cm² de membrana), se sella la bolsa herméticamente y se incuba durante 1 hora a 55°C si la solución de hibridación es acuosa o a 42°C si presenta 50% de formamida.

Se corta una esquina de la bolsa, se descarta esta solución y se añade nuevamente solución de hibridación, agregando la sonda desnaturalizada por ebullición a 100°C. Se sella la bolsa y se durante 16 horas a 55°C si la solución de hibridación es acuosa o a 42°C si presenta 50% de formamida.

Detección por isótopos radioactivos (³²P).

Si la sonda utilizada ha sido marcada con ³²P, se procede a retirar esta y se lava la membrana con SSC 2X. Se descarta esta solución y se lava en agitación y a temperatura ambiente por 15 min. con cada una de las siguientes soluciones: SSC 2X/SDS 0.1%; SSC 0.5X/SDS 0.1%; SSC 0.1X/SDS 0.1%.

De acuerdo a las necesidades requeridas pueden hacerse lavados a mediana y alta astringencia. Las condiciones son las siguientes:

ASTRINGENCIA	TEMPERATURA	SOLUCION
MEDIA	55°C	SSC 2X, SDS 0.1%
ALTA	68°C	SSC 0.2X, SDS 0.1%

Después de lavarse las membranas, se colocan sobre un papel filtro y se cubren con envoltura adherente para mantenerlas húmedas. Se exponen a placas de rayos X en un cassette a -70°C durante el tiempo necesario.

Detección por quimioluminiscencia.

Si se ha hibridado con una sonda marcada con digoxigenina, después de retirada esta, se lava dos veces, en agitación durante 5 min. con SSC 2X/SDS 1%, se tira esta solución y se agrega solución de SSC 1X/SDS 1% incubándose 30 min a 55°C. Se descarta esta solución y se lava con SSC 1X dos veces durante 5 min a temperatura ambiente.

Enseguida se lava dos veces la membrana con solución de bloqueo (ver apéndice sol. M), se tira esta solución y se agrega nueva solución de bloqueo incubando a temperatura ambiente y en agitación durante 30 min. Se añade anticuerpo Antidigoxigenina (Antidigoxigenin-AP, Fab fragments Boehringer Mannheim) y se agita durante 30 min a temperatura ambiente. Se descarta esta solución y se lava la membrana 5 min. en agitación con solución de bloqueo.

Se hacen tres lavados en agitación cada uno de 10 min. con solución de lavado (sol. N), por último se hacen dos lavados de 2 min. con solución de ensayo (sol. O) y se agrega sustrato quimioluminiscente (CSPD Tropic), a una concentración de 0.12 mg/ml, se incuba en agitación durante 5 min. y se coloca en una bolsa sellada exponiéndose a una placa de rayos X en un cassette por el tiempo necesario (figura 11).

3.4 AMPLIFICACION CON DISTINTOS OLIGONUCLEOTIDOS POR PCR

Se realizó la tipificación de los distintos genomas de HIV-1 por medio de amplificación con 6 pares de oligonucleótidos específicos para el HIV-1 y un par para amplificar globina. La mezcla de reacción para todas las amplificaciones es la siguiente:

H ₂ O	27.7-28.7 µl
Amortiguador 10X	5 µl
dNTP's (125 µM cada uno)*	5 µl
Oligonucleótido 1 (50 pM)	0.5-1 µl
Oligonucleótido 2 (50 pM)	0.5-1 µl
Taq polimerasa (2 U)	0.3 µl
aceite mineral	2 gotas
DNA (3-4 µg)	10 µl

* dNTPs contiene: dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Estos nucleótidos se encuentran a una concentración Stock de 100 mM (Pharmacia).

El amortiguador 10X contiene KCl 500 mM, Tris-HCl, pH = 8.3 100 mM y MgCl₂ 25 mM.

En todos los casos las condiciones en las cuales se llevaron a cabo las amplificaciones fueron de 35 ciclos: 45 seg. a 95°C; 45 seg. a 55°C y 1 min a 72°C.

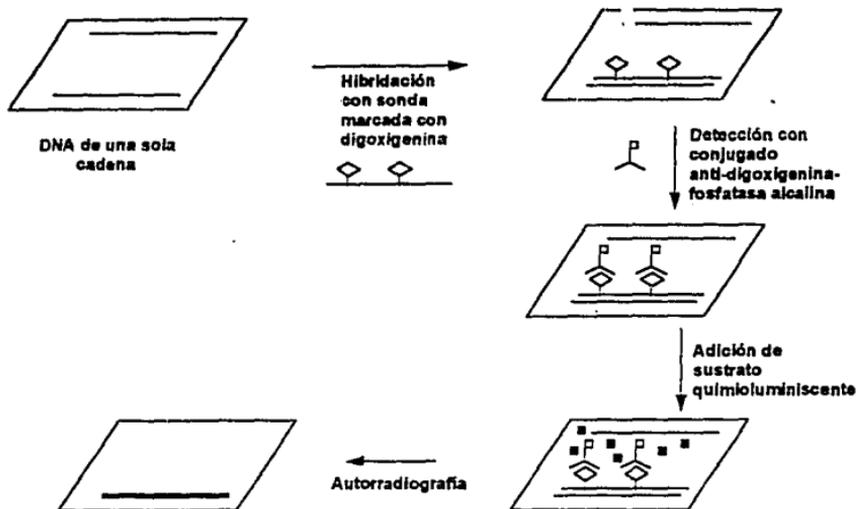


FIGURA 10: DETECCIÓN DE SONDAS MARCADAS CON DIGOXIGENINA.

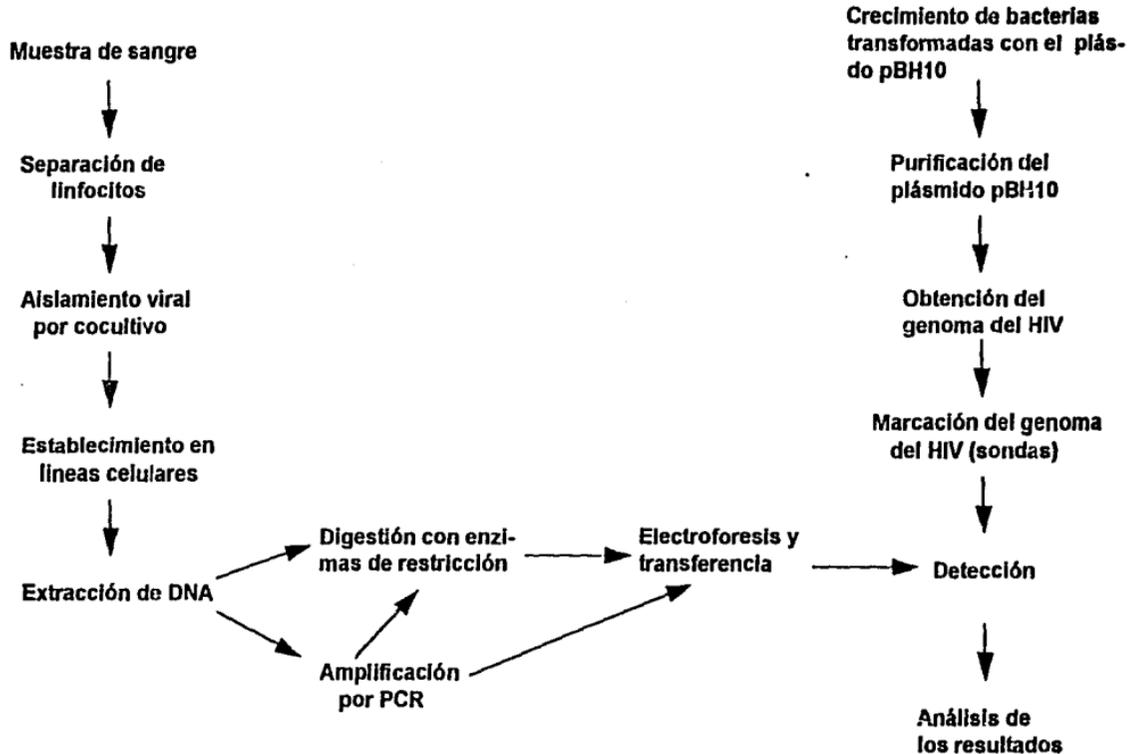
DetECCIÓN de los productos amplificados.

Los productos amplificados se detectaron por medio de electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, teniendo como referencia un marcador de peso molecular.

Identidad de los productos de amplificación.

A los productos amplificados de cada par de oligonucleótidos se les realizó una digestión con una o varias enzimas de restricción y se identificaron los fragmentos de esta digestión por medio de electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Una forma alternativa de identificación de estos fragmentos fue la posterior transferencia de los geles a membranas de nylon e hibridación con una sonda marcada con digoxigenina, detectándolos por medio de quimioluminiscencia.

DISEÑO EXPERIMENTAL



4.- RESULTADOS

4.1 MUESTRAS DE DNA PROBLEMAS

Se estudiaron cuatro diferentes cepas de HIV-1 crecidas en líneas celulares linfocitarias. Como control positivo se incluyó la cepa prototipo HTLV-IIIb y como control negativo el DNA de células no infectadas.

Los HIV-1 incluidos en el trabajo fueron: virus prototipo HTLV-IIIb en células Molt o Hut 78; aislado C20, en células Molt; aislado C20-1 en células Supt1; aislado P4 en células Molt y aislado P42 en células Supt1.

4.2 CONSTRUCCION DE LA SONDA

El plásmido pBH10, conteniendo el genoma del HTLV-IIIb, obtenido por medio de lisis alcalina y precipitación por polietilenglicol, produjo un rendimiento de 7.9 µg de plásmido por 100 ml de cultivo de bacterias. Esta cantidad de plásmido fue suficiente para realizar los ensayos posteriores.

La identidad del plásmido se corroboró por medio de dos digestiones con las enzimas Hind III y Sst I. En la figura 11 se muestran los fragmentos generados por cada una de las enzimas elegidas, los cuales corresponden con los fragmentos esperados, esto nos aseguró que se estaba trabajando con el plásmido adecuado.

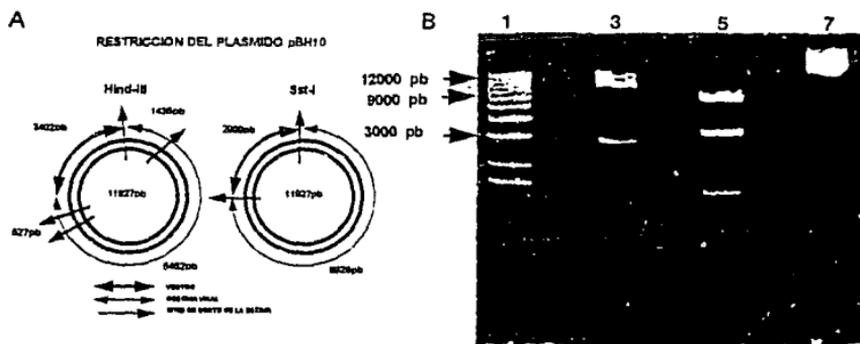


FIGURA 11: A) Muestra los cortes teóricos esperados con las enzimas señaladas. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del plásmido pBH10 después de haber sido sometido a restricción con las enzimas señaladas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 3: pBH10 digerido con Sst I. Carril 5: pBH10 digerido con Hind III. Carril 7: pBH10 sin digerir.

4.3 DETERMINACION DE VARIABILIDAD GENOMICA POR SOUTHERN BLOT

El fragmento de 9 Kb del genoma del HIV-1 (HTLV IIIb), obtenido por digestión del pBH10 con Sst-I, purificado por agarosa de bajo punto de fusión (BPF), se utilizó para hacer varios tipos de sondas tal como se describió en Materiales y Métodos.

Sonda del genoma completo del HIV-1 marcada con ^{32}P : Una primera sonda obtenida por marcaje con ^{32}P -dATP del genoma completo del HIV-1 y de la cual no se pudo determinar su actividad específica, fue empleada para detectar DNA obtenido del plásmido pBH10 y DNA proveniente del cultivo de la cepa C20-1. Por detección en franja utilizando pBH10, C20-1 y DNA de células no infectadas, en condiciones de baja astringencia, solamente resultó positivo el pBH10, detectando una concentración de 0.1 ng, que equivalen a 6×10^6 genomas virales.

Con una segunda sonda obtenida de la misma forma se hibridó otra fijación de DNA conteniendo las mismas cantidades de DNA viral que la anterior dando diferentes resultados; el DNA del pBH10 resultó positivo solo hasta 10 ng y C20-1 fue detectado a 15 μg (2.25×10^6 células).

Sondas de DNA del HIV-1 digerido con las enzimas Ava II y Pvu II marcado con ^{32}P : Con el fin de marcar de forma más eficiente el DNA del HIV-1 y obtener así una sonda con mayor incorporación, que nos permitiera detectar DNA proviral en las líneas celulares infectadas, se construyeron otras sondas marcando los productos de la digestión con las enzimas Ava II o Pvu II con ^{32}P .

La primera de estas sondas con DNA digerido con Ava II, a la cual tampoco se le determinó su actividad específica, se empleó para hibridar una fijación en franja que contenía DNA de pBH10, de la cepa prototipo HTLV IIIb, de la cepa viral C20-1 y de células no infectadas. Se utilizaron en este ensayo condiciones de baja astringencia. Esta sonda detectó DNA del plásmido pBH10 hasta una concentración de 1 ng, que equivalen a 6×10^7 genomas virales.

Con esta misma sonda se hibridó una membrana que contenía DNA digerido con la enzima de restricción Hind III, de pBH10 (0.8 μg), de HTLV-IIIb (10 μg) y de células no infectadas (10 μg), detectando solo DNA del plásmido pBH10.

A la segunda sonda, construida mediante la marcación del genoma del HIV-1 digerido con la enzima Pvu II, se le determinó su actividad específica, resultando esta de 6×10^5 cpm/ μg . Con esta sonda se hibridó una fijación en franja que contenía DNA de pBH10, de HTLVIIIb y de células no infectadas. En condiciones de baja astringencia esta sonda detectó: DNA de pBH10 hasta 0.1 ng (6×10^6 genomas virales); de HTLVIIIb hasta 0.1 μg (15000 células) y de células no infectadas hasta 2.5 μg (3.75×10^5 células). Después de lavar a mediana astringencia esta membrana para eliminar las uniones inespecíficas de la sonda con DNA heterólogo, solo permaneció la unión de esta con el DNA del plásmido pBH10, detectando hasta 0.1 ng.

Esta misma sonda se empleó para detectar DNA de HTLVIIIb digerido con la enzima Hind III, transferido por medio de la técnica de Southern blot. Se obser-

vó señal solamente al emplear 15 µg de DNA correspondientes a 2.25×10^8 células, no detectando concentraciones mayores o menores, ni tampoco DNA de células no infectadas (figura 12).

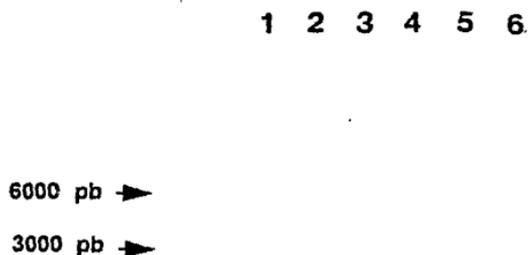


FIGURA 12: Análisis por Southern blot de DNA digerido con la enzima Hind III y detectado con una sonda de HIV digerido con Pvu II, marcada con ^{32}P por iniciación al azar. Camiles 1, 3 y 5: Células Molt 7.5, 10 y 15µg; Camiles 2, 4 y 6: HTLVIIIb 7.5, 10 y 15µg.

Sonda marcada con d-UTP-DIG por medio de iniciadores al azar y por PCR: Se utilizaron en forma alternativa marcaciones no radiactivas para construir sondas que detectaran DNA viral en líneas celulares. Una primera sonda se realizó marcando con digoxigenina el DNA del HIV-1 obtenido de la digestión con Sst I del pBH10, digerido con la enzima Pvu II, usando el método de iniciadores al azar. Esta sonda solo se probó en Southern blot, detectando hasta 10 ng de pBH10 (6×10^8 genomas virales) y con resultados negativos en el DNA de las células control no infectadas. Este ensayo se llevo a cabo en condiciones de astringencia media.

Una última sonda se realizó marcando con digoxigenina el DNA del HIV-1 digerido con la enzima Pvu II por medio de PCR. Esta sonda detectó en hibridación en franja DNA de pBH10 correspondiente a 0.02 ng (equivalente a 1×10^6 genomas virales) figura 13A y DNA de HTLVIIIb hasta 2 µg (equivalentes a 3.12×10^5 células) figura 13B. En hibridación en Southern blot solo resultaron positivos 1 y 0.1 ng de plásmido pBH10 (6×10^8 genomas virales) y no se detectó DNA de HTLVIIIb, el DNA control de células no infectadas no presentó reactividad (figura 13C).

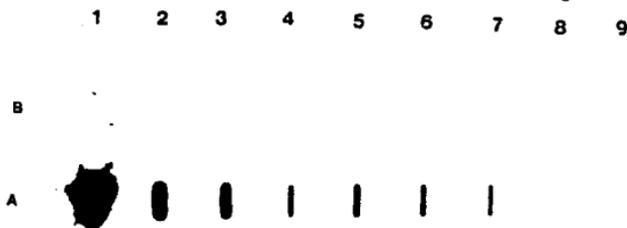


FIGURA 13A: Hibridación de fijación en franja, detectada con una sonda de HIV-1 digerido con PvuII marcada con dUTP-DIG por medio de PCR. Camiles A1-A9 : pBH10 100, 10, 1, 0.1, 0.08, 0.06, 0.05, 0.03 y 0.02 ng; B1-B9: DNA de virus Lambda 100, 10, 1, 0.1, 0.08, 0.06, 0.05, 0.03 y 0.02 ng.

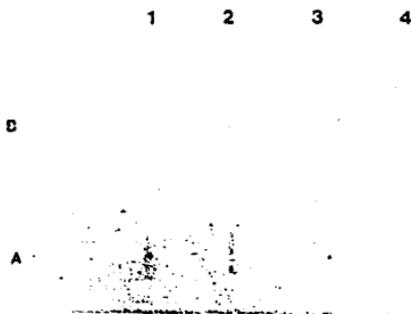


FIGURA 13B: Hibridación de fijación en franja, detectada con una sonda de HIV-1 digerido con PvuII marcada con dUTP-DIG por medio de PCR. Camiles A1-A4 : HTLVIIIb 16, 8, 4 y 2µg; B1-B4: Células Molt 16, 8, 4 y 2µg.

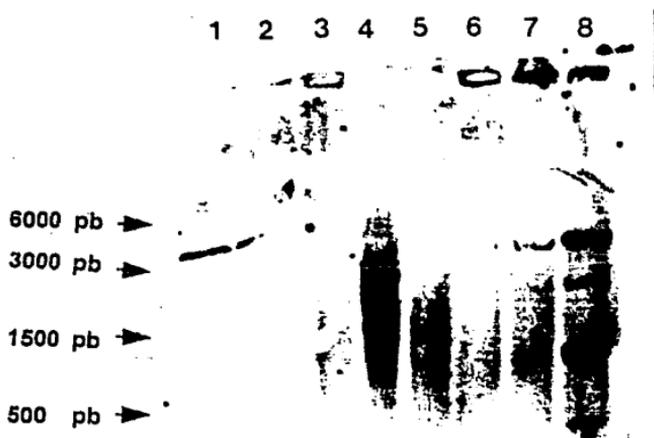


FIGURA 13C: Análisis por Southern blot de DNA digerido con la enzima Hind III, detectado con una sonda de HIV-1 digerido con Pvu II marcada con dUTP-DIG por medio de PCR. Camil 1: Células Molt (10µg); Camiles 2, 3 y 4: HTLVIIIb 10, 20 y 50µg; Camiles 5, 6 y 7: pBH10 0.01, 0.1 y 1 ng.

4.4 DETERMINACION DE VARIABILIDAD GENOMICA POR PCR

Debido a que las sondas obtenidas no alcanzaron la sensibilidad ni la reproducibilidad necesarias para la detección de DNA proviral en líneas celulares infectadas con el HIV-1 por la técnica de Southern blot y tomando en cuenta que el objetivo del trabajo era determinar la variabilidad genómica de estas cepas virales, se buscó un método alternativo que nos proporcionara la información para cumplir este objetivo.

Con este fin se amplificaron por PCR varias regiones del genoma del HIV-1 de las diferentes cepas virales y posteriormente los fragmentos amplificados se digirieron con enzimas de restricción comparando los patrones resultantes.

Se utilizaron 6 pares de oligonucleótidos que codifican para diferentes regiones del genoma del HIV-1 (figura 14), realizándose 7 amplificaciones.

En la tabla 4 se indican las amplificaciones realizadas y el tamaño del producto de amplificación obtenido.

TABLA 4
TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACION

INICIADORES	PRODUCTO DE AMPLIFICACION (pb)	LOCALIZACION EN EL GENOMA DEL HIV (5'-3')
P17 1/2	453	777-1230
P17 1/SK 431	721	777-1498
SK 145/SK 431	142	1356-1498
Pol 3/4	308	2844-3152
Env 3/4	534	5989-6523
KSI 5'/3'	336	7034-7370
Env 1/2	332	7683-8015

Para determinar que el DNA de las cepas estudiadas se encontraba en condiciones óptimas para los ensayos de amplificación, se sometieron previamente a un ensayo de PCR con un par de iniciadores para el gen de globina. Posteriormente se realizaron 7 amplificaciones con los 6 pares de oligonucleótidos antes mencionados, de las 4 cepas mexicanas y del virus prototipo. Los iniciadores P17 1 junto con SK 431 se emplearon para amplificar una secuencia mayor del gen gag. En la tabla 5 se muestran los resultados de todas estas amplificaciones con las distintas cepas virales.

TABLA 5
RESULTADOS DE LAS AMPLIFICACIONES

	IIIb	C20	C20-1	P4	P42
P17 1/2	+	-	-	-	+
P17 1/SK431	+	-	+	-	+
SK 145/SK 431	+	-	+	+	+
Pol 3/4	+	+	+	+	+
Env 1/2	+	+	+	+	+
Env 3/4	+	-	-	-	+
KSI 5'/3'	+	+	+	+	-

Para obtener más información de los productos de amplificación, se eligieron diferentes enzimas las cuales tuvieran su sitio de corte en los fragmentos estudiados, siendo los patrones de restricción teóricos los siguientes.

TABLA 6
DIGESTIONES DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACION

INICIADORES (pb DEL PRODUCTO)	ENZIMA(S)	FRAGMENTOS RESULTANTES	
		Número	Pares de bases
P17 1/P17 2 (453)	Pvu II	2	368 y 85
P17 1/SK431 (721)	Hind III	2	416 y 305
SK 145/SK 431 (142)	Pst I	2	61 y 81
Pol 3/Pol 4 (308)	Sau 3A	2	202 y 106
	Eco RV	2	169 y 139
Env 1/Env 2 (332)	Hae III	2	193 y 139
Env 3/Env 4 (534)	Ava II	2	171 y 363
KSI 5'/KSI 3' (336)	Pvu II	2	82 y 254
	Ava II	2	155 y 181

Se realizaron digestiones con las enzimas de restricción señaladas para cada producto de amplificación, obteniéndose los siguientes resultados.

Con el par de iniciadores P17 1/P17 2 solo amplificaron 2 cepas virales, el virus prototipo y el aislado P42. Los productos resultantes de estas dos cepas se digirieron con la enzima Pvu II, encontrándose el patrón teórico esperado en ambas cepas virales. En la tabla 7 se muestran estos resultados.

TABLA 7: Producto de amplificación de P17-1/2 (453 pb) digerido con Pvu II.

Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
P42	+		

Cuando se utilizaron los iniciadores P17 1/SK 431, solo se amplificaron las cepas C20-1, P42 y el virus prototipo HTLVIIIb. A estos amplificados se les digirió con la enzima Hind III mostrando el patrón de corte esperado en ambos casos (Tabla 8).

TABLA 8: Producto de amplificación de P17 1/SK 431 (721 pb) digerido con HlnD III.

Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
C20-1	+		
P42	+		

En el caso de la amplificación con los oligonucleótidos SK 145/SK 431, solo un aislado no amplificó, siendo el patrón de corte con la enzima Pst I el mismo para las otras cuatro cepas (Tabla 9).

TABLA 9: Producto de amplificación de SK 145/SK 431 (141 pb) digerido con Pst I.

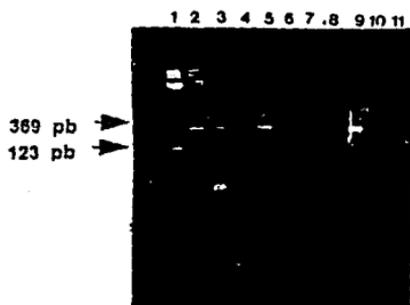
Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
C20-1	+		
P4	+		
P42	+		

Se amplificó con los iniciadores Pol 3/Pol 4 un fragmento de 308 pb para todos los aislados, sometiendo a estos productos a una digestión con la enzima Sau 3A. Tres de estos aislados (HTLVIIIb, P4 y P42) presentaron el patrón de corte teórico esperado, mientras que los aislados C20 y C20-1 no presentaron ningún sitio de corte (Tabla 10 y figura 15).

TABLA 10: Producto de amplificación de Pol3/4 (308 pb) digerido con Sau 3A.

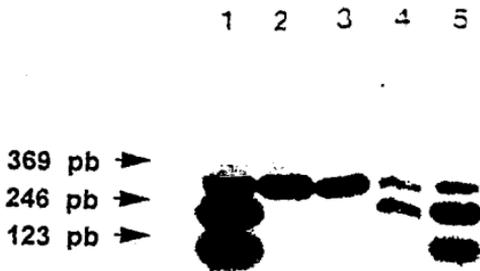
Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
C20			+
C20-1			+
P4	+		
P42	+		

A



Carril 1: Marcador de peso molecular.
 Carril 2: C20
 Carril 3: C20-1
 Carril 4: P4
 Carril 5: P42
 Carril 9: HTLVIIIb
 Carril 10: Control negativo
 Carril 11: Control de reactivos

B



Carril 1: HTLVIIIb
 Carril 2: C20
 Carril 3: C20-1
 Carril 4: P4
 Carril 5: P42

FIGURA 15: A: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con el par de iniciadores Pol 3/Pol 4. B: Detección de los productos de amplificación con el par de iniciadores Pol 3/Pol 4, digeridos con la enzima Sau 3A por medio de quimioluminiscencia utilizando una sonda de HIV-1 digerido con Pvu II marcada por medio de PCR con dUTP-DIG.

Con el par de iniciadores Env 1/Env 2 se amplificaron todos los aislados, estos se digirieron con la enzima Hae III, observando el patrón esperado en cada una de las cepas virales (Tabla 11 y figura 16).

TABLA 11: Producto de amplificación de Env 1/2(332 pb) digerido con Hae III.

Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
C20	+		
C20-1	+		
P4	+		
P42	+		

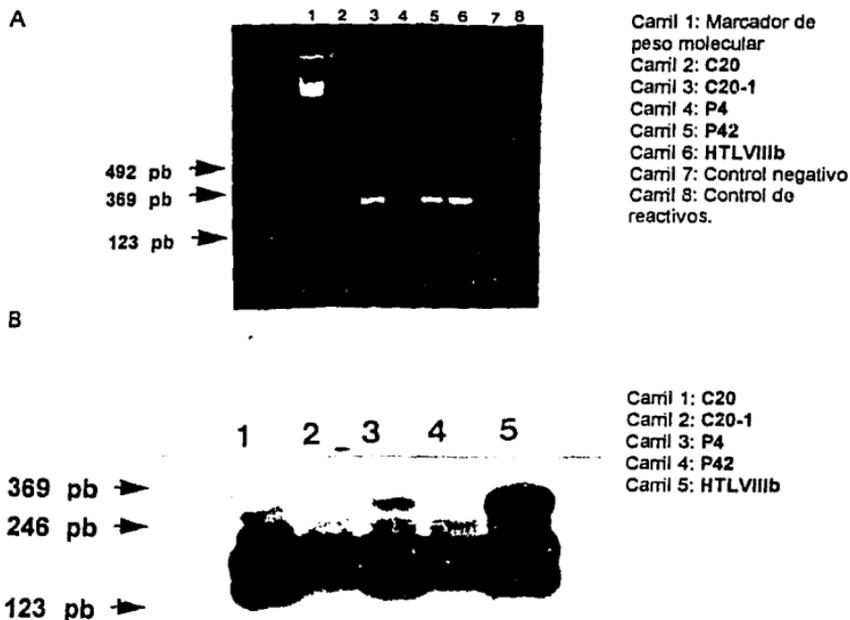


FIGURA 16: A: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con el par de iniciadores Env 1/Env 2. **B:** Detección de los productos de amplificación con el par de iniciadores Env 1/Env 2, digeridos con la enzima Hae III por medio de quimioluminiscencia utilizando una sonda de HIV-1 digerido con Pvu II marcada por medio de PCR con dUTP-DIG.

Con los oligonucleótidos Env 3/Env 4 solo amplificó la cepa P42 y el virus prototipo HTLVIIIb. Se realizó una digestión con la enzima Ava II resultando el corte teórico esperado para ambos aislados (Tabla 12).

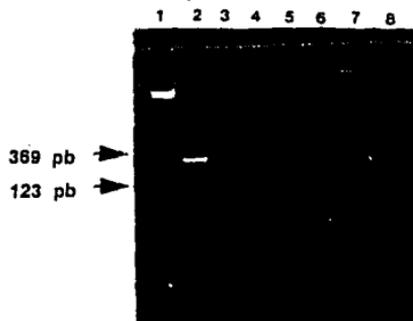
TABLA 12: Producto de amplificación de Env 3/4(534 pb) digerido con Ava II.

Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
P42	+		

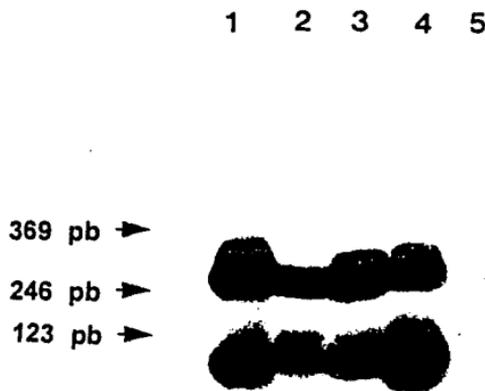
Por último con el par de iniciadores KSI 5'/KSI 3' solo el aislado P42 no amplificó. Se realizó una digestión con la enzima Pvu II y se observó que los aislados HTLVIIIb, C20-1 y P4 presentaron el patrón de corte esperado, mientras que la cepa C20, presentó un patrón de corte distinto. (Tabla 13 y figura 17).

TABLA 13: Producto de amplificación de KSI 5'/3' (336 pb) digerido con Pvu II

Cepa viral	Corte esperado	Corte distinto al esperado	No cortó
IIIb	+		
C20		+	
C20-1	+		
P4	+		
P42	+		

A

Carril 1: Marcador de peso molecular
Carril 2: HTLVIIIb
Carril 3: C20
Carril 4: C20-1
Carril 5: P4
Carril 6: P42
Carril 7: Control negativo
Carril 8: Control de reactivos

B

Carril 1: HTLVIIIb
Carril 2: C20
Carril 3: C20-1
Carril 4: P4
Carril 5: P42

FIGURA 17: A: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con el par de iniciadores KSI 5'/KSI 3'. B: Detección de los productos de amplificación con el par de iniciadores KSI 5'/KSI 3', digeridos con la enzima Pvu II por medio quimioluminiscencia utilizando una sonda de HIV-1 digerido con Pvu II marcada por medio de PCR con dUTP-DIG.

TABLA 14
RESULTADOS DE LAS DIGESTIONES DE LOS DIFERENTES AISLADOS

par de iniciadores/Enzima	IIIb	C20	C20-1	P4	P42
P17 1-2/Pvu II*	+/+	-	-	-	+/+
P17 1-SK 431/Hind III	+/+	-	+/+	-	+/+
SK 145-SK 431/Pst I	+/+	-	+/+	+/+	+/+
Pol 3-4/Sau 3A	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+
Env 1-2/Hae III	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Env 3-4/Ava II	+/+	-	-	-	+/+
KSI 5'-3'/Pvu II	+/+	+/**	+/+	+/+	-

* Se indica en el numerador si se encontró producto de amplificación y en el denominador si dicho producto fué cortado en el sitio esperado por la enzima indicada.

** Este producto de amplificación produjo fragmentos distintos de los esperados

5.- ANALISIS DE RESULTADOS

Existen diversas metodologías que permiten estudiar la variabilidad genómica de los organismos, todas ellas detectan cambios en la secuencia nucleotídica de los mismos.

Dentro de las metodologías empleadas se encuentran aquellas que podríamos definir como menos específicas y nos indican cambios mayores, como puede ser polimorfismo de sitios de corte por enzimas de restricción o cambios en capacidad de hibridación de regiones específicas del genoma variando la astringencia, mientras que existen otras totalmente específicas como la secuenciación, que nos permite detectar cambios hasta de una base nucleotídica.

Algunos reportes en la literatura indican el empleo de la técnica de Southern blot en fragmentos digeridos de genoma del HIV para estudiar la variabilidad del mismo, por lo que se decidió tratar de implementar esta metodología para realizar un tamizaje y detectar grupos virales en la población de HIV-1 encontrados en nuestro país.

Con este objetivo se prepararon diferentes sondas empleándose el plásmido pBH10 que contiene el genoma casi completo del virus prototipo HTLV IIIb. El plásmido fué purificado de bacterias transformadas con el mismo, obteniéndose 7.9 µg de plásmido (4.74×10^{11} copias de genoma de HIV-1) por 100 ml de cultivo de bacterias.

Con este material se preparó una sonda utilizando el genoma completo del HIV obtenido por digestión del pBH10 con la enzima Sst 1, e incorporando ^{32}P mediante el método de iniciadores al azar. Al utilizar esta sonda para hibridar DNA homólogo obtenido del propio plásmido y depositado en franjas se detectó el equivalente a 6×10^5 partículas virales, el DNA obtenido de células Molt infectadas no fué detectado y el DNA de células infectadas con el aislado mexicano C20-1 fué detectado en una equivalencia de 1.5×10^6 células infectadas.

Una segunda sonda se obtuvo utilizando el genoma completo del HIV-1 obtenido del pBH10 y digerido con la enzima Ava II, en este caso también se incorporó ^{32}P por el método de iniciadores al azar. Con esta sonda se alcanzó a detectar, en hibridación en franja, 6×10^7 partículas virales provenientes de pBH10 y no se detectó DNA de células infectadas con el virus HTLV IIIb.

Se construyó una tercera sonda de la misma forma que las dos anteriores empleando el genoma completo del HIV digerido con la enzima Pvu II. La actividad específica de esta sonda se pudo determinar resultando de 6×10^5 cpm/µg. Al emplearla en hibridación en franja se detectaron 6×10^6 partículas virales de HIV-1 obtenido de pBH10 y 15,000 células infectadas con el virus HTLV-IIIb. En esta ocasión se observó una alta reactividad de fondo con células no infectadas (3.75×10^5 células), la cual, al utilizar astringencia mediana desapareció, permaneciendo solamente la señal del pBH10.

Esta misma sonda se empleó para hibridar una transferencia de Southern Blot y fué posible detectar 15 µg de DNA de células infectadas con el virus HTLV IIIb, que corresponden a 2.25×10^6 células.

Debido a la imposibilidad de obtener una sonda marcada radiactivamente con la actividad específica necesaria se marcaron dos tipos de sondas con digoxigenina. La primera se construyó mediante el método de iniciadores al azar y sólo se empleó en Southern blot, detectando 6×10^8 partículas virales del pBH10. La segunda de estas sondas se marcó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, empleando 7 diferentes pares de oligonucleótidos que amplifican diversas regiones de los tres genes estructurales del HIV-1. Esta última sonda detectó en hibridación en franja 1×10^6 partículas virales en el pBH10 y 3.12×10^5 de células infectadas con el virus HTLV IIIb, mientras que en hibridación en Southern blot detectó 6×10^6 partículas virales en el pBH10 y no detectó células infectadas.

Al analizar los resultados al emplear las sondas obtenidas y comparando con la literatura (11) encontramos que para detectar el DNA proviral presente en las células infectadas, la sonda requerida para detectar entre 5 y 15 μg de DNA que corresponden a 0.75×10^6 - 2.25×10^6 células infectadas debería de tener una actividad específica de aproximadamente 2×10^8 cpm/ μg (11-17). En la única ocasión que se pudo determinar adecuadamente la actividad específica de las sondas producidas en el laboratorio esta fue de 6×10^5 cpm/ μg , que es 3 logaritmos por debajo de lo reportado en la literatura. Esta baja actividad específica podría explicar la baja sensibilidad de estas sondas en nuestros ensayos, ya que solo en un caso (la sonda del genoma del HIV-1 digerido con la enzima Pvu II) se detectaron 15 μg de DNA de HTLV IIIb, sin digerir y digerido con la enzima Hind III. En este mismo ensayo se obtuvieron resultados negativos al emplear mayor cantidad de DNA total, para explicar esto podríamos pensar en una posible inhibición de la hibridación específica por la presencia de un exceso de DNA celular que afecte o impida la reacción de la sonda con el DNA proviral.

El marcaje realizado por PCR resultó el más sensible y específico de todos, ya que detectó en hibridación en punto hasta 1×10^6 moléculas de plásmido pBH10 y en Southern 6×10^6 moléculas, sin embargo, al emplear esta sonda en hibridación de Southern blot los resultados no fueron los esperados.

Sabemos que nuestros resultados negativos no se deben al DNA empleado, puesto que la presencia de genoma de HIV-1 en el mismo ha sido demostrada por PCR y la cantidad añadida en los ensayos tanto en franja como de Southern blot fue cuantificada espectrofotométricamente y conocemos el número de células del cual fue extraído. Así mismo, los pasos de transferencia y/o fijación fueron verificados.

Después de analizar todos estos resultados se puede llegar a la conclusión que ninguna de las técnicas de marcaje empleadas nos permitió construir una sonda adecuada para detectar DNA proviral de células infectadas.

Debido a que no se pudo obtener una sonda adecuada para emplear la técnica de Southern blot para detectar DNA de células infectadas con el HIV-1, se decidió implementar la metodología de amplificación de segmentos específicos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual nos permitió amplificar diversas regiones del genoma proviral presente en diferentes aislados virales y determinar la variabilidad en estos fragmentos.

Empleando esta metodología podemos medir el cambio de la secuencia nucleotídica del DNA blanco considerando ya sea la variación en los sitios de hibridación que produzca un resultado negativo de la amplificación, o por cambios en el tamaño de los fragmentos obtenidos o finalmente por los patrones de restricción de dichos fragmentos. Hay reportes en la literatura en que emplean esta metodología de PCR para determinar la variabilidad genómica de cepas de HIV (39-42).

En todos los ensayos fueron incluidos los controles necesarios para permitirnos asegurar que los resultados negativos en alguna amplificación no eran debidos a fallas metodológicas.

En la figura 18 podemos observar que con respecto al gen gag, los iniciadores P17 1/P17 2 solo amplificaron el virus prototipo (IIIb) y el aislado P42, empleando P17 1 con SK 431 solo amplificaron el prototipo y los aislados mexicanos C20-1 y P42, mientras que los iniciadores SK 145/SK 431 permitieron la amplificación de todas las cepas exceptuando al aislado C20. Estos resultados indican, en los casos en que no hubo amplificación, que hay diferencias en la secuencia de nucleótidos en la zona de hibridación de uno o dos de los oligonucleótidos de cada par, encontrando que la región de la proteína p17 es más variable entre estos aislados que la región de p24 que probó ser más conservada.

Al analizar los fragmentos obtenidos cortando con enzimas de restricción los productos de amplificación de los pares de oligonucleótidos P17 1/P17 2, P17 1/SK 431 y SK 145/SK 431 no se observó ninguna diferencia con respecto al patrón teórico esperado en los aislados mexicanos con respecto al virus prototipo IIIb (figura 19). Esto nos está indicando que entre los aislados que no presentaron diferencias en el sitio de hibridación con los oligonucleótidos, tampoco encontramos diferencias en el sitio de corte de las enzimas de restricción empleadas.

Cuando se emplearon los iniciadores Pol 3/Pol 4 que corresponden a una región del gen pol, todos los aislados amplificaron y al realizar digestiones con las enzimas Sau 3A y Eco RV observamos que en el primer caso los aislados C20 y C20-1 perdieron su sitio de corte, mientras que el resto de los aislados lo conservan. En la digestión con Eco RV todos los aislados presentaron el mismo patrón de restricción (figuras 18 y 19).

El gen env fué estudiado amplificando con 3 pares de oligonucleótidos. La secuencia nucleotídica comprendida entre las proteínas de envoltura gp41 y gp120 amplificada por los oligonucleótidos Env 1/Env 2, no presentó ninguna variación entre los diferentes aislados, ya que todos ellos amplificaron con este par de iniciadores y en la digestión con la enzima Hae III todos presentaron los mismos sitios de corte. En lo que respecta a los primeros KSI 5'/KSI 3', que amplifica la secuencia nucleotídica que codifica para la región variable 3 (V3) que es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes en la proteína de envoltura gp120, solo el aislado P42 no amplificó, los aislados C20-1 y P4 presentaron el patrón de corte teórico esperado para el virus prototipo HTLV IIIb mientras que el aislado C20 presentó un patrón de corte distinto.

Por último se analizó la región del genoma proviral que codifica para el péptido guía y la proteína gp120 con los oligonucleótidos Env3/Env4. Solo el virus

prototipo HTLV IIIb y el aislado mexicano P42 amplificaron con este par de iniciadores, presentando el mismo patrón de corte con la enzima *Ava* II.

Los resultados de las amplificaciones se resumen en la figura 18, en la que se muestran los sitios de hibridación de cada par de iniciadores con el virus prototipo y los obtenidos con cada uno de los 4 aislados mexicanos estudiados.

SITIOS DE HIBRIDACION DE LOS DIFERENTES OLIGONUCLEOTIDOS

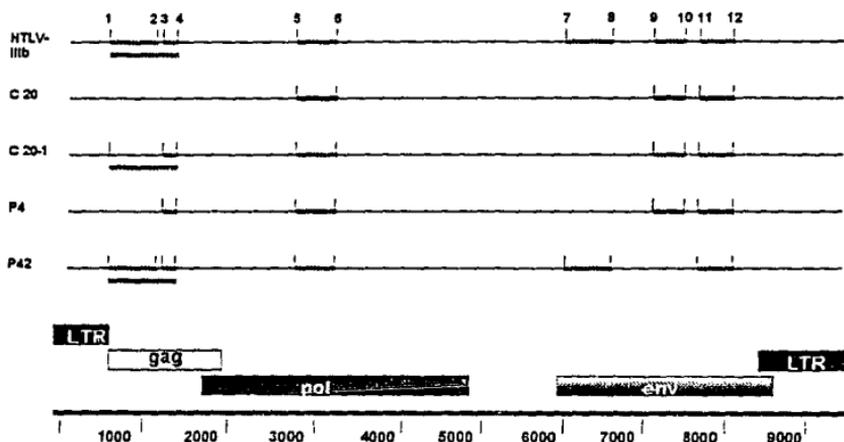


Figura 18: En la gráfica se muestran enumerados los sitios de hibridación de los oligonucleótidos empleados en el trabajo en los diferentes aislados de HIV-1. Estos oligonucleótidos son: 1) P17-1; 2) P17-2; 3) SK-145; 4) SK-431; 5) Pol-3; 6) Pol-4; 7) Env-3; 8) Env-4; 9) KSI-5; 10) KSI-3; 11) Env-1; 12) Env-2. Los diferentes sitios de hibridación se muestran con una barra, la ausencia de esta indica no hibridación.

En la figura 19 se muestran los sitios de corte de los fragmentos amplificados.

PATRON DE CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCION

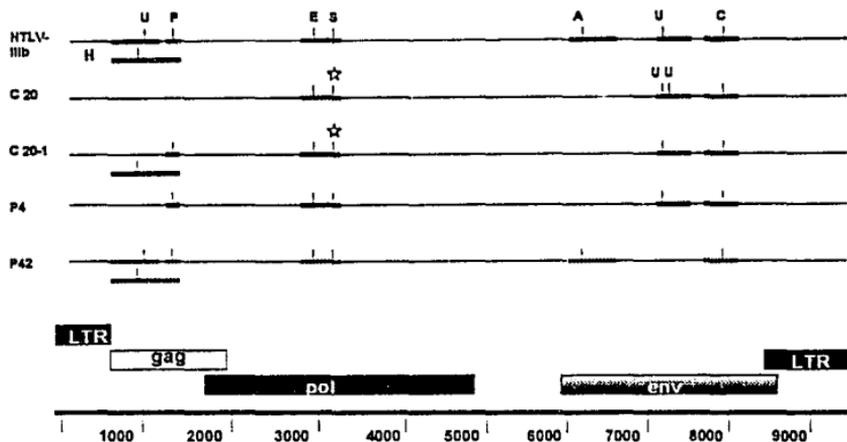


Figura 19: En la gráfica se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción en los diferentes aislados. Las enzimas son: H) Hind III; U) Pvu II; P) Pst I; E) Eco RV; S) Sau 3A; A) Ava II; C) Hae III. Las regiones amplificadas en cada aislado se indican con una barra, los sitios donde se realizaron cortes se indican con una línea horizontal. El asterisco indica pérdida y la doble línea duplicación del sitio de corte.

Utilizando los 7 pares de oligonucleótidos disponibles se pudo amplificar 23 % del total del genoma del HIV-1. Podemos considerar que por lo tanto existen 7 sitios de hibridación (dobles) que tendrían que ser reconocidos para obtener una amplificación positiva y además 8 sitios de cortes con enzimas de restricción en partes comprendidas en los fragmentos de amplificación, los cuales fueron analizados como lugares teóricos de variación. En la siguiente tabla se muestra el porcentaje de homología entre las diferentes cepas virales mexicanas con respecto al virus prototipo HTLV IIIb.

TABLA 13
PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA ENTRE LOS AISLADOS ESTUDIADOS Y LA
CEPA PROTOTIPO HTLV IIIb.

CEPA VIRAL	SITIOS DE HIBRIDACION*	% DE HOMO LOGIA CON HTLV-IIIb	SITIOS DE CORTES DE RESTRICCIÓN*	% DE HOMO LOGIA CON HTLV-IIIb
C20	3/7	42%	2/4	50%
C20-1	5/7	71%	5/6	83%
P4	4/7	57%	5/5	100%
P42	6/7	85%	6/6	100%

* conservados/total

Existe una gran heterogeneidad presente en los aislados mexicanos con respecto al virus prototipo. El más divergente fué el aislado C20, el cual presentó un 42% de homología en sitios de hibridación y un 50% en sitios de cortes de restricción, mientras que el aislado más homólogo al prototipo resultó el P42, con un 85% de sitios de hibridación y el 100% de homología en sitios de cortes de restricción.

Esta variabilidad genómica presentada por las cepas virales mexicanas también se refleja en sus propiedades biológicas. Se ha estudiado en el laboratorio algunas de estas propiedades en diferentes aislados, presentando variaciones en la tasa de replicación, en propiedades citopatogénicas y en la capacidad de infectar distintas líneas celulares tanto monocíticas como linfocíticas (43).

Por otro lado también se ha observado variación en los diferentes aislados mexicanos en la secuencia de aminoácidos de la región variable 3 (V3) de la glicoproteína gp 120, donde se encuentra situado el dominio principal de neutralización. Esta región es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes contra el virus y el cambio de aminoácidos de esta región se traduce en variación antigénica que afecta la respuesta inmune humoral (44).

También se ha observado diferencias en los pesos moleculares de las proteínas de un aislado mexicano con respecto al virus prototipo HTLV IIIb, esta diferencia no se ve reflejada en sus propiedades de crecimiento ni en su reactividad inmune (43).

6.- CONCLUSIONES

Durante el presente estudio se trabajó en la estandarización de la técnica de Southern blot, sin embargo no se logró construir una sonda con alta actividad específica que detectará DNA proviral en células infectadas, por lo tanto no se utilizó esta metodología para estudiar variabilidad genómica.

Esta variabilidad se estudio analizando los sitios de hibridación de diferentes iniciadores empleados en la amplificación de diversas regiones del genoma de HIV en varios aislados mexicanos, así como sitios de cortes con enzimas de restricción de dichos fragmentos amplificados.

Se determinó por este método una gran variabilidad entre los aislados mexicanos con respecto al virus prototipo HTLV IIIb. Esta variabilidad fluctuó entre un 20 y 50% en los sitios de hibridación de los iniciadores empleados y entre un 0-50% en los sitios de corte con las enzimas de restricción.

Existe también una gran heterogeneidad entre cada uno de los aislados mexicanos estudiados, resultando dos aislados secuenciales de un paciente (C20 y C20-1) heterogeneos entre si y con respecto a los demás.

La variabilidad se presenta en todos los sitios estudiados en los tres genes estructurales del HIV-1 (gag, pol y env).

Conjuntando todos estos datos y los reportados anteriormente por el laboratorio pueden ayudarnos a clasificar fenotípica y genotípicamente a los virus aislados en nuestro país.

7.- APENDICE

SOLUCIONES

A.-Medio Luria-Bertini.

Bacto triptona 10 g, Extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g. Se ajusta el pH=7, se lleva a un litro y se esteriliza 20 minutos a 15 lb/cm² de presión.

B.-Solución de lisis I.

50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH=8 y 10 mM EDTA.

C.-Solución de lisis II.

200 mM NaOH y 1% SDS.

D.-Solución de lisis III.

60 ml de acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético y 28.5 ml de H₂O.

E.-Tris-EDTA (TE).

10 mM Tris-HCl y 1mM EDTA.

F.-Solución amortiguadora de muestra para DNA.

15% ficoll, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% de xilencianol.

G.-Amortiguador de fosfatos (PBS).

0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na₂HPO₄ y 0.02% KH₂PO₄.

H.-Solución de desnaturalización.

3 M NaCl y 0.4 M NaOH.

I.-Amortiguador para electroforesis.

242 g Tris Base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M (pH=8.0).

J.-Solución de transferencia.

3M NaCl, 8 mM NaOH y 2 mM sarkosyl.

K.-Solución de neutralización 5X.

Amortiguador de fosfatos 1M pH=6.8.

L.-Solución de hibridación.

0.25 M NaHPO₄ pH=7.2, 0.25 M NaCl, 7% SDS, 1 mM EDTA c/s 50 % de formamida.

M.-Solución de bloqueo para quimioluminiscencia.

0.2% de Reactivo de bloqueo (Tropix Inc), 0.5% SDS en PBS 1X.

N.-Solución de lavado para quimioluminiscencia.
0.5% SDS en PBS 1X.

O.-Solución de ensayo para quimioluminiscencia.
0.1 M dietanolamina, 1mM MgCl₂ y ajustar el pH=10.0.

P.-Sustrato quimioluminiscente.
0.25 mM de sustrato quimioluminiscente CSPD (Tropix) en solución de ensayo.

El resto de los reactivos y soluciones se mencionan a lo largo de la metodología.

8.- BIBLIOGRAFIA

1. - Gallo C. Robert and Montagnier Luc. AIDS in 1988. In *What science knows about AIDS Scientific American* 1988, 259:25-32.
2. - Barré-Sinoussi et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome. *Science* 1983, 220:868-871.
3. - Clavel Francois et al. Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS. *Science* 1986, 233:343-346.
4. - Gallo C. Robert. The first human retrovirus. *Scientific American* 1986, 255:78-88.
5. - Gallo C. Robert. The AIDS virus. *Scientific American* 1987, 256:38-48.
6. - Mildvan Donna, Solomon Steven. The spectrum of disease due to Human Immunodeficiency Virus infection. In: *Current Topics in AIDS* Gottlieb, M.S. et al Vol. 1. John Wiley & Sons Great Britain 1987. pp 45-55.
7. - Fields Bernard, Knipe David. *Fields Virology Vol 2*. Raven Press Nueva York 1990. pags 1437-1570.
8. - Soler Claudín Carmen. Vacunas para el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. En: *Vacunas Ciencia y Salud*. Escobar Gutierrez Alejandro, Valdespino J.L. y Sepulveda A .J. (ed). México S.S.A. 1992 pp 421-437.
9. - Callebaut Christian, Krust Bernard et al. T cell activation antigen, CD 26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. *Science* 1993, 262:2045-2050.
- 10.- Sodroski J, Kowalski M, Haseltine W. Structure y function of the HIV envelope. Implications for vaccine development. In: *AIDS vaccine research and clinical trials*, Putney SD, Bolognesi DP (ed). New York: Marcel Dekker 1990. pp 93-106.
- 11.- Hahn Beatrice, Shaw George, et al. Genetic Variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at Risk for AIDS. *Science* 1986, 232:1548-1553.
- 12.- Hahn Beatrice, Shaw George, et al. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* 1984, 312:166-169.
- 13.- Shaw George, Hahn Beatrice et al. Molecular characterization of Human T-Cell Leukemia (Lymphotropic) Virus Type III in the Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Science* 1984, 226:1165-1171.

- 14.- Wong Staal Floosie, Shaw George, Hahn Beatrice. Genomic diversity of Human T Lymphotropic Virus Type III (HTLV-III). *Science* 1985, 229:759-762.
- 15.- Benn Steven, Rutledge Rosamond et al. Genetic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science* 1985, 230:249-251.
- 16.- Hahn Beatrice, Shaw George. Genetic variability in Human Immunodeficiency viruses. In: *AIDS Vaccine research and clinical trials*. Putney SD, Bolognesi DP (ed). New York: Marcel Dekker 1990. pp 121-135.
- 17.- Saag Michael, Hahn Beatrice. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* 1988, 334:440-444.
- 18.- Meyerhans Andreas, Cheyner Rem et al. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo. Are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 1989, 58: 901-910.
- 19.- Hahn Beatrice, Shaw George. Genetic variation among isolates of HIV-1 and HIV-2. In: *HIV detection by genetic engineering methods*. Luciw Paul, Steiner Kathelyn (ed).
- 20.- Tersmette M. The Role of HIV variability in the pathogenesis of AIDS. In: *Immunology of HIV infection*. Graham Bird (ed). Kluwer Academic Pubs. London 1992 pp 31-43.
- 21.- Rosenberg Zeda, Fauci Anthony. Immunology of HIV infection. In: *Fundamental immunology*. William Paul (ed). Raven Press. New York 1993 pp 1375-1397.
- 22.- Wilber Judith. New developments in diagnosing HIV infections. In: *AIDS clinical review*. Volderbing Paul (ed). Dekker New York 1991 pp 1-17.
- 23.- Constantine Niel, Callahan Jonny, Watts Douglas. *Retroviral Testing. Essentials for quality control and laboratory diagnosis*. CRC Press U.S.A. 1991 pp 35-85.
- 24.- Healey D.S., et al. A preliminary evaluation of five HIV antigen detection assays. *J. Virol. Meth* 1988, 20:115-125.
- 25.- Saiki Randall. Amplification of genomic DNA. In *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis Michael (ed). Academic Press U.S.A. 1990 pp 13-20.
- 26.- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press U.S.A. 1989. Cap 9-10.

- 27.- Southern Edwin. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975, 98:503.
- 28.- Southern Edwin. Gel electrophoresis of restriction fragments. In *Methods in enzymology* Vol 68. Academic Press 1979 pp 152-182.
- 29.- Meinkoth J, Goeffrey Wahl. Hybridation of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical biochemistry* 1984, 138:267-284.
- 30.- Khandjian E.W. Optimized hybridization of DNA blotted and fixed to nitrocellulose and nylon membranes. *Bio/Technology* 1987, 5:165-167.
- 31.- Denhad David. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochemical and biophysical research communications* 1966, 23:641-646.
- 32.- Wahl Geoffrey, Stern Michael and Stark George. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 1979, 76:3683-3687.
- 33.- Amasino Richard. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Analytical biochemistry* 1986, 152:304-307.
- 34.- Bronstein I, Voyta J.C. et al. Rapid and sensitive detection of DNA in Southern blots with chemiluminescence. *BioTechniques* 1990, 8:310-313.
- 35.- Feinberg Andrew and Vogelstein Bert. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 1983, 132:6-13.
- 36.- Rigby Peter, Dieckmann Marianne et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by Nick Translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 1976, 113:237-251.
- 37.- Retner L., Haseltine W., Petarca R., Livak K., Starcich B., Josephs F., Doran E., Rafalski A., Whitehorn A., Baumeister K., Ivanoff L., Petteway R., Peterson M., Lautenberger A., Papas T., Ghayeb J., Chang N., Gallo R., Wong-Staal F. *Nature* 1985, 313:277-284.
- 38.- Melton D.A., Krieg M.R., Rebaguati M.R., Maniatis T., Zinn K., Green M.R. *Nucleic acid research* 1984, 12:7035-7056.
- 39.- Moodley D, Reddy K. Heterogeneity of HIV-1 in South Africa detected by polymerase chain reaction. *AIDS* 1993, 7:1538-1539.

- 40.- Candotti Daniel, Jung Magdalena et al. Genetic variability affects the detection of HIV by polimerase chain reaction. AIDS 1991, 5:1003-1007.
- 41.- McCutchan Francine, Buell Eric Sanders et al. Genetic comparison of human immunodeficiency virus (HIV-1) isolates by polimerase chain reaction. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 1991, 4:1241-1250.
- 42.- McCutchan Francine, Hegerich Patricia et al. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. AIDS Research and Human Retroviruses 1992, 8:1887-1895.
- 43.- Soler Claudín Carmen. Caracterización Molecular de la Epidemia de SIDA en México. En Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Tomo I, UNAM 1993. p:555-563.
- 44.- Gudiño Rosales José Carmen Tesis de Maestría en Investigación Bimédica Básica, UACPyP. 1994.