



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA *PHAGE DISPLAY*
EN EL ESTUDIO DE TRES EPÍTOPOS DEL VIH-1
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL DE UN PACIENTE MEXICANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

P R E S E N T A :

MARÍA FERNANDA VALLADARES SAMPERIO



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA
Vocal: Prof. FERNANDO GARCÍA TAMAYO
Secretario: Prof. KARLEN GAZARIAN
1er. Suplente: Prof. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS
2do. Suplente: Prof. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
UNAM

Dr. Karlen Gazarian

Asesor

M. en C. Yadira Palacios
Rodríguez

Supervisor Técnico

María Fernanda Valladares
Samperio

Sustentante

Reconocimiento

A la Dra. Tatiana Gazarian quien formó parte activa en el desarrollo experimental de este trabajo.

Agradecimientos

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada en el proyecto IN210402.

Al Dr. Fernando García Tamayo y al Q.F.B. Saturnino de León Chapa, porque sin duda enriquecieron este trabajo con sus sugerencias y comentarios.

Al Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz por su valiosa colaboración tanto en la donación del suero del paciente como en la proporción de los datos clínicos.

A la Q.F.B. Fabiola Mújica y al Biol. José Alberto Campillo por su confianza y su amistad; entusiasmo y apoyo incondicional en este trabajo.

A la Dra. Tatiana Gazarian con especial cariño, por sus enseñanzas, por el apoyo en el laboratorio, pero sobre todo por su comprensión y trato gentil.

Al Dr. Karlen Gazarian, que en su desempeño como asesor quiero destacar su interés por transmitir conocimientos y experiencia. Con profundo respeto y gran admiración.

Una mención especial merece, así como toda mi gratitud, respeto y admiración la candidata a Doctora Yadira Palacios Rodríguez, protagonista directa de mi aprendizaje y consejera profesional, que se ha dedicado con seriedad y paciencia a la elaboración de esta tesis, tanto en la parte experimental como en la redacción. Sin ella poco o nada habría podido hacer.

Dedicatorias

A mi mamá y hermanas:

Fuente de orgullo, inspiración y grandes satisfacciones. Protagonistas de todos mis logros. Gracias mamá, Gaby y Karla, por creer en mí, por estar a mi lado en todo momento, pero sobre todo por darme valor para seguir adelante. Cuento con ustedes como siempre; cuentan conmigo para siempre. ¡Dios las bendiga!

A mi amado e inolvidable papá:

Hombre talentoso, admirable, excepcional. Ejemplo de coraje, disciplina y liderazgo. Estés donde estés, gracias papá, por iluminar mi camino con tu luz y por haber sembrado en mí la semilla que me produjo la inquietud de conocer y alcanzar la cumbre del éxito. Con profundo e infinito amor.

A mis tíos adorados:

Gregorio Samperio García. Con la más profunda admiración y respeto por su esfuerzo, seguridad, tenacidad y disciplina para sobrevivir con éxito a tanta adversidad, por ser un ejemplo de lucha, de trabajo constante y de búsqueda de felicidad.

Cupertino Samperio García. Que respeto y admiro tanto por su calidad como humano y amor por la verdad; y porque pese a todo lo ocurrido, su corazón sigue siendo el mismo en grandeza, sensibilidad, alegría y bravura. ¡Vamos equipo!

A mis abuelitos, Kiko y Kika:

Grandes sabios de la vida y mis mejores maestros de valentía y fortaleza espiritual

A todos los demás miembros de mi gran familia:

Con especial gratitud a mi tía Coco, tío Francisco, tío Cecilio, tía Lupe, tía Celia, Diana, Bernardo, Laura y Angélica, que mucho me quieren, y que yo adoro por ser siempre generosos y leales; y por demostrarme que la unión hace la fuerza.

Al Dr. José Antonio Palomo:

Mi ídolo, mi héroe, mi salvador. Hombre talentoso, honesto, apasionado por su trabajo. El mejor cardiólogo de este país tan necesitado de ética, profesionalismo y eficiencia. Con profunda e inalterable admiración y respeto.

A José Alberto Campillo:

Mi amigo, mi compañero, mi confidente. Persona extraordinaria empeñada en arribar a puertos remotos a pesar de las dificultades del trayecto. Gracias Bert, por haber estado conmigo en el lugar correcto, en el momento correcto. Te quiero mucho!

A la banda de la Facultad de Química:

Chucho, Liz, Ale, Joel, Paula, Fabi, Areli P, Areli T, Tere, Enequina, Martín, Agustín, Maribel, Rosa. Amig@s incondicionales que me enseñaron que el cariño y la amistad son las armas más poderosas para vencer la enfermedad.

A Moní Hidalgo , Rafa Muñoz., Paola Mendoza:

Preciosas compañeras de trabajo, inteligentes, sensibles; que para fortuna mía, me eligieron como amiga.

A Luis Macedo y Alfredo Sánchez:

Mis amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Apreciables, solidarios, incondicionales, que me tendieron su mano cuando más lo necesitaba.

A Verónica Orduña:

Mi entrañable amiga, brillante profesionalista e imparable cuando se trata de hacerme sonreír.

A todas aquellas personas con las que he compartido momentos inolvidables y que permanecerán por siempre sin necesidad de estar:

Ismael, Sandra A, Sandra C, Minerva, Liz, Cris, Diana

A Dios:

Porque definitivamente sin su voluntad, nada de esto hubiera sido posible. Gracias, por haberme dado una segunda oportunidad de vida para continuar el camino cerca de mis seres queridos.

Un año ha transcurrido desde aquel acontecimiento.
Ha sido difícil. El daño en mi corazón fue terrible,
pero me di cuenta que existe una luz de fe y esperanza.
Gracias a la orientación y consejos médicos proporcionados por
profesionistas expertos del HCCMNSXXI, a los ejercicios
de rehabilitación aprendidos en el hospital, pero sobre todo
al amor de las personas que me rodean,
logré recuperar la confianza en mí misma, elevar el ánimo,
vencer mis miedos y recobrar fuerzas para seguir la vida paso a paso
con mi caminata, dándole salud a mi corazón para vivir
muchos años más con mis seres queridos.
A todas aquellas personas que de manera
directa o indirecta contribuyeron a mi recuperación,
¡Un millón de gracias!

MF Valladares

Índice

Glosario de Abreviaturas	III
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Características generales del VIH-1	2
2.1.1 Epidemiología	2
2.1.2 Orígenes del VIH-1	3
2.1.3 Estructura del VIH-1	4
2.1.4 Organización del genoma viral	4
2.1.5 El ciclo de replicación del VIH-1	6
2.1.5.1 Células blanco y mecanismo de entrada	6
2.1.5.2 Eventos post-fusión	8
2.2 Sistema inmune y VIH-1	9
2.2.1 Historia natural de la infección	9
2.2.1.1 Diagnóstico	10
2.2.2 Inmunidad celular	12
2.2.3 Inmunidad humoral	12
2.3 Terapia antirretroviral	13
2.4 Tecnología <i>Phage Display</i> en el estudio del VIH-1	15
2.4.1 Bibliotecas de péptidos <i>phage display</i>	15
2.4.2 Aplicaciones de <i>phage display</i> en el mapeo de epítomos del VIH-1	17
3. Antecedentes	19
4. Justificación	20
5. Hipótesis	20
6. Objetivos	21
7. Materiales y Métodos	22
7.1 Selección del paciente	22
7.2 Suero humano	22
7.3 Purificación de anticuerpos IgG a partir del suero	22
7.4 Cuantificación de IgG	22
7.5 Biblioteca de péptidos <i>phage display</i>	23
7.6 Selección de afinidad de fagos por <i>biopanning</i>	23
7.7 Aislamiento de clonas de fago seleccionadas por los anticuerpos	24
7.8 Secuenciación de ADN	24
7.9 Reactividad en ELISA de las clonas de fago seleccionadas	25

7.10 Bioseguridad	25
8. Resultados	26
8.1 Selección de clonas con IgG de un paciente infectado por VIH-1	26
8.1.1 Características clínicas del paciente	26
8.1.2 Selección de clonas antes de recibir TARV	26
8.1.2.1 Clonas con motivo GQ/PGP	27
8.1.2.2 Clonas con motivo CxxC	29
8.1.2.3 Clonas con motivo CxxKxxC	30
8.1.3 Selección de clonas después de TARV	32
9. Discusión	34
10. Conclusiones	43
11. Bibliografía	44
Apéndice I. Soluciones, amortiguadores y medios de cultivo	54
A.1.1 Amortiguadores para purificación de IgG	54
A.1.2 Amortiguadores y soluciones para <i>biopanning</i>	54
A.1.3 Medios de cultivo para <i>biopanning</i>	54
A.1.4 Soluciones para obtención de ADN de cadena sencilla (<i>ss-form</i>)	55
A.1.5 Preparación del cultivo de <i>E. coli</i> cepa ER2738	55
A.1.6 Gel de acrilamida (6%) para secuenciación de ADN	55
A.1.7 Gel de agarosa	55
A.1.8 Soluciones para ELISA	55
Apéndice II. Concentración de los eluatos de IgG	57
A.2.1 Paciente infectado por VIH-1	57
A.2.2 Sujetos VIH negativo	57
Apéndice III. Títulos de fago	58
A.3.1 Eluatos de las rondas de <i>biopanning</i> con la IgG del paciente	58
A.3.2 Títulos de algunas clonas de fago después de la amplificación individual (solución concentrada de fago)	58
Apéndice IV	59
A.4.1 Selección de clonas con IgG de individuos VIH negativo	59
Apéndice V	60
A.5.1 Clonas sin motivo seleccionadas por la IgG del paciente en estudio	60

Glosario de Abreviaturas

ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo
CTLs	Linfocitos T citotóxicos (CD8+)
CV	Carga Viral
ddC	Zalcitabina (ITRAN)
ddl	Didanosina (ITRAN)
gp	Glicoproteína
IN	Integrasa
IP	Inhibidor de Proteasa
ITRAN	Inhibidores de Transcriptasa Reversa Análogos Nucleósidos
ITRNN	Inhibidores de Transcriptasa Reversa no Nucleósidos
LAV	<i>Lymphadenopathy Associated Virus</i> (Virus Asociado a Linfadenopatía)
LTNP	<i>Long Term Non Progressor</i> (Sujeto no progresor a SIDA)
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (Secuencia Terminal Larga Repetida)
mAb	Anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NAb	Anticuerpo Neutralizante
NFV	Nelfinavir (IP)
PND	<i>Principal Neutralizing Determinat</i> (Determinante Principal de Neutralización)
PR	Proteasa
RT	Transcriptasa Reversa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de Inmunodeficiencia Simia
TARV	Terapia Antirretroviral
ufp	Unidades Formadoras de Placa
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
ZDV	Zidovudina (ITRAN)

2. Introducción

En 1981 aparecieron los primeros informes donde se describió a un grupo de jóvenes homosexuales con enfermedades raras tales como sarcoma de Kaposi, neumonía por *Pneumocystis carinii* y linfadenopatía persistente que se asociaron con una deficiencia de linfocitos T CD4+. Las observaciones iniciales de estas patologías sugirieron que se trataba de un retrovirus similar a dos retrovirus descubiertos previamente, el HTLV-1 y el HTLV-2 (Virus de Leucemia Humana de Célula T tipo 1 y tipo 2) que eran conocidos por infectar preferencialmente linfocitos T CD4+ y causar leucemia (Carrillo-Maravilla y Villegas-Jiménez, 2004). En 1983, Luc Montagnier del Instituto Pasteur y su grupo, aislaron un retrovirus al que denominaron LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) e identificaron la asociación de este virus con el SIDA (Barré-Sinoussi y cols., 1983). Un año después, este mismo grupo e investigadores del NIH (National Institutes of Health) en EUA, dirigidos por Robert C. Gallo, publicaron los escritos en los cuales se estableció con evidencia virológica y epidemiológica que el virus ahora conocido como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) era el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Gallo, 2002a; Montagnier, 2002).

2.1 Características Generales del VIH-1

2.1.1 Epidemiología

A pesar de las recientes mejoras en el campo del tratamiento antirretroviral y la atención en muchas regiones del mundo, en 2005 la epidemia del SIDA acabó con la vida de 3,1 millones de personas (UNAIDS, 2005). En esta misma fuente se reporta que el número total de personas que viven con el VIH ha alcanzado su nivel más alto, se estima que 40,3 millones de personas han sido infectadas con el VIH y cerca de 5 millones contrajeron el virus en 2005. La prevalencia nacional del VIH en la población adulta de México ha permanecido muy por debajo del 1%, pero la epidemia presenta tendencias variadas. Hasta el 15 de noviembre de 2005, en México se registraron 98,933 casos de SIDA. Del total de personas infectadas con VIH por tipo de población, el 57% se trata de hombres que tienen sexo con hombres; 23% son mujeres; 14% hombres heterosexuales; 2% mujeres trabajadoras sexuales; 2% personas que viven en prisión; 1% son usuarios de drogas inyectadas y 1% de trabajadores sexuales masculinos. Los casos nuevos registrados durante este año fueron 4,963 (79% corresponden a hombres y 21% a mujeres), de los cuales, la transmisión del 97% de los casos fue por vía sexual sin uso de condón; 2% perinatal y 1% por uso de drogas inyectadas. Los 10 estados con el mayor número de casos acumulados de SIDA, registrados al 15 de noviembre de 2005 fueron: el Distrito Federal con 19,528 casos; el Estado de México con 10,569; Veracruz 8,923, seguido de Jalisco, Puebla, Baja California, Guerrero, Chiapas, Oaxaca y Michoacán. De acuerdo al programa de acceso universal gratuito de antirretrovirales implementado en nuestro país, al

finalizar 2005, 31.000 personas con VIH/SIDA contaban con tratamiento antirretroviral (Instituto Nacional de Salud Pública, 2005).

2.1.2 Orígenes del VIH-1

El Virus de Inmunodeficiencia Humana es un retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus. Actualmente se reconocen dos variantes: VIH-1 y VIH-2. Ambos virus son muy semejantes, sin embargo, difieren con respecto al peso molecular de sus proteínas, así como en los genes de proteínas accesorias. El VIH-2 está genéticamente más relacionado al Virus de Inmunodeficiencia Simia (SIV) encontrado en el mono gris africano (sooty mangabeys, SIVsm). Tanto el VIH-1 como el VIH-2 se replican en células T CD4+ y son considerados como patogénicos en personas infectadas, aunque el estado de inmunodeficiencia puede ser menos grave en individuos infectados con VIH-2 (Hanh y cols., 2000). Se ha propuesto que el VIH tiene su origen a partir de la transmisión del SIV a humanos (Hillis y cols., 2000). Se estima que el último ancestro común del VIH-1 grupo M, data de 1931, época en la que se identifica el comienzo de la diversificación del linaje viral en humanos después de la transmisión de un reservorio presente en el chimpancé *Pan troglodytes troglodytes* en África Central (Gao y cols., 1999; Korber y cols., 2000; Hillis y cols., 2000; Gisselquist, 2003). Debido a que los chimpancés eran cazados para la alimentación, probablemente la transmisión entre especies ocurrió de esta manera (Fauci, 2003).

Actualmente se conocen tres grupos filogenéticos del VIH-1, M (*main*), O (*outlier*), y N (non M, non-O). La mayoría de las infecciones en una escala global son causadas por virus del grupo M. Dentro del grupo M, se reconocen nueve subtipos, identificados por las letras A-D, F-H, J y K. Los virus del grupo O están limitados a infectar personas que viven en África Central, principalmente Camerún. La diversificación inicial del grupo M pudo haber ocurrido dentro o cerca del territorio de la República Democrática de Congo (Vidal y cols., 2000), donde se han documentado los casos de infección de VIH-1 más tempranos (1959). De acuerdo a estudios recientes, las formas genéticas prevalentes del VIH-1 son los subtipos, A, B y C. Muchas infecciones en países de la parte sur de África, India y Etiopía son causadas por el subtipo C, que también circula en forma menor en Brasil y Rusia. Los virus del subtipo A son predominantes en áreas del centro y este de África (Kenia, Uganda, Tanzania y Rwanda) y en países del este de Europa. El subtipo B es la principal forma genética en el oeste y centro de Europa, América y Australia, y es también común en varios países del sureste de Asia y norte de África. Otra forma genética menos prevalente del VIH-1, pero común en una escala más localizada es el subtipo D, distribuido principalmente en el este de África (Uganda, Tanzania y Kenia); predominante en Rumania y encontrado en una minoría en individuos infectados con VIH-1 en Brasil; el subtipo G circula en el oeste y centro de África, con una prevalencia mayor

en Nigeria, también en Portugal y noroeste de España. Los virus H, J y K circulan en forma menor en África Central (Thomson y cols., 2002).

2.1.3 Estructura del VIH-1

El VIH es un retrovirus esférico de entre 100-120nm de diámetro. Esta forma viene determinada por tres capas concéntricas: una bicapa lipídica externa derivada de la célula del hospedero, constituida por la inserción de moléculas del MHC clase I y glicoproteínas (gp) virales constituidas por trímeros de gp120 (en la superficie) y gp41 (transmembranal). La siguiente estructura es una matriz esférica formada por la polimerización de monómeros de la proteína 17 (p17) y una última capa que es la cápside, constituida por la proteína 24 (p24) que rodea la nucleocápside, la cual contiene dos cadenas de ARN, la transcriptasa reversa (RT), la proteasa viral (PR) y la integrasa (IN) (fig. 1) (Galicia y cols., 2002; Soto-Ramírez, 2004).

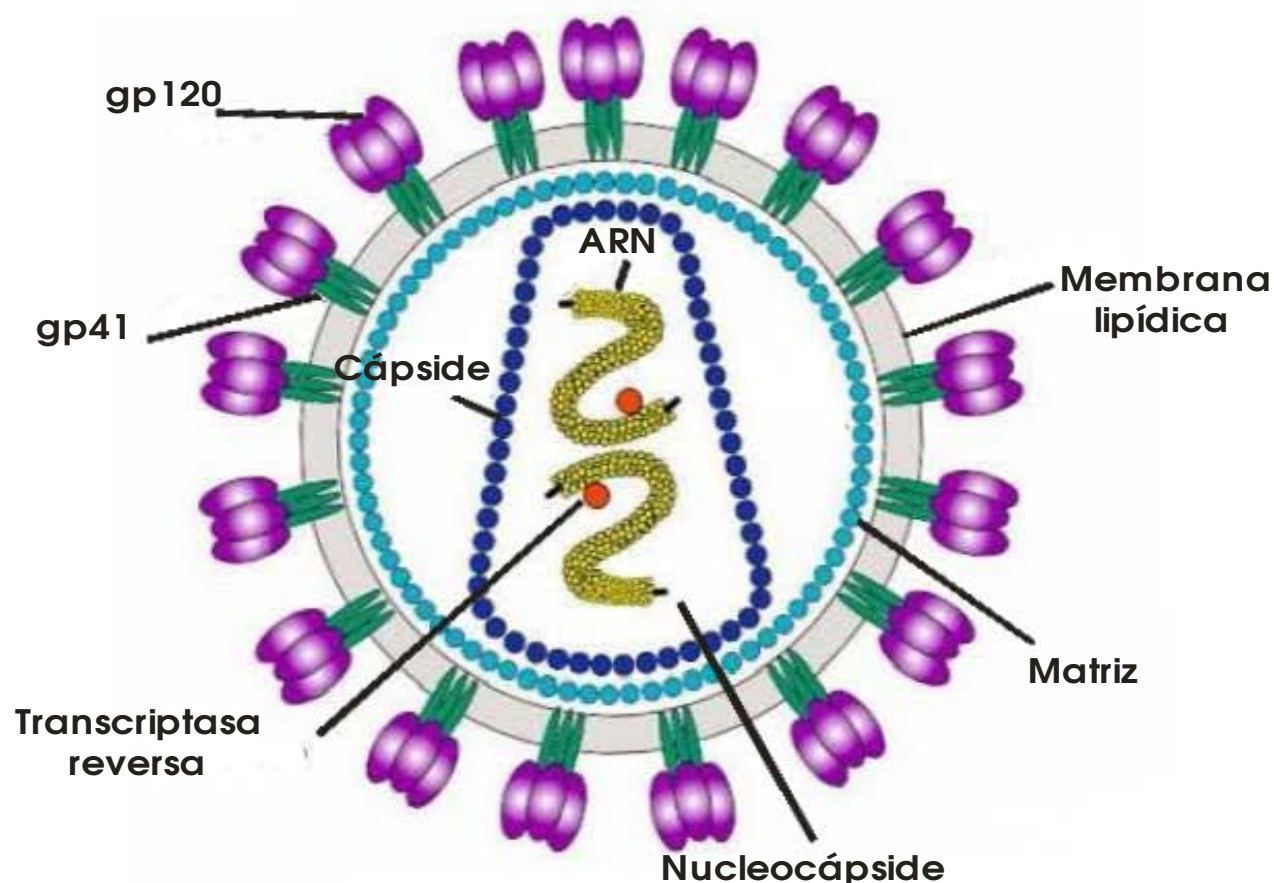


Figura 1. Estructura del VIH. La bicapa lipídica es de origen celular e incluye trímeros de gp41 y gp120. Las proteínas estructurales que forman el core son la matriz (MA o p17), la cápside (CA o p24) y la nucleocápside (NC o p7) que contiene el ARN y la RT. (www.niaid.nih.gov)

2.1.4 Organización del genoma viral

Existen genes encargados de codificar los componentes de la partícula viral (genes estructurales) y de regular la expresión de los mismos (genes reguladores). Los tres genes principales, que codifican las proteínas respectivas correspondientes a los antígenos internos,

son comunes a todos los retrovirus y son los que se denominan *gag*, *pol* y *env*: *gag* significa antígeno de grupo (*group antigen*), *pol* representa polimerasa y *env* es envoltura. El esquema clásico de la estructura de un genoma retroviral contiene: 5´LTR-*gag-pol-env*-LTR 3´ (fig. 2). Las regiones LTR (*long terminal repeat*, (secuencias terminales largas repetidas)) representan dos porciones terminales del genoma viral que no codifican para ninguna proteína, sin embargo, su función está íntimamente relacionada con la replicación viral. El LTR 5´ está involucrado en los procesos de inicio y regulación de la transcripción viral, mientras que el LTR 3´ participa en procesos post-transcripcionales, tales como la poliadenilación y producción de transcritos virales. Cabe mencionar que este extremo está traslapado con el gen *nef* (Gomez-Román y Soler-Claudín, 2000). De los genes estructurales, el gen *gag* codifica las proteínas de la cápside, matriz y nucleocápside; las cuales son derivadas de la degradación proteolítica de la proteína Gag. El gen *pol* codifica fundamentalmente las enzimas RT, PR e IN. Así como algunos productos del gen *gag*, estas proteínas son derivadas de una poliproteína Gag-Pol que es codificada en diferentes marcos de lectura del genoma del VIH-1 y los dos marcos de lectura abiertos están traslapados. El gen *env* codifica las proteínas de la envoltura viral (glicoproteína de superficie 120 y la transmembranal, gp41), estas son producidas por la degradación de una proteína precursora: gp160. Además, el VIH-1 contiene en su ARN de 9.2 kB, seis genes accesorios (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*) que contribuyen a su complejidad genética (Galicia y cols., 2002; Sleasman y Goodenow, 2003).

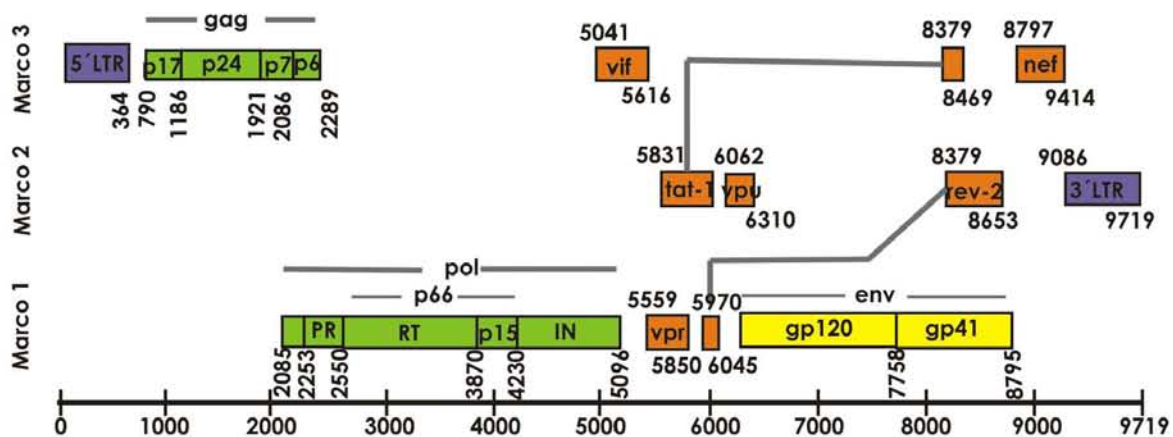


Figura 2. Organización del genoma del VIH-1. Se muestran los tres marcos de lectura y pueden distinguirse cuatro regiones del genoma: (1) LTR; regiones reguladoras localizadas en ambos extremos de las moléculas de ARN. (2) El gen *gag-pol* que codifica dos precursores de poliproteínas. La poliproteína Gag incluye las proteínas de la nucleocápside, y la poliproteína Gag-Pol comprende proteínas estructurales y tres enzimas virales: PR, RT e IN. (3) El gen *env* que codifica la gp160 precursora de gp41 y gp120. (4) Genes accesorios del VIH-1: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* (modificado de Sierra y cols., 2005).

Tat y Rev son proteínas reguladoras que se acumulan dentro del núcleo y se unen a regiones definidas del ARN viral. La proteína Tat es un potente activador transcripcional de la región promotora de LTR y es esencial para la replicación viral (Gatignol y Jeang, 2000). Rev activa la expresión de genes estructurales y enzimáticos e inhibe la producción de proteínas

reguladoras, por lo tanto promueve la formación de partículas virales maduras (Cullen, 1998). El producto del gen *nef* interviene en las señales apoptóticas para promover la producción del virus. La proteína Nef además contribuye a disminuir la función inmune de las células infectadas mediante regulación negativa de la expresión de moléculas CD4. Nef también promueve el escape de las células infectadas de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) por regulación negativa de la expresión de moléculas del MHC clase I. El producto del gen *vpr* detiene el ciclo celular de las células infectadas en la fase G2. Vpr también actúa como un promotor principal en la infección en macrófagos (Gallo, 2002b). Vpu es importante en el proceso de liberación de los viriones; además está involucrada en el momento en que se degradan los complejos CD4-gp160 dentro del retículo endoplásmico y por lo tanto permite reciclar gp160 para la formación de nuevos viriones (Bour y cols., 1995). Vif es importante para los mecanismos de transporte intracelular de los componentes virales. Los viriones que carecen de *vif* pueden ser transmitidos de célula a célula, pero no en medios libres de células (Cullen, 1998).

2.1.5 El ciclo de replicación del VIH-1

2.1.5.1 Células blanco y mecanismo de entrada

El VIH-1 es capaz de infectar diferentes células del organismo. Sus blancos principales son los linfocitos T CD4+ y los macrófagos aunque es capaz de infectar otros linfocitos, células microgliales del cerebro y neuronas, células del intestino y células dendríticas incluyendo las células de Langerhans, así como precursores de médula ósea (Soto-Ramírez, 2004). La infección inicia con el ataque de los viriones a la superficie celular mediada por una interacción entre la gp120 (que está asociada con la gp41 formando trímeros en la superficie del virus) (fig. 3) y receptores celulares. CD4 es el receptor principal para VIH-1 y los receptores de quimiocina CCR5 y CXCR4 son los principales correceptores del VIH-1 *in vivo*. El primero es expresado en macrófagos mientras que el segundo se encuentra en linfocitos T. El tropismo viral está determinado por el uso del correceptor por lo que las cepas virales se denominan: M-trópicos o L-trópicos (Gallo, 2002b).

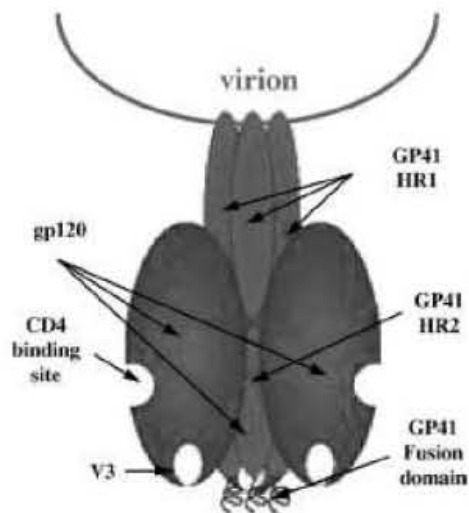


Figura 3. Complejo gp120/gp41 del VIH-1. La gp120 se encuentra en la parte externa del virus mientras que la gp41 es transmembranal. El complejo gp120/gp41 es un trímero unido no covalentemente. Se señalan los dominios involucrados en el mecanismo de fusión (Sierra y cols., 2005).

Una vez que el dominio externo de la gp120 se une con la molécula CD4 se inducen cambios conformacionales en la gp120, de tal forma que se expone el sitio de unión al correceptor (presumiblemente el asa V3). La unión al correceptor induce cambios conformacionales adicionales en la gp41 que incluyen la exposición de su péptido de fusión hidrofóbico en el extremo N-terminal que se desplaza a la membrana de la célula y después se inserta en ella. Este proceso parece estar mediado en parte por la formación de una estructura trimérica helicoidal del dominio HR1 (*N-terminal heptad region*) de cada uno de los tres dominios de la gp41. La subunidad de la gp41 sufre cambios conformacionales permitiendo que una segunda región: HR2 (*C-terminal heptad region*) se empaquete en la superficie de la estructura trimérica helicoidal formando así una horquilla (*6-helix bundle*) que comprende tres dominios de HR1 en el centro con tres dominios HR2 en la superficie en forma antiparalela (fig. 4) (Moore y Doms, 2003).

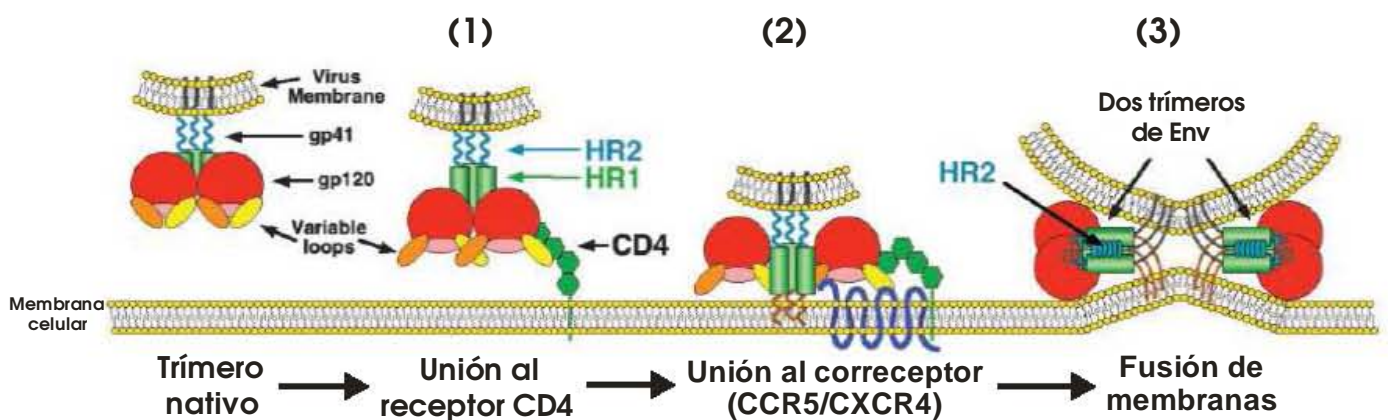


Figura 4. Esquema general de la unión y fusión del VIH-1 con la célula blanca. Ocurre en tres principales pasos: 1) Unión de la gp120 a un dominio de la porción extracelular del receptor CD4, 2) Unión al receptor de quimiocina (CCR5/CXCR4) vía cambios conformacionales en la gp120 que exponen su asa V3 y 3) fusión de las membranas celular y viral ocasionada por la unión de los dominios HR1 y HR2 de la gp41 que forman una estructura de horquilla (*6-helix bundle*) (Moore y Doms, 2003).

2.1.5.2 Eventos post-fusión

Una vez que ocurre la fusión de las membranas, el contenido viral que está constituido por proteínas, enzimas y ARN genómico, es liberado al interior de la célula y el ARN de cadena sencilla es convertido en el citoplasma a ADN de doble cadena por la enzima RT con regiones LTR en los extremos. Después de la síntesis del ADN viral, un complejo de preintegración se transporta al núcleo y el ADN lineal del VIH-1 se integra al genoma de la célula hospedera como ADN proviral para usar su maquinaria enzimática y poder replicarse. Este paso está mediado por la enzima IN. El ADN proviral puede permanecer en estado latente por muchos años. La activación transcripcional del provirus integrado es controlada por complejas interacciones entre proteínas reguladoras del VIH-1 y factores de transcripción celular regulados a su vez por el estado de activación de la célula. En este proceso, la proteína Tat actúa estimulando la elongación a través de la unión con el elemento TAR del LTR 5' vía su forma complejada con factores celulares: ciclina T1 y Cdk9. Esta unión potencia la elongación transcripcional (Liou y cols., 2004). El provirus activado produce ARN genómico y ARNm que a su vez se traduce a proteínas virales. El ARN junto con las proteínas, migran a la membrana celular, donde se ensamblan en nuevos viriones. Después del ensamblaje, los nuevos viriones formados salen a de la superficie celular para entrar a la circulación (fig. 5).

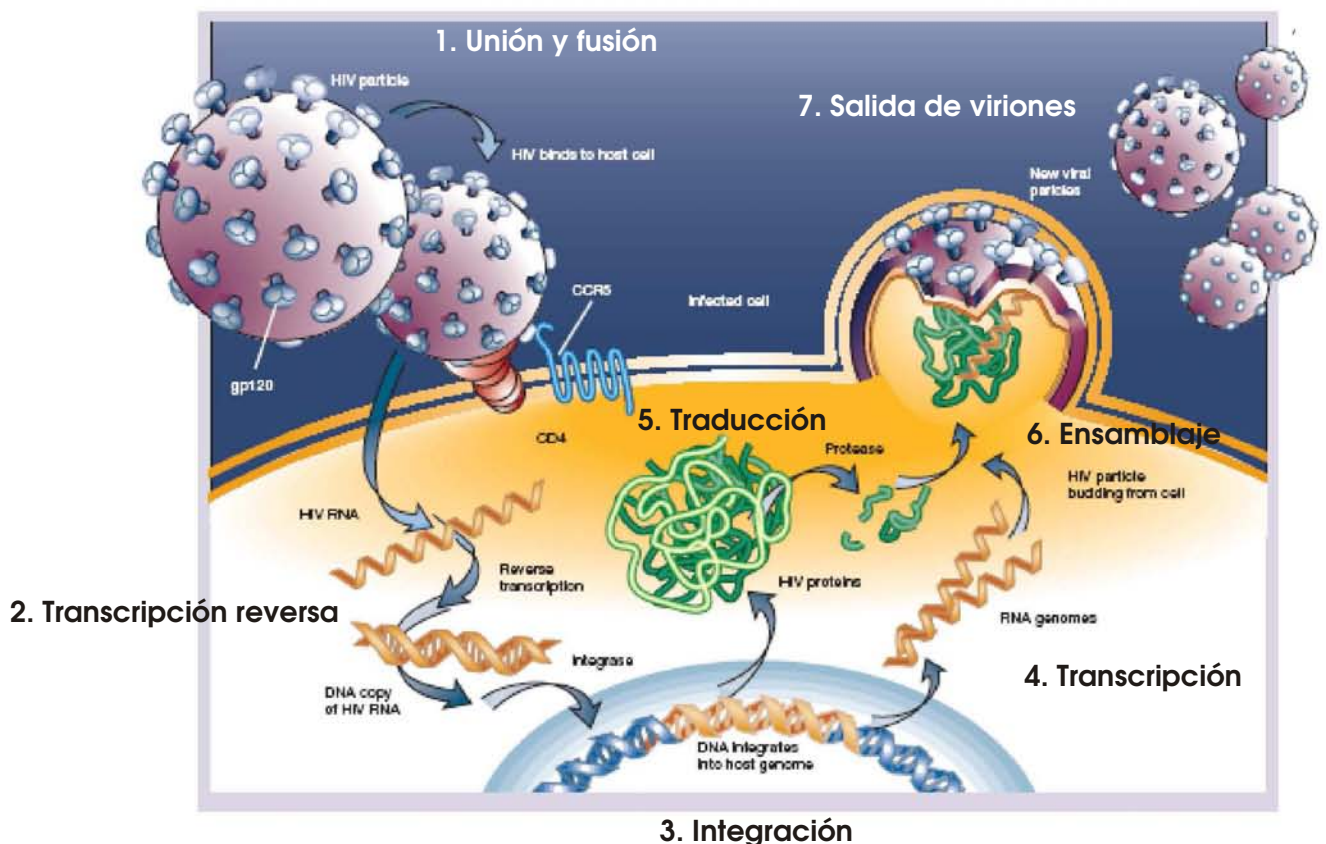


Figura 5. Ciclo de replicación del VIH-1. El virus entra a la célula después de la unión al receptor CD4 y receptor de quimiocina (CCR5/CXCR4). Una vez que el contenido es liberado al interior de la célula, el ARN se transcribe reversamente a ADN de doble cadena que entra al núcleo donde se integra al genoma de la célula hospedera. El ADN proviral se transcribe a ARNm que a su vez se traduce a proteínas virales. Finalmente, los viriones se ensamblan y salen de la membrana celular (Weiss, 2001).

2.2 Sistema inmune y VIH-1

2.2.1 Historia natural de la infección

El curso de la infección por VIH-1 en la mayoría de los individuos sin previo tratamiento con terapia antirretroviral se ilustra en la figura 6. Se estima que un 40-90% de los pacientes desarrollan un síndrome retroviral agudo tras unas 2 a 6 semanas después de la exposición que se caracteriza por fiebre, fatiga, faringitis, pérdida de peso, sudoraciones nocturnas, sarpullido, linfadenopatía, mialgias, dolor de cabeza, náuseas y diarrea. El sarpullido y ulceraciones de las mucosas se asocian a una forma de mononucleosis. El desarrollo de los síntomas del síndrome retroviral agudo coincide con una elevada viremia que puede alcanzar niveles de varios millones de copias que son más altos que en cualquier otro periodo durante la historia natural de la infección y una reducción en la cuenta de linfocitos T CD4+. En respuesta a la viremia durante la infección aguda, se produce una potente reacción en el sistema inmune mediada principalmente por CTLs, que se asocia al control parcial de viremia en esta fase. La generación de anticuerpos específicos de VIH-1 frecuentemente se detecta dentro de las semanas 3-12 de la infección y esta respuesta marca el término de la seroconversión (Kassutto y Rosenberg, 2004). La mayoría de los anticuerpos iniciales son inducidos por componentes de las proteínas de envoltura gp120 y gp41 pero no son neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes usualmente se generan una vez que la infección está bien establecida. Después de varios meses la cuenta de linfocitos T CD4+ se incrementa de forma parcial, normalmente a valores inferiores del nivel de preinfección y entonces se alcanza el punto fijo (*set point*) que refleja un balance entre la producción y destrucción de viriones (Hogan y Hammer 2001a). El punto fijo viral que usualmente ocurre de 6-12 meses después del inicio de la infección, ha mostrado estar inversamente correlacionado con el progreso de la enfermedad (Kassutto y Rosenberg, 2004). A partir de este punto, el individuo infectado entra a una fase asintomática o de latencia clínica, que generalmente dura varios años y durante la cual el virus continúa replicándose en el tejido linfoide a pesar de los niveles indetectables del virus en sangre periférica (Pantaleo y cols., 1993). Durante esta segunda fase de la enfermedad los individuos infectados generalmente no presenten manifestaciones clínicas. Asimismo se ha mostrado que la replicación viral persiste a través de la infección a una velocidad variable; se producen y eliminan al menos 10^{10} viriones por día en un individuo infectado (Ho y cols., 1995; Wei y cols., 1995).

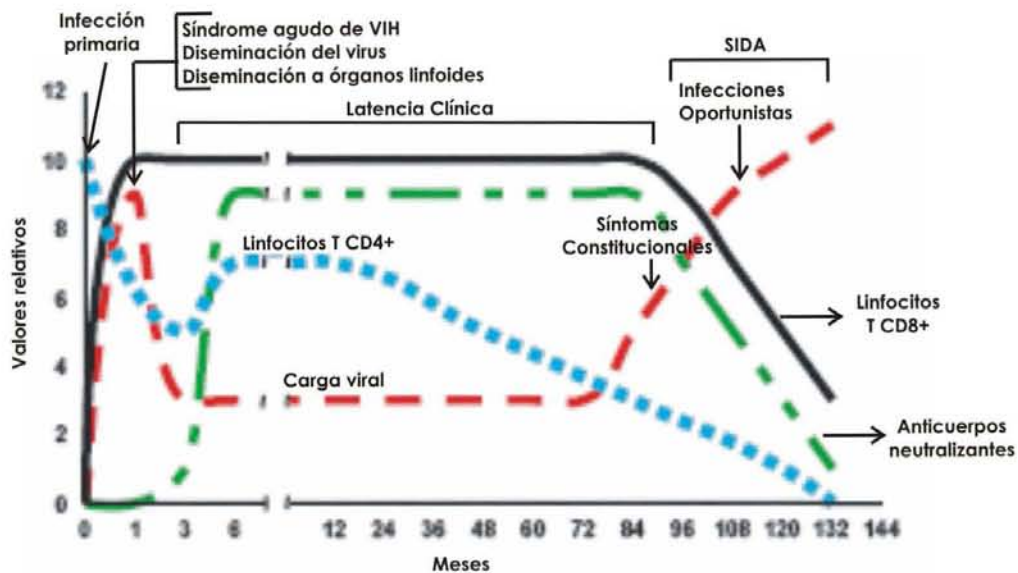


Figura 6. Curso típico de la infección por VIH. A través del curso de la infección, el virus se replica y la inmunodeficiencia progresa constantemente a pesar de la ausencia de síntomas observada durante el periodo de latencia clínica. Gradualmente, hay un deterioro de células TCD4+ y un incremento en la carga viral que aumenta la susceptibilidad a infecciones oportunistas (modificado de Alimonti y cols., 2003).

El título de anticuerpos específicos de VIH-1 se mantiene prácticamente constante durante esta fase. Con el transcurso del tiempo se produce un deterioro gradual del sistema inmunitario generalmente asociado a la progresiva destrucción de linfocitos T CD4+, que conduce a la tercera fase llamada crónica o SIDA que se manifiesta inicialmente con síntomas que incluyen: fiebre, pérdida de peso, astenia y diarrea por *Cryptosporium sp.* Las manifestaciones clínicas incluyen principalmente desórdenes gastrointestinales: colitis; cardiovasculares: fusión pericardial, miocarditis, endocarditis y cardiomiopatía dilatada; neurológicos: encefalopatía, meningitis aséptica y neuropatía periférica; hematológicos: anemia. En esta situación, el nivel de linfocitos T CD4+ es un indicador importante del riesgo de enfermedades que definen el SIDA, entre las que se encuentran infecciones oportunistas tales como candidiasis esofágica, neumonía por *Pneumocystis carinii*, citomegalovirus, tuberculosis, toxoplasmosis y sarcoma de Kaposi, así como ciertas neoplasias (Moylett y Shearer, 2002). Esto frecuentemente ocurre con un rápido incremento de viremia, una disminución de células T CD4+ a niveles menores de 200 células/ μ L y un decremento progresivo de CTLs y anticuerpos neutralizantes (Alimonti y cols., 2003).

2.2.1.1 Diagnóstico

El diagnóstico de infección por VIH-1 requiere un alto grado de inspección clínica basada en los síntomas e historia de la exposición, además de las pruebas de laboratorio que confirman el diagnóstico (Huang y cols., 2005).

Están disponibles diferentes pruebas para el diagnóstico de la infección primaria por VIH. Estas son: detección de ARN de VIH-1 y antígeno p24, además de las pruebas de anticuerpos. De ellas, la prueba más sensible es la detección en plasma del ARN del VIH-1. La carga viral es muy alta en pacientes con infección aguda, generalmente excede 1 millón de copias/mL (Rosenberg y cols., 2000). La presencia de un bajo nivel de ARN de VIH-1 en plasma en pacientes con síntomas de seroconversión, no excluye la infección aguda pero puede sugerir un resultado falso positivo. Los resultados falsos positivos a partir de estas pruebas se dan usualmente en mediciones de menos de 3,000 copias de ARN de VIH-1 en plasma. Los falsos positivos pueden ser eliminados realizando una repetición del ensayo con la misma muestra. La medición de ARN del VIH-1 en muestras por duplicado da como resultado una sensibilidad y especificidad del 100%. Para la interpretación de pruebas positivas se considera un umbral >5000 copias/mL (fig. 7) (Hecht y cols., 2002). La identificación oportuna de la infección primaria por VIH es importante para los pacientes y para la salud pública por varias razones. Durante esta fase de la infección, los linfocitos T CD4+ son destruidos por el virus, ocasionando un daño permanente en el sistema inmune. El tratamiento oportuno de la infección puede ofrecer oportunidades para preservar la respuesta inmune específica de VIH (Rosenberg y cols., 2000). El diagnóstico temprano de la infección primaria puede también representar una importante oportunidad para interrumpir la transmisión de VIH debido a que las personas en este estado pueden ser una fuente de nuevas infecciones (Cates y cols., 1997).

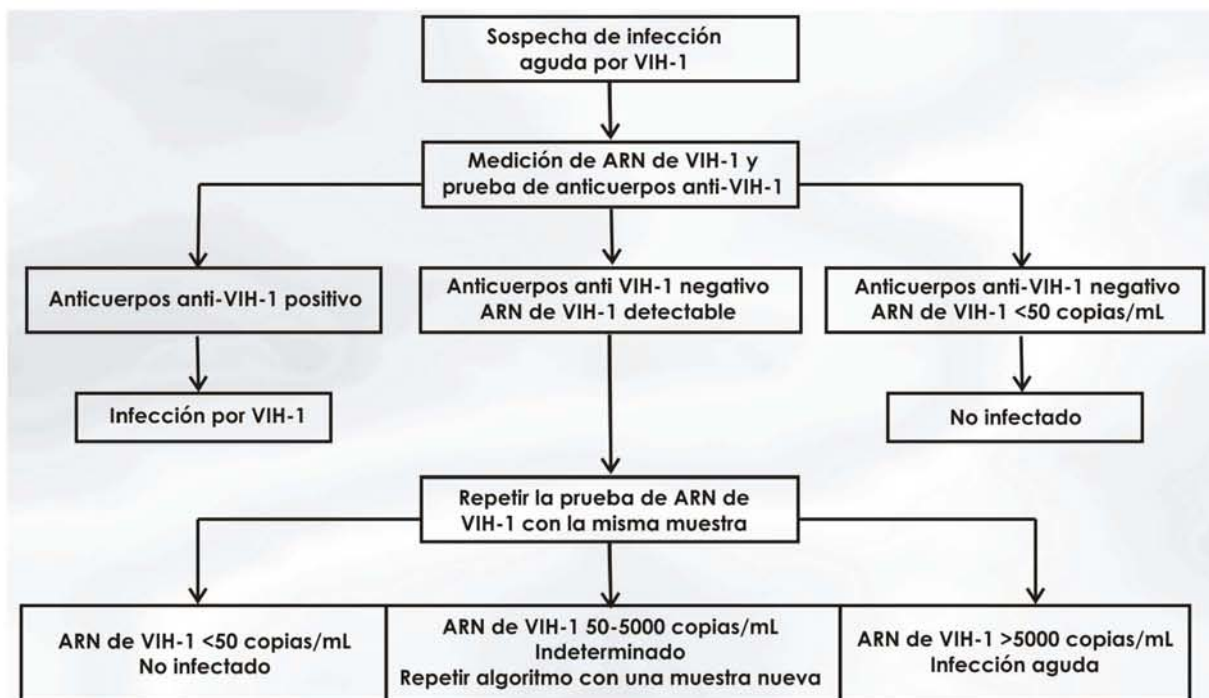


Figura 7. Algoritmo del diagnóstico de infección aguda por VIH-1. Se evalúa la consistencia de los síntomas y el riesgo de exposición para determinar si proceden las pruebas de laboratorio. Se realizan pruebas para detección de anticuerpos y ARN del VIH-1. Si la prueba de anticuerpos no es reactiva pero se detecta ARN de VIH-1 entonces se repite esta última prueba. Si el resultado del duplicado es: 50-5000 copias ARN/mL, se considera equivocado y se repite el algoritmo con una nueva muestra (modificado de Hecht y cols., 2002).

2.2.2 Inmunidad celular

Durante la infección primaria y generalmente antes de la seroconversión, ocurre la activación de CTLs específicos. La respuesta CTL es efectiva en el control inicial de la replicación viral (Hogan y Hammer, 2001a; McMichael y Rowland-Jones, 2001; Kassutto y Rosenberg, 2004). Existen varios mecanismos para la inhibición del virus mediada por CTLs. Los CTLs reconocen a las células presentadoras de antígeno infectadas de VIH-1 vía su receptor de célula T (TCR). El TCR del CTL se une a péptidos virales asociados con moléculas del MHC clase I en la superficie de células infectadas e induce la liberación granzimas y perforinas llevando a la lisis de células infectadas (McMichael and Rowland-Jones, 2001). Un segundo mecanismo es la interacción del ligando Fas (FasL) en la superficie de los CTLs con moléculas Fas de las células blanco que resulta en apoptosis de células infectadas (Hadida y cols., 1999). Además de lisis celular, la unión de CTLs a las células infectadas de VIH-1 induce la producción de citocinas que pueden afectar la replicación viral. Estas incluyen IFN- γ y TNF- α (Meylan y cols., 1993). Los CTLs específicos de VIH también producen quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES que suprimen la replicación del VIH por competencia o desregulación del correceptor CCR5. También se ha reportado la secreción de un factor parcialmente caracterizado: factor antiviral de células TCD8+ o CAF que bloquea la transcripción en células infectadas (McMichael and Rowland-Jones, 2001).

2.2.3 Inmunidad humoral

La respuesta inmune humoral se desarrolla de manera lenta. Sin embargo se ha encontrado un alto título de anticuerpos neutralizantes en pacientes infectados no progresores a SIDA (*Long Term Non Progressor* (LTNP)) (Cao y cols., 1995) y un bajo título o la falta de una respuesta humoral en individuos que progresan rápido a SIDA (*rapid progressor* RP) (Zhang y cols., 1997). Estudios posteriores han sugerido que existe una asociación entre la actividad neutralizante y la no progresión o la lenta progresión a la enfermedad y una asociación de la pérdida de la actividad neutralizante con el progreso de la enfermedad (Jolly y Weiss 2000). La cantidad de anticuerpos neutralizantes más que la cantidad de anticuerpos específicos totales es crucial para la reducción de partículas virales. (Hogan y Hammer 2001a). Por otro lado, el principal obstáculo en la actividad de los anticuerpos es la alta variabilidad que presenta el virus ya que es posible tener un buen título de anticuerpos pero cuando eso ocurre, la variante viral que los generó ha desaparecido del organismo y prevalece una nueva variante viral, ante esta dinámica la primer respuesta humoral generada resulta obsoleta (da Silva, 2003) (fig. 8). La unión de anticuerpos neutralizantes a partículas virales bloquea la interacción del virus con la célula blanco (Klasse y Sattentau, 2002) y media la incorporación y destrucción de viriones por fagocitosis. Además del efecto neutralizante, hay anticuerpos que pueden desempeñar otras

funciones. Por ejemplo, activación de la cascada de complemento que lleva a la fagocitosis o lisis de viriones (Sullivan y cols., 1996). La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), un mecanismo de eliminación de células infectadas por virus a través de células NK, también se ha relacionado con el control de viremia durante la infección aguda (Connick y cols., 1996); y en otros estudios se han encontrado títulos más altos de estos anticuerpos en LTNP que en progresores rápidos (Baum y cols., 1996).

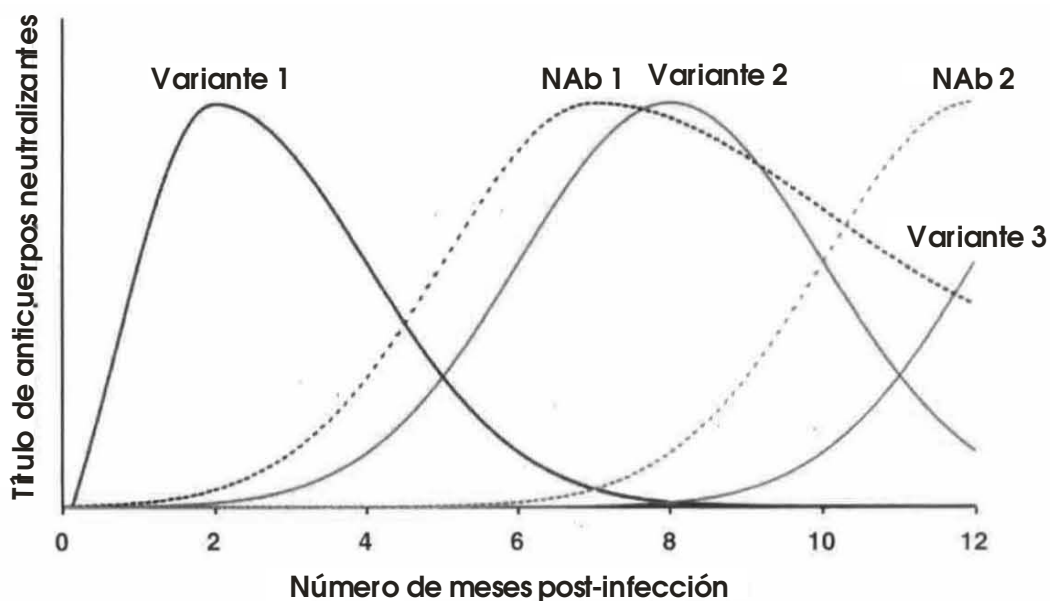


Figura 8. Dinámica de la generación de anticuerpos neutralizantes (NABs) en la infección por VIH-1. Cuando se genera una respuesta humoral contra una determinada variante viral, esta se vuelve obsoleta por la aparición de una nueva variante viral (da Silva, 2003)

2.3 Terapia antirretroviral

El tratamiento de la infección por VIH-1 con terapia antirretroviral (TARV; en inglés HAART: *Highly Active Antiretroviral Therapy*) lleva a una profunda supresión virológica, incremento en la cuenta de linfocitos T CD4+ y una mejoría clínica remarcable (Hammer y cols., 1997) en la mayoría de los pacientes. También hay evidencia de reconstitución inmune en algunos de estos pacientes (Hirsch y cols., 2004). El primer compuesto que demostró eficacia en un estudio clínico controlado para prolongar la supervivencia de personas con SIDA fue la zidovudina (AZT), inhibidor de la transcriptasa reversa (ITRN) (Sierra-Madero y Franco-San Sebastián, 2004). Actualmente existen 20 compuestos aprobados para uso humano. Los tres grupos principales de fármacos que son usados en la práctica clínica son inhibidores de la transcriptasa reversa (RT) (nucleósidos/nucleótidos: ITRAN y no nucleósidos: ITRNN) y los inhibidores de proteasa (IP). Recientemente la cuarta clase de antirretrovirales comenzó a usarse clínicamente con la introducción de enfuvirtida (T20), el primer inhibidor de fusión (IF) (Tabla 1). La estrategia

terapéutica actual involucra el uso de agentes de al menos dos distintas clases de antirretrovirales (Yeni y cols., 2004).

Tabla 1. Fármacos usados actualmente en la TARV

Clase	Sustancia (abreviatura)	Mecanismo de acción
ITRAN	Zidovudina (AZT); Didanosina (ddI); Zalcitabina (ddC); Stavudina (d4T); Lamivudina (3TC); Abacavir (ABC); Tenofovir (TDF)	Su metabolito 5' trifosfato es análogo de nucleósido pero sin grupo hidroxilo en el extremo 3', evitando la formación de enlaces fosfodiéster 3'-5' entre la cadena de DNA en elongación y los 5' trifosfatos.
ITRNN	Nevirapina (NVP); Delaviridina (DLV); Efavirenz (EFV).	Se unen a un sitio cercano del sitio activo de la RT, impidiendo su función.
IP	Saquinavir (SQV); Ritonavir (RTV); Indinavir (IDV); Nelfinavir (NFV); Lopinavir (LPV); Atazanavir (ATZ); Tripanavir (TPV); Amprenavir (APV); Fosamprenavir (FPV);	Moléculas que mimetizan el sitio de división de Gag-Pol y compiten con él por la PR. La inhibición de la PR viral lleva a la producción de partículas virales inmaduras no infecciosas.
IF	Enfurvitida (T20)	El péptido se une a la región HR1 de gp41 y bloquea la fusión de las membranas viral y celular.

El inicio de TARV en etapas tempranas teóricamente ofrece beneficios, sin embargo, el éxito del tratamiento a largo plazo está limitado por el desarrollo de resistencia del virus, efectos colaterales, interacciones farmacológicas o por elección personal del paciente. Los objetivos de la TARV incluyen: supresión virológica máxima, preservación y/o reconstitución inmune y prolongar la vida del paciente. Los factores a considerar para iniciar TARV son: 1) las manifestaciones clínicas, 2) el grado de inmunodeficiencia determinado por la cuenta de linfocitos T CD4+, 3) el riesgo de progreso de la enfermedad, 4) los beneficios y riesgos potenciales de los fármacos a largo plazo y 5) el deseo y compromiso del individuo de seguir el tratamiento (Soto-Ramírez y cols., 2004). La Guía Nacional de manejo antirretroviral actual, no recomienda iniciar tratamiento en las personas asintomáticas, con cuentas de linfocitos T CD4+ > 350/mL, debido a que es bajo el riesgo de desarrollo de enfermedades asociadas al VIH pero se debe vigilar cada tres a cuatro meses con cuenta de células T CD4+. Por el contrario, aquellas personas con niveles de linfocitos T CD4+ < 200 células/mL, independientemente del estado clínico o carga viral (CV), se recomienda iniciar tratamiento, considerando que el riesgo de progresión de la enfermedad es muy significativo. Cuando hay manifestaciones clínicas, la cuenta de linfocitos T CD4+ está entre 200 y 350 células/mL y la CV es igual o mayor a 100,000 copias/mL se recomienda iniciar TARV considerando que el riesgo de progresión de la enfermedad es significativo. Si no se dispone de CV, se debe asumir que es elevada, por lo tanto se debe iniciar tratamiento. Con CV < 100,000 copias/mL el riesgo de progresión es menor y la decisión de iniciar se puede aplazar. En personas que presentan manifestaciones clínicas ocasionadas por alguna infección oportunista o neoplasia asociada a la infección por el VIH, la indicación de iniciar TARV es clara y aunque es deseable tener las determinaciones

de CV y cuenta de linfocitos T CD4+ en ese momento, la falta de disponibilidad de estas pruebas no debe retrasar el inicio del tratamiento. Actualmente las combinaciones más comunes para inicio de tratamiento son: 2 ITRAN + 1 ITRNN o 2 ITRAN + IP (potenciación con uso de bajas dosis de Ritonavir) excepto NFV (Secretaría de Salud, 2005).

2.4 Tecnología *Phage display* en el estudio del VIH-1

2.4.1 Bibliotecas de péptidos *phage display*

Phage Display es una técnica molecular descrita por primera vez por George Smith en 1985, que consiste en la expresión de péptidos o proteínas sobre la superficie de fagos filamentosos. La secuencia de ADN que codifica para el péptido de interés se inserta en una región del genoma del fago, de tal forma que la molécula codificada se despliega como producto de fusión a una de las proteínas de superficie del fago. De este modo, es posible construir bibliotecas combinatorias de péptidos al azar con una complejidad de hasta 10^{10} diferentes secuencias (Smith, 1985; Azzazy y Highsmith, 2002). La primer biblioteca de fagos, se construyó diseñando péptidos lineales al azar fusionados al extremo N-terminal de la proteína III del fago filamentososo M13 (Scott y Smith, 1990). Con diversos estudios desarrollados a nivel mundial, incluido nuestro país, se ha demostrado que las bibliotecas de péptidos expresados en fago pueden ser de gran utilidad en el mapeo de epítomos. Para tal fin, los péptidos son aislados de la biblioteca a través de un proceso de selección *in vitro* llamado *biopanning* o tamizado, basado en la afinidad de unión y el reconocimiento de los péptidos en fago hacia moléculas blanco, tales como anticuerpos y otras moléculas de importancia biológica (Smith y Petrenko, 1997). La bioselección se lleva a cabo incubando la biblioteca con una placa cubierta con la molécula blanco (fig. 9). Posteriormente, se hace un lavado para eliminar los fagos que no fueron seleccionados. Los fagos que se unieron específicamente, se eluyen mediante un cambio de pH para ser amplificados en *E. coli* y repetir el proceso. Esto se realiza tres veces o más (hasta ocho) para enriquecer las clonas que fueron reconocidas específicamente (Scott y Smith, 1990; New England BioLabs, Ph-12). En la mayoría de los procesos de selección, los péptidos aislados presentan secuencias consenso que frecuentemente evidencian el epítomo del ligando natural en el caso de anticuerpos. Los péptidos con estas características han sido denominados *mimótopos* (Geysen y cols., 1986) ya que por lo general la secuencia reconocida presenta variaciones respecto al epítomo nativo, en los aminoácidos que contribuyen en la interacción con la molécula blanco. Es decir, las secuencias mimetizan al epítomo natural sin tener necesariamente la misma estructura primaria. Como ejemplo de lo anterior, el mAb BCF2 dirigido a la toxina de escorpión Cn2, seleccionó tres motivos que presumiblemente mimetizan epítomos de esta proteína (Gazarian y cols., 2003).

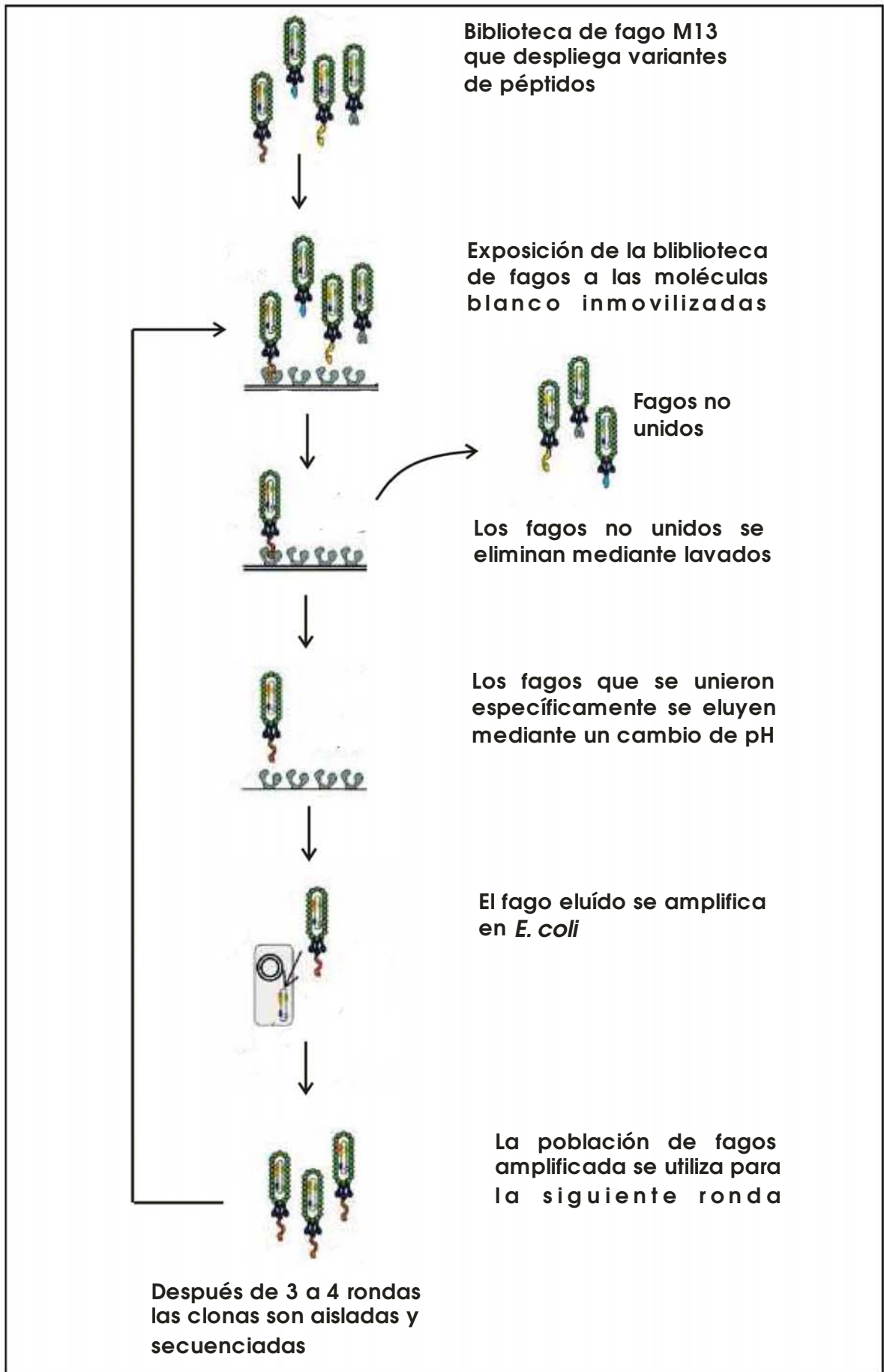


Figura 9. Esquema del proceso de selección (*biopanning*) empleando una biblioteca de péptidos expresados en el fago M13 (modificado de Willliats, 2002).

La tecnología *phage display* basada en bibliotecas de péptidos se ha utilizado ampliamente para el estudio de interacciones proteína-proteína en varios campos. Existen muchos reportes de aplicaciones tales como identificación de epítomos, sustratos de enzima, péptidos que se unen a ADN, péptidos de unión a proteínas, inhibidores de enzimas y receptores, entre otros fenómenos de importancia biológica involucrados en el desarrollo de enfermedades infecciosas, autoinmunes y cáncer. Estos estudios han proporcionando una gran cantidad de resultados que pueden ser útiles para el futuro descubrimiento y diseño de fármacos (Gazarian, 2005). Asimismo la metodología se ha propuesto para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que puedan ser utilizados en un futuro próximo (Azzazy y Highsmith, 2002; Arnaud y cols., 2004).

2.4.2 Aplicaciones de *phage display* en el mapeo de epítomos de VIH-1

La identificación de epítomos reconocidos por anticuerpos monoclonales VIH específicos se ha realizado generalmente con sistemas *in vitro* mediante la construcción y uso de péptidos sintéticos, proteínas purificadas, recombinantes, etc. Sin embargo con estas herramientas no se ha logrado comprender ni reflejar la variabilidad del virus en el organismo. Recientemente una metodología alternativa en el mapeo de epítomos que presenta amplias expectativas para el estudio de epítomos virales ha sido el uso de bibliotecas combinatorias de péptidos expresados en fago. En el grupo de Scala y cols., (1999), encontraron dos tipos de secuencias en los péptidos seleccionados empleando suero de un sujeto infectado no progresor: uno que no mostró similitud estructural a ningún epítomo del VIH-1 pero fue reconocido por el suero de la mayoría de los sujetos infectados, sugiriendo que eran mimótopos de epítomos conformacionales; y una segunda secuencia que presentó homología parcial al asa del epítomo inmunodominante de la gp41: GTKLVC. Los péptidos fueron inmunogénicos en ratones. En esa época el grupo reportó que los anticuerpos generados neutralizaron aislados del VIH-1, sin embargo, en la actualidad no hay ninguna evidencia que confirme que esta región genera anticuerpos neutralizantes. Por otro lado, Enshell-Seijffers y cols., (2001), emplearon esta metodología para estudiar el epítomo inmunodominante de la gp41: CSGKLIC, logrando aislar cuatro mimótopos también relacionados a este epítomo. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo el suero policlonal de individuos infectados de VIH-1 también se ha utilizado en la selección de 21 péptidos asociados al asa del dominio inmunodominante de la gp41 (Palacios-Rodríguez, 2003; Arnaud y cols. 2004).

De igual manera, se ha empleado el mAb neutralizante 2F5 para la selección, el cual reconoce la secuencia ELDKWAS cercana al dominio transmembranal de la gp41; se encontraron secuencias de péptidos relacionadas con el epítomo (Menéndez y cols., 2004; Mújica-Guzmán, 2005). En este caso, los mimótopos seleccionados fueron altamente

inmunogénicos en ratones generando una respuesta específica (Mújica-Guzmán, 2005). Este epítipo es importante porque es altamente conservado en diferentes cepas virales. Además los anticuerpos dirigidos a esta región poseen actividad neutralizante por lo que se considera un blanco terapéutico (Zolla-Pazner, 2004). Contrariamente, en otro trabajo realizado con el mAb b12, que se une al sitio de la gp120 reconocido por la molécula CD4, se identificó que los péptidos seleccionados no presentaron homología estructural al la gp120 (Boots y cols., 1997). Con lo anterior se evidencia que la metodología puede proporcionar nueva información acerca de la respuesta humoral específica del VIH-1, en términos de estructura e inmunogenicidad de epítipos que son importantes en la patogénesis de SIDA.

1. Resumen

El Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) induce una respuesta humoral contra una amplia diversidad de epítomos de sus proteínas. Estudios con anticuerpos monoclonales (mAbs) han ayudado a identificar algunos de estos epítomos, sin embargo, han sido pocos los trabajos en los que se han empleado anticuerpos policlonales para identificar las especificidades de los anticuerpos inducidos en los individuos infectados. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta humoral hacia epítomos del VIH-1 de un paciente mexicano infectado aplicando la metodología *phage display*. Se empleó una biblioteca combinatoria de péptidos lineales de 12 aminoácidos con secuencias al azar para la selección de péptidos reconocidos por anticuerpos policlonales (IgG) provenientes del paciente. Se identificaron tres familias de mimótopos de epítomos del VIH-1: CxxKxxC, GQ/PGP y CxxC. Los péptidos con la secuencia CxxKxxC representan mimótopos del epítomo inmunodominante de la gp41: CSGKLIC. Se propone que los péptidos que presentaron la secuencia GQ/PGP mimetizan al dominio GPGR del asa V3 de la gp120, conocido como "determinante principal de neutralización". Los péptidos con el motivo CxxC se sugiere que son mimótopos de la proteína Tat del virus. Los anticuerpos (IgG) de este mismo paciente usados después del inicio de la Terapia Antirretroviral (TARV) no seleccionaron mimótopos. Las secuencias obtenidas representan una fuente de información acerca de los epítomos virales activos en este paciente. Los péptidos con estas secuencias podrían ser empleados como antígenos e inmunógenos VIH-1 específicos, útiles en el diagnóstico de la infección y el diseño de vacunas.

3. Antecedentes

En el laboratorio del Dr. Karlen Gazarian (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) se realizó un trabajo previo (Palacios-Rodríguez, 2003) en el cual se analizaron 5 pacientes mexicanos VIH positivo, candidatos a recibir TARV. Empleando anticuerpos policlonales (IgG) de estos pacientes y mediante el tamizado de bibliotecas de péptidos lineales de 12 aminoácidos, se lograron aislar péptidos miméticos del epítipo inmunodominante de la gp41 (*cluster 1*) del VIH-1, identificando con ello el alto grado de variación de este epítipo. Sin embargo, como resultado de este trabajo se obtuvieron otras secuencias relacionadas a epítipos virales que merecen un estudio más profundo. Debe destacarse además la obtención de poblaciones de secuencias obtenidas específicamente por cada paciente. Mediante la selección e investigación de péptidos miméticos de epítipos virales involucrados en la respuesta inmune y empleando la amplia información que existe, es posible analizar cuales de los epítipos interactúan con el sistema inmune de cada uno de los sujetos infectados y el impacto que puede tener la TARV sobre los mismos.

Uno de los casos más interesantes fue el paciente número 3. Tanto la variabilidad de estructuras obtenidas así como la relación que pudieran tener con el VIH, sugirieron realizar un estudio más detallado que ayudara a comprender el significado de esos resultados.

4. Justificación

El surgimiento del SIDA y el descubrimiento de su agente etiológico, el VIH, han denotado una actividad de investigación muy importante a nivel mundial que ha producido una cantidad impresionante de información, no solo sobre el virus y la infección, sino sobre la respuesta que el sistema inmune establece contra él. Estos estudios han aportado además resultados para el diseño de nuevos esquemas de TARV. Sin embargo, a pesar de los datos obtenidos y los continuos avances en este campo, no ha sido posible diseñar estrategias para erradicar el virus, por lo que resulta necesario conocer más a fondo los determinantes de la relación virus-hospedero. En este contexto, es prioritario el estudio de la inmunidad específica hacia epítomos del VIH-1. Recientemente, se ha considerado que la inmunidad protectora hacia el VIH comprende tanto una respuesta mediada por células (linfocitos TCD4+ y CD8+) como una respuesta de anticuerpos (Fauci, 2003; Pantaleo y Koup., 2004). Dado lo anterior, es muy importante elucidar la dinámica de la respuesta humoral hacia epítomos virales.

Los métodos que se han empleado en el estudio de VIH-1 han proporcionado información relevante, sin embargo, no han permitido encontrar las vías específicas para lograr el control de la enfermedad. Las bibliotecas combinatorias de péptidos en fago (*phage display*) representan poderosas herramientas para el mapeo de epítomos, además de ser un campo con grandes posibilidades para obtener mayor información en términos del descubrimiento y caracterización molecular de epítomos virales. Con esta estrategia se abre un campo que permitirá abordar el estudio de la respuesta humoral que se genera en diferentes periodos de la enfermedad e incluso en distintas fases de la terapia antirretroviral.

5. Hipótesis

Mediante el tamizado de una biblioteca combinatoria de péptidos en fago será posible identificar y caracterizar epítomos activos del VIH-1, a través de la selección por afinidad de mimótopos con anticuerpos policlonales provenientes de un sujeto mexicano infectado.

6. Objetivos

General

- Caracterizar la respuesta humoral de un individuo mexicano VIH-1 positivo a través de la selección de péptidos expresados en fago que mimeticen epítomos del virus, empleando anticuerpos policlonales provenientes del paciente y usando como control los anticuerpos policlonales de un sujeto sano.

Particulares

- Analizar las secuencias de los mimótopos aislados para identificar homologías así como aminoácidos críticos en la interacción epítomo-parátomo.
- Analizar la reactividad de los mimótopos frente a la IgG del paciente.
- Analizar la respuesta humoral del paciente después de iniciar TARV siguiendo la misma estrategia.
- Analizar la relación estructural entre los epítomos y los mimótopos seleccionados.

7. Materiales y Métodos

La preparación de soluciones, amortiguadores y medios de cultivo mencionados en este apartado se describe detalladamente en el Apéndice I.

7.1 Selección del paciente

En este estudio se incluyó a un sujeto mexicano infectado por VIH-1 que era candidato a recibir TARV. El paciente era atendido en la clínica de SIDA del Hospital General Regional No. 1 "Gabriel Mancera" del IMSS (Cd. de México, México). De acuerdo a los procedimientos éticos establecidos en el hospital, el paciente fue informado del estudio y firmó el documento correspondiente para dar su consentimiento de las tomas de muestra. El criterio para inicio de la terapia establecido en el hospital fue un nivel de linfocitos T CD4+ menor o igual a 350 células/mL. Las características clínicas del paciente y el esquema de tratamiento empleado se describen en Resultados.

7.2 Suero humano

Las muestras de sangre se tomaron antes y después del inicio de TARV. El suero fue separado de los componentes de la sangre en el mismo hospital por centrifugación. Las muestras de suero se trasladaron al laboratorio y se almacenaron en alícuotas a -20°C. Como controles tanto para la selección de péptidos en fago como en los ensayos de ELISA, se emplearon sueros de dos individuos VIH-1 negativos aceptados como donadores de sangre en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría.

7.3 Purificación de anticuerpos IgG a partir del suero

La fracción IgG del suero se purificó por cromatografía de afinidad en una matriz de agarosa con proteína G (Gazarian y cols., 2000a). Se mezclaron 250µL de proteína G con 500 µL de suero. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente agitando 2 minutos para homogeneizar. Se centrifugó 30 segundos a 3000 rpm para desechar el sobrenadante. Se lavó 5 veces con el amortiguador de unión. Posteriormente se mezcló el sedimento con 750µL del amortiguador de elución para centrifugar bajo las mismas condiciones y obtener el sobrenadante como fracción de IgG previo ajuste a pH 7 con el amortiguador correspondiente.

7.4 Cuantificación de IgG

La concentración de proteínas totales en el eluato de IgG se determinó con base en el método de Bradford, que involucra la unión de una solución ácida de Azul Coomassie (ácido fosfórico, metanol y azul brillante G-250) a proteínas, principalmente a aminoácidos básicos y

aromáticos, especialmente, arginina (BIO-RAD Protein Assay). Se prepararon diluciones de proteína estándar: IgG humana purificada por cromatografía, partiendo de una concentración de 5.0 mg/mL del estándar (Zymed Laboratories, South San Francisco CA, USA). Para la curva patrón se prepararon concentraciones de 2, 4, 8, 12 y 20 µg/mL. Se tomó un volumen de 800µL de cada solución y se trasladó a un tubo nuevo. Se añadieron 200µL del reactivo colorido ácido (ácido fosfórico y metanol) y se mezcló con vórtex. Se incubó a temperatura ambiente por un tiempo no menor de 5 minutos y no mayor a una hora. Se midió la absorbancia a 595nm. Para determinar la concentración de las fracciones de IgG purificadas se tomaron 1 y 0.5µL del eluato, se disolvieron en 800µL de agua bidestilada y desionizada y se añadieron 200 µL del reactivo. Las diluciones de IgG se sometieron al mismo tratamiento que las diluciones usadas para la curva patrón. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. La concentración de los eluatos de IgG se obtuvo interpolando los valores de absorbancia en la curva patrón. La linealidad de la curva fue de 0.9937. Las concentraciones de los eluatos se presentan en el Apéndice II.

7.5 Biblioteca de péptidos *phage display*.

Se utilizó una biblioteca *phage display* comercial de dodecapéptidos lineales con secuencias al azar (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Los péptidos se expresan en el extremo N-terminal de la proteína III (pIII), proteína de cubierta menor del fago filamentoso M13. La complejidad de la biblioteca fue del orden de 2.7×10^9 .

7.6 Selección de afinidad de fagos por *biopanning*

La selección de fagos por *biopanning* se llevó a cabo como se describe en trabajos previos y de acuerdo a la experiencia en nuestro grupo (Scott y Smith, 1990; Gazarian y cols., 2000a; 200b; Palacios-Rodríguez 2003). Se usaron micro placas de 96 pozos como fase sólida (Immulon, 4 flat bottom plates, Dynatech Lab Inc, USA). Se sensibilizaron 2 pozos con IgG del paciente a una concentración de 15 y 7.5µg en 100µL de PBS 1x y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con agitación suave y en cámara húmeda. Los anticuerpos no adheridos se desecharon y los pozos se lavaron 4 veces con 200µL de PBST (Tween-20 0.1% v/v). Posteriormente se bloqueó con 300µL de PBS-BSA al 1% (albúmina sérica bovina) durante una hora a 4°C, los pozos se lavaron 6 veces.

La solución de fago se preparó tomando 10µL de la biblioteca original (2×10^{11} fagos) en 190µL de PBST 0.1%. Se añadieron 100µL a cada pozo y se incubó por una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Los fagos que no se unieron a la IgG se eliminaron lavando 10 veces. Los fagos seleccionados por afinidad se eluyeron con 100µL de glicina-HCl 0.2M, pH 2.2 a temperatura ambiente con agitación suave durante 10 minutos. Los eluatos de los dos pozos

se colectaron en un mismo tubo y se neutralizaron con Tris-HCl 1M, pH 9.1. El eluato obtenido se tituló para determinar el número de clonas de fago recuperadas. Para ello, se prepararon tres diluciones seriadas (1:1000) en medio LB líquido, partiendo de 1 μ L del eluato. Se adicionaron 10 μ L de la última dilución en 200 μ L de cultivo de *E. coli* ER2738 (Biolabs) y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos para que se llevara a cabo la infección. Transcurrido el tiempo, el volumen se transfirió a un tubo que contenía 4mL de medio agarosa top previamente fundido. Se mezcló por inversión y el contenido se vertió en una caja Petri con LB-tetraciclina 20mg/mL. Se incubó toda la noche a 37°C. Se determinaron las ufp y el título del eluato se obtuvo a partir de las diluciones realizadas. Posterior a la titulación, el 75% del eluato se amplificó en cultivo de *E. coli* ER2738 diluído 1:100 en medio 2xYT durante 4.5 horas a 37°C con agitación. El cultivo con fago amplificado se centrifugó a 10 000 rpm, 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le añadió ¼ de volumen de PEG/NaCl. Se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm, 4°C durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1mL de PBS 1x. Nuevamente se centrifugó a 10 000 rpm, 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó ¼ de volumen de PEG/NaCl. Se mezcló y se incubó a 4°C durante 60 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 10 000 rpm y 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 200 μ L de PBS 1x/NaN₃ 0.02%. Se centrifugó una vez más a 10 000 rpm, 4°C durante 2 minutos y el sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo. El eluato amplificado y purificado de la primera ronda se sometió a una segunda ronda de *biopanning* para enriquecer los fagos capaces de unirse específicamente a los anticuerpos. Con base en el título del eluato amplificado, se calculó el volumen correspondiente para tener 10¹¹ fagos y se llevaron a cabo dos rondas más bajo el mismo procedimiento. A partir de la segunda ronda se incrementó la concentración de Tween-20 en la solución de lavado (PBST) a 0.5%.

7.7 Aislamiento de clonas de fagos seleccionadas por los anticuerpos

El eluato de la tercera ronda no amplificado, se tituló directamente en placas de LB/X-gal/IPTG para aislar al azar clonas individuales mediante picadura teniendo cuidado de tomar únicamente placas azules. Cada clona se amplificó siguiendo el esquema general de amplificación descrito en el punto anterior. Del sobrenadante obtenido después de centrifugar el cultivo con fago amplificado, se tomó 1mL para purificar ADN de cadena sencilla y determinar la secuencia de las clonas individuales; el resto se utilizó para purificar el fago de la misma manera que en el punto 7.6, solo que en este caso el precipitado inicial se resuspendió en un volumen de 200 μ L de PBS 1x, y el final en 80 μ L de PBS1x/NaN₃ 0.02%.

Los títulos de los eluatos y de algunas clonas individuales se presentan en el Apéndice III.

7.8 Secuenciación de ADN

El ADN de cadena sencilla se preparó de acuerdo a lo descrito por Sambrook y cols., 1989. La determinación de secuencia se llevó a cabo por el método de di-deoxinucleótidos (Sanger y cols., 1977) empleando la secuenasa T7 (T7 Sequenase version 2.0 Quick-Denature Plasmid Sequencing kit, Amersham, UK), iniciador de secuenciación -28 gIII (5' HO GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C-3') (New England Biolabs) y (³⁵S) dATP(Amersham), todos se usaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuencia de aminoácidos de los péptidos fue deducida de la secuencia de nucleótidos obtenida del ADN.

7.9 Reactividad en ELISA de las clonas de fago seleccionadas

El ELISA se llevó a cabo en microplacas (Maxi Sorp TM Nunc Roskilde, Denmark) por incubación de 100µL/pozo de una suspensión del fago (1 X 10¹⁰ ufp/mL en PBS/BSA 50 ng/100µL) toda la noche a 4°C. Los fagos no unidos se eliminaron y los pozos sensibilizados se lavaron 3 veces con 200µL de PBS/Tween-20 0.3%. Posteriormente se bloquearon con 300µL de PBS/BSA 1% 1 hora a 37°C. Después de 5 lavados los pozos se incubaron con IgG del paciente (5µg/pozo) diluída en PBS/BSA 0.2%/Tween-20 0.2% por una hora a 37°C y se lavaron 6 veces. Los anticuerpos unidos se detectaron usando un anticuerpo anti- IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina diluído 1:1000 en PBS/BSA 0.2%/Tween-20 0.2% de acuerdo a la recomendaciones del fabricante (Zymed Laboratories, South San Francisco CA, USA). La placa se incubó a 37°C durante una hora. Después de 8 lavados se añadieron 100µL de p-nitrofenilfosfato (Sigma) a cada pozo diluido en amortiguador de dietanolamina 1M, pH 9.8. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas automático (Humareader, Humarco) a 405 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

7.10 Bioseguridd

El traslado de los sueros desde el hospital hacia el laboratorio donde se realizó este estudio se llevó a cabo siguiendo los reglamentos generales establecidos en las "Normas de bioseguridad para los laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH", editadas por la OMS, 1992. La manipulación de los sueros dentro del laboratorio durante la purificación de IgG, se realizó bajo las mismas normas. De igual manera se siguieron los lineamientos establecidos por la Comisión de Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El material usado se sometió a procesos de desinfección con hipoclorito de sodio al 10%, o bien a esterilización por vapor. Los desechos sólidos se depositaron en un contenedor adecuado para su incineración.

8. Resultados

8.1 Selección de clonas con IgG de un paciente infectado por VIH-1.

8.1.1 Características clínicas del paciente.

Se estudió un sujeto de 42 años que acudió al Hospital General Regional No. 1 "Gabriel Mancera" del IMSS (México, D.F.) por problemas respiratorios en 2001. Fue hospitalizado y diagnosticado como VIH positivo. El paciente presentaba dificultad respiratoria con sensación de ahogo (cuadro de neumonía atípica). Se sospechó de infección por *Pneumocystis carinii* y se indicó tratamiento: anfotericina B, trimetoprima con sulfametoxazol, amikacina y cefotaxina. El análisis microbiológico para detección de BAAR resultó negativo por lo que el diagnóstico final fue neumonía polimicrobiana. Posteriormente recibió transfusión de cinco paquetes globulares y se realizaron los análisis inmunológicos pertinentes. Se encontró una CV de 116 000 copias/mL y una cuenta de linfocitos TCD4+ de 26 células/mm³. El paciente nunca había recibido TARV pero de acuerdo a los parámetros clínicos y el estado crítico de salud en el que se encontraba se decidió iniciar tratamiento. El esquema consistió en una combinación de tres antirretrovirales: dos inhibidores de la transcriptasa reversa (ITRAN), zidovudina (ZDV) y zalcitabina (ddC); y un inhibidor de proteasa (IP), nelfinavir (NFV). Además se indicó ranitidina, fluconazol y trimetoprima con sulfametoxazol. Después de 15 semanas de TARV, la cuenta de linfocitos TCD4+ se incrementó a 136 células/mm³ y la CV descendió a 5840 copias/mL. Cabe mencionar que el paciente tuvo estricto apego al tratamiento. Después de 12 meses de iniciar TARV se presentó síndrome anémico: pérdida de peso, astenia, anorexia y disnea; entonces se indicó fumarato ferroso, ranitidina y la TARV continuó igual. Transcurridos dos meses se sospechó de toxicidad por ZDV, por lo que se suspendió y se indicó otro inhibidor de la transcriptasa reversa (ITRAN); didanosina (ddl).

La primer toma de muestra para este estudio se realizó antes de iniciar el tratamiento y posteriormente, a las 15 semanas de haber iniciado el mismo se tomó una segunda muestra de sangre.

8.1.2 Selección de clonas antes de recibir TARV

A fin de identificar epítomos de células B en este paciente, que reflejaran su estado inmune humoral se decidió emplear una biblioteca de péptidos con secuencias al azar de 12 aminoácidos expresados en la proteína III de la superficie del fago filamentoso M13.

En el trabajo realizado por Palacios-Rodríguez (2003), se reportó una selección control empleando como blanco IgG de dos sujetos VIH negativo para dar validez a los resultados de la selección con el paciente VIH positivo y comprobar que los motivos que pudieran

seleccionarse con la IgG del paciente estuvieran asociados a la infección por VIH-1. Las secuencias de los péptidos seleccionados por estos individuos se presentan en el Apéndice IV. En el presente estudio se desarrolló una selección con IgG proveniente del paciente VIH positivo antes de recibir TARV empleando la biblioteca de 12 aminoácidos. Después de tres rondas de selección, se secuenciaron al azar un total de 62 clonas que se clasificaron en 4 grupos de acuerdo a la secuencia que presentaron en el péptido que despliegan.

8.1.2.1 Clonas con motivo GQ/PGP

Un grupo de clonas seleccionadas por este paciente presentó homología a la región GPGR del asa V3 de la gp120 del VIH-1 (fig. 10).

El asa V3 es una de las regiones en el virus con la tasa más alta de variación, pero es en cuatro aminoácidos sobre los que recae la responsabilidad estructural de la región: GPGR ya que participan en la unión con el receptor CD4 de la célula blanco y la unión al correceptor (receptor de quimiocina CCR5 o CXCR4). Estos mecanismos cruciales en la infectividad del virus explican por qué esta región es relativamente conservada estructuralmente (Zolla-Pazner, 2004) pero con distintas variaciones reportadas para esta secuencia (Nájera y cols., 2002). Este epítipo localizado en la parte central del asa V3 es susceptible de neutralización (Denisova y cols., 1995), por ello y por las características mencionadas es considerado un blanco importante en el diseño de vacunas.

Se obtuvieron dos clonas relacionadas a este epítipo. Las secuencias de los péptidos fueron: **HGQGP**FWDPTLP y AGTV**SGP**PHHP. La variación de los motivos es solo en un aminoácido: glutamina (Q) por prolina (P).

Aunque ambos péptidos fueron seleccionados por los anticuerpos del paciente durante el tamizado, solo la clona 15 fue reconocida eficientemente por los anticuerpos en formato de ELISA (fig. 11). La alta reactividad de los anticuerpos hacia esta clona puede atribuirse a que la secuencia de su péptido es la que mejor mimetiza al epítipo que generó los anticuerpos en el paciente; o bien a que la forma del epítipo GQGP predomina más en el virus que la forma GPGP.

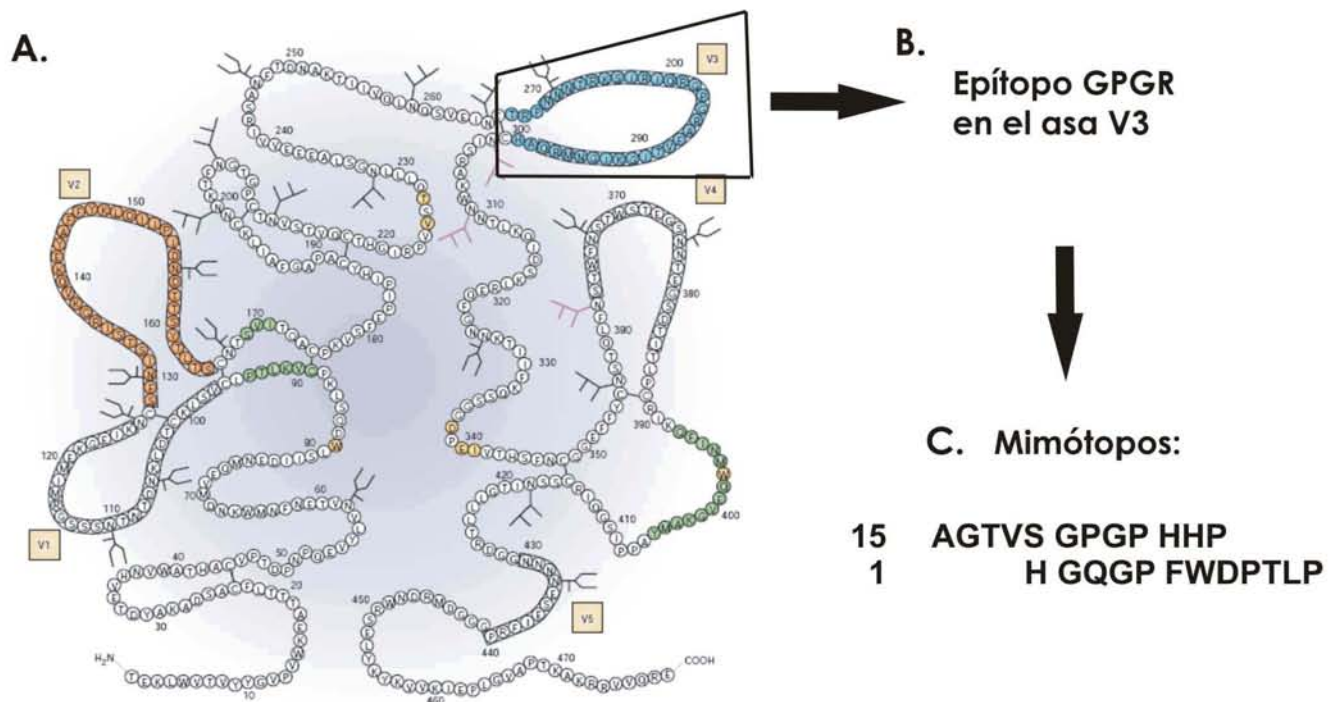


Figura 10. Representación esquemática de la gp120, epítipo y mimótopos. **A.** Se muestra la estructura primaria de la proteína (Zolla-Pazner, 2004). **B.** Secuencia del epítipo del asa V3 de la gp120 que induce anticuerpos neutralizantes. **C.** Secuencias de los mimótopos seleccionados por los anticuerpos del paciente. Del lado izquierdo, se indica el número asignado a cada clona.

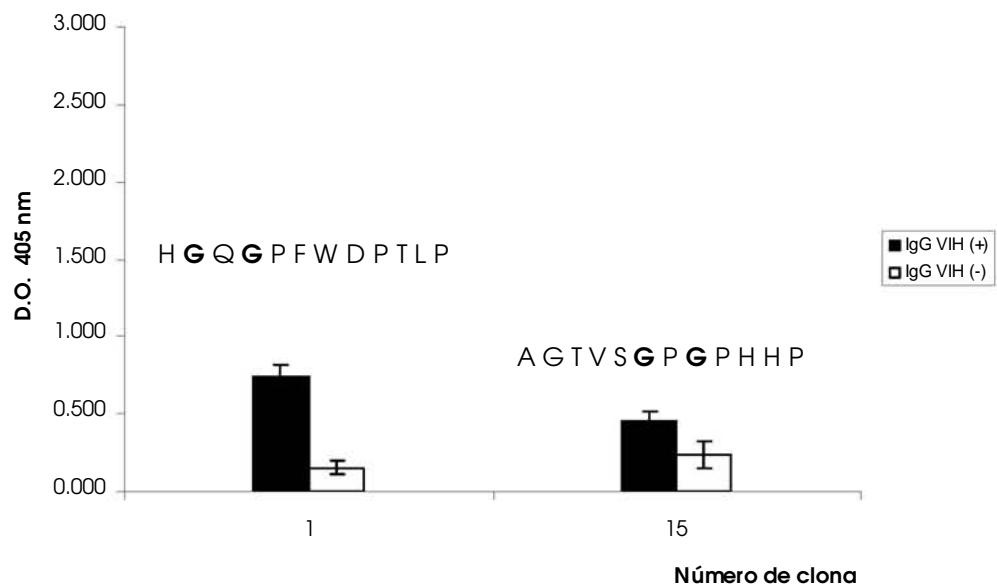


Figura 11. Reactividad en ELISA de las clonas con motivo GQ/PGP seleccionadas por la IgG del paciente antes de iniciar TARV. En la parte superior se muestra la secuencia de los péptidos correspondientes. Las clonas se enfrentaron a la IgG del paciente (barras negras) y a IgG de los sujetos VIH negativo (barras blancas).

8.1.2.2 Clonas con motivo CxxC

Por otro lado, en este paciente también se aislaron clonas con otro motivo. El motivo en este caso presentó la estructura CxxC. Las secuencias se muestran en la Tabla 2. En este caso se asignaron las posiciones 1 a 4 a los aminoácidos que abarcan el motivo CxxC, comenzando con la cisteína (C) del extremo N-terminal. Se obtuvieron ocho clonas con esta estructura, donde se observó que las cisteínas 1 y 4 fueron constantes.

Tabla 2. Secuencias de los péptidos seleccionados por la IgG del paciente antes de iniciar TARV que contienen el motivo CxxC

Clona/Frecuencia*	N-terminal	Secuencia										C-terminal	
8/2		C	L	V	C	L	S	<u>L</u>	I	<u>P</u>	D	P	L
14/2	Q	C	L	V	C	P	T	<u>L</u>	V	<u>P</u>	S	L	
13/2		C	I	I	C	H	T	<u>L</u>	L	<u>P</u>	S	T	W
4/1	E R M	C	N	K	C	D	P	<u>L</u>	V	<u>P</u>			
52/1	D L S	C	L	I	C	H	P	<u>L</u>	V	<u>P</u>			

*Frecuencia: número de veces que se obtuvo esa secuencia

Los aminoácidos de la posición 2 fueron leucina (L), que fue el predominante, isoleucina (I) y asparagina (N), mientras que en la posición 3, la valina (V) fue el aminoácido que se presentó con mayor frecuencia seguido de isoleucina (I) y lisina (K). Además de este motivo se encontraron otros aminoácidos que se conservan en todas las secuencias, como son la leucina (L) y prolina (P) en el extremo C-terminal, posiciones 7 y 9 respectivamente.

Estas secuencias que contienen cisteínas podrían estar relacionadas a la proteína Tat del VIH-1 pues esta contiene un dominio rico en cisteínas en los aminoácidos 22-37 (fig. 12A y 12B).

Se han identificado epítomos de células B en la región rica en cisteínas (Tähtinen y cols., 1997) y un péptido que coincide con esta región fue capaz de inducir respuesta CTL en ratones (Morris y cols., 2002).

La reactividad de estas clonas en ELISA se muestra en la figura 13. Las clonas 8, 13 y 14, fueron reconocidas eficientemente por la IgG del paciente, y en el proceso de selección estas mismas secuencias se aislaron más de una vez.

Para fines de estudio, se numeraron las posiciones del 1 al 7 a los aminoácidos que cubren el motivo CxxKxxC. El número 1 comienza en la cisteína (C) del extremo N-terminal. Es posible observar que las cisteínas (C) 1 y 7, y la lisina (K) 4 siempre se conservaron, mientras que los aminoácidos de las posiciones 2, 3, 5 y 6 fueron variables. Los aminoácidos que predominaron en estos motivos de acuerdo a la secuencia del epítipo de la gp41 fueron: glicina (G) en la posición 3, leucina (L) en la posición 5 e isoleucina (I) en la posición 6. En la posición 2 predominó treonina (T) y se obtuvo serina (S) en la clona 11. Se encontró también que la mayoría de los péptidos presentaron treonina (T) en las posiciones 8 y 9 al igual que ocurre en el epítipo de la gp41 (Tabla 3).

Para evaluar la reactividad de las clonas, en el presente trabajo se realizó el ELISA con los ocho mimótopos presentados en la tabla 3 (fig. 14). La mayoría de las clonas fueron reconocidas eficientemente por los anticuerpos. Se identificó que las clonas con las reactividades más altas fueron aquellas que se seleccionaron más de una vez; siendo el valor mayor para la clona 23, seguido de la clona 5 que se aisló 6 veces y el menor para la 55, que solo se seleccionó una vez.

Tabla 3. Secuencia de los péptidos que contienen el motivo CxxKxxC seleccionados por IgG del paciente antes de iniciar TARV (resultado obtenido en experimentos anteriores: Palacios-Rodríguez, 2003)

	Epítipo													
	C S G K L I C													
Clona/Frecuencia*	N-terminal					Motivo							C-terminal	
5/6	L	P	Q	Q	A	C	L	G	K	L	L	C		
11/2				T	I	C	S	M	K	S	A	C	I	I
12/2			L	L	A	C	T	M	K	L	P	C	S	V
23/2				D	V	C	M	G	K	L	V	C	I	M
24/1			S	P	N	C	E	G	K	I	I	C	G	S
36/1				H	A	C	T	G	K	L	R	C	I	I
22/1				Y	G	C	H	S	K	I	T	C	I	I
55/1	H	L	S	I		C	D	S	K	L	I	C	H	

*Frecuencia: número de veces que se obtuvo esa secuencia

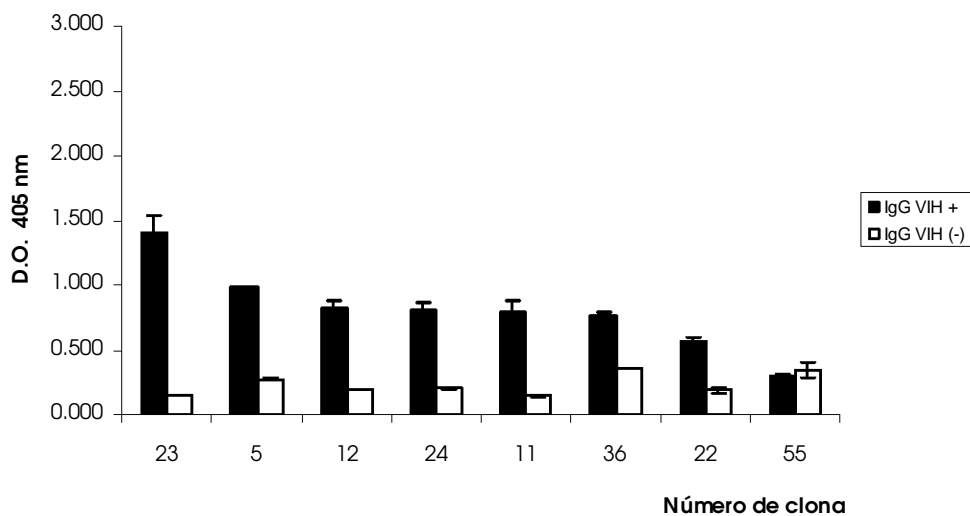


Figura 14. Reactividad en ELISA de las clonas con motivo CxxKxxC seleccionadas por IgG del paciente antes de iniciar TARV. Las clonas se enfrentaron a la IgG del paciente (barras negras) y a IgG de los sujetos VIH negativo (barras blancas) que se emplearon como controles negativos.

El último grupo de clonas aisladas en este proceso de selección, en el que se usó la IgG del paciente antes de iniciar TARV, corresponde a aquellas que no presentaron motivo y se presentan en el Apéndice V.

8.1.3 Selección de clonas después de TARV

Después de 15 semanas de tratamiento antirretroviral, se realizó una segunda toma de muestra para purificar IgG y emplearla en una nueva selección.

Se obtuvieron 16 clonas con 15 secuencias diferentes. La clona 8 se seleccionó dos veces. Los tres patrones de reconocimiento mostrados anteriormente (CxxC, GQ/PGP y CxxKxxC) desaparecieron. Estas secuencias contienen un alto contenido de triptofano (W), lo que sugiere interacciones inespecíficas. Las secuencias seleccionadas en este periodo de la TARV se presentan en la Tabla 4.

Analizando la reactividad de estas clonas en el ELISA bajo las nuevas condiciones, se obtuvieron en general bajos niveles (fig. 15). Transcurridas las 15 semanas de TARV, el paciente mejoró notablemente pues su CV descendió a 5840 copias/mL y cuenta de linfocitos T CD4+ fue de 136 células/mm³. Probablemente el control de la viremia después del uso de TARV ocasionó un cambio en la respuesta humoral, lo cual se reflejó en las secuencias obtenidas pues no se volvieron a seleccionar los motivos obtenidos antes del tratamiento.

Tabla 4. Secuencias de los péptidos seleccionados por la IgG del paciente después de 15 semanas de TARV

Clona/Frecuencia*	Secuencia											
8/2	F	H	R	W	P	T	W	P	L	P	S	P
2/1	A	T	W	S	H	H	L	S	S	A	G	L
3/1	M	A	P	E	V	H	P	V	P	H	L	R
5/1	H	L	F	S	P	W	W	I	S	R	W	A
6/1	H	L	R	H	Y	A	P	W	F	W	T	T
7/1	N	V	L	H	N	S	S	L	S	R	F	P
1/1	K	P	Q	P	Y	Y	V	T	T	L	R	F
9/1	H	L	R	Y	F	W	Q	P	V	T	T	T
10/1	H	F	W	N	R	W	M	Y	N	P	A	P
12/1	E	Y	L	S	A	I	V	A	G	P	W	P
13/1	T	Q	Q	S	V	P	S	T	T	L	M	Y
14/1	H	F	S	L	R	D	W	W	L	P	Q	R
15/1	L	H	R	H	S	L	W	A	S	A	W	T
16/1	G	F	L	S	Y	P	T	V	K	R	P	P
18/1	H	W	Y	G	W	I	T	S	A	T	H	V

*Frecuencia: número de veces que se obtuvo esa secuencia.

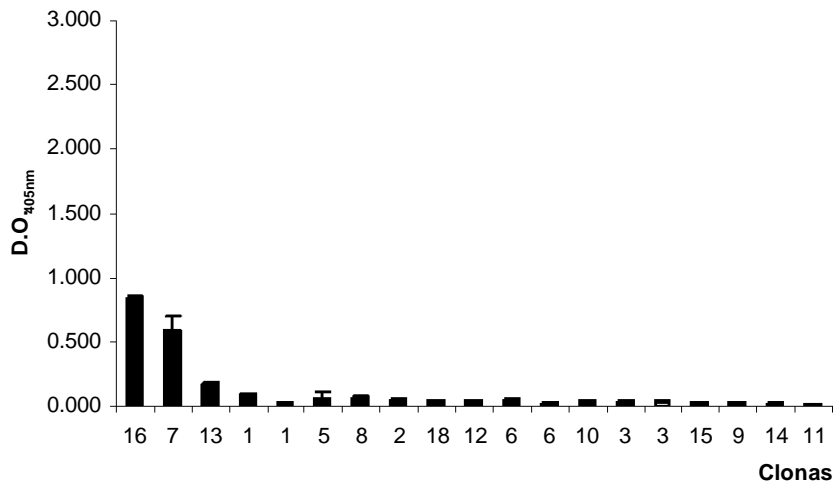


Figura 15. Reactividad en ELISA de las 16 clonas seleccionadas por la IgG del paciente después de 15 semanas de TARV.

9. Discusión

La infección por VIH-1 causa un amplio espectro de manifestaciones clínicas, sin embargo éstas se presentan en una forma muy variada entre los individuos infectados. Estas diferencias se atribuyen principalmente a la constitución genética del individuo y a factores inmunológicos que comprenden tanto la inmunidad humoral como la celular (Hogan y Hammer, 2001a; 2001b). Algunos estudios han sugerido que la inmunidad mediada por células juega un papel crítico en el control de la viremia y subsecuentemente en el curso clínico de la enfermedad. No obstante, también es claro que la inmunidad humoral tiene un papel importante en la defensa contra el VIH-1 (Haigwood y Zolla-Pazner, 1998; Burton, 2002). Un aspecto importante en el análisis de la respuesta inmune humoral es la identificación de epítomos de células B que sean importantes en la inducción de anticuerpos. Se han definido epítomos con el uso de anticuerpos monoclonales (Xu y cols., 1991; Keller y cols., 1993; Menéndez y cols., 2004), sin embargo pocos se han identificado con anticuerpos policlonales provenientes de sujetos infectados (Scala y cols., 1999; Enshell-Seijffers y cols., 2001; Arnaud y cols., 2004).

En el presente trabajo se empleó la metodología *phage display* como herramienta para estudiar el caso clínico de un individuo mexicano VIH positivo y aportar nuevos resultados en términos de los epítomos reconocidos por anticuerpos policlonales de clase IgG provenientes del paciente infectado que pudieran reflejar el estado de su respuesta humoral. El paciente se encontraba en un estado de salud crítico con una cuenta de linfocitos T CD4+ de 26 células/mL y una CV de 116 000 copias/mL, por lo que era candidato a recibir TARV. También se incluyó el análisis después de la administración de TARV para evaluar el efecto del tratamiento sobre la respuesta humoral.

Antes de recibir TARV se identificó que los anticuerpos fueron capaces de seleccionar un número variado de mimótomos. Se obtuvieron cuatro grupos de secuencias. Las más abundantes pero sin relevancia fueron aquellas que no presentaron ningún motivo (Apéndice V), seguidas por el grupo que presentó el motivo CxxKxxC (Palacios-Rodríguez, 2003). En menor proporción se encontraron motivos con la estructura CxxC y solamente se aislaron dos secuencias con el motivo GQ/PGP.

Las secuencias con motivo CxxKxxC reportadas por Palacios-Rodríguez (2003), se asocian directamente al epítomo inmunodominante de la gp41: CSGKLIC, residuos 603-609 cuya estructura está flanqueada por las cisteínas que forman un puente disulfuro que mantiene una conformación en asa (fig. 16A y 16B). En los mimótomos seleccionados las cisteínas pueden formar esta asa característica del epítomo, pues se ha descrito que los péptidos desplegados

en la superficie de fagos filamentosos que contienen cisteínas en sus secuencias forman estructuras secundarias, tales como asas (péptidos cíclicos) mediante puentes disulfuro (O'Neil y cols., 1992). En ningún caso se obtuvieron mimótopos que correspondieran al epítipo original, sin embargo, a pesar de las variaciones encontradas en los aminoácidos de las posiciones 2, 3, 5 y 6, en la mayoría de los casos se presentaron los aminoácidos correspondientes al epítipo original. Además de los aminoácidos CKC que siempre se presentaron, las treoninas (T) de las posiciones 8 y 9 involucradas en la mayoría de los péptidos, (Tabla 3, fig. 16A y 16B) sugieren que estos aminoácidos son también componentes del epítipo e importantes en términos de inducción de anticuerpos. Para apoyar estos resultados, cabe mencionar que dentro del mismo trabajo de Palacios-Rodríguez (2003), se analizaron otros 4 pacientes bajo la misma estrategia y se encontró que uno de ellos también seleccionó mimótopos de manera eficiente pues el 79% de las clonas aisladas presentó el motivo CxxKxxC en 13 secuencias diferentes (resultados no mostrados). La mayoría de las clonas también involucraron treonina (T) en las posiciones 8 y 9. La secuencia correspondiente a la clona 5 se presentó con alta frecuencia y también las clonas 12 y 55 fueron seleccionadas por este paciente. Estos datos y resultados de ensayos adicionales realizados en el laboratorio para ambos pacientes han confirmado que las estructuras CxxKxxC mimetizan perfectamente al epítipo inmunodominante de la gp41 del VIH-1.

El análisis de la reactividad (fig. 14) reveló una mayor afinidad hacia las clonas 5 y 23. Probablemente en estas dos secuencias, la combinación de los aminoácidos en las posiciones designadas como "x" permite una mejor conformación del epítipo para que interaccione con el anticuerpo y por eso se tiene una mayor reactividad.

Los resultados de la selección de estas clonas, así como su nivel de reactividad en ELISA indican que en este paciente, la estructura CxxKxxC produce una fuerte respuesta humoral. Este resultado coincide con el hecho de que el 90-100% de los individuos infectados por VIH-1 reconocen el epítipo CSGKLIC (Gallaher y cols., 1989; Goudsmit y cols., 1990; Horal y cols., 1991). De hecho, este epítipo ha mostrado ser importante para el diagnóstico diferencial de infecciones causadas por VIH-1 y se usa en pruebas de rutina para diagnóstico (Grann y cols., 1987). No obstante, se ha demostrado que aunque en términos generales los sujetos infectados reconocen la secuencia CSGKLIC, no todos son capaces de seleccionar mimótopos de este epítipo (Palacios-Rodríguez, 2003). Dado esto, queda claro que aunque exista una respuesta humoral en el organismo dirigida a la secuencia CxxKxxC no siempre la selección de motivos resulta exitosa.

Otro aspecto importante de esta región es que aunque es altamente inmunogénica, los anticuerpos que genera no son neutralizantes, sin embargo pueden mediar otras funciones

tales como ADCC y activación de la cascada de complemento (Zolla-Pazner, 2004; Burrer y cols., 2005).

En términos generales, los mimótopos obtenidos podrían reflejar las posibles variantes que presenta el epítipo, sin embargo, se sabe que esta asa es conservada en la mayoría de los retrovirus e incluso en los diferentes lentivirus, lo que sugiere una función esencial de esta región en el virus (Pancino y cols., 1995). Los aminoácidos CKC que se conservaron en todos los mimótopos y que mantienen la conformación en asa parecen ser clave en el reconocimiento por los anticuerpos. Esta idea es acorde con el trabajo realizado por Xu y cols. (1991), en el que se demostró que la desnaturalización del asa mediante sustitución de una cisteína por serina en los extremos N-terminal o C-terminal puede impedir la unión con anticuerpos policlonales, lo que sugiere que el puente disulfuro es necesario para mantener la estructura tridimensional requerida para el reconocimiento del anticuerpo. En las figuras 16A y 16B se representa el epítipo inmunodominante de la gp41 y en la 16C se proponen las posibles variantes del epítipo de acuerdo a las ocho secuencias obtenidas. Es importante observar que ninguna secuencia de los mimótopos corresponde a la del epítipo original.

La selección de mimótopos correspondientes al epítipo inmunodominante de la gp41 por medio de *phage display* utilizando anticuerpos policlonales también ha sido reportada por Scala y cols., (1999) y Enshell-Seijffers y cols., (2001). Estructuralmente, los mimótopos seleccionados en el trabajo previo a este estudio (Palacios-Rodríguez, 2003), indican características distintas a las reportadas por los dos autores antes mencionados, además en nuestro caso se cuenta con una colección más grande de mimótopos. En ambos trabajos se evidenció que hay diferencias a nivel de reconocimiento de los mimótopos entre los individuos infectados y más aún en el mismo individuo. Los mimótopos obtenidos en nuestra selección reflejan la variabilidad de la respuesta humoral hacia el VIH-1 en un mismo individuo.

Finalmente, se sabe que la secuencia CSGKLIC es reconocida por la mayoría pero no por todos los pacientes. Por lo tanto, las presentaciones alternativas de este dominio son de particular interés para el diseño de nuevos métodos de diagnóstico. La colección de mimótopos obtenida, podría ser utilizada para este fin y ser aplicada a la población mexicana.

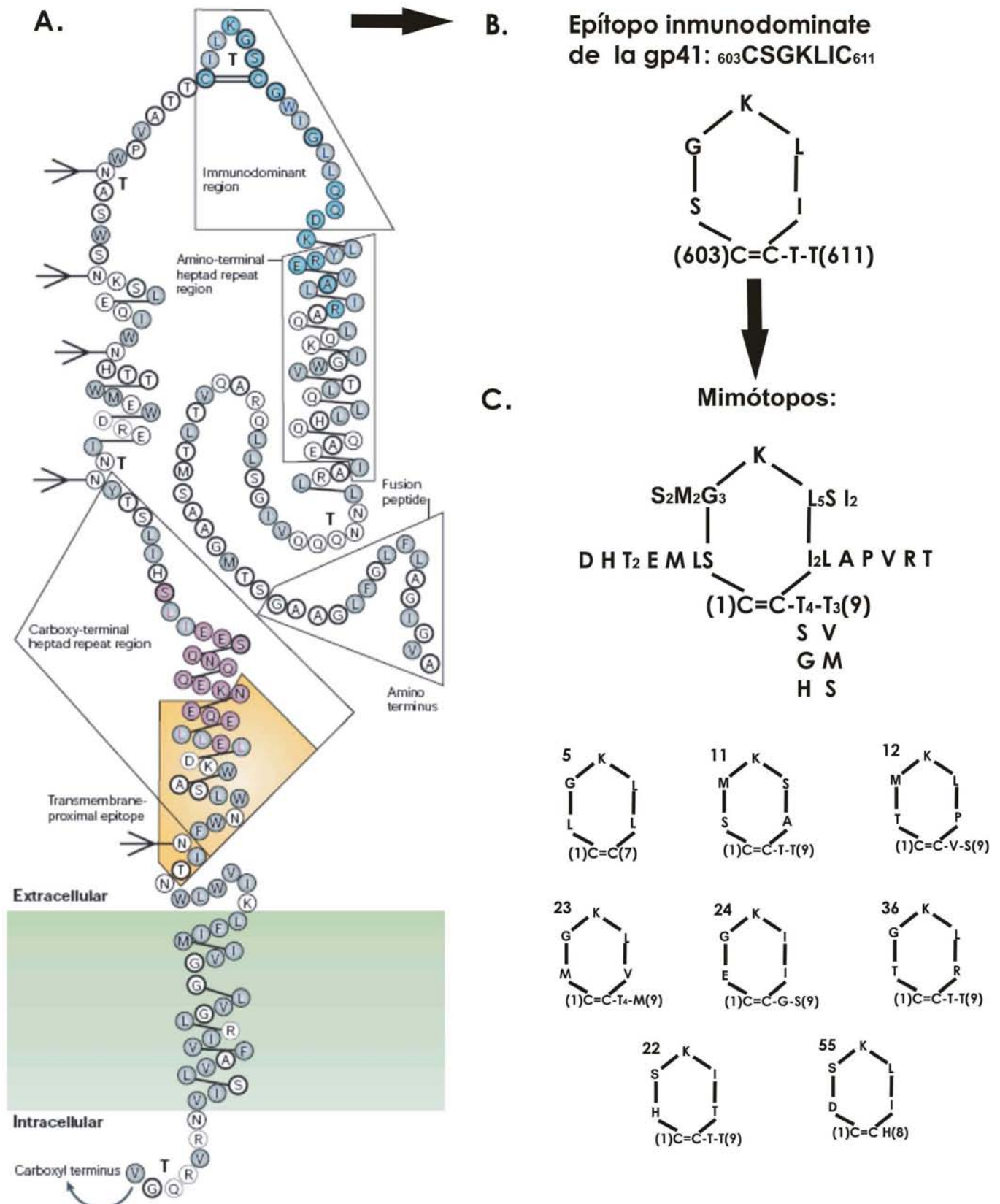


Figura 16. Representación esquemática de la gp41, epítipo inmunodominante y mimótopos seleccionados. **A.** Se muestra la estructura primaria de la proteína y elementos secundarios (hélices y asa) (Zolla-Pazner, 2004). **B.** Secuencia del epítipo inmunodominante de la gp41 en forma de asa. **C.** Secuencias de los mimótopos seleccionados por los anticuerpos del paciente VIH positivo. En la parte superior izquierda de cada mimótopo se indica el número asignado a cada clona.

El otro grupo de clonas obtenidas después de la selección se propone que están relacionadas con el epítopo GPGR del asa V3 de la gp120 del VIH-1. El asa hipervariable V3 de la gp120 desempeña un papel importante en el proceso de la entrada del virus a la célula. Contribuye al tropismo y al uso del correceptor CXCR4 ó CCR5 (Bandres y cols., 1998; Cormier y cols., 2001; Dong y cols., 2005a). El asa V3 es también importante en la inducción de anticuerpos específicos de VIH-1. Recientemente se ha encontrado que los anticuerpos anti-V3 fueron capaces de inhibir parcialmente la unión a DC-SIGN, una molécula presente en células dendríticas, lo que sugiere que estos anticuerpos impiden estéricamente la unión de DC-SIGN a la gp120 (Lekkerkerker y cols., 2004). El dominio central de esta asa originalmente se definió como el "determinante principal de neutralización" (PND por sus siglas en inglés) porque péptidos y fragmentos de proteínas que contenían V3 podían inducir anticuerpos neutralizantes. El asa V3 (aproximadamente 35 aminoácidos) varía extensamente en su secuencia entre diferentes cepas virales, pero tiene una región de aminoácidos relativamente conservada en la punta del asa (*crown*): GPGR. Las variaciones reportadas para esta secuencia son: GVGR, GIGK, GWGR, GRGR (Nájera y cols., 2002) y recientemente; GPGK(S/G) y GQ(L/W)G (Dong y cols., 2005b). En un estudio epidemiológico realizado en cinco regiones geográficas de México: Distrito Federal, Nuevo León, Jalisco, Puebla y Yucatán, se encontró que el motivo GPGR fue predominante en la población estudiada y reportaron diez variaciones, de las cuales tres coinciden con las reportadas por Dong y cols., (2005b): GPGS, GPGG y GPGK; y otras dos no habían sido observadas anteriormente: HPGG y GPEG (Rivera-Morales y cols., 2001). Los mimótopos GPGP y GQGP obtenidos en el presente trabajo pueden ser variaciones alternativas en la población mexicana. Aunque solo se aislaron dos péptidos con esta característica y solamente uno de ellos presentó reactividad alta en ELISA (fig. 11), la posibilidad de que estos motivos estén asociados al asa V3 de gp120 existe pues se ha descrito que los anticuerpos anti-V3 están presentes en el suero de muchos individuos infectados de VIH-1 (Krachmarov y cols., 2001). Por lo tanto, es posible que la respuesta humoral dirigida al asa V3 haya estado presente en el paciente en el momento de la toma de muestra. El hecho de haber seleccionado solo dos péptidos con este motivo no indica que sean de menor importancia. Una posible explicación de por qué se seleccionó una baja cantidad de estos mimótopos puede ser que el paciente seleccionó dos estructuras adicionales (CxxKxxC y CxxC) que competían con los mimótopos GP/QGP en la inducción de anticuerpos. Por lo tanto la poca frecuencia en que se aislaron estos motivos no se debe a la falta de una respuesta humoral fuerte dirigida a V3, sino quizás a la existencia de estructuras virales más inmunodominantes en el paciente. Otra posibilidad es que la biblioteca de péptidos lineales empleada en este estudio no es la más adecuada para encontrar mimótopos del epítopo. Las

diferencias de reactividad obtenidas en ELISA reflejan mayor afinidad hacia el motivo GQGP respecto a GPGP. Probablemente esta estructura mimetiza mejor al epítopo que generó la respuesta en el paciente. La propuesta de que los motivos tienen relación a V3 se sustenta con los resultados de estudios recientes realizados en este laboratorio, en donde se aislaron nuevas clonas cuyas secuencias presentaron la misma estructura (GP/QGX) usando la IgG de otro paciente y una biblioteca distinta con péptidos en asa flanqueados por dos cisteínas para formar el puente disulfuro. Los péptidos con este motivo se presentaron en alta proporción y frecuencia (Palacios-Rodríguez y cols., 2005). También, el motivo GPXR fue identificado anteriormente en péptidos seleccionados de una biblioteca de *phage display* pero en este caso se utilizó el anticuerpo monoclonal humano 447/52-D que es específico para esa región (Keller y cols., 1993). La importancia del presente trabajo radica en que es el primer reporte en el que se identifican motivos característicos del asa V3 de la gp120 empleando anticuerpos policlonales provenientes de un paciente, lo cual provee un mejor entendimiento de las características del epítopo nativo en el curso de la infección. Adicionalmente, se ha demostrado que estos mimótopos son altamente inmunogénicos y los anticuerpos generados tienen un alto potencial como inhibidores de la fusión celular mediada por las proteínas del VIH-1 por lo que la región se considera un blanco en el diseño de vacunas (Palacios-Rodríguez y cols., 2005). Dada la importancia de estos resultados, los mimótopos aislados se continúan estudiando.

El último grupo de secuencias seleccionadas por el paciente contiene el motivo CxxC. Este tipo de estructuras se encuentran en una forma repetida dentro de la región rica en cisteínas (aminoácidos 22-37) de la proteína reguladora Tat del VIH-1 (fig. 12A). El estudio de la proteína Tat es importante desde que se sabe que ejerce muchas actividades extracelulares que son críticas en la patogénesis del SIDA (Zagury y cols., 1998) particularmente en el progreso de la infección de VIH, el desarrollo de sarcoma de Kaposi y desórdenes neurológicos (Gallo, 1999). Se aislaron ocho clonas con este motivo, las dos cisteínas se conservaron en todas las secuencias y en ELISA, solamente las clonas 8, y 13 14 fueron reconocidas por los anticuerpos del paciente (fig. 13), que fueron precisamente las que se seleccionaron más de una vez, lo cual refleja una mayor afinidad hacia estas secuencias. Probablemente la interacción entre los anticuerpos y la estructura CxxC se facilita más cuando no se tiene un contexto de aminoácidos en el extremo N-terminal (Tabla 2, fig. 13). Los motivos obtenidos sugieren que los aminoácidos clave en el reconocimiento fueron las dos cisteínas. Esta idea es consistente con el trabajo realizado por Rossi y cols., (1997) en el cual se identificó que las mutaciones en las cisteínas 22 o 22/37 hacen a la proteína deficiente en sus capacidades transactivadoras, ello indica que estas cisteínas son cruciales para que Tat ejerza su función completa.

Aunado a esto está el hecho de que la proteína Tat contiene residuos o secuencias conservadas entre cepas virales (Liou y cols., 2004), e incluso en todos los lentivirus de primates (Jeang y cols., 1999). Los aminoácidos conservados incluyen siete cisteínas en las posiciones 22, 25, 27, 30, 31, y 37 de la región rica en cisteínas (Belliard y cols., 2003). Estos dominios ricos en cisteínas son de gran interés pues Boykins y cols., (1999) demostraron que al igual que la molécula Tat completa, el fragmento 21-41 es suficiente para transactivar, inducir replicación viral y causar angiogénesis. También se demostró que el péptido 24-51 induce entrada de Ca^{2+} en monocitos y macrófagos, similar a β -quimiocinas (Albini y cols., 1998). Recientemente, se identificó un epítipo, que abarca la región rica en cisteínas capaz de activar apoptosis *in vitro* con la misma eficiencia que la proteína Tat completa y fue capaz de inducir una fuerte respuesta humoral en animales, y los anticuerpos generados inhibieron la apoptosis de linfocitos T (Belliard y cols., 2003). La selección de motivos CxxC y su reactividad en ELISA indican la existencia de una respuesta humoral importante en el paciente dirigida a este tipo de estructura que se propone puede estar relacionada a Tat. Este hecho es probable pues también se sabe que los anticuerpos anti-Tat están presentes en el suero de pacientes infectados por VIH (Rodman y cols., 1993). Además, se han reconocido epítipos de Tat usando suero de pacientes. Estos epítipos se han caracterizado en varias regiones de la proteína (Tähtiinen y cols., 1997; Re y cols., 2001; Noonan y cols., 2003; Moreau y cols., 2004). También se ha evidenciado que el título de anticuerpos de Tat es elevado en LTNP o progresores lentos y es bajo en progresores rápidos, su decline en individuos asintomáticos estaría relacionado a un rápido progreso a SIDA (Rodman y cols., 1993; Re y cols., 1996; Zagury y cols., 1998; Re y cols., 2001;). Adicionalmente, se ha demostrado que estos anticuerpos pueden interferir con el progreso de la enfermedad por bloqueo de la proteína extracelular (Re y cols., 1995; Zagury y cols., 1998). Los anticuerpos anti-Tat suprimen la replicación del VIH-1 en cultivos celulares infectados *in vitro* (Re y cols., 1995) y se ha encontrado una relación inversa entre la ocurrencia de una fuerte respuesta humoral contra la proteína Tat del VIH y la CV (Re y cols., 2001). Estos resultados promueven el estudio de la proteína Tat como un posible componente para una vacuna contra el VIH-1 (Gallo, 1999). Dado lo anterior, resultaría interesante el hecho de haber encontrado anticuerpos dirigidos a la proteína Tat en este paciente. Sin embargo esto aún no es claro y por ello las propiedades de los mimótipos continúan en estudio. Se debe enfatizar el hecho de que en ninguna secuencia hubo sustitución de alguna de las dos cisteínas; asimismo los aminoácidos leucina (L) y prolina (P) fuera del motivo también fueron constantes en todos los casos, lo que podría sugerir que también puedan ser parte importante del epítipo en términos de interacción con el parátipo. Probablemente el anticuerpo reconozca el epítipo en un contexto más amplio: CxxCxxLxP y no solo CxxC. Por lo tanto, la tarea ahora es identificar completamente el epítipo que generó esta respuesta de anticuerpos en el

paciente aplicando otras estrategias para comprobar la propuesta de que los motivos con estructura CxxC están asociados a la región rica en cisteínas de Tat.

Con respecto al análisis post-TARV, se ha mostrado que una adecuada combinación de antirretrovirales, usando inhibidores de transcriptasa reversa e inhibidores de proteasa, prolonga la supervivencia del paciente y reduce dramáticamente la expresión de VIH e incrementa los niveles de linfocitos T CD4+ (Hammer y cols., 1997). El paciente incluido en este estudio, mejoró en sus indicadores clínicos pues antes del inicio de TARV su cuenta de células T CD4+ era de 26 células/mm³ y CV de 116 000 copias/mL. Transcurridas 15 semanas de TARV la cuenta de linfocitos TCD4+ se incrementó a 136 células/mm³ y la CV descendió a 5840 copias/mL. Morris y cols., (1998), reportaron un decremento gradual en la respuesta humoral específica de VIH asociada a la TARV; paradójicamente, Kim y cols. (2001), no observaron cambios dramáticos en el título de anticuerpos y encontraron que el título de anticuerpos neutralizantes se incrementó después de la TARV aunque hubo decremento de anticuerpos específicos del dominio inmunodominante de gp41. Otros estudios en los que se midió la respuesta inmune humoral dirigida al VIH después de iniciar TARV mostraron una disminución en la capacidad de unión a gp120 (Markowitz y cols., 1999). Estos resultados proveen evidencia del cambio en la respuesta inmune humoral específica de VIH causado por el uso de TARV. La selección de péptidos con los anticuerpos del paciente después del uso de TARV reflejó cambios en su respuesta humoral pues antes de iniciar TARV se tuvo selección específica de tres mimótopos: CxxKxxC, GP/QGP y CxxC pero después de 15 semanas de TARV estos motivos desaparecieron y no se observaron nuevos motivos. Por lo tanto, la TARV suprimió la selección de mimótopos, sugiriendo además por la evolución clínica del paciente, que los virus presentes en el individuo no desarrollaron resistencia al tratamiento hasta ese momento. El resultado obtenido en esta selección puede deberse a la caída en la CV causada por la TARV con el concomitante decremento de estimulación antigénica. Esta idea es consistente con el hecho de que la selección de mimótopos con este tipo de bibliotecas es posible solamente cuando el título de anticuerpos generado por un determinado epítipo en los pacientes, es superior o igual a un umbral que es específico para cada paciente. Una segunda posibilidad es que los nuevos epítipos virales no generaron anticuerpos como consecuencia del tratamiento pues se ha propuesto que durante la TARV los nuevos mutantes pueden desarrollar resistencia a los fármacos pero ser menos patogénicos (Morris y cols., 2001).

Por otro lado, se ha definido una relación entre una fuerte respuesta humoral específica de VIH antes de iniciar TARV y un resultado exitoso del tratamiento. Por el contrario, una débil respuesta humoral antes del inicio de TARV culmina con el fracaso del tratamiento. Con estos resultados, se ha propuesto la respuesta inmune humoral antes de la TARV como predictor

potencial del resultado del tratamiento (Morris y cols., 2001). Por lo tanto, el conocimiento de la respuesta inmune humoral de los pacientes antes de recibir TARV sería útil en la elección del esquema de tratamiento más adecuado. En este contexto, *phage-display* resultó ser un buen indicador del estado de la respuesta humoral del individuo infectado. La fuerte respuesta humoral presente en este paciente antes de recibir TARV, reflejada en la variedad y cantidad de mimótopos seleccionados sugiere una relación con el resultado exitoso del tratamiento pues actualmente el paciente se encuentra en buen estado clínico y su CV y cuenta de linfocitos T CD4+ han mejorado.

En resumen, por primera vez la aplicación de la metodología de *phage display* con el uso de anticuerpos policlonales provenientes de un paciente mexicano infectado por VIH-1 fue posible identificar un número variado de mimótopos que reflejaron el estado de la respuesta inmune humoral del paciente. La estructura CxxKxxC obtenida previamente (Palacios-Rodríguez, 2003) y analizada en el presente estudio, indujo el mayor título de anticuerpos que se reflejó en el número de clonas seleccionadas, por lo que es el epítopo inmunodominante en este paciente, seguido de la estructura CxxC y finalmente los mimótopos GQ/PGP que fueron aislados y caracterizados en este trabajo. Las diferentes estructuras seleccionadas y la variabilidad presente en las mismas, reflejan el amplio repertorio de anticuerpos presentes en este paciente y contribuyen al entendimiento de las propiedades de los epítomos virales en su ambiente nativo. Un factor determinante en la selección exitosa de mimótopos pudo haber sido la respuesta humoral generada en el paciente y probablemente ésta contribuyó al éxito de la TARV.

10. Conclusiones

- Con el uso de la metodología *phage display* se identificaron tres estructuras miméticas de epítomos del VIH-1 que infectó al sujeto mexicano investigado. Las estructuras fueron: CxxKxxC, GQ/PGP y CxxC
- La estructura CxxKxxC indujo el mayor título de anticuerpos reflejado en el número de péptidos seleccionados, por lo que representa el epítomo inmunodominante en este paciente, seguido de la estructura CxxC y finalmente, GQ/PGP.
- Por primera vez, se identificaron mimótopos característicos de la secuencia GPGR del asa hipervariable V3 de la gp120. Los mimótopos GQGP y GPGP obtenidos en el presente trabajo pueden ser nuevas variaciones del dominio GPGR encontradas en la población mexicana.
- Las secuencias con motivo CxxC son mimótopos de un epítomo diferente a los del complejo de envoltura. Se propone que podrían estar relacionados a la proteína reguladora Tat del virus que contiene un conjunto de estructuras CxxC.
- El uso de anticuerpos del paciente después de iniciar Terapia Antirretroviral (TARV) mostró su incapacidad para seleccionar mimótopos. La TARV causó como consecuencia de la supresión viral, un cambio en la respuesta humoral del paciente.
- Los péptidos seleccionados podrían ser empleados como antígenos e inmunógenos VIH-1 específicos, útiles en el diagnóstico de la infección y el diseño de vacunas.

Apéndice I

Soluciones, amortiguadores y medios de cultivo

A.1.1 Amortiguadores para purificación de IgG

- 1) Amortiguador de unión (1L): Fosfato de sodio 0.01M, pH 7.0/Cloruro de sodio 0.15M. Adicionar 0.53g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.87g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) y 8.77g de cloruro de sodio (NaCl) a 900mL de agua desionizada, ajustar pH a 7.0 con Trizma-base 1M y aforar.
- 2) Amortiguador de elución (1L): Glicina 0.1M/HCl, pH 2.6. Adicionar 7.51g de glicina a 900mL de agua desionizada. Ajustar pH con HCl 5N y aforar.
- 3) Amortiguador de neutralización: Trisma-base 1.0M

A.1.2 Amortiguadores y soluciones para *biopanning*

- 1) Solución concentrada de tetraciclina: 20mg/mL en etanol/agua 1:1. Conservar a -20°C en oscuridad. Homogeneizar en vórtex antes de usar.
- 2) IPTG/Xgal: Mezclar 1.25g de IPTG (isopropil β -D-tiogalactósido) y 1g de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) en 25mL de dimetilformamida. Repartir en alícuotas y almacenar en la oscuridad a -20°C .
- 3) PEG 20%/NaCl 40% (1L): 200g de Polietilenglicol 8000 en 500mL de agua desionizada y 146.1g de NaCl en 500mL. Esterilizar por separado. Mezclar después de la esterilización. Conservar a temperatura ambiente.
- 4) PBS 10x (1L): 6.1g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4), 1.9g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 80g de cloruro de sodio (NaCl), 2g de cloruro de potasio (KCl). Ajustar pH a 7.4. Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente. Diluir diez veces esta solución para obtener PBS 1x.
- 5) Amortiguador de elución: Glicina 0.20M-HCl en BSA 1mg/mL, pH 2.2.
- 6) Amortiguador para neutralizar el pH del eluato de fago: Tris 1M-HCl, pH 9.1.
- 7) PBS/Azida (NaN_3) al 0.02% (50mL): 1mL de NaN_3 al 1% en 49mL de PBS 1x. Conservar a temperatura ambiente.

A.1.3 Medios de cultivo para *biopanning*

- 1) LB (Luria Bertani) (1L)*: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl. Adicionar agua bidestilada y homogeneizar.
- 2) LB agar (1L)*: Preparar de la misma manera que el anterior, pero en este caso, añadir adicionalmente 15g de agar.

- 3) 2xYT (1L)*: 10g de NaCl, 10g de extracto de levadura y 16g de triptona.
- 4) Agarosa Top (1L)*: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl, 1g de MgCl₂ y 7g de agarosa.
- 5) LB-tetraciclina en placas: Fundir 1L de LB agar y enfriar a 70°C. Adicionar 1mL de solución de tetraciclina 20mg/mL. Homogeneizar y vaciar en cajas Petri. Almacenar a 4°C en oscuridad.
- 6) LB/IPTG/X-gal en placas: Fundir 1L de LB agar y enfriar a 70°C. Adicionar 1mL de solución de IPTG/X-gal, homogeneizar y vaciar en cajas Petri. Almacenar a 4°C en oscuridad.

*Después de su preparación, los medios de cultivo son esterilizados y almacenados a temperatura ambiente hasta su uso.

A.1.4 Soluciones para obtención de ADN de cadena sencilla (ss-form)

Amortiguador de yoduro de sodio: 10mM de Tris-HCl (pH 8), 1mM EDTA, 4M NaI. Almacenar a temperatura ambiente en oscuridad.

A.1.5 Preparación del cultivo de E. coli cepa ER2738

A 30 mL del medio LB, adicionar 30µL de solución de tetraciclina 20mg/mL. Inocular con una colonia de *E.coli* cepa ER2738 (BioLabs). Incubar a 37°C con agitación suave durante toda la noche o hasta obtener un crecimiento de 0.5 de Absorbancia a 600 nm.

A.1.6 Gel de acrilamida (6%) para secuenciación de ADN

Se mezclan 33.6 g de urea, 11.6mL de poliacrilamida (40%), 16mL de TBE 5x, 28mL de agua bidestilada y desionizada. Homogeneizar, filtrar y desgasificar la mezcla durante 40 minutos. Posteriormente, adicionar, 640µL de persulfato de amonio (10%) y 16µL de TEMED (0.1mg/µL de agua) para polimerizar.

A.1.7 Gel de agarosa

Se mezclan 0.5g de agarosa, 49mL de agua desionizada. Hervir y añadir 1mL de TAE 50x y 8µL de bromuro de etidio.

A.1.8 Soluciones para ELISA

Dilución de fago: PBS/BSA 50ng/100µL

Solución bloqueadora: PBS/BSA 1%

Dilución de anticuerpos: PBS/BSA 0.2%/Tween-20 0.2%

Solución de lavado: PBS/Tween-20 0.2%

Amortiguador de dietanolamina (1L): 100mL de dietanolamina, 102mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.4g de NaN_3 . Ajustar pH a 9.8 con HCl. Conservar a temperatura ambiente en oscuridad.

Apéndice II

Concentración de los eluatos de IgG

A.2.1 Paciente infectado por VIH-1

Fase de la toma de la muestra	Concentración de IgG en el eluato ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Primer toma: Antes de iniciar TARV	4.22
Segunda toma: 4 semanas de TARV	4.88
Tercera toma: 15 semanas de TARV	4.19

A.2.2 Sujetos VIH negativo

	Concentración de IgG en el eluato ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Sujeto 1	3.74
Sujeto 2	3.92

Apéndice III

Títulos de fago

A.3.1 Eluatos de las rondas de *biopanning* con la IgG del paciente

Eluato	Título (ufp/mL)
Primera ronda	1.4×10^6
Primera ronda amplificada	8.5×10^{12}
Segunda ronda	3.3×10^7
Segunda ronda amplificada	6.3×10^{13}
Tercera ronda	4×10^8

A.3.2 Títulos de algunas clonas de fago después de la amplificación individual (solución concentrada de fago)

No. de clona	Secuencia del péptido	Título (ufp/mL)
1	HGQGPFWDPTLP	8×10^{11}
2	WHRPLSPWNWMF	5×10^{11}
8	CLVCLSLIPDPL	5×10^{11}
11	TICSMKSACTTW	4.2×10^{12}
15	AGTVSGPGPHHP	2.5×10^{11}
22	YGCHSKITCTTF	4×10^{11}
23	DVCMGKLVCTML	3.6×10^{12}
24	SPNCEGKIICGS	5.4×10^{12}
34	FHWTQYFSPWIR	7.7×10^{12}
40	HYGLSTSLWIVP	8×10^{11}
65	LHWTPWWRPQHL	5.8×10^{12}

Apéndice IV

A.4.1 Selección de clonas con IgG de individuos VIH negativo.

Las secuencias de los péptidos seleccionados por IgG de dos sujetos VIH negativo se presentan en la Tabla 5. En todos los casos las secuencias fueron diferentes y con alto contenido de triptofano (W). De acuerdo a la experiencia en los trabajos realizados por Gazarian y cols., (2003), se ha observado que las secuencias de péptidos ricas en triptofano podrían sugerir interacciones inespecíficas, no seleccionadas por la molécula blanco.

El resultado de la selección es consistente con el estudio realizado por Folgori y cols., (1994), donde se definió que la identificación de epítomos de un determinado patógeno por medio de la selección de péptidos de bibliotecas *phage display* se logra empleando como blanco suero de sujetos enfermos pero no de sujetos sanos pues en estas condiciones no existe un estímulo antigénico que promueva la generación de una respuesta inmune potente. Los sujetos incluidos en esta parte del estudio no presentaban ninguna enfermedad. De hecho, por sus características generales fueron aceptados como donadores de sangre en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Tabla 5. Péptidos seleccionados por IgG de dos sujetos (99 y 68) VIH negativo. No se observa ninguna homología entre las diferentes clonas obtenidas

Sujeto/Clona	Secuencia											
99/4	W	Y	Y	P	P	W	W	T	Q	P	A	S
99/5	N	P	T	E	L	Y	T	E	S	R	Y	M
99/6	F	H	D	R	F	F	W	S	W	P	T	A
99/7	K	A	P	N	S	Q	Q	T	M	T	T	L
99/8	M	T	L	N	L	S	L	F	M	S	R	Y
99/11	F	Q	L	P	Y	W	W	Y	P	S	T	I
99/12	F	T	Y	N	A	W	N	S	G	G	V	H
99/14	L	K	L	Q	P	A	S	V	S	S	P	P
99/15	S	H	F	S	T	W	K	W	W	Q	N	R
99/16	F	H	K	N	W	P	I	W	W	Y	P	P
99/17	Y	G	G	M	P	P	P	N	N	N	A	G
68/2	G	I	N	T	Y	V	L	I	H	T	S	M
68/4	F	G	F	E	P	F	P	Q	P	M	S	L
68/5	N	P	Q	K	P	H	T	Y	M	F	P	R
68/6	L	T	L	N	P	L	Y	T	R	P	P	M
68/10	N	P	I	E	N	L	L	L	S	R	W	D
68/11	F	G	F	E	P	F	P	Q	P	T	S	L

Apéndice V

A.5.1 Clonas sin motivo seleccionadas por la IgG del paciente en estudio

El último grupo de clonas seleccionadas por IgG del paciente antes de iniciar TARV, no presentó ninguna homología con las proteínas del VIH-1 que pudiera sugerir algún mimótopo. La presencia de triptofano (W) fue constante en algunos péptidos.

Se obtuvieron 24 secuencias diferentes de un total de 35 clonas seleccionadas (56%) con esta característica. Las clonas 46, 3, 27 y 65 fueron seleccionadas más de una vez (Tabla 6).

Para evaluar el nivel de reactividad de estas clonas frente a la IgG se realizó un ensayo de ELISA (fig. 17). En términos generales la reactividad de las clonas fue baja.

Tabla 6. Secuencias de las clonas sin motivo seleccionadas por IgG del paciente antes de iniciar TARV

Clona/Frecuencia*	Secuencia
46/8	S L D H L W E L M T A T
3/3	S S S P A H P L W R L N
27/2	L G N S P D F L V P T S
65/2	L H W T P W W R P Q H L
2/1	W H R P L S P W N W M F
6/1	H Q G Q I F R S T L H Y
7/1	A L K S P Q A T S T T L
16/1	G Q L I V H Q A V P Y Y
17/1	N P M Y K P S L E R W K
20/1	S P L I L H D A V A P A
21/1	A W M T T P A P W F P A
34/1	F H W T Q Y F S P W I R
35/1	E S R H F A H D S T I H
39/1	A G L I I I E A V P P Y
40/1	H Y G L S T S L W I V P
45/1	L D A R I F P R S F P F
47/1	A T T Q P H N P H P M R
49/1	N P F I M H S A V P T Y
57/1	V S R P W L T P L T R P
58/1	L T T T L K P G V T A G
59/1	S G K T P F P T S F P W
61/1	E S R S Y H E F G L R L
62/1	L D A R I F P R S F P F
64/1	A E A I W D P R A Y L R

*Frecuencia: número de veces que se obtuvo esa secuencia

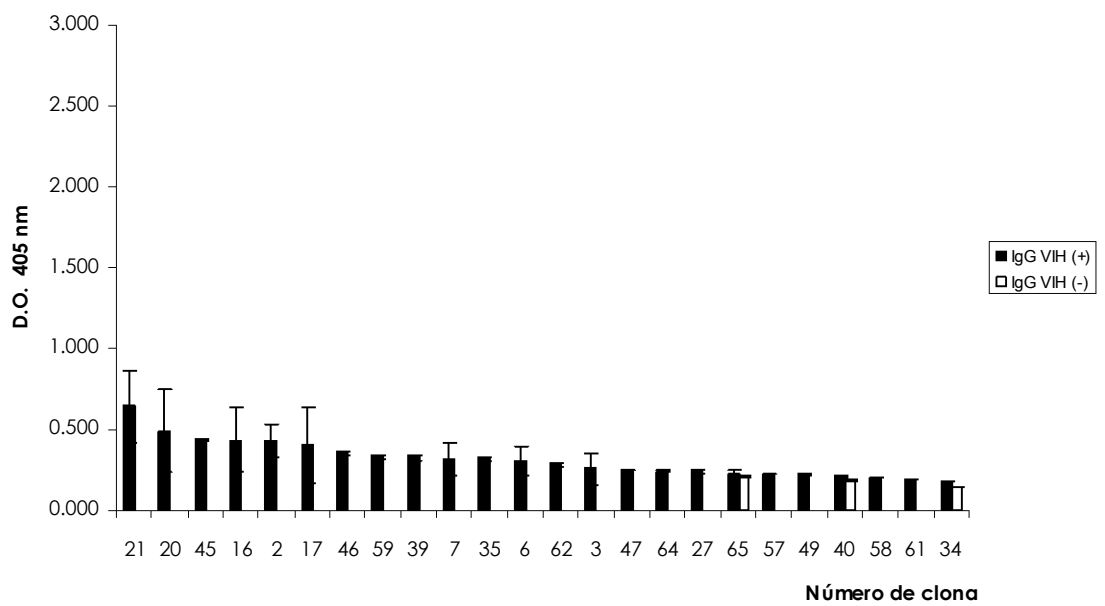


Figura 17. Reactividad en ELISA de las clonas sin motivo seleccionadas por IgG del pacientes antes de recibir TARV. Las clonas se enfrentaron a la IgG del paciente (barras negras). Como testigos, se seleccionaron tres clonas al azar y se enfrentaron a la IgG de los sujetos VIH negativo (barras blancas).

11. Bibliografía

1. Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *PNAS USA* 1998; 95:13153-13158.
2. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J. Gen. Virol.* 2003; 84:1649-1661.
3. Arnaud MC, Gazarian T, Palacios-Rodríguez Y, Gazarian K, Sakanyan V. Array assessment of phage-displayed peptide mimics of Human Immunodeficiency Virus type 1 gp41 immunodominant epitope: binding to antibodies of infected individuals. *Proteomics* 2004; 4:1959-1964.
4. Azzazy HM, Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.* 2002; 35:425-445.
5. Bandres JC, Wang QF, O'Leary J, Baleaux F, Amara A, Hoxie JA, Zolla-Pazner S, Gorny MK. Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J. Virol.* 1998; 72:2500-2504.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautuet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Síndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-871.
7. Baum LL, Cassutt KJ, Knigge K, Khattri R, Margolick J, Rinaldo C, Kleeberger CA, Nishanian P, Henrard DR, Phair J. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J. Immunol.* 1996; 157:2168-2173.
8. Belliard G, Romieu A, Zagury JF, Dali H, Chaloin O, Le Grand R, Loret E, Briand JP, Roques B, Desgranges C, Muller S. Specificity and effect on apoptosis of Tat antibodies from vaccinated and SHIV-infected rhesus macaques and HIV-infected individuals. *Vaccine* 2003; 21:3186-3199.
9. Boots LJ, McKenna PM, Arnold BA, Keller PM, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Robinson JE, Conley AJ. Anti-human immunodeficiency virus type 1 human monoclonal antibodies that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1997; 13:1549-1559.
10. Bour S, Schubert U, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol.* 1995; 69:1510-1520.

11. Boykins RA, Mahieux R, Shankavaram UT, Gho YS, Lee SF, Hewlett IK, Wahl LM, Kleinman HK, Brady JN, Yamada KM, Dhawan S. Cutting edge: a short polypeptide domain of HIV-1-Tat protein mediates pathogenesis. *J. Immunol.* 1999; 163:15-20.
12. Burrer R, Haessig-Einius S, Aubertin AM, Moog C. Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology* 2005; 333:102-113.
13. Burton, D. R. Antibodies, viruses and vaccines. *Nature Rev. Immunol.* 2002; 2:706–713.
14. Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrin, J., and Ho, D. D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332:201-208.
15. Carrillo-Maravilla E, Villegas-Jiménez A. El descubrimiento de VIH en los albores de la epidemia del SIDA. *Rev. Invest. Clín.* 2004; 56:130-133.
16. Cates W, Jr, Chesney MA, Cohen MS. Primary HIV infection a public health opportunity. *Am. J. Pub. Health* 1997; 87:1928-1930.
17. Connick E, Marr DG, Zhang XQ, Clark SJ, Saag MS, Schooley RT, Curiel TJ. HIV-specific cellular and humoral immune responses in primary HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996; 12:1129-1140.
18. Cormier, E.G., Tran, D.N., Yukhayeva, L., Olson, W.C., and Dragic, T. Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120–CD4 complexes. *J. Virol.* 2001; 75:5541–5549.
19. Cullen BR. HIV-1 Auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 1998; 93:685-692.
20. da Silva J. The evolutionary adaptation of HIV-1 to specific immunity. *Curr. HIV Res.* 2003; 1:363-371.
21. Denisova G, Zwickel J, Gershoni J. Binding of HIV-1 gp120 to an anti-V3 loop antibody reveals novel antigen-induced epitopes. *FASEB J.* 1995; 9: 127-132.
22. Dong XN, Chen X, Chen Y, Ablimit A, Ye Z, Wu Y, Chen YH. HIV-1 phenotype, tropism and sequence patterns: the association and preference. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2005a; 21:234–8.
23. Dong XN, Wu Y, Ying J, Chen YH. The antigenic tip GPGRAF_Y of the V3 loop on HIV-1 gp120: genetic variability and subtypes. *Immunol. Lett.* 2005b;101:112-114.
24. Enshell-Seijffers D, Smelyanski L, Vardinon N, Yust I, Gershoni JM. Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV+ individuals. *FASEB J.* 2001;15:2112-2120.
25. Fauci AS. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* 2003; 9:839-43.

26. Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Galfré G, Cortese R, Monaci P, Nicosia A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* 1994; 13:22-36.
27. Galicia O, Sánchez-Alavez M, Méndez-Díaz M, Navarro L, Próspero-García O. La glicoproteína 120 del VIH: potencial agente etiológico de la demencia asociada al SIDA. *Rev. Invest. Clín.* 2002; 54:437-452.
28. Gallaher, W. R., Ball, J. M., Garry, R. F., Griffin, M. C., Montelaro, R. C. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1989; 5:431-440.
29. Gallo RC. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine. *PNAS USA* 1999; 96:8324-8326.
30. Gallo RC. Historical essay. The early years of HIV/AIDS. *Science* 2002a; 298:1728-1730.
31. Gallo RC. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. *Immunological Reviews* 2002b; 185:236-265.
32. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cumminsk LB, Arthur LO, Peeters M., Shaw MG, Sharp PM, Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397:436-41.
33. Gatignol A., Jeang KT. Tat as a transcriptional activator and a potencial therapeutic target for HIV-1. *Adv. Pharmacol.* 2000; 48:20-227.
34. Gazarian KG, Gazarian TG, Solís CF, Hernández R, ChB Shoemaker, Lacleite JP. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immunol. Letters* 2000a; 72: 191-195.
35. Gazarian T, Selisko B, Herion P, Gazarian K. Isolation and structure-functional characterization of phage display library-derived mimotopes of noxiustoxin, a neurotoxin of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Mol. Immunol.* 2000b; 37:755-766.
36. Gazarian TG, Selisko B, Gurrola GB, Hernandez R, Possani LD, Gazarian KG. Potential of peptides selected from random phage-displayed libraries to mimic conformational epitopes: a study on scorpion toxin Cn2 and the neutralizing monoclonal antibody BCF2. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2003; 6:119-132.
37. Gazarian K, Caldwell GW, Atta-ur-Rahman, Spronger BA. Drug discovery and design via high throughput screening of combinatorial phage display protein-peptide libraries. In: *frontiers in drug design and discovery*. Bentham Science Publishers USA 2005; 1:29-67.
38. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 1986; 23:709-715.
39. Gisselquist D. Emergence of the HIV type 1 epidemic in the twentieth century: comparing hypotheses to evidence. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2003; 19:1071-1078.

40. Gómez-Román R, Soler-Claudín C. La importancia de la Secuencia Terminal Repetida Larga (LTR) en la patogenia del virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev. Invest. Clín.* 2000; 11:61-71.
41. Goudsmit J, Meloen RH, Brasscur R. Map of sequential B cell epitopes of the HIV-1 transmembrane protein using human antibodies as probe. *Intervirology* 1990; 31:327-338.
42. Grann Jr JW, Schwimmbeck PL, Nelson JA, Truax AB, Oldstone MBA. Diagnosis of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 1987; 156:261-267.
43. Hadida F, Vieillard V, Mollet L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P. Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 1999; 163:1105–1109.
44. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000;287:607-14.
45. Haigwood, NL; Zolla-Pazner S. Humoral immunity to HIV, SIV, and SHIV. *AIDS.* 1998; 12 (Suppl. A), S121–S132.
46. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ Jr, Feinberg JE, Balfour HH Jr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:725-733.
47. Hecht FM, Busch MP, Rawal B, Webb M, Rosenberg E, Swanson M, Chesney M, Anderson J, Levy J, Kahn JO. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 2002; 16:1119-1129.
48. Hillis D.M. Origins of HIV. *Science* 2000, 288:1757-1759.
49. Hirsch HH, Kaufmann G, Sendi P, Battegay M. Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38:1159–1166.
50. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-126.
51. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann. Intern. Med.* 2001a; 134:761-776.
52. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 2001b;134:978-996.
53. Horal P, Svennerholm B, Jcansson S, Rymo L, Hall WW, Vahlne. Continuous epitopes of the immunodeficiency virus type I (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J. Virol.* 1991; 65:2718-2723.

54. Huang ST, Lee HC, Liu KH, Lee NY, Ko WC. Acute human immunodeficiency virus infection. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2005; 38:65-68.
55. Instituto Nacional de Salud Pública. Actualizado al 15 de Noviembre de 2005. Disponible en www.insp.mx
56. Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:28837-28840.
57. Jolly PE, Weiss HL. Neutralization and enhancement of HIV-1 infection by sera from HIV-1 infected individuals who progress to disease at different rates. *Virology* 2000; 273:52-59.
58. Kassutto S, Rosenberg ES. Primary HIV Type 1 Infection. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38:1447-1453.
59. Keller, P. M. Arnold BA, Shaw AR, Tolman RL, Middelsworth FV, Bondy S, Rusiecki VK, Koenig S, Zolla-Pazner S, Conard P, Emini EA, Conley AJ. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology* 1993; 193:709-716.
60. Kim JH, Mascola JR, Ratto-Kim S, VanCott TC, Loomis-Price L, Cox JH, Michael NL, Jagodzinski L, Hawkes C, Mayers D, Gilliam BL, Birx DC, Robb ML. Selective increases in HIV-specific neutralizing antibody and partial reconstitution of cellular immune responses during prolonged, successful drug therapy of HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2001; 17:1021-1034.
61. Klasse PJ, Sattentau QJ. Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J. Gen. Virol.* 2002; 83:2091-2108.
62. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288:1789-1796.
63. Krachmarov, C.P., Kayman, S.C., Honnen, W.J., Trochev, O., Pinter, A. V3-specific polyclonal antibodies affinity purified from sera of infected human effectively neutralize primary isolates of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2001; 17:1737-1748.
64. Lekkerkerker AN, Ludwig IS, van Vliet SJ, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. Potency of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 antibodies to inhibit the interaction of DC-SIGN with HIV-1 gp120. *Virology* 2004; 329:465-476.
65. Liou LY, Herrmann CH, Rice AP. Human immunodeficiency virus type 1 infection induces cyclin T1 expression in macrophages. *J. Virol.* 2004; 78:8114-8119.
66. Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K, Cao Y, Binley JM, Talal A, Hurley A, Jin X, Chaudhry MR, Yaman M, Frankel S, Heath-Chiozzi M, Leonard JM, Moore JP, Racz P, Nixon DF, Ho DD. The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses. *J. Infect. Dis.* 1999; 179:527-537.

67. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001; 410:980-987.
68. Menéndez A, Chow KC, Pan OC, Scott JK. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J. Mol. Biol.* 2004; 338:311-327.
69. Meylan PR, Guatelli JC, Munis JR, Richman DD, Kornbluth RS. Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferon alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* 1993; 193:138-148.
70. Montagnier L. Historical essay. A history of HIV discovery. *Science* 2002, 298:1727-1728.
71. Moore JP, Doms RW. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *PNAS USA* 2003; 100:10598-602.
72. Moreau E, Belliard G, Partidos CD, Pradezinsky F, Le Buanec H, Muller S, Desgranges C. Important B-cell epitopes for neutralization of human immunodeficiency virus type 1 Tat in serum samples of humans and different animal species immunized with Tat protein or peptides. *J. Gen. Virol.* 2004; 85:2893-2901.
73. Morris CB, Thanawastien A, Sullivan DE, Clements JD. Identification of a peptide capable of inducing an HIV-1 Tat-specific CTL response. *Vaccine* 2002; 20:12-15.
74. Morris L, Binley JM, Class BA, Bonhoeffer S, Astill TP, Kost R. HIV-1 antigen specific and nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 1998; 188:233-45.
75. Morris MK, Katzenstein DA, Israelski D, Zolopa A, Hendry RM, Hanson CV. Characterization of the HIV-1 specific humoral immune response during highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2001; 28:405-415.
76. Moylett EH, Shearer WT. HIV: clinical manifestations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110:3-16.
77. Mújica-Guzmán F. Aislamiento y caracterización de péptidos en fago seleccionados por 2F5: un anticuerpo monoclonal neutralizante del virus de inmunodeficiencia humana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2005
78. Nájera R, Delgado E, Pérez Alvarez L, Thomson MM. Genetic recombination and its role in the development of HIV-1 pandemic. *AIDS* 2002; 16(suppl 4):S3-S16.
79. New England Bio Labs, Ph12. Phage display peptide library kit. Instruction manual. Catálogo 8100:1-21.
80. Noonan DM, Gringeri A, Meazza R, Rosso O, Mazza S, Muca-Perja M, Le Buanec H, Accolla RS, Albin A, Ferrini S. Identification of immunodominant epitopes in inactivated Tat-vaccinated healthy and HIV-1-infected volunteers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2003; 33:47-55.

81. O'Neil KT, Hoess RH, De Grado WF. Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from conformationally constrained phage display library. *Proteins* 1992; 14:509-515.
82. Organización Mundial de la Salud (OMS). Normas de bioseguridad para los laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH. Serie OMS sobre el SIDA, No. 9. Ginebra 1992.
83. Palacios-Rodríguez Y. Investigación de la respuesta immune contra un epítipo inmunodominante de la gp41 del VIH-1 en pacientes infectados, antes y durante tratamiento antirretroviral. Un estudio con phage display. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Inmunología. IPN. 2003.
84. Palacios-Rodríguez Y, Gazarian T, Majluf-Cruz A, Gazarian K. Using combinatorial phage display libraries as a source of novel peptides for anti-HIV-1 vaccines. XI Congreso de Carteles "Dr. Lino Díaz de León" 7 de Octubre 2005. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
85. Pancino G, Camion L, Sonigo P. Structural analysis of the principal immunodominant domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 1995; 69:2110-2118.
86. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993; 362:355-358.
87. Pantaleo G; Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what should know. *Nat. Med.* 2004; 10:806-810.
88. Re MC, Furlini G, Vignoli M, Ramazzotti E, Roderigo G, De Rosa V, Zauli G, Lolli S, Capitani S, La Placa M. Effect of antibody to HIV-1 Tat protein on viral replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1995; 10:408-416.
89. Re MC, Furlini G, Vignoli M, Ramazzotti E, Zauli G, La Placa M. Antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat protein may have influenced the progression of AIDS in HIV-1-infected hemophiliac patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996; 3:230-232.
90. Re MC, Vignoli M, Furlini G, Gibellini D, Colangeli V, Vitone F, La Placa M. Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients. *J. Clin. Virol.* 2001; 21:81-89.
91. Rivera-Morales LG, Novitsky VA, Trujillo JR, Lavallo-Montalvo C, Cano-Dominguez C, Ramos-Jimenez J, Jimenez-Rios E, Flores-Flores L, Lopez-Guillen P, Gilbert P, Vannberg F, Tamez-Guerra R, Rodriguez-Padilla C, Essex M. The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2001; 17:87-92.

92. Rodman TC, To SE, Hashish H, Manchester K. Epitopes for natural antibodies of human immunodeficiency virus (HIV)-negative (normal) and HIV-positive sera are coincident with two key functional sequences of HIV Tat protein. *PNAS USA* 1993; 90:7719-7723.
93. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJ, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; 407:523-526.
94. Rossi C, Balboni PG, Betti M, Marconi PC, Bozzini R, Grossi MP, Barbanti-Brodano G, Caputo A. Inhibition of HIV-1 replication by a Tat transdominant negative mutant in human peripheral blood lymphocytes from healthy donors and HIV-1-infected patients. *Gene Ther.* 1997; 4:1261-1269.
95. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. eds. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989:4.29-4.30.
96. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* 1977; 74:5463-5467.
97. Scala, G., Chen X, Liu W, Telles JN, Cohen OJ, Vaccarezza M, Igarashi T, Fauci AS. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J. Immunol.* 1999; 162:6155-6161.
98. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 1990; 249:386-390.
99. Secretaría de Salud. Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas que Viven con el VIH/SIDA. Segunda edición. México 2005-2006. Disponible en www.salud.gob.mx/conasida
100. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 2005; 34:233-244.
101. Sierra-Madero JG, Franco-San-Sebastian D. Tratamiento antiviral en el manejo de la infección por VIH ¿En dónde estamos y hacia donde vamos? *Rev. Invest. Clin.* 2004; 56:222-231.
102. Sleasman JW, Goodenow MM. HIV-1 infection *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111:S582-S592.
103. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317.
104. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem. Rev.* 1997; 97:391-410.
105. Soto-Ramirez LE, Perez-Saleme L, Hernandez-Tepichin G, Sierra-Madero J, Leon-Juarez EA, Romo-Garcia J, Rangel-Frausto S, Gaona-Flores V, Jauregui-Chiu M, Lopez-Martinez C, Vazquez-Valls E, Varela-Trejo C; Grupo de Tratamiento en Adultos del Comité de Atención

- Integral de CENSIDA. Guía para el tratamiento antirretroviral de las personas adultas que viven con VIH/SIDA. Rev. Invest. Clin. 2004; 56:253-271.
106. Soto-Ramírez LE. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. Rev. Invest. Clín. 2004; 56:143-152.
 107. Sullivan BL, Knopoff EJ, Saifuddin M, Takefman DM, Saarloos MN, Sha BE, Spear GT. Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. J. Immunol. 1996; 157:1791-1798.
 108. Tähtinen M, Ranki A, Valle SL, Ovod V, Krohn K. B-cell epitopes in HIV-1 Tat and Rev proteins colocalize with T-cell epitopes and with functional domains. Biomed. Pharmacother. 1997; 51:480-487.
 109. Thomson M., Pérez-Alvarez L., Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. Lancet Infect. Dis. 2002; 2:461-471.
 110. UNAIDS. AIDS epidemic update December 2005. Disponible en www.unaids.org
 111. Vidal N., Peeters M. Mulanga-Kabeya. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggest that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. J. Virol. 2000; 74:10498-507.
 112. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 1995; 373:117-122.
 113. Weiss RA. Gulliver's travels in HIVland. Nature 2001; 410:963-967.
 114. Willits GT. Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology 2002; 50:837-854.
 115. Xu, J.-Y., Gorny, M. K., Palker, T., Karwowska, S. & Zolla-Pazner, S. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1, using ten human monoclonal antibodies. J. Virol. 1991; 65:4832-4838.
 116. Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, Saag MS, Schechter M, Carpenter CC, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Volberding PA. Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. JAMA. 2004; 292:251-265.
 117. Zagury JF, Sill A, Blattner W, Lachgar A, Le Buanec H, Richardson M, Rappaport J, Hendel H, Bizzini B, Gringeri A, Carcagno M, Criscuolo M, Burny A, Gallo RC, Zagury D. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine. J. Hum. Virol. 1998; 1:282-292.

118. Zhang, Y., Fracasso, C., Fiore, J. R., Bjorndal, A., Angarano, G., Gringeri, A., and Fenyo, E. M. Augmented serum neutralizing activity against primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in two groups of HIV-1 infected long-term nonprogressors. *J. Infect. Dis.* 1997; 176:1180-1187.
119. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nature Reviews* 2004; 4:199-210.