

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**



TESIS

Caracterización molecular del DNA del VIH-1 en niños
seronegativos nacidos de madres infectadas

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ

TUTOR

CARMEN SOLER CLAUDÍN

DICIEMBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera reconocer la ayuda de varias personas que voluntaria e involuntariamente cooperaron para que este trabajo concluyera.

En primer lugar a mi esposa Olga, que me ha acompañado en todos estos años, en mis desventuras que no han sido pocas y en las buenas que ojalá hubieran sido más. Su amor, apoyo y compañía fue indispensable en todo momento. Gracias por las hijas y el hogar que has formado.

A mi hijas, Daniela, que al verla todos los días me recordaba en todo momento que tenía algo pendiente que terminar. A Fernanda por existir.

A mis padres y mis hermanas que no han cesado en su apoyo de todo tipo hacia mi familia y a mí. Quisiera decirles que estoy orgulloso de ustedes, de su fortaleza, entereza y tesón.

A los tutores del doctorado, Dr. Carlos Rosales, Dr. Luis Padilla, Dra. Blanca Ruiz, que me brindaron un poco de su tiempo y me orientaron en mi trabajo doctoral.

Especialmente:

Al Dr. Gustavo Reyes Terán que me impulsó en la parte final del doctorado y que me brindó todo su apoyo en los más momentos más difíciles.

Al Dr. Enrique Espinosa, gracias por su ayuda desinteresada en el proceso de la escritura del artículo.

A la Dra. Carmen Soler, sus enseñanzas y su ejemplo en todos estos años han sido clave para mi formación como persona y como investigador. Gracias por su apoyo incondicional.

Por último a los integrantes de la extinta UIRH, por su compañía y por darme un lugar en el lab. A la UNAM que ha sido mi alma mater desde el bachillerato hasta el posgrado.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

- Datos epidemiológicos 5
- Biología del VIH 5
- Ciclo de replicación 11
- Vías de transmisión 16
- Historia Natural 17
- Diagnóstico de la Infección por el VIH-1 18
- Personas expuestas seronegativas 20

2.- JUSTIFICACIÓN 21

3.- HIPÓTESIS 23

4.- OBJETIVOS 23

5.- METODOLOGIA 24

6.- RESULTADOS 30

- Detección de anticuerpos IgG contra proteínas virales. 31
- Detección del genoma de VIH-1. 32
- Estado del DNA viral en las células: detección de formas episomales. 35
- Estado del DNA viral en las células: estado de integración al genoma celular. 38
- Detección de especies de RNAm virales multiprocesados y con procesamiento sencillo. 40
- Secuencias de la región *nef*LTR 43
- Relación filogenética de las secuencias *nef*LTR. 47

7.- DISCUSIÓN 49

8.- BIBLIOGRAFÍA 53

9. - APÉNDICE

- ARTÍCULO: Human Immunodeficiency Virus type 1 in seronegative infants born to HIV-1-infected mothers. 64

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH es el causante de una de las epidemias más grandes de la historia de la humanidad. Actualmente existen 40 millones de personas infectadas por el VIH y han muerto 28 millones de personas en todo el mundo¹. Han pasado 25 años desde que se dieron los primeros reportes de enfermedades raras como neumonía por *Pneumocistis Carinni* o Sarcoma de Kaposi en pacientes homosexuales en mayo de 1981² y que se describió el agente etiológico de esta nueva enfermedad el VIH-1^{3,4}.

En 25 años ha cambiado la perspectiva de la enfermedad por el VIH de un padecimiento fatal a uno de manejo crónico. Aunado a esto los esfuerzos a nivel mundial principalmente en países desarrollados con respecto a la investigación clínica y básica se han enfocado principalmente en el estudio de la biología del virus, en la patogénesis de la enfermedad, en la respuesta inmunológica contra el virus y el desarrollo de una posible vacuna. A pesar de todos estos esfuerzos aún no existe una posible cura o vacuna contra la enfermedad.

Los esfuerzos en el área de prevención de la enfermedad aunque numerosos han sido insuficientes, de tal forma que aún en países en desarrollo el número de casos sigue incrementándose alarmantemente. Al principio de la epidemia la infección era preponderantemente masculina sin embargo actualmente la infección en mujeres ha aumentado de forma considerable, incrementando a su vez el número de transmisiones de madre a hijo o transmisión vertical, por lo tanto es de suma importancia encontrar las estrategias necesarias para el diagnóstico temprano y eficiente de las mujeres en edad reproductiva, administrar un tratamiento adecuado y evitar la posible transmisión de la infección por el VIH a los hijos.

El presente trabajo de doctorado está enfocado precisamente en la problemática de la transmisión vertical y la importancia de un diagnóstico adecuado de la infección por el VIH en niños. En específico en la detección de DNA del VIH en niños nacidos de madres infectadas por el virus. Comenzaré mostrando datos de la epidemia a nivel mundial y nacional, seguiré con la descripción de la biología del VIH, las vías de transmisión de la infección especialmente la vertical, posteriormente describiré las técnicas de diagnóstico para VIH de forma específica en niños. Por último mencionaré los hallazgos realizados con el presente trabajo.

Datos Epidemiológicos:

Se estima que en el 2006 entre 34.1 millones a 47.1 millones de personas en el mundo viven con el VIH, que se presentaron 4.3 millones nuevas infecciones y murieron en 2006 2.9 millones de personas por SIDA. En 1997 aproximadamente 41% de los adultos que vivían con VIH/SIDA eran mujeres; para el 2006 la proporción alcanzó el 48%. Cada día se infectan aproximadamente 5500 mujeres y más de 3000 mueren de enfermedades relacionadas con el SIDA^{1,5}.

Existen pocos datos acerca de la epidemia en México, los datos oficiales en el 2006 nos muestran una prevalencia nacional baja del VIH estimada en adultos del 0.1% y los casos acumulados hasta el 2006 son 107,625 casos de los cuales el 87% son hombres y 13% son mujeres⁶. Sin embargo es muy probable que estos datos estén subestimados y el número de casos y de infección sea mucho mayor, ONUSIDA y la Organización Mundial de la Salud estiman que existe una prevalencia del 0,3% [0,2-0,7%] –, y que 180 000 [99 000-440 000] personas vivían en México con el VIH en 2005⁵. La epidemia en nuestro país se concentra principalmente entre hombres que tienen relaciones sexuales con hombres. Se cree que las relaciones sexuales entre hombres representan más de la mitad (57%) de las infecciones por el VIH registradas hasta la fecha, aunque hay indicios de un riesgo creciente de infección por el VIH entre las mujeres⁵.

Biología del VIH:

Estructura y Genoma

El VIH es un lentivirus perteneciente a la familia Retroviridae. El VIH se clasifica en tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2), que a su vez se diferencian en diferentes clados. Su material genómico consiste de dos cadenas de RNA de polaridad positiva, unidas a este dos RNA de transferencia de lisina (tRNA Lys) que le sirven como iniciadores al momento de llevarse a cabo la retrotranscripción viral. Posterior a esta retrotranscripción se lleva a cabo la integración del genoma viral al DNA celular, al genoma viral integrado se le denomina DNA proviral o DNA de VIH integrado. La forma integrada del DNA tiene aproximadamente 9.8 Kb y presenta dos estructuras en sus extremos 5' y 3' llamadas secuencias repetidas largas (Long Terminal Repeat) o LTR por sus siglas en inglés. Los genes estructurales y funcionales se encuentran en el centro y codifican para diferentes proteínas. Proteínas estructurales Gag, Pol y Env, proteínas reguladoras Tat y Rev y proteínas accesorias Vif, Vpu, Vpr y Nef.

El virus en su parte más externa presenta una membrana lipídica de origen celular y ancladas a ella dos glicoproteínas codificadas por el gene env: gp120 y gp41. En el interior se encuentra una estructura llamada matriz compuesta por la proteína p17 codificada por el gen gag y en la parte más interna una estructura llamada nucleocápside compuesta por el RNA genómico, otras proteínas codificadas por gag: p24, p9 y p6, así como por las enzimas virales codificadas por el gen pol (Fig 1).

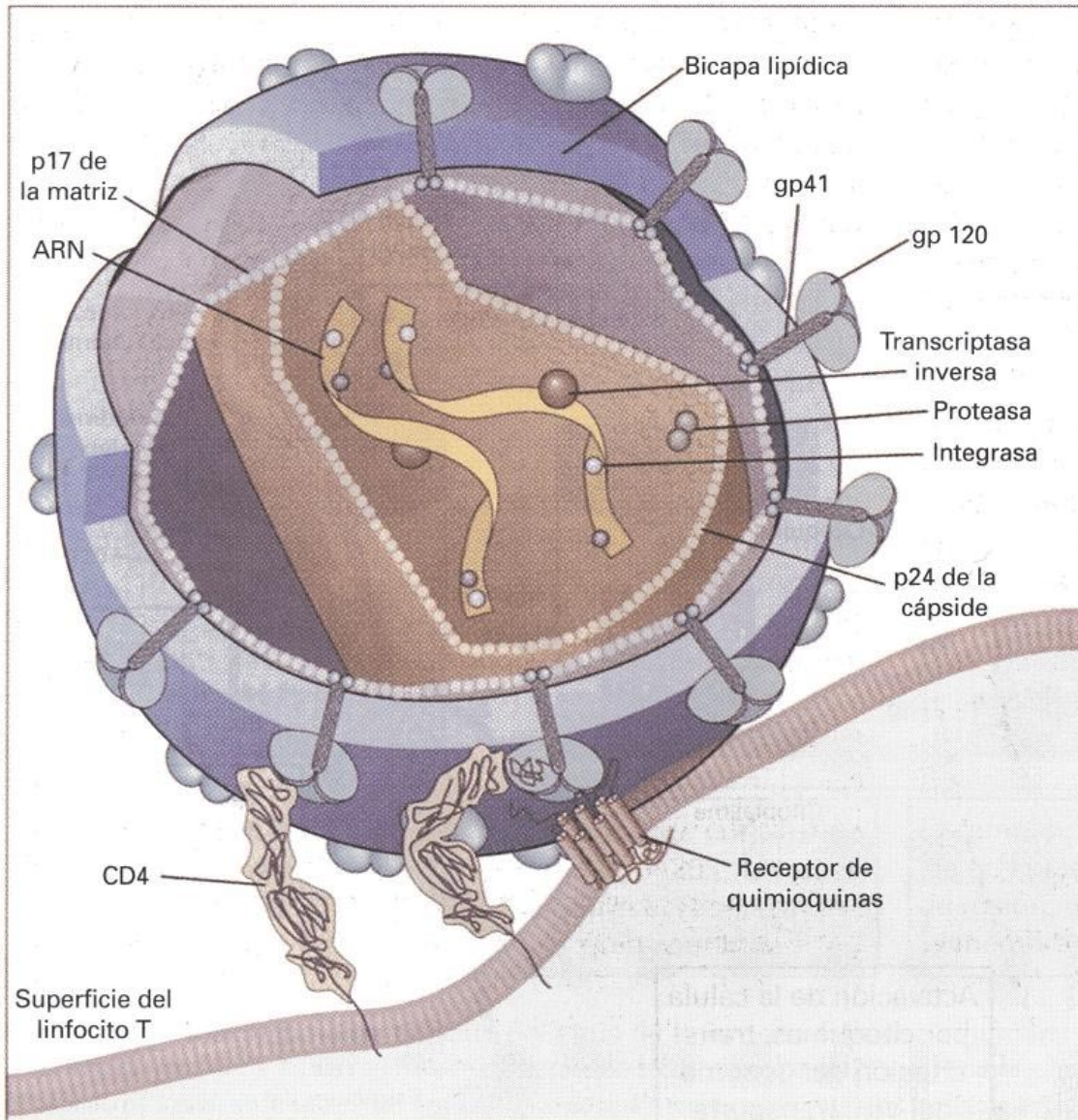


Fig 1. Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1).

Gen *gag*

El gen *gag* da lugar a un precursor polipeptídico de 55 kD (p55), el cual se expresa a partir de RNAs mensajeros virales no procesados. Durante la traducción de la proteína p55, se modifica su NH₂ terminal agregándosele residuos de ácido mirístico, los cuales tienen la función de dirigir la unión

con el lado citoplásmico de la membrana celular. La poliproteína p55 recluta 2 copias de RNA viral genómico junto con otras proteínas celulares y virales para la posterior gemación de la nueva partícula viral. Posteriormente durante el proceso de maduración la enzima proteasa viral corta el polipéptido en cuatro proteínas más pequeñas MA (matriz p17), CA (Cápside p24), NC (Nucleocápside p9) y p6^{7,8}. La proteína MA permanece unida a la superficie interna de la membrana lipídica viral, ayudando a estabilizar la partícula. Algunas moléculas de MA se asocian al DNA viral y facilitan el transporte al núcleo de la célula por medio de una señal kariofílica que es reconocida por la maquinaria de importación nuclear⁹. La proteína p24 (CA) forma el corazón (core) cónico de las partículas virales y se ha demostrado la interacción con una proteína celular llamada ciclofilina. Esta interacción permite la incorporación de CA en las partículas virales^{10,11}. La proteína NC es responsable del reconocimiento específico de la señal de empaquetamiento del VIH¹². La señal de empaquetamiento consiste de 4 estructuras de tallo asa localizadas cerca de la región 5' del RNA viral. La NC enlaza a la señal de empaquetamiento a través de interacciones mediadas por dos secuencias de dedos de zinc, además la NC facilita también la retrotranscripción¹³. La proteína p6 interactúa con p55 y con la proteína accesoria Vpr permitiendo la incorporación de Vpr en los viriones ya ensamblados. La región p6 también contiene un dominio tardío para la liberación eficiente de los viriones de la célula infectada¹⁴.

Gen *pol*

El gen *pol* codifica para 3 enzimas: proteasa, integrasa y transcriptasa Reversa. Estas proteínas se expresan a partir de un precursor Gag-Pol o p160. Este precursor es generado por un cambio de lectura del ribosoma debido a una secuencia en el RNA viral. Cuando los ribosomas encuentran esta secuencia cambian su marco de lectura de forma que 5% de las veces se lee el marco de lectura del gen *pol* sin interrupción. La frecuencia del cambio de lectura explica el porque la relación de los precursores Gag y Gag-Pol es 20:1¹⁵.

Durante la maduración viral la proteasa corta el polipéptido Pol en diferentes enzimas: proteasa (p10), transcriptasa reversa (p50), RNasa H (p15) e integrasa (p31). Esto cortes no ocurren eficientemente de tal forma que aproximadamente el 50% de la TR permanece unido a RNasa H en un solo polipéptido p65.

La proteasa del VIH-1 es una aspartil proteasa y se encuentra en forma de dímero. Esta proteína viral es requerida para el corte de los polipéptidos Gag y Gag-Pol durante la maduración del virión. La estructura tridimensional ha sido determinada y su conocimiento ha permitido el desarrollo de

fármacos anti-VIH (antirretrovirales) que actualmente se emplean como tratamiento en pacientes infectados por el VIH¹⁶. El gen *pol* también codifica para la enzima transcriptasa reversa que presenta actividad de polimerasa de DNA dependiente de RNA. Durante la retrotranscripción la polimerasa sintetiza un DNA de doble cadena empleando como molde el RNA genómico viral. La RNasa H remueve el molde de RNA original que está unido a la primera cadena de DNA o DNA complementario (cDNA). La especie predominante funcional de la polimerasa es un heterodímero de p65 y p50, esta enzima se encuentra dentro de la cápside de los viriones. Debido a que la TR no tiene actividad correctiva en la replicación del DNA como la tienen otras polimerasas, se introducen mutaciones en cada nueva copia de genoma viral. De igual forma que de la proteasa la estructura de la TR ha sido dilucidada y se han creado fármacos que inhiben la replicación viral¹⁷. La integrasa (IN) lleva a cabo la inserción del DNA viral en el DNA genómico de la célula infectada. Este proceso lo realiza a través de tres funciones distintas. Primero la actividad exonucleasa corta dos nucleótidos 3' de cada DNA viral, después a través de la actividad endonucleasa corta el DNA celular y por último la actividad ligasa genera la unión con el DNA viral¹⁸.

Gen *env*

La glicoproteína gp160 se expresa a partir de RNAs mensajeros con procesamiento sencillo. Se sintetiza en ribosomas asociados a retículo endoplásmico y en su transporte a través de Aparato de Golgi es glicosilado con la adición de 25 a 30 residuos de carbohidratos que son agregados en el aminoácido asparagina. Esta glicosilación es necesaria para la infectividad del virus. Una proteasa celular corta la gp160 y produce dos glicoproteínas gp41 y gp120; gp41 contiene un dominio transmembranal, mientras gp120 se encuentra localizado en la superficie del virión a través de uniones no covalentes con gp41¹⁹.

Las interacciones entre el VIH y su receptor CD4 son mediadas a través de dominios específicos de gp120²⁰. Presenta cinco regiones llamadas hipervariables V1 a V5, que son altamente polimórficas entre los diferentes aislados de VIH-1. La región llamada loop o asa V3 es una secuencia importante involucrada en la selección del tropismo ya sea hacia linfocitos o monocitos²¹. Secuencias dentro de la región V3 interactúan con los co-receptores CXCR4 y CCR5 que pertenecen a la familia de receptores de quimiocinas y determinan parcialmente la susceptibilidad a ciertas cepas virales²². La región V3 también es el principal blanco para los anticuerpos neutralizantes que pueden bloquear la infección²³. Por otra parte la glicoproteína gp41 presenta un dominio de fusión en su región N-

terminal que media la fusión de las membranas viral y celular permitiendo la entrada de los componentes internos del VIH al citoplasma de la célula²⁴.

Genes Reguladores

tat

El gen *tat* codifica la proteína Tat. Esta proteína es esencial para la replicación del VIH-1 presenta actividad como transactivador transcripcional. Existen dos especies de Tat de 72 y 101 aminoácidos ambas son activas, se encuentran dentro del núcleo de la célula infectada y provienen de RNAs mensajeros tempranos multiprocesados (multispliced mRNA)²⁵. Tat es una proteína que se une a una estructura localizada en el 5' del RNA viral llamada elemento de respuesta de transactivación (TAR por sus siglas en inglés). La unión de Tat y otras proteínas celulares a TAR activan la transcripción del LTR viral al menos 1000 veces²⁶. La forma de acción de Tat es promover la elongación o alargamiento de la transcripción de tal forma que los RNA mensajeros completos puedan ser generados. En la ausencia de la proteína Tat se generan solamente mensajeros cortos de 100 nucleótidos²⁷. En presencia de Tat se reclutan proteínas celulares como ciclina T y CDK9 esta última una cinasa de serinas que fosforila el dominio Carboxilo terminal de la polimerasa (CTD) en la secuencia TAR para permitir el alargamiento de la transcripción²⁸.

rev

El gen *rev* codifica para una proteína (Rev) de 13 kD con sitios de unión a RNA. Se produce a partir de RNA mensajeros multiprocesados y la acumulación de esta proteína en el núcleo permite la transición de la fase temprana a la fase tardía de la expresión genética del VIH²⁹. Rev se une a una estructura secundaria en el RNA viral llamada elemento de respuesta a Rev o Rev response element (RRE). Rev se une en un sitio específico de RRE llamado sitio de enlace de alta afinidad a Rev que es una secuencia de RNA de doble cadena³⁰. La unión de Rev a RRE facilita la exportación del núcleo al citoplasma de los RNAs mensajeros no procesados y los de procesamiento sencillo. Rev tiene al menos tres dominios funcionales. El primero es una secuencia de unión a RNA rica en arginina que interviene en la interacción con RRE. El segundo es un dominio de multimerización que es requerido para su función y el tercero es un dominio efector el cual contiene una señal de exportación nuclear³¹. La exportación de RNA mensajeros virales por Rev es a través de la vía empleada por otros RNA como son los RNA pequeños nucleolares (snRNA) o por el RNA 5s ribosomal. La proteína Rev es esencial para la replicación del VIH-1, se ha demostrado que provirus

que carecen del gene *rev* son transcripcionalmente activos pero no expresan los genes tardíos y no producen viriones³².

Genes adicionales: *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*.

Además de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, y los genes reguladores *tat* y *rev*, existen cuatro genes adicionales *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* que codifican para proteínas accesorias. Las proteínas accesorias no son totalmente requeridas para la replicación in vitro, sin embargo representan un factor de virulencia in vivo. Nef es expresada a partir de RNAs mensajeros multiprocesados, mientras que Vif, Vpr y Vpu se expresan a partir de RNAs mensajeros con procesamiento sencillo.

Nef (negative Factor) es una proteína de 27 kD y es codificada a partir de un solo exón sobrelapado con la secuencia LTR 3'. Se han demostrado diversas actividades de Nef entre las que se encuentran regulación negativa de CD4 y MHC clase I, alteración de la activación celular y estimulación de la infectividad del VIH³³.

En las partículas virales se incorporan aproximadamente 100 copias de la proteína Vpr. Esta proteína esta involucrada en facilitar la infección del VIH permitiendo la localización nuclear del complejo de preintegración (PIC) en células que no están en división. Vpr puede actuar como un factor de transporte nucleocitoplásmico dirigiendo el genoma viral al núcleo celular³⁴.

Vpu es una fosfoproteína que se encuentra localizada en el interior de la membrana. Vpu se expresa a partir de RNA mensajeros que codifican también para Env. Vpu es traducida en niveles menores que Env debido a su baja eficiencia de lectura de inicio del codón³⁵. Vpu incrementa la liberación del VIH de la superficie de la célula. En la ausencia de Vpu gran número de viriones pueden ser vistos unidos a la superficie de las células infectadas³⁶.

Vif es una proteína de 23 kD esencial para la replicación del VIH en linfocitos de sangre periférica, macrófagos y algunas líneas celulares. Recientemente se caracterizó un gene en líneas celulares que permite la replicación en ausencia de Vif o de Vif mutado. El gene codifica para una enzima citidin deaminasa (APOBEC3G) que convierte los uracilos del DNA viral en citosinas. Esta hipermutación viral introduce codones de paro en el marco de lectura, alterando la expresión del genoma del VIH. Vif impide la acción de APOBEC3G a través de la unión, ubiquitinación y posterior degradación por medio del proteosoma celular³⁷.

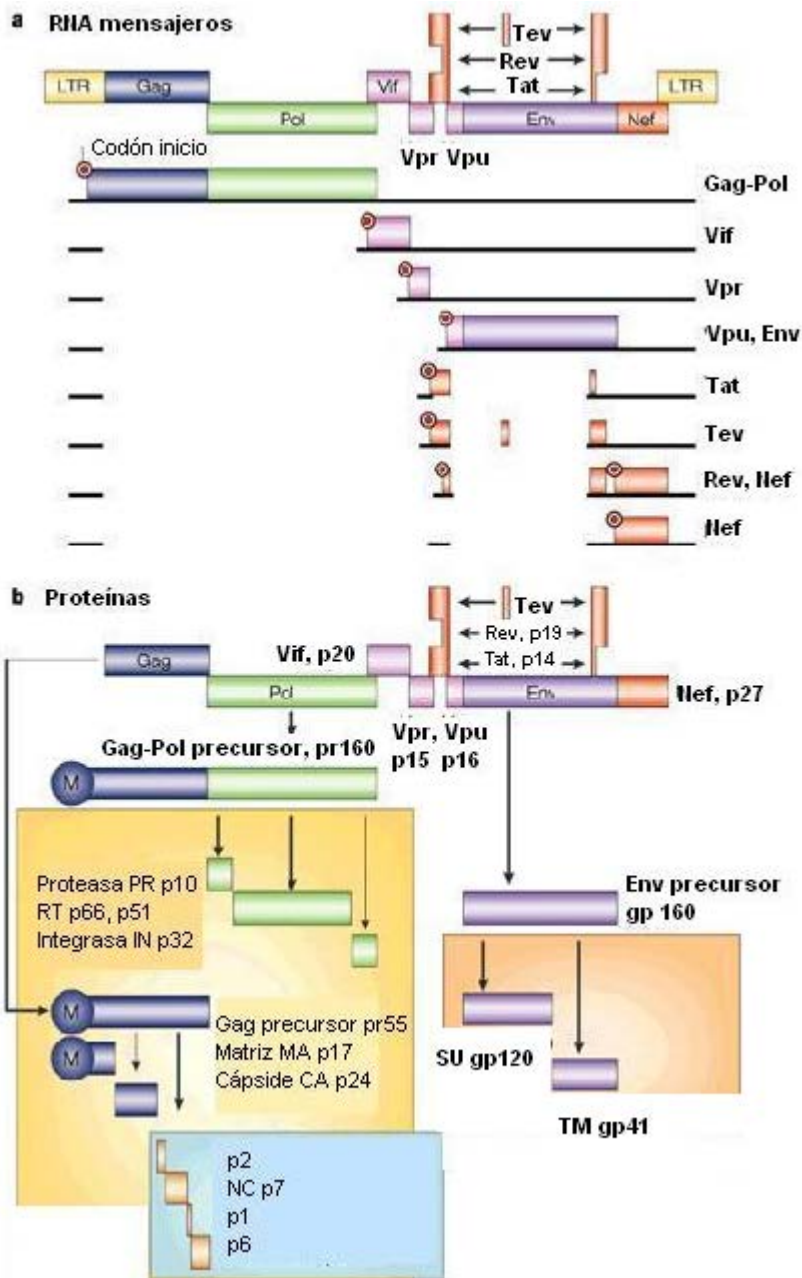


Fig. 2. RNA mensajeros virales y proteínas del VIH-1.

Ciclo de Replicación

El proceso de la entrada del VIH involucra la fusión de la envoltura viral con la membrana celular y requiere interacciones específicas entre diferentes moléculas virales y celulares. Las dos glicoproteínas virales gp120 y gp41 forman un trímero de moléculas insertadas en la membrana lipídica viral. Este trímero se une al receptor celular CD4, induciendo un cambio conformacional en las glicoproteínas, permitiendo la unión a un grupo de receptor de quimiocinas³⁸. Hasta el momento se han reportado doce receptores de quimiocinas que pueden funcionar como coreceptores para el

VIH en células en cultivo, pero solo dos tienen un papel importante in vivo. El primer receptor es CCR5 y une a virus con tropismo a monocitos-macrófagos, no inductores de sincicios (R5) que están asociados con la transmisión a través de mucosas y de forma sanguínea. Por otra parte los virus que se unen al receptor CXCR4 tienen tropismo hacia Linfocitos T y son inductores de sincicios, además se encuentran con mayor frecuencia en las etapas tardías de la enfermedad³⁹. Recientemente se han reportado estudios acerca del empleo de fármacos que se unen ya sea al coreceptor CCR5 o al CXCR4 para inhibir la entrada del virus a la célula⁴⁰.

Existen microdominios en la membrana celular enriquecidos con colesterol y esfingolípidos llamados balsas de lípidos (lipid rafts), estos dominios proveen un mejor ambiente para la fusión entre las membranas virales y celulares. En estas balsas de lípidos se encuentran tanto el receptor CD4 como los receptores de quimiocinas⁴¹. La unión de gp120 con CD4 y los receptores de quimiocinas producen un cambio conformacional adicional en gp41. Ensamblada como un trímero en la membrana del virión, la estructura es abierta proyectando tres dominios de fusión o péptidos de fusión que atacan la bicapa lipídica de la célula blanco. Posteriormente los dominios de fusión forman estructuras parecidas a bucles que dirigen la fusión de las membranas, permitiendo la liberación de la nucleocápside en el interior de la célula. Los inhibidores de fusión T-20 y T-1249 son fármacos que se emplean actualmente como antirretrovirales y su mecanismo de acción es la inhibición de las estructuras de bucles⁴².

Una vez que el virus entra a la célula este es desnudado mientras aún esta asociado a la membrana plasmática. Este proceso todavía esta poco estudiado pero puede involucrar la fosforilación de la proteína de matriz por una MAP cinasa (mitogen-activated protein), aunado a la acción de ciclofilina así como de Nef y Vif⁴³. Posteriormente el complejo de la Transcriptasa Reversa (TR) que contiene a la enzima, el RNA de transferencia para lisina (tRNA^{Lys}), el RNA viral diploide, la integrasa, proteínas de la matriz y la nucleocápside, así como proteínas celulares es liberado de la membrana. Este complejo se ancla en los microfilamentos de actina, siendo esta interacción importante para lograr la síntesis eficiente del DNA viral⁴⁴.

Después de la retrotranscripción se forma otro complejo denominado Complejo de preintegración o PIC por sus siglas en inglés (Preintegration complex), compuesto por el DNA de doble cadena, integrasa, la proteína de matriz p17, Vpr y proteínas celulares de alta movilidad de enlace a DNA (HMGI Y). El PIC se mueve hacia el núcleo usando los microtúbulos del citoesqueleto como conductos⁴⁵ (fig 3). La entrada del PIC al núcleo celular necesita la participación de las proteínas

virales y de una gran compactación del DNA viral. Además existe una estructura en el DNA del VIH llamada DNA flap que puede unir a proteínas que contengan señales de unión a poro⁴⁶. A su vez la proteína de matriz presenta señales de localización nuclear que son reconocidas por la alfa y beta importinas, las cuales son componentes de la vía de importación nuclear clásica.

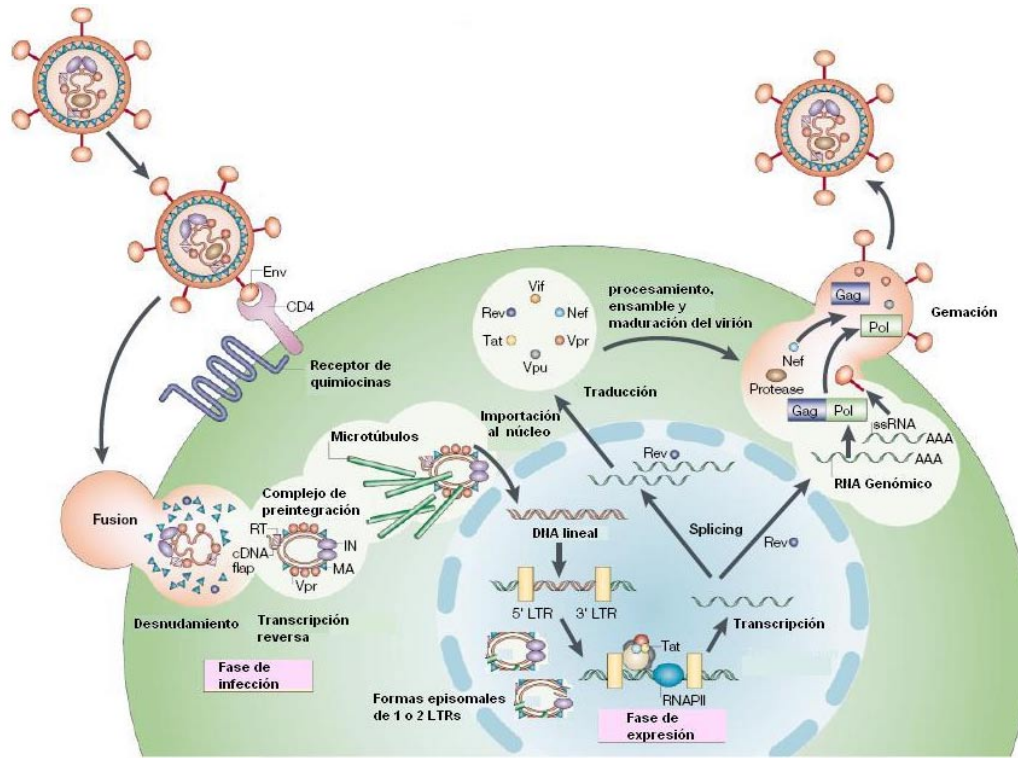


Fig. 3. Ciclo de replicación del VIH-1.

Por otro lado Vpr también contiene al menos tres señales de localización nuclear, Vpr puede importar el PIC por medio del anclaje directo con uno o más componentes del complejo de poro nuclear⁴⁷.

Ya dentro del núcleo el DNA viral de doble cadena se integra en el cromosoma celular mediado por la integrasa viral. Las proteínas HMGI(Y) y la Barrera de autointegración (BAF) son requeridos también a pesar de que no se conoce bien su función⁴⁸. La integrasa retira los nucleótidos terminales del DNA, después su actividad endonucleasa corta el DNA celular y por último su actividad ligasa genera la unión entre DNA viral y el cromosoma celular⁴⁹. No todos los PICs establecen un provirus funcional, los extremos del DNA viral pueden unirse para formar un círculo conteniendo 2 LTR, o puede llevarse a cabo un proceso de recombinación que de lugar a un círculo de un solo LTR. Estas formas circulares pueden producir Tat o Nef pero no producen virus infecciosos⁵⁰.

El proceso de integración puede resultar en formas transcripcionalmente inactivas o latentes⁵¹. La infección latente contribuye a un reservorio de virus silenciosos que no pueden ser erradicados por la terapia antirretroviral, ni por la respuesta inmunológica.

En el genoma celular, la secuencia 5' del LTR funciona como cualquier unidad transcripcional eucarionte. Contiene elementos promotores río arriba y río abajo (upstream y downstream) como el iniciador (Inr), caja TATA y tres sitios de unión para el factor de transcripción Sp1⁵². Estas secuencias ayudan a posicionar a la RNA polimerasa II (RNAPII) en el sitio de inicio de la transcripción y el ensamble del complejo de preiniciación. Hacia la región 5' se encuentran elementos aumentadores de la transcripción (enhancers) como son sitios de unión al factor nuclear kappa B (NF- κ B), factor nuclear de células T activadas (NFAT) y miembros de la familia Ets⁵³ (Fig 4). Cuando estos factores se unen al LTR la transcripción comienza, pero necesita la presencia de Tat para el adecuado alargamiento de la transcripción. En este proceso se sintetizan RNA mensajeros cortos nopoliadenilados los cuales son estables y persisten en la célula debido a la formación de una estructura secundaria llamada TAR⁵⁴. Tat aumenta significativamente la expresión viral uniéndose a TAR en conjunto con la ciclina T1 (CycT1). Ambas proteínas reclutan a la cinasa 9 (Cdk9) y otros factores (P-TEFb). Cdk9 fosforila el carboxilo terminal de la RNAPII, comenzando la transición entre inicio a extensión de la transcripción⁵⁵ (Fig 4).

La transcripción del genoma viral da como resultado más de una docena de RNA mensajeros. Algunos son rápidamente procesados en la célula y transportados al citoplasma⁵⁶ (Fig. 3). Estos RNA multiprocesados codifican para las proteínas Nef, Tat y Rev. Rev puede inhibir el procesamiento (splicing) mediante la unión con el factor de procesamiento 2 (ASF/SF2) y permitir la síntesis de RNA mensajeros con procesamiento sencillo o sin procesar⁵⁷. El transporte de los RNA mensajeros con procesamiento sencillo o sin procesamiento depende de la cantidad de Rev. Esta proteína enlaza al RNA en una secuencia de asa y tallo llamada RRE que se encuentra localizada en *env*, Rev además tiene una secuencia de exportación nuclear rica en leucina (NES). La exportación de los RNA mensajeros se realiza a través de un complejo con exportina 1 (CRM1/exportin-1) en la presencia Ran GTP^{58,59}.

Las nuevas partículas virales son ensambladas a partir de la membrana plasmática (Fig. 4). Cada virión contiene aproximadamente 1500 moléculas de Gag y 100 de la poliproteína Gag-Pol, dos copias del RNA genómico, así como Nef y Env⁶⁰. Las proteínas de Gag son modificadas por miristilación y asociadas con los microdominios de membrana enriquecidas con glicolípidos y

colesterol. Esta composición favorece la liberación de las nuevas partículas virales y la fusión a la próxima célula blanco^{61,62}.

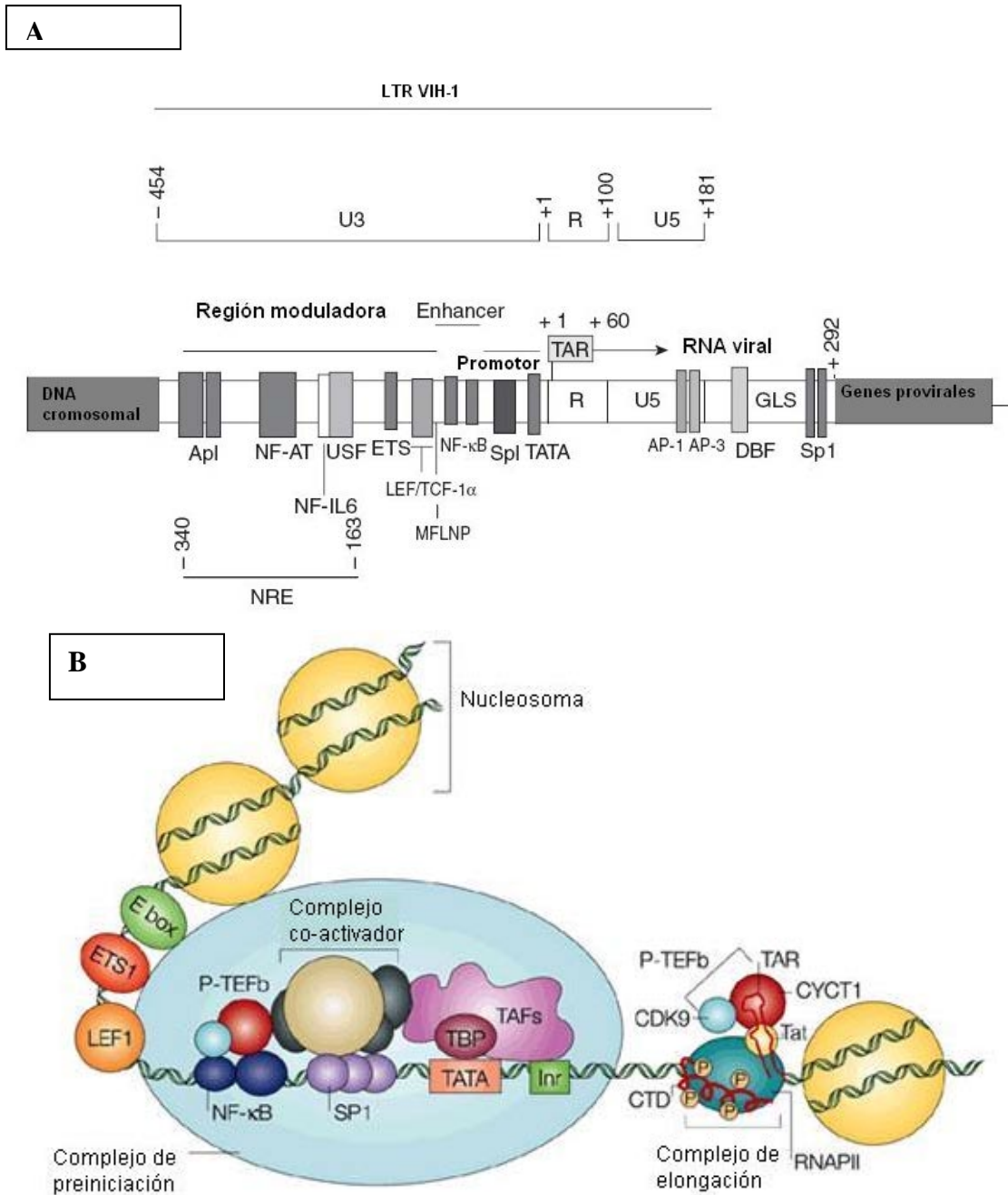


Fig. 4. A) Esquema de la secuencia promotora LTR en el VIH-1, donde se indican los sitios de unión de diferentes factores de transcripción. **B)** Esquema que muestra los complejos de iniciación y elongación necesarios para el inicio de la transcripción en el VIH-1.

Vías de Transmisión

Existen diferentes formas en las cuales se transmite la infección por el VIH.

- A través de relaciones sexuales sin protección con personas infectadas.
- Transfusión de sangre o derivados sanguíneos contaminados con el VIH.
 - A través de compartir jeringas con personas infectadas, especialmente en el caso de drogas intravenosas.
 - Exposición ocupacional en trabajadores de la salud.
- Transmisión de madre a hijo o transmisión vertical

Sexual

Las relaciones sexuales sin protección es la vía más importante de transmisión del VIH a nivel mundial. El riesgo más alto de infección es el sexo anal receptivo, pero se ha descrito infección por una sola exposición ya sea por vía anal o vaginal. La presencia de otras infecciones de transmisión sexual aumenta el riesgo de infección por el VIH, también la carga viral puede ser un factor determinante en la transmisión, se ha reportado que el riesgo de infección aumenta por cada incremento en el logaritmo de carga viral⁶³. La carga viral alta es el factor de infección más importante. Esto es primordial durante la infección primaria cuando el virus tiene el punto más alto de replicación que puede alcanzar hasta el millón de copias de RNA/mL.

Sanguínea

La infección por transfusiones sanguíneas o uso de productos sanguíneos ha disminuido de forma considerable en la mayoría de los países, debido al uso cada vez más extensivo de métodos de diagnóstico de la infección, siendo el riesgo de infección a través de una unidad de sangre de 1:1,000,000. Sin embargo en países en vías de desarrollo aún no realizan una detección del VIH de forma estricta⁶⁴.

Otra forma de transmisión sanguínea es compartir jeringas con alguna persona que esta infectada por el VIH, particularmente en el uso de drogas intravenosas. El riesgo de transmisión es alto debido a que el usuario al inyectarse la droga necesita asegurarse del sitio de la punción, esto lo realiza aspirando sangre⁶⁵.

Transmisión Madre-Hijo o Vertical

La transmisión puede llevarse a cabo durante la gestación, el parto o durante la lactancia. En ausencia de tratamiento anti-VIH se estima que entre el 15 al 30 % de las madres transmitirán a su

hijo la infección. Se ha reportado que puede variar dependiendo de la zona geográfica entre 15 a 25% en Europa a 25 a 40% en África y Asia^{66,67}. La infección de madre a hijo aún sigue siendo un gran problema de salud, a pesar de la reducción de este tipo de transmisión en los países desarrollados. Se estima que más de 2 millones de niños mundialmente están infectados con el VIH y que más de 1800 nuevas infecciones son transmitidas de madres a hijos anualmente¹.

Historia Natural

Posterior a la entrada del virus por cualquiera de las formas de transmisión descritas anteriormente, comienza un síndrome viral agudo o infección primaria el cual se define como el periodo de tiempo de la infección inicial al desarrollo de la respuesta de anticuerpos (Fig. 5). Puede ser acompañado por signos y síntomas inespecíficos que se confunden con otros padecimientos como resfriado o mononucleosis dentro de los primeros días o semanas después de la exposición. La infección aguda se caracteriza por una alta carga viral o viremia plasmática y una marcada disminución de los LT CD4+. Posteriormente existe una recuperación en la cuenta de LT CD4+ pero no a su cuenta normal y se establece un equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmunológica contra el VIH. El periodo que sigue se denomina latencia clínica y muchas personas infectadas pueden no presentar manifestaciones clínicas por muchos años. Aún en ausencia de tratamiento, este periodo de latencia clínica puede durar hasta 8 o 10 años (Fig. 5). Sin embargo en este periodo el virus sigue replicándose y existe un gran número de recambios de los LT CD4+. Al final de este periodo comienzan a aparecer desordenes inmunológicos, dermatológicos, hematológicos y signos neurológicos. Otros padecimientos como fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna y diarrea pueden aparecer. La medición de LT CD4+ es importante a través de todo el tiempo de avance de la enfermedad, debajo de 200 células/ μ l el número de infecciones oportunistas y neoplasias pueden aparecer estableciendo la siguiente etapa de la enfermedad que es la de SIDA. Diferentes factores inmunológicos, virales y genéticos determinan una rápida progresión hacia la inmunodeficiencia o si el individuo puede permanecer sin deterioro de su sistema inmunológico por muchos años más y pertenecer al selecto grupo (5%) de progresores a largo plazo (Long term non progressors LTNP)⁶⁸.

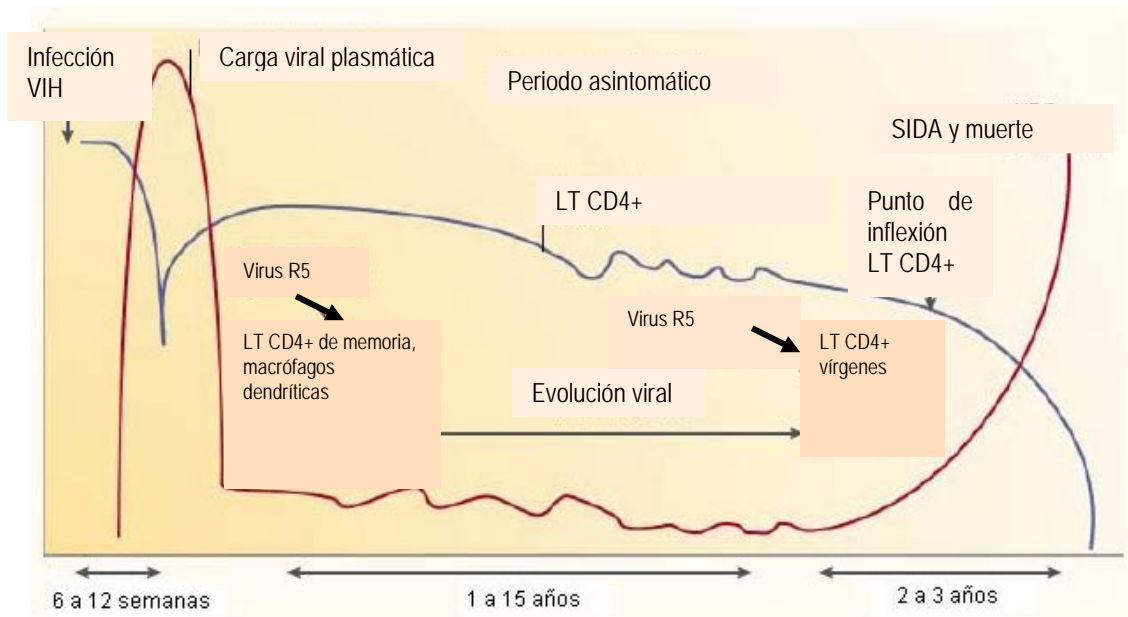


Fig. 5. Historia natural de la infección por el VIH-1.

Diagnóstico de la Infección por el VIH-1

El diagnóstico de la infección por el VIH se realiza de forma indirecta a través de la demostración de anticuerpos específicos contra el VIH⁶⁹. Estos anticuerpos se encuentran en casi el 100% de individuos infectados y representan un marcador de la respuesta inmunológica humoral contra el virus. El diagnóstico también se puede realizar directamente demostrando la presencia de proteínas o del genoma viral.

En las pruebas de diagnóstico de detección de anticuerpos se requieren realizar por seguridad del diagnóstico al menos dos diferentes ensayos: a) una prueba de tamizaje y b) al menos una prueba confirmatoria. La mayoría las pruebas de tamizaje están basadas en la técnica inmunoenzimática de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) o en ensayos muy similares. Estos ensayos deben ser muy sensibles con el objetivo de evitar resultados falsos negativos, además deben detectar anticuerpos con baja afinidad como los encontrados en la infección primaria y deben detectar anticuerpos contra todos los tipos del VIH (VIH-1, VIH-2) y subtipos (VIH-1-N, VIH-1-O, VIH-1-M). Si el resultado es positivo debe corroborarse por medio de pruebas confirmatorias como Inmunofluorescencia o Western blot⁷⁰.

El Western blot se realiza de la siguiente manera. El VIH es propagado en células en cultivo, los virus son recolectados, purificados y disgregados en sus componentes. Entonces las proteínas virales son separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana es cortada en tiras y cada tira es incubada con suero del paciente. Si el suero contiene

anticuerpos contra las proteínas virales, estos se unen a la tira de nitrocelulosa y esta unión es evidenciada al agregarse anticuerpos secundarios marcados con una enzima y se revelan con su respectivo sustrato. Una prueba positiva es visualizada por la aparición de bandas sobre la tira. Las proteínas del VIH y sus bandas correspondientes en el Western blot son designados por la letra p (proteínas) o gp (glicoproteínas) seguido del peso molecular en kiloDaltons. Las proteínas virales pueden ser divididas en tres grupos: glicoproteínas de la envoltura (gp41, gp120 y gp160), proteínas de gag (p18, p24 y p55) y proteínas de pol (p34, p40, p52 y p68)⁷¹.

El diagnóstico de la infección por el VIH también puede ser realizada a través de la detección del virus. La detección del virus por medio de aislamiento en cultivo es empleada solamente en ciertas circunstancias debido a su alto grado de especialización y a su alto costo⁷². Por otro lado la detección del genoma viral se realiza por medio de diferentes técnicas de laboratorio. Estos métodos pueden ser empleados para detectar ya sea DNA proviral en células de sangre periférica o RNA viral en plasma. Estas pruebas son un complemento para el diagnóstico de la infección en situaciones especiales como en la sospecha de infección primaria, ausencia de anticuerpos en el periodo de ventana o en niños nacidos de madres infectadas⁷³. Por otro lado la detección cuantitativa del RNA viral en plasma o carga viral es usada como un marcador pronóstico para monitorear el efecto de la terapia anti-VIH⁷⁴ mas no como un método diagnóstico. Existen diferentes métodos comerciales que utilizan diferentes tecnologías como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), DNA ramificado, NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) o detección cuantitativa de la actividad de la transcriptasa reversa. La prueba con mayor sensibilidad puede detectar desde 50 copias de RNA/mL de plasma.

Diagnóstico de la infección por el VIH en niños nacidos de madres infectadas.

El diagnóstico de la infección por el VIH en niños nacidos de madres infectadas debe ser primordial. En estos niños se detectan anticuerpos contra el VIH provenientes de la madre hasta los 12 a 15 meses y esporádicamente a los 18 meses. En el caso de que el niño no esté infectado tendrá resultados positivos al inicio, posteriormente perderá los anticuerpos de la madre (seroreversión) y los siguientes resultados serán negativos. Sin embargo si los anticuerpos anti-VIH persisten más allá de los 15 meses el niño ha desarrollado su propia respuesta contra el virus, indicando una posible infección⁷⁵. Un diagnóstico más temprano se realiza mediante la detección del genoma viral en células mononucleares de sangre periférica mediante PCR⁷⁶. Un resultado positivo debe ser confirmado inmediatamente con una segunda muestra. En niños nacidos de madres infectadas dos

resultados negativos de PCR son requeridos para excluir la infección, el primero dentro del primer al cuarto mes de edad y el otro después del cuarto mes. Si la primera muestra es positiva y es confirmada la transmisión puede ser una transmisión intrauterina y si solo la segunda muestra es positiva se trata de una infección durante el parto⁷⁷.

Personas expuestas seronegativas

Diversos estudios han demostrado que ciertos individuos que se exponen al VIH son resistentes a la infección⁷⁸. A pesar de que estos individuos se exponen al virus o a sus antígenos no presentan anticuerpos de tipo IgG, pero si una alta actividad linfoproliferativa de LT CD4+ y una respuesta elevada de LT CD8+ contra el VIH ⁷⁹⁻⁸¹. Diversas explicaciones se han propuesto para explicar estos casos a) una respuesta inmunológica eficiente que impide el establecimiento de la infección, b) exposición a cantidades bajas de virus, c) infección por un virus defectuoso o d) una respuesta celular cruzada contra antígenos del VIH-1⁸².

Otros estudios han descrito casos en los cuales individuos expuestos al VIH-1 son seronegativos pero se ha detectado DNA del virus en sus células mononucleares periféricas. Ejemplos de este tipo de infecciones incluyen individuos que tienen relaciones sexuales con parejas seropositivas y niños nacidos de madres infectadas⁸³⁻⁸⁵. En el caso de los niños algunos eliminan el DNA viral de sus células por mecanismos desconocidos⁸⁶ y otros continúan con células con DNA viral durante largos periodos de tiempo⁸⁷. Este tipo de casos se han denominado infecciones pediátricas silenciosas.

De forma similar existen otros reportes recientes acerca de la detección en muy baja cantidad de DNA viral en personas seronegativas^{88,89}. En ambos casos la detección se realizó en una subpoblación de LT CD4+ llamadas de memoria en reposo. Estas células tienen como principal característica la expresión del marcador de memoria CD45RO y ausencia de marcadores de activación temprana como CD69 o tardía como CD38, HLA-DR o CD25⁹⁰. La infección en estas células ha sido descrita ampliamente como infección latente y tiene gran implicación en la patogenia del VIH, en la respuesta inmunológica, en el posible desarrollo de una vacuna, así como en el éxito del tratamiento antirretroviral actualmente disponible⁹¹.

La infección latente en LT CD4+ de memoria en reposo y en líneas celulares in vitro ha sido descrita extensivamente⁹². En ambos tipos de células se encuentra DNA viral integrado, sin expresión de RNA mensajeros. En algunos casos existe ausencia total de RNAs mensajeros, en otros solo se expresan RNAs mensajeros cortos o RNAs multiprocesados que dan lugar a las proteínas reguladoras^{93,94}. La infección latente en LT CD4+ de memoria en reposo también se ha descrito in

vivo, en adultos infectados con el VIH asintomáticos, en niños y adultos que se encuentran tomando tratamiento antirretroviral⁹⁵⁻⁹⁸. Los posibles mecanismos tanto celulares como virales implicados en las infecciones latentes han sido ampliamente descritos, entre estos se pueden mencionar el sitio de integración del VIH, la ausencia de factores de transcripción como NF-κB o NFAT, la ausencia de factores celulares que se unen a Tat y al sitio TAR, así como mutaciones en los genes virales *tat*, *rev* o *nef*^{91,99-104}.

La causa de que se encuentre DNA del VIH en personas que se exponen al virus y sus posibles implicaciones en la evolución de la infección por el VIH aún es tema de controversia y de estudio.

En el presente trabajo estamos reportando la presencia de DNA del VIH en ocho niños nacidos de madres infectadas por el VIH-1¹⁰⁵. Estos niños eran asintomáticos, sin evidencia de replicación viral y sin presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el virus. El DNA fue detectado y amplificado por medio de PCR a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La secuencia del LTR viral fue analizada, llevándose a cabo un estudio filogenético con estas secuencias. Por último se analizó la expresión viral en sus células.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes adelantos en la investigación relacionada con el VIH/SIDA y los conocimientos emanados de la misma en los campos de la patogenicidad viral, la biología del virus, la respuesta inmunológica contra el VIH, así como el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales y el estudio de posibles vacunas, aún no existe una cura o vacuna contra la infección. Mientras tanto sigue creciendo el número de casos de personas infectadas por el VIH-1 y cada vez más mujeres en el mundo viven con el VIH/SIDA. La introducción del tratamiento altamente efectivo o HAART por sus siglas en inglés en mujeres embarazadas infectadas con el VIH-1 ha disminuido el riesgo de infección vertical hasta menos del 1%. Claro está que esto se ha logrado en países donde se lleva a cabo un diagnóstico oportuno de la infección en mujeres y se cuenta con tratamiento antirretroviral adecuado. Sin embargo en la mayoría de los países no se realiza este diagnóstico y por lo tanto el número de casos de niños infectados por el VIH sigue incrementándose. En México en el año 2006 se registraron oficialmente 99 casos de niños menores de 10 años infectados¹⁰⁶, pero se cree que existen muchos más casos no reportados.

vivo, en adultos infectados con el VIH asintomáticos, en niños y adultos que se encuentran tomando tratamiento antirretroviral⁹⁵⁻⁹⁸. Los posibles mecanismos tanto celulares como virales implicados en las infecciones latentes han sido ampliamente descritos, entre estos se pueden mencionar el sitio de integración del VIH, la ausencia de factores de transcripción como NF-κB o NFAT, la ausencia de factores celulares que se unen a Tat y al sitio TAR, así como mutaciones en los genes virales *tat*, *rev* o *nef*^{91,99-104}.

La causa de que se encuentre DNA del VIH en personas que se exponen al virus y sus posibles implicaciones en la evolución de la infección por el VIH aún es tema de controversia y de estudio.

En el presente trabajo estamos reportando la presencia de DNA del VIH en ocho niños nacidos de madres infectadas por el VIH-1¹⁰⁵. Estos niños eran asintomáticos, sin evidencia de replicación viral y sin presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el virus. El DNA fue detectado y amplificado por medio de PCR a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La secuencia del LTR viral fue analizada, llevándose a cabo un estudio filogenético con estas secuencias. Por último se analizó la expresión viral en sus células.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes adelantos en la investigación relacionada con el VIH/SIDA y los conocimientos emanados de la misma en los campos de la patogenicidad viral, la biología del virus, la respuesta inmunológica contra el VIH, así como el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales y el estudio de posibles vacunas, aún no existe una cura o vacuna contra la infección. Mientras tanto sigue creciendo el número de casos de personas infectadas por el VIH-1 y cada vez más mujeres en el mundo viven con el VIH/SIDA. La introducción del tratamiento altamente efectivo o HAART por sus siglas en inglés en mujeres embarazadas infectadas con el VIH-1 ha disminuido el riesgo de infección vertical hasta menos del 1%. Claro está que esto se ha logrado en países donde se lleva a cabo un diagnóstico oportuno de la infección en mujeres y se cuenta con tratamiento antirretroviral adecuado. Sin embargo en la mayoría de los países no se realiza este diagnóstico y por lo tanto el número de casos de niños infectados por el VIH sigue incrementándose. En México en el año 2006 se registraron oficialmente 99 casos de niños menores de 10 años infectados¹⁰⁶, pero se cree que existen muchos más casos no reportados.

Debido a esto sigue siendo imperiosa la implementación de un diagnóstico oportuno de la infección por el VIH en mujeres en etapa reproductiva, así como de los niños después del nacimiento. De la misma forma es importante implementar el tratamiento adecuado tanto en la madre en la etapa de gestación y parto como en el niño después del nacimiento.

El diagnóstico de la infección por el VIH en niños nacidos de madres seropositivas en los primeros meses de edad necesita realizarse mediante aislamiento del virus en cultivo celular o amplificando por medio de PCR el genoma del VIH en las CMSP de los niños. Este diagnóstico es crucial ya que determinará el seguimiento que se dará al niño y en el caso de estar infectado determinar cuando comenzar su tratamiento antirretroviral. Se han reportado casos que demuestran presencia de DNA del VIH en CMSP en algunos niños nacidos de madres seropositivas en los primeros meses de vida, sin embargo en meses posteriores la detección por medio de PCR resulta negativa. Estos niños a pesar de tener DNA viral no presentan respuesta inmunológica de anticuerpos y en los casos reportados no se ha investigado la presencia de respuesta celular de LT CD4+ o CD8+. Estos casos son muy controversiales, sin embargo han sido reportados en otro tipo de poblaciones como parejas de seropositivos que han tenido relaciones sexuales sin protección. Los posibles mecanismos virales, genéticos e inmunológicos que están involucrados en este tipo de "infecciones" aún quedan por estudiarse. Aunado a esto aún no se sabe la importancia que pueda tener esta presencia de DNA viral en la patogénesis de la enfermedad y/o en un correcto diagnóstico de la infección.

En el presente trabajo estamos reportando la presencia de DNA del VIH en ocho niños nacidos de madres infectadas por el VIH-1⁹⁰. Estos niños fueron asintomáticos durante los dos años de seguimiento y no presentaron evidencia de replicación viral ni presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el virus. Por lo tanto dada la poca información que existe al respecto es de suma importancia caracterizar de forma molecular e inmunológica este fenómeno.

HIPÓTESIS

La exposición al virus de inmunodeficiencia humana puede tener como producto infecciones susceptibles de ser eliminadas. Así, la detección de DNA de VIH –integrado o no- en células mononucleares de sangre periférica de niños nacidos de madres infectadas con el virus y que no presentan respuesta inmune en forma de anticuerpos puede indicar una infección temporal, no productiva, similar a infecciones en células en latencia, la cual en ausencia de replicación viral lleva al no establecimiento de una infección permanente y la eliminación del material genético viral.

OBJETIVOS

GENERAL:

- Confirmar la presencia de DNA del VIH-1 en las células mononucleares periféricas de niños seronegativos, nacidos de madres infectadas, conocer de que forma se encuentra el DNA viral y su estado transcripcional en estas células.

PARTICULARES

- Confirmar la presencia de DNA del VIH-1 en muestras secuenciales de niños con posibles infecciones silenciosas, mediante amplificación de diferentes regiones conservadas del virus.
- Demostrar si el DNA del VIH-1 detectado se encuentra integrado al genoma celular o en forma episomal y si esto puede ser un factor que impida la replicación viral.
- Demostrar si la inhibición de la replicación es debida a mutaciones en la región reguladora viral nef/LTR que alteren el inicio de la transcripción,
- Detectar mediante RT-PCR los RNAm virales como medida de la expresión del VIH para saber si existe un bloqueo en la transcripción viral.

METODOLOGÍA

Selección de las muestras:

Se seleccionaron 8 niños con diagnóstico indeterminado a la infección por VIH-1, los cuales presentaron resultados positivos de PCR con los iniciadores SK (descritos mas adelante), en al menos su primera muestra y con resultados negativos para aislamiento viral.

Estos niños provienen de una cohorte de aproximadamente 300 niños nacidos de mujeres infectadas por VIH cuyas muestras fueron sometidas a detección de anticuerpos IgG por ELISA, antígeno p24, detección de genoma viral por PCR y aislamiento viral. Se dispone de diversas muestras secuenciales de los menores incluidos en el estudio (P1 a P8), marcadas con la misma clave y letras secuenciales (Tabla 1). Como control positivo se utilizaron las muestras de un bebé infectado perinatalmente (PINF) con resultados positivos de aislamiento viral, PCR y Ag p24. En el caso de detección de RNA mensajeros virales, adicionalmente se empleó la muestra de un adulto seronegativo, expuesto a VIH con serología negativa, aislamiento viral negativo, Ag p24 negativo y resultados positivos de PCR (AEXP), así como muestras de dos adultos infectados por el VIH en etapa crónica de la enfermedad, sin tratamiento antirretroviral (AI1 y AI2).

Ninguno de los ocho niños integrados al estudio presentaba sintomatología clínica relacionada al VIH ni había recibido tratamiento antirretroviral.

Células mononucleares de sangre periférica:

Se colectó sangre periférica y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se separaron por un gradiente de Ficoll-Hypaque, una alícuota se empleó en el procedimiento de aislamiento viral en cultivo y otra alícuota se congeló, para la realización de nuestros estudios.

Detección de anticuerpos IgG contra el VIH:Western blot.

Los anticuerpos IgG en los plasmas de los pacientes se detectaron mediante Western blot, como se ha descrito anteriormente¹⁰⁷ (Travers, K. & Kanki, PJ 1990). con modificaciones. Brevemente virus semipurificado por gradiente de sacarosa IIB/LAV fue lisado en buffer de muestra (20mM Tris-Base pH=6.8, 0.1% SDS, 5% glicerol, 1% DTT, BioRad) y desnaturalizado por ebullición. Las proteínas fueron separadas por medio de electroforesis SDS-PAGE y transferidas pasivamente a membranas de nitrocelulosa (BioRad). La reacción inmunoenzimática de detección se realizó cortando tiras de NC y se incubó con el suero de cada paciente diluido 1:100. Para la detección se empleó un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa (Sigma Aldrich) y se utilizó como sustrato y cromógeno, H₂O₂ y Diaminobencidina (DAB) respectivamente (sigma Aldrich).

Extracción de DNA y PCR

La extracción del DNA se realizó mediante la adición de buffer Tris Base 0.01M, 0.005M EDTA, 0.5% SDS y proteinasa K (20mg/mL) a 1×10^6 células. Se incubó a 56°C durante 1 hora y se inactivó la proteinasa K por ebullición durante 10 min. El DNA se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol absoluto, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en agua. Se cuantificó la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm.

Gen β -globina

Como control de calidad del DNA se amplificó el gen de β -globina, la cual se realizó de la siguiente forma. La reacción de PCR se llevo a cabo en un volumen total de 50 μ L (100mmol Tris-HCl pH=8.3, 20 pmol de cada iniciador y 2.5 U Taq polimerasa, GIBCO BRL) en un Termociclador Gene Amp 2600 (Applied Biosystems Forter City CA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes 94°C 5 min. seguidos de 3 ciclos a 94°C 10 seg, 60°C 10 seg, 72°C 30 seg. Posteriormente 32 ciclos a 94°C 10 seg, 55°C 10 seg, 72°C 30 seg. Finalmente al finalizar los 35 ciclos de PCR se

incuba a 72°C durante 7 minutos y 4°C hasta que se retiren los tubos. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% en buffer Tris-Borato EDTA (TBE 1X: 0.1 M Tris Base pH = 7.2, 0.1 M ácido bórico y 2.0 mM de EDTA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Se utilizaron como referencia los marcadores de peso molecular de 100bp, o lambda digerido con Hind III (Gibco BRL). Solo los DNAs positivos a este gen se utilizaron para el estudio.

Amplificación de los genes virales gag y nef/LTR

Se amplificó la región del gen gag de 142 pb de la proteína p24 que se emplea regularmente en diagnóstico, empleando los iniciadores SK 431 y SK 162. La secuencia de los iniciadores es la siguiente:

SK 431 (5'TGCTATGTTAGTTCCCCTTGGTTCTCT3')

SK162 (5'AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT3'),

Además se amplificaron otros dos fragmentos del genoma del VIH-1 Gag y nef/LTR. El fragmento gag de 698 pb comprende parte de las proteínas p24, p6 y p7 de la cápside viral. Para amplificar este fragmento se empleó un PCR anidado con los iniciadores siguientes:

GAG 1 (5'TCCACCTATCCCAGTAGGAG3'),

GAG 2 (5'GGTCGTTGCCAAAGAGTGAT3')

y para la segunda ronda

GAG 3 (5'TAAAAGATGGATAATCCTGGG3'),

GAG 4 (5'GCCAAAGAGTGATCTGAGGG3').

También se empleó un PCR anidado para amplificar el fragmento nef/LTR de 500 pb que comprende la secuencia de R y U5 del LTR y se sobrepone con la secuencia 3' del gen nef. Para amplificar este fragmento se empleó un PCR anidado con los iniciadores siguientes:

LTR 1 (5'CACACAAGGCTACTTCCCTGA3'),

LTR 2 (5'GATCTCTAGTTACCAGAGTCA3')

y en la segunda ronda

LTR 3 (5'CCCTGATTAGCAGAACTACAC3'),

LTR 4 (5'GTCACACAACAGACGGGCACAC3').

En cada reacción se utilizaron 2 µg de DNA de las muestras. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µL (100mmol Tris-HCl pH=8.3, 20 pmol de cada iniciador y 2.5 U Taq polimerasa, GIBCO BRL) en un Termociclador Gene Amp 2600 (Applied Biosystems Forter City CA). Para el primer par de iniciadores (SK 431, SK162) las condiciones de amplificación fueron 95°C 2min. 3 ciclos de 95°C 30 s., 60°C 30 s., 72°C 30 s., 32 ciclos de 95°C 10 s., 55°C 10 s., 72°C 10 s. Para el resto de los iniciadores las condiciones de ambas rondas de amplificación fueron 95°C 2 min., 35 ciclos de 95°C 10 s., 55°C 10 s., 72°C 10 s., y 72°C 5 min.

En cada amplificación se empleo un control positivo de 10 copias empleando DNA proveniente de células Molt infectadas con el virus prototipo IIIB/LAV (IIIBMOLT), como control negativo se utilizó DNA extraído de CMSP de una persona no infectada. El procedimiento se realizó en tres cuartos diferentes, uno para la extracción de DNA, otro para la preparación de reactivos y buffer de PCR y un último cuarto para la purificación y electroforesis de los amplicones de PCR. Los amplicones nunca fueron transferidos al área destinada para la extracción y la preparación de buffers de tal forma que productos obtenidos no son atribuibles a contaminación del PCR.

Los productos de amplificación se identificaron separándolos por medio de electroforesis en geles de agarosa con buffer de Tris-Borato-EDTA (TBE) al 1.5%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Se utilizaron como referencia los marcadores de peso molecular de 100bp, o lambda digerido con Hind III (Gibco). En la figura 8 se indica la posición de los iniciadores y el tamaño del fragmento de PCR amplificado.

Detección de DNA episomal

Para la detección de DNA viral de 2-LTR se amplificó la unión entre las secuencias U3-U5 que se encuentra entre los dos LTRs. Se emplearon los iniciadores INT-1U3 (5'AATCAGGGAAGTAGCCTTGTGTGTG3') y el ya mencionado LTR3. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ l conteniendo 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M deoxinucleosidos trifosfatados (dNTPs), 50 pmoles de cada iniciador y 1.0 U de *Taq* DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 2 min., posteriormente 35 ciclos de amplificación de 94°C por 10 s., 55°C por 10 s., y 72°C por 30 s.; y una extensión final de 72°C por 5 min. El PCR de Nef-INT-1U3 se realizó empleando las mismas condiciones empleando 50 pmoles de los iniciadores Nef1 (5'ACATACCTAGAAGAATAAGACAGG3'), INT-1U3. Los productos de amplificación se identificaron separándolos por medio de electroforesis en geles de agarosa con buffer de Tris-Borato-EDTA (TBE) al 1.5%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Se utilizaron como referencia los marcadores de peso molecular de λ DNA digerido con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III (DNA Molecular Weight Marker III Roche) . En la figura 11 se indica la posición de los iniciadores y el tamaño del fragmento de PCR amplificado.

Detección de DNA integrado de VIH-1

Se empleó la técnica descrita anteriormente (Wu Y. y colaboradores 2001)¹⁰⁸, que emplea en una primera ronda un iniciador para la secuencia Alu y un iniciador para la secuencia viral LTR (LTR4) para delimitar una zona de amplificación en el DNA genómico donde se encuentre la integración viral. Posteriormente se realiza una segunda ronda de amplificación con iniciadores específicos del VIH-1 LTR3-UIRH4. La detección de DNA integrado de VIH-1 se realizó empleando 2 μ g de DNA total de CMSP de las personas en estudio. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 μ L (100mmol Tris-HCl pH=8.3, 20 pmol de cada primer y 2.5 U *Taq* polimerasa, GIBCO BRL) en un

Termociclador Gene Amp 2600 (Applied Biosystems Foster City CA). Las condiciones fueron las siguientes: 35 ciclos de amplificación de 94°C por 30 s., 66°C por 40 s., y 72°C por 3 min.; y una extensión final de 72°C por 5 min. Posteriormente se realizó otra ronda de amplificación con los iniciadores LTR3-UIRH4 tomando 5 µL de la primera reacción con 100mmol Tris-HCl pH=8.3, 20 pmol de cada primer y 2.5 U Taq polimerasa, (GIBCO BRL). La reacción de PCR se realizó de la siguiente forma 95°C por 2 min. Posteriormente 35 ciclos de amplificación de 94°C por 10 s., 55°C por 10 s., y 72°C por 10 s.; y una extensión final de 72°C por 5 min.

Secuenciación

La secuencia de la región nef/LTR se obtuvo a través del secuenciador ABI Prism 310, utilizando el estuche ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. (PE Applied Biosystems). Los productos de amplificación de PCR se purificaron previamente utilizando el kit Wizard PCR PrepsDNA Purification y el aparato Vac-Man Laboratory vacuum Manifold (Promega).

Aislamiento del RNA y RT-PCR

El RNA total se obtuvo de CMSP congeladas usando el reactivo TRIZOL (Gibco) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El RNA precipitado se resuspendió en agua bidestilada tratada con Dietil pirocarbonato (DEPC Sigma) y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA se verificó detectando el RNA ribosomal en geles desnaturalizantes agarosa- formaldehído. Para verificar la calidad del RNA empleado en cada muestra primero se amplificó el gen de la enzima Gliceraldehidofosfato deshidrogenasa (GAPDH), solo los RNAs positivos a este gen se utilizaron para el estudio.

Para amplificar los RNAm virales con procesamiento múltiple o sencillo (16), se utilizaron los iniciadores siguientes:

BSS (5'GGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGG3')

BAMA (5'GCCAAGGATCCGTTCCTACTAATCGAATGG3').

Para la síntesis de los cDNA y la posterior amplificación por PCR se empleó el estuche GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer). El RNA total (2 ug) fue retrotranscrito en presencia del iniciador BAMA y el DNA obtenido fue amplificado en el mismo tubo. La síntesis del cDNA se realizó en 100 uL de reacción 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 5mM MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 50 U de transcriptasa reversa de MuLV y 50 pmoles de iniciador. La mezcla de reacción fue incubada a 45°C por 2 horas. La amplificación se realizó al añadir 50 pmoles del iniciador BSS y 2 U de AmpliTaq DNA polimerasa. Se utilizaron las siguientes condiciones: 95°C 5 min., 35 ciclos de 95°C 30 seg., 55°C 30 seg. y 72°C 2 min.

Como controles positivo y negativo se empleó RNA extraído de las células descritas anteriormente.

Marcaje de la sonda y Southern blot.

Para verificar la especificidad de los productos de RT-PCR producidos con los iniciadores BSS-BAMA se realizó una sonda que identificará a todas las especies de RNA mensajeros. La sonda se realizó por medio de PCR emplearon los iniciadores Tat1 y Tat2, el fragmento amplificado hibrida con parte del exón 5 que comparten todos los RNA mensajeros del VIH-1. La reacción de marcaje de la sonda por medio de PCR se realizó con el estuche DIG DNA labeling kit (Roche), incorporando Digoxigenina dUTP (Roche) de acuerdo a las indicaciones establecidas por el proveedor. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 20 ciclos de 95°C 30 seg., 55°C 30 seg. y 72°C 2 min.

Los productos de la reacción de RT-PCR se separaron en geles de poliacrilamida al 5% en condiciones no desnaturalizantes y fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa (Zetaprobe BioRad). Posteriormente se llevo a cabo la detección de los productos de RT-PCR con la sonda Tat1-Tat2 (T1) marcada con d-UTP digoxigenina y revelada empleando el estuche de detección DIG luminescent detection kit (Roche) de acuerdo a las condiciones establecidas por el proveedor.

RESULTADOS

Detección de anticuerpos IgG contra proteínas virales.

En los ocho niños en estudio se realizó un Western blot (WB) para determinar la presencia de anticuerpos tipo IgG contra proteínas específicas del VIH-1. La primera muestra de P1 tiene anticuerpos contra las proteínas p66 y p51 del gen *pol*, contra las proteínas p55 y p24 del gen *gag*, así como contra la glicoproteína gp41 del gen *env* (fig 6). En sus tres muestras posteriores la reactividad contra estas proteínas se mantuvo a excepción de la p24 que no fue detectada. P2 presentó anticuerpos contra las proteínas p66, p55, p51 y gp41 en sus dos primeras muestras, en las tres muestras posteriores los anticuerpos contra gp41 disminuyeron mientras que para las demás proteínas se observó mayor reactividad. P3 presentó anticuerpos contra la glicoproteína gp120 del gen *env* y contra las proteínas, p66, p55, p51, gp41, p31 y p24 en su primera muestra, mientras que en sus dos muestras posteriores solo se observó anticuerpos contra p66, p55 y p51. En P4, P5 y P6 solo se observó baja intensidad de las bandas que corresponden a las proteínas p66, p55 y p51. P7 y P8 presentaron anticuerpos contra las proteínas virales p24, p55 y p66 en su primera muestra., mientras que en sus tres muestras siguientes en ambos casos solo se detectaron presencia de anticuerpos contra p66. De acuerdo a lo establecido por el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos con sede en Atlanta (CDC Atlanta), una muestra es positiva cuando se detectan anticuerpos contra al menos 2 de las siguientes proteínas virales p24, gp41 o gp120/160⁷¹. Una muestra es negativa cuando no presenta ninguna banda, mientras que la muestra es indeterminada cuando existe reactividad contra una o dos proteínas virales pero que no cumplen con los requisitos de muestra positiva anteriormente descritos. Tomando en cuenta los criterios del CDC de Atlanta, solamente los niños P1, P2 y P3 se consideran positivos en su primera muestra, mientras que en sus muestras posteriores son negativos. Esto puede deberse a que los anticuerpos de tipo IgG

contra el virus de la madre pasaron a través de la placenta al niño y aún se encontraban presentes en los niños en los primeros meses de vida. Posteriormente estos anticuerpos no fueron detectados y no hubo producción de anticuerpos propios del niño contra el VIH-1. En conclusión en ninguno de los niños se evidenció una respuesta de anticuerpos de tipo IgG indicativa de infección por el virus.

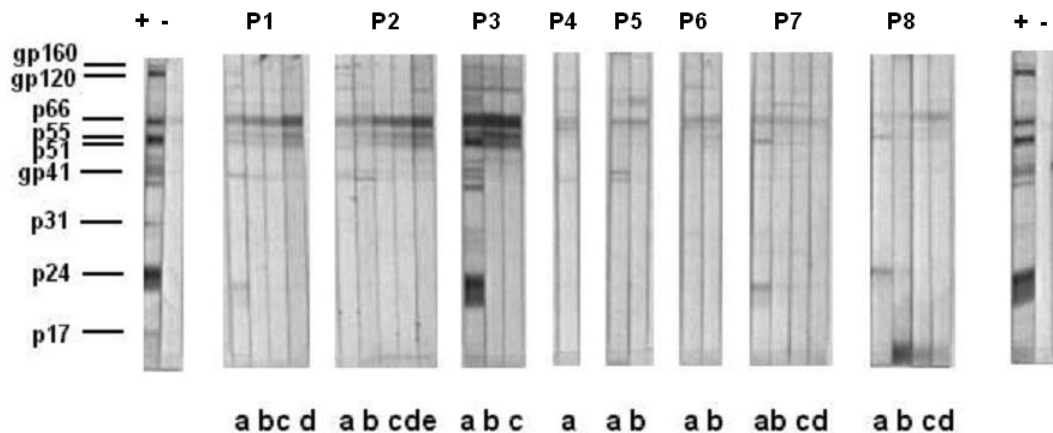


Fig. 6. Detección de anticuerpos anti-VIH-1 de tipo IgG mediante WB. Cada bloque de tiras corresponde a un niño diferente cuya clave de identificación aparece arriba y en la parte inferior se indica el número secuencial de la muestra. (+) y (-) corresponden a controles positivo y negativo. Las bandas correspondientes a las proteínas virales así como sus pesos moleculares se indican en el control positivo del margen izquierdo.

Detección del genoma de VIH-1.

El genoma del VIH-1 se detectó por medio de la amplificación del fragmento SK, todas las primeras muestras de los niños resultaron positivas. El fragmento SK se amplificó con iniciadores ampliamente utilizados en el diagnóstico molecular de la infección por el VIH a nivel mundial y son empleados también en métodos automatizados de detección de carga viral del VIH-1⁷⁴. Posteriormente se confirmó esta detección amplificando dos fragmentos más GAG y *nef/LTR*, los cuales se encuentran en zonas altamente conservadas del genoma del VIH-1 subtipo B; los fragmentos SK y GAG se encuentran en el gen *gag* y el *nef/LTR* en la región promotora del VIH-1 (Fig. 7). El fragmento SK abarca 142 pb de la proteína p24 y el fragmento GAG abarca 700 pb de la

región 3' de la proteína p24. Por otro lado la región amplificada LTR abarca 500 pb de la secuencia 5' reguladora de la transcripción. Esta región también está presente en la parte 3' del genoma del VIH y se traslapa con una parte de la región codificante del gen *nef*. Por lo tanto con esta metodología de PCR amplificamos dos regiones una no codificante LTR y una codificante del gen *nef* (*nef*/LTR).

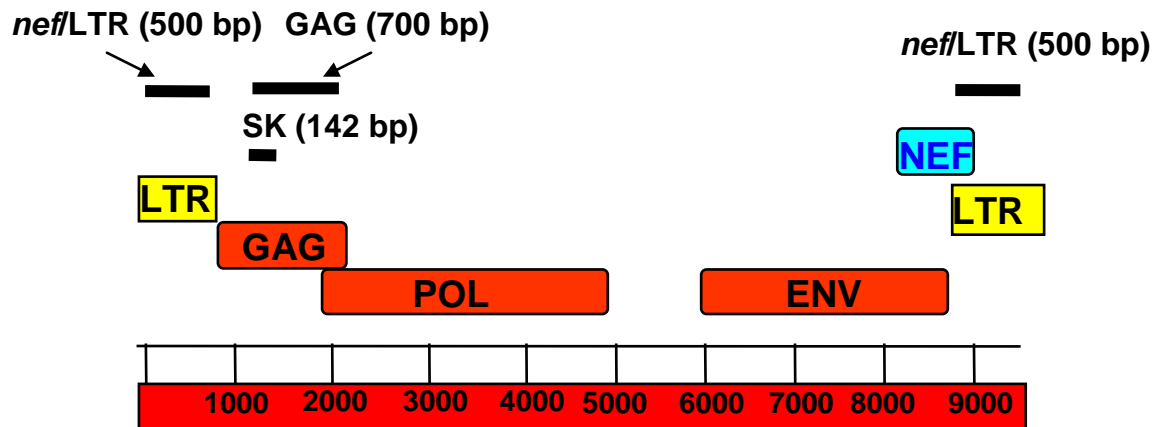


Fig. 7. Esquema gráfico de las regiones de VIH amplificadas. Se muestran los 3 genes estructurales *gag*, *pol* y *env* en el genoma proviral del VIH-1, así como el gen accesorio *nef*. En ambos extremos se encuentran las regiones repetidas largas o LTR por sus siglas en inglés (Long Terminal Repeat). El fragmento amplificado se esquematiza en la figura mediante líneas dobles, indicando el nombre y el tamaño en pares de bases (pb).

Los resultados de la amplificación de los fragmentos GAG y *nef*/LTR nos permitieron agrupar a los pacientes en dos grupos (Fig. 8). En el primer grupo, P1 y P5 amplificaron los tres fragmentos en todas sus muestras analizadas. P1 hasta los 22 meses y P5 hasta los 24 meses de edad. En el segundo grupo P2, P3, P6, P7 y P8 amplificaron los tres fragmentos sólo en sus primeras muestras (6, 21, 24, 20 y 11 meses respectivamente), en las muestras posteriores la amplificación fue negativa (Tabla 1). En este segundo grupo la edad máxima a la que se obtuvieron resultados positivos fue entre los 6 meses y los 24 meses de edad. En el caso de P4 solo contamos con una muestra, siendo positiva para la amplificación de los tres fragmentos. Estos resultados nos muestran que en todos los niños se detectó genoma del VIH-1 al menos en su primera muestra.

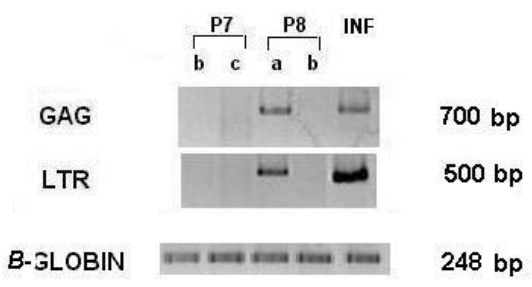
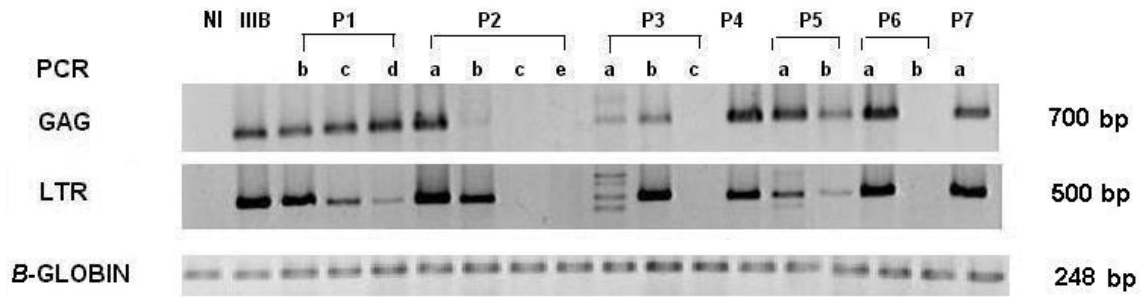


Fig. 8. Amplificación de los fragmentos GAG y *nef*/LTR. Se indica la clave del paciente y la muestra secuencial en la parte de arriba. Se incluyó un control negativo DNA de células de un niño no infectado (NI) y controles positivos: DNA de células infectadas con el virus prototipo IIIB/ LAV (IIIB) y DNA de células de un niño infectado con el VIH-1 (INF). Se realizó una amplificación del gen de β -globina como control de calidad del DNA empleado.

Individuo	Muestra	Edad (Meses)	Anticuerpos anti-VIH	PCR		DNA Integrado
				LTR	GAG	Alu-LTR
P1	a	9	gp41, p55, p66, p24	ND	ND	ND
	b	14	gp41, p51, p55, p66	+	+	+
	c	15	gp41 p51, p55, p66	+	+	+
	d	22	gp41 p51, p55, p66	+	+	+
P2	a	3	gp41, p55, p51, p66	+	+	+
	b	6	p66, p55, p51	+	+	+
	c	11	p66, p55, p51	-	-	-
	d	22	p66, p55, p51	-	-	-
P3	a	18	p24, p31, gp41 p51, p55, p66, gp120	+	+	+
	b	21	p51, p55, p66	+	+	+
	c	29	p51, p55, p66	-	-	-
P4	a	15	p51, p55, p66	+	+	+
P5	a	16	p51, p55, p66	+	+	+
	b	24	p51, p55, p66	+	+	+
P6	a	24	p51, p55, p66	+	+	+
	b	55	p51, p55, p66	-	-	-
P7	a	20	p24, p55, p66	+	+	+
	b	24	P66	-	-	-
	c	29	P66	-	-	-
	d	31	P66	ND	ND	ND
P8	a	11	p24, p55, p66	+	+	+
	b	14	p66	-	-	-
	c	18	p66	ND	ND	ND
	d	20	p66	ND	ND	ND
NI*	NA	NA	Negative	-	-	-
IIIB°	NA	NA	NA	+	+	+
PINF°	NA	NA	Positive	+	+	+

Tabla 1. Muestras secuenciales de los niños estudiados y los resultados de presencia de anticuerpos, detección de genoma viral por PCR y estado del DNA viral.

(NI) Suero y DNA de CMSP de un niño no infectado por el VIH, usado como control negativo.

(IIIB°) DNA de células Molt infectadas con el virus prototipo IIIB/LAV fueron usadas como control positivo. (PINF) DNA de CMSP de un niño infectado por el VIH-1 usado como control positivo.

NA No aplica ND No determinado.

Estado del DNA viral en las células: detección de formas episomales.

Durante las etapas tempranas de la infección por el VIH-1 en una célula se acumulan formas de DNA episomales o circulares. Estas especies de DNA viral son muy poco estables y son degradadas si no se lleva a cabo la integración al genoma celular¹⁰⁹. Por lo tanto para descartar la posibilidad de que el DNA viral detectado se encuentre en una forma episomal, se implementó una metodología que nos permitiera distinguir si el DNA viral se encontraba sin integrar (episomal) o integrado. Para detectar DNA no integrado o episomal se utilizó un PCR inverso con los iniciadores LTR-3 y INT-U3. Con estos iniciadores se amplificó un fragmento de 650 pb que une la región U3 del LTR 5' y U5 del LTR 3' (Fig. 9). Esta unión sólo se encuentra en formas de DNA circulares que están unidas por sus dos extremos LTR (2 LTR), por lo tanto distingue entre DNA circular o episomal y DNA integrado. Como control positivo de DNA episomal se empleó la línea celular linfocitaria MT2 después de 12 horas de ser infectada con el virus prototipo III BLAV (IIIBMT2). Como control negativo de DNA episomal se utilizaron células Molt infectadas de forma crónica con el virus III BLAV (IIIBMOLT). Como control de la presencia del genoma del VIH-1, se incluyó en cada muestra una amplificación con los iniciadores Nef-1 y INT-U3 (Fig. 9). Con estos iniciadores se amplificó un fragmento del gen nef de 400 pb.

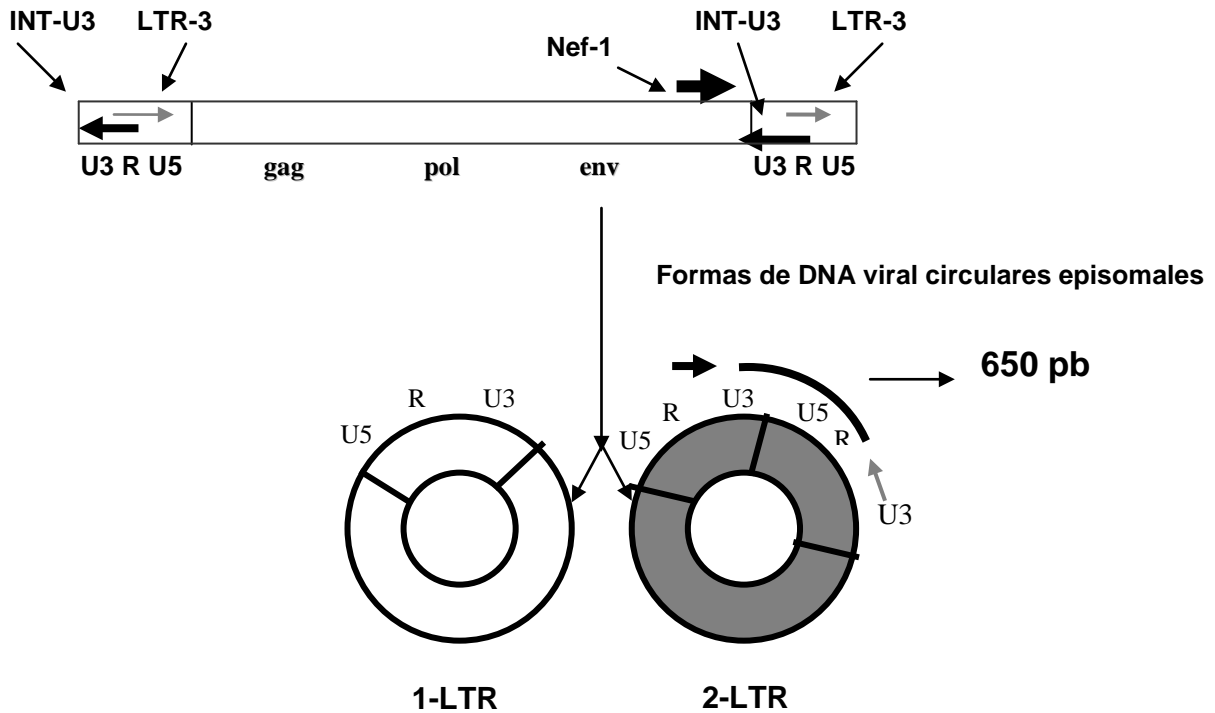


Fig. 9. Representación gráfica de la metodología (PCR inverso) empleada en la detección de DNA episomal. En los extremos se encuentran los LTR's, dentro de estas secuencias se encuentran tres regiones U3, R y U5. En la parte superior se indican los iniciadores empleados, el sitio donde se unen y su orientación. Los iniciadores se unen a ambas secuencias de LTR, pero solo los iniciadores INT-U3 en el LTR 5' y LTR-3 en el LTR 3' son empleados para la amplificación de una secuencia de 650 pb presente solo en el DNA circular de 2-LTR. Como control de presencia de DNA viral se incluyó en cada muestra el iniciador Nef-1. El producto amplificado con los iniciadores Nef-1 y INT-U3 es de 400 pb.

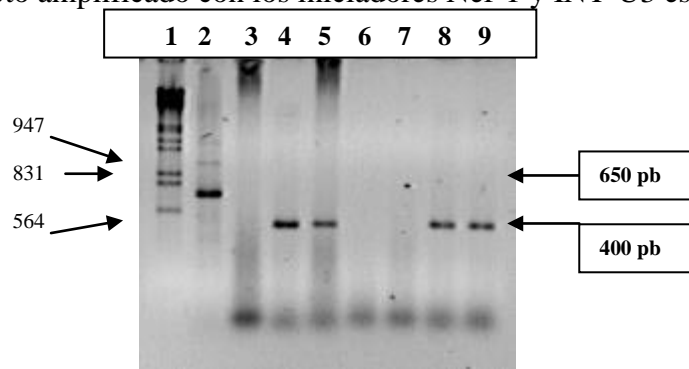


Fig. 10. Productos de amplificación de la metodología de PCR inverso para detectar DNA episomal. Los productos de PCR se separaron y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1; Marcador de peso molecular (MPM), carriles 2,3 y 6,7 amplificación con los iniciadores INT-U3-LTR-3 (PCR inverso), carril 2; células MT2 control positivo, carril 3; células IIBMOLT control negativo, carril 6; niño P3, carril 7; niño P6. Carriles 4,5 y 8,9 amplificación con los iniciadores Nef-1 y LTR-3, carril 4; células MT2, carril 5; células IIBMOLT, carril 8; niño P3, carril 9; niño P6.

El DNA episomal fue detectado en las células recién infectadas IIBMT2, pero no en las células infectadas de forma crónica IIBMolt. El DNA episomal no fue detectado en ninguna de las muestras de los niños. Las muestras de los niños P3 y P6 son indicadas como ejemplos en la figura 10. En todas las muestras se amplificó el fragmento del gen nef de 400 pb. Esto nos indica que todas presentan genoma viral, pero no se encuentra de forma episomal.

Estado del DNA viral en las células: estado de integración al genoma celular.

Posteriormente se utilizó una metodología de PCR descrita por Wu Y y colaboradores que permite amplificar solo DNA de VIH integrado¹¹⁰. Esta metodología utiliza un iniciador que hibrida con las secuencias repetidas Alu en el genoma celular. Para detectar el DNA del VIH proviral o integrado se emplea un iniciador antisentido (LTR4) en la región LTR de tal forma que solo se amplifican fragmentos de DNA viral que estén unidos a DNA celular. En la primera ronda de amplificación se forman fragmentos de diferentes tamaños, dependiendo de la distancia del sitio de integración con la secuencia Alu. En una segunda ronda de amplificación se emplean iniciadores que se unen a la región LTR del VIH-1 formando un producto de 371 pb, indicando la presencia de DNA del VIH integrado (Fig. 11).

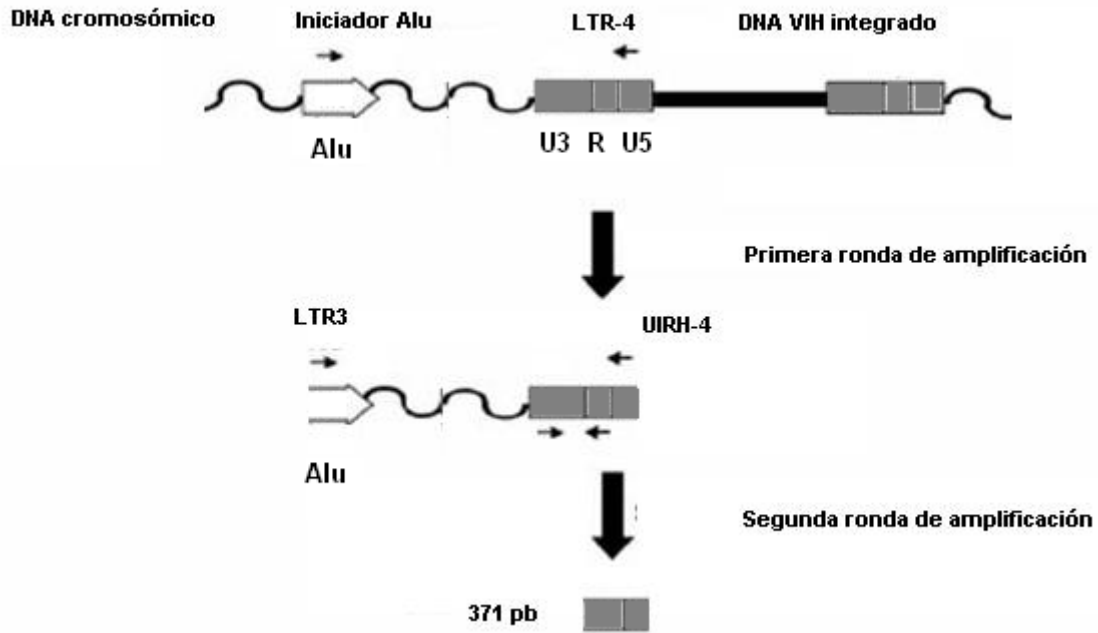


Fig. 11. Esquema del PCR empleado para la detección de DNA integrado del VIH-1.

Todas las muestras de CMSP que resultaron positivas a la amplificación con los iniciadores GAG y LTR, también fueron amplificadas con los iniciadores Alu-LTR (Fig. 12). P1 y P5 en sus tres muestras secuenciales, P2, P3, P6, P7 y P8 amplificaron sólo en sus primeras muestras (6, 21, 24, 20 y 11 meses respectivamente) y P4 fue positivo en su única muestra. Estos resultados confirman la presencia de DNA del VIH e indican que este DNA viral se encuentra integrado en el genoma celular.

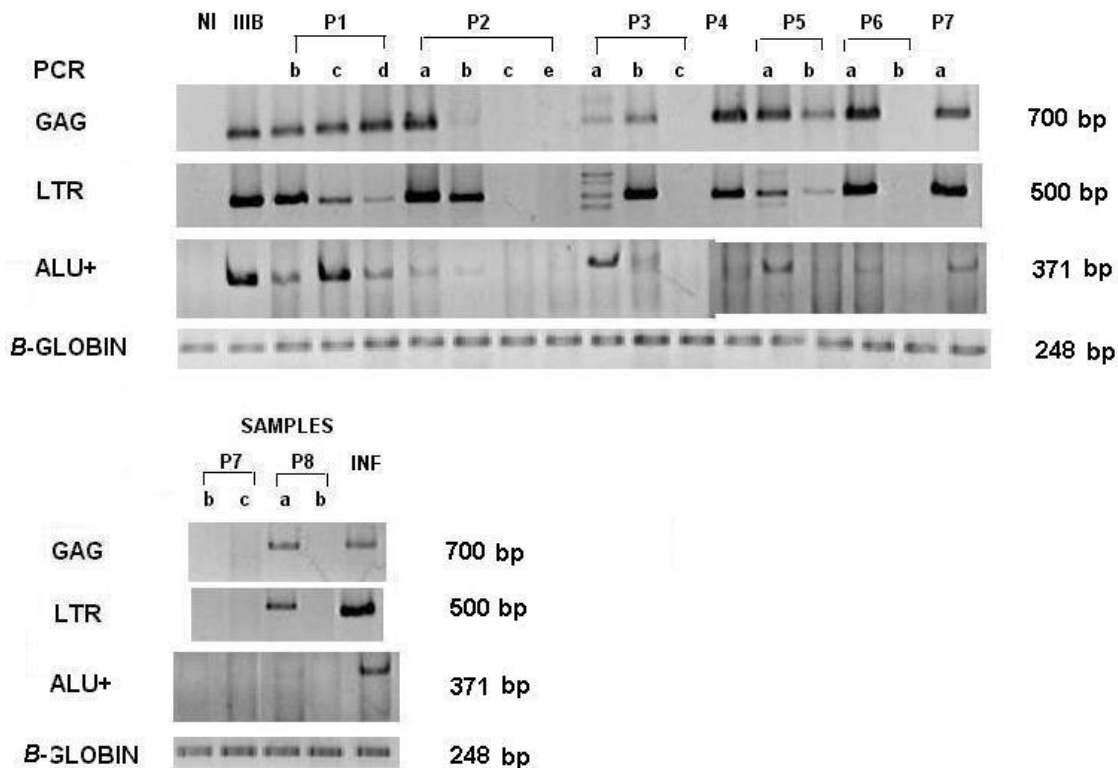


Fig. 12. Detección de DNA de VIH integrado. Se indica la clave del paciente y la muestra secuencial en la parte de arriba. Se incluyó un control negativo células de un niño no infectado (NI) y controles positivos, células con el virus prototipo IIIB/ LAV (IIIB) y células de un niño infectado con el VIH-1 (INF). Se realizó una amplificación del gen de β -globina como control de calidad del DNA empleado.

Detección de especies de RNAm virales multiprocesados y con procesamiento sencillo.

Durante la infección por el VIH en una célula se producen diferentes especies de RNA mensajeros (RNAm) virales. Se pueden distinguir RNAm multiprocesados que dan lugar a las proteínas reguladoras Rev y Tat y a la proteína accesoria Nef. Los RNAm virales con procesamiento sencillo dan lugar a las proteínas accesorias Vif, Vpu y Vpr, así como a la glicoproteína de la envoltura gp160. Por último los RNAm virales sin procesar dan lugar a las proteínas estructurales del gen *gag* y del gen *pol*, y forma el RNA genómico para la formación de nuevas partículas virales¹¹¹. En células donde se encuentra replicación viral activa se expresan los tres tipos de RNAm, mientras que en células donde se establece un estado de latencia solo se expresan los RNAm multiprocesados¹¹².

Para establecer el estado transcripcional en que se encuentra el DNA proviral detectado y por lo tanto el estado replicativo del virus se detectaron los diferentes RNAm virales que expresan las células de los niños. Para ello los RNAm virales se utilizaron los iniciadores BSS y BAMA descritos por Schwartz y colaboradores¹¹³ (fig 13). Esta estrategia permite la amplificación de los RNAm virales con procesamiento múltiple y los de procesamiento sencillo. Para identificar los productos de amplificación de los diferentes RNAm virales se utilizaron las células Molt infectadas con virus prototipo IIIB (IIBMolt). Los diferentes productos de amplificación y el gen al que pertenecen se muestran en la figura 14. La identidad viral de los productos obtenidos se demostró por medio de un Southern blot empleando una sonda preparada con el fragmento Tat1-Tat2 (T1).

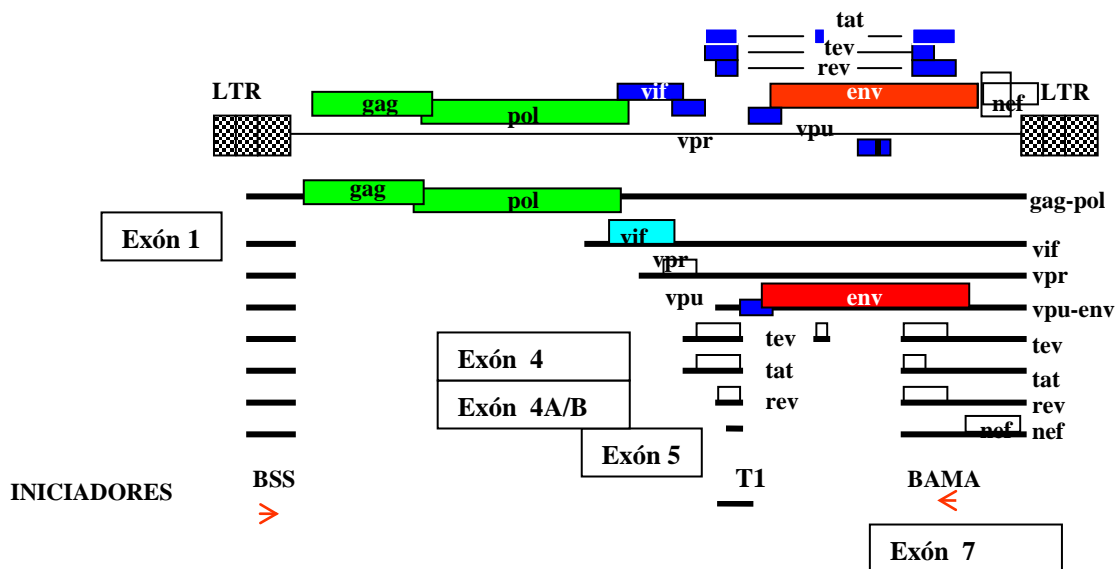


Fig. 13. Esquema del DNA proviral y ejemplos de RNA mensajeros del VIH-1. Los exones se representan con líneas continuas, los iniciadores BSS-BAMA se indican con flechas y con doble raya se indica la ubicación de la sonda empleada para la detección de los productos de amplificación con los iniciadores ya mencionados.

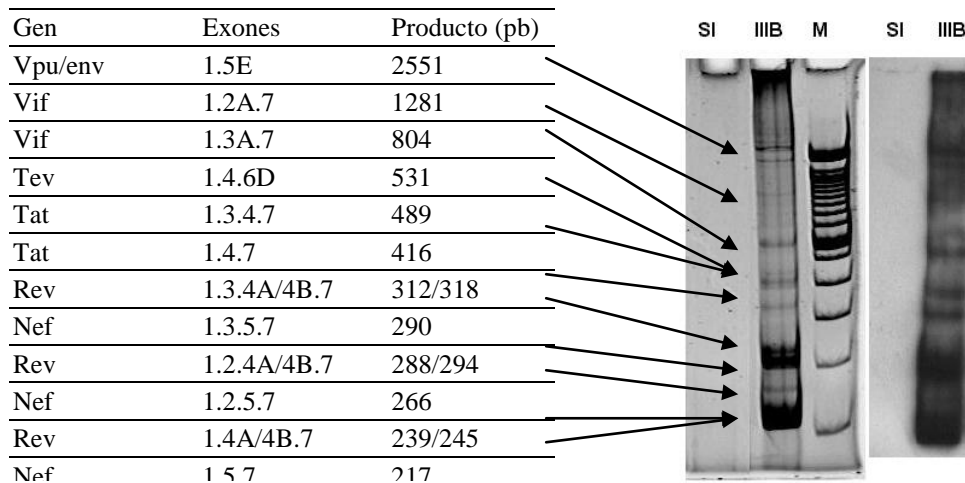


Fig. 14. Productos de amplificación con los iniciadores BSS-BAMA. A la izquierda se muestra la separación de los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de acrilamida y tinción con bromuro de etidio. Carril 1; Niño sin infección SI, carril 2; células IIBMOLT, carril 3; Marcador de peso molecular (100 pb). A la derecha se muestra un Southern blot de las mismas muestras empleando como detección la sonda Nef1-IU3. A la izquierda se señalan la identidad de los productos de amplificación y su tamaño en pares de bases.

Se analizó la expresión de RNAm viral solo en las muestras que presentaron DNA integrado (Fig. 15). Como control se incluyó RNA de un niño con infección por VIH-1 (INF), así como RNAs de una persona adulta expuesta seronegativa (AEXP) y dos personas adultas con infección por el VIH-1. Además se incluyó también como control positivo el RNA de las células IIBMolt. Al examinar la amplificación de los RNAm virales en las muestras de los niños empleando geles de poliacrilamida (figura 14) observamos diferentes patrones de bandas. El niño infectado (carril 15), y la muestra a del niño P5 (carril 11), presentan un patrón de RNAm muy similar al obtenido con las células IIBMOLT (carril 10). En estas muestras se observan productos de RT-PCR que corresponden a diferentes especies de RNAm de los genes *nef*, *tat* y *rev*, así como a *vpu*, *vpr* y *env*. Los niños P1, P2, P4, y P8, así como el paciente adulto (AEXP) tienen un patrón semejante entre ellos. Se observan dos bandas una de 217 pb que corresponde al gen *nef* y otra de 416 pb que corresponde al gen *tat*. Los niños P3 y P7 no presentaron mensajeros virales en ninguna de sus muestras. Para

confirmar la especificidad de las bandas observadas en el gel de poliacrilamida se realizó un southern blot empleando la sonda específica contra VIH-1 (nef1-IU3). La sonda específica contra el VIH no detectó las bandas observadas en los niños P1, P2, P4, P5 y P8, por lo tanto no pudimos confirmar que estas fueran virales.

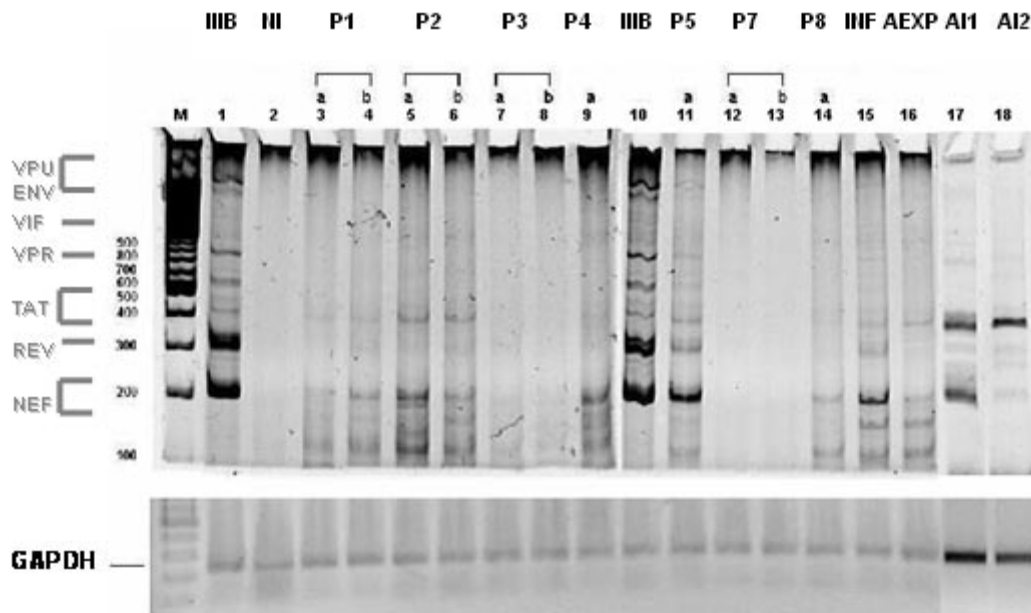


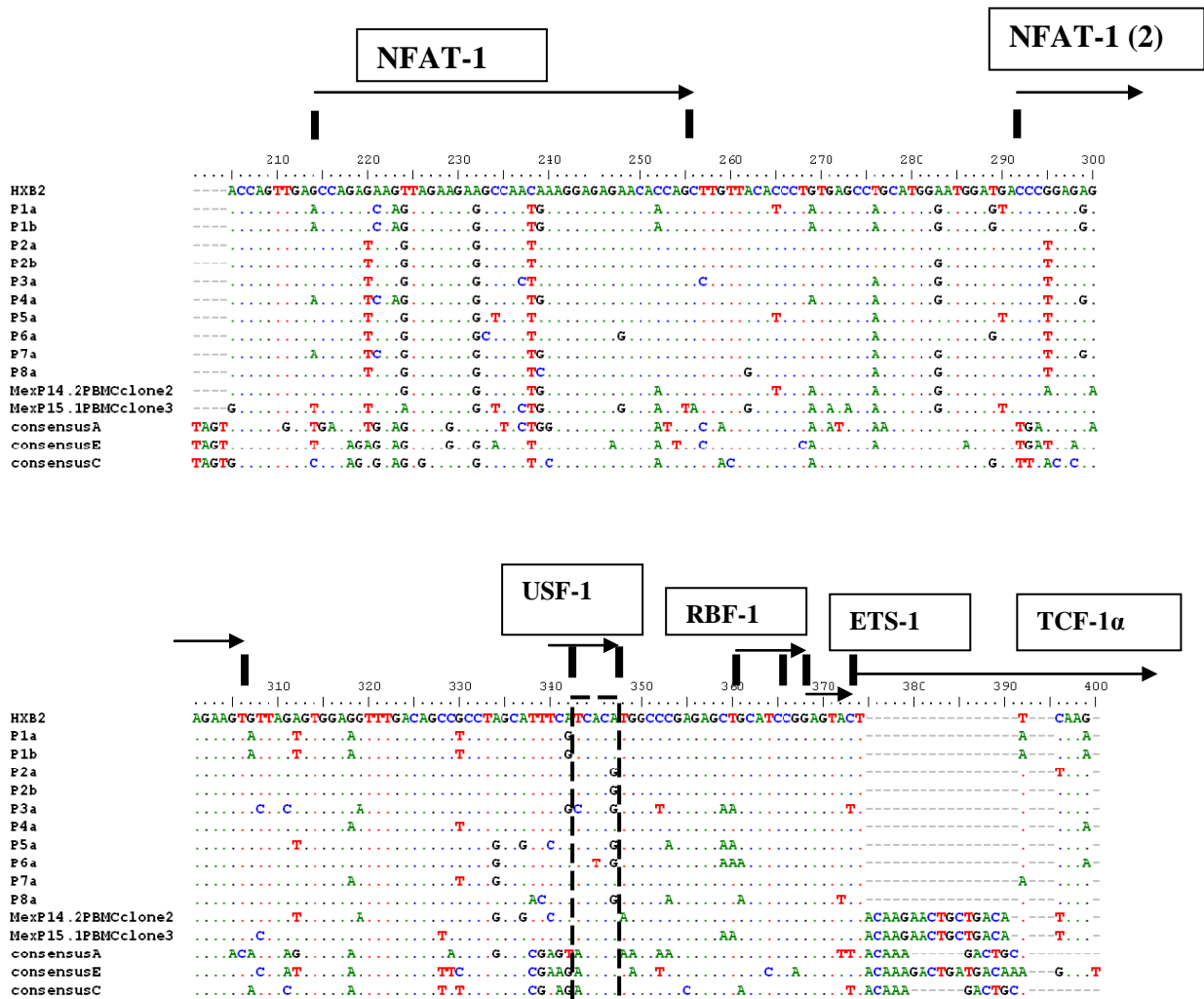
Fig 15. Detección de RNA mensajeros virales en las muestras de los niños en estudio. Carril 1; Marcador de Peso Molecular (100 pb), carril 2; IIIBMolt, carril 3; P1a, carril 4; P1b, carril 5; P2a, carril 6 P2b, carril 7; P3a, carril 8; P3b, carril 9; P4a, carril 10; IIIBMolt, carril 11; P5, carril 12; P7a, carril 13; P7b, carril 14; P8, carril 15; niño infectado (INF), carril 16; adulto expuesto (AEXP), carril 17 y 18; adultos infectados con el VIH-1. Como control de calidad del RNA se amplificó el gen constitutivo GAPDH.

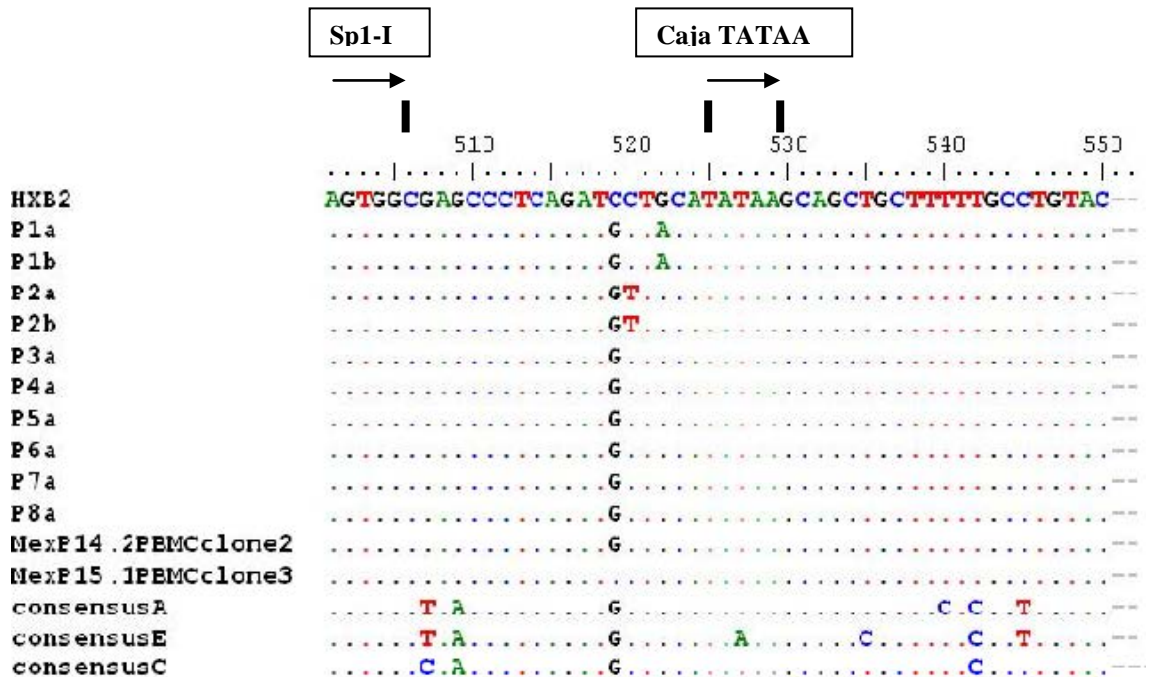
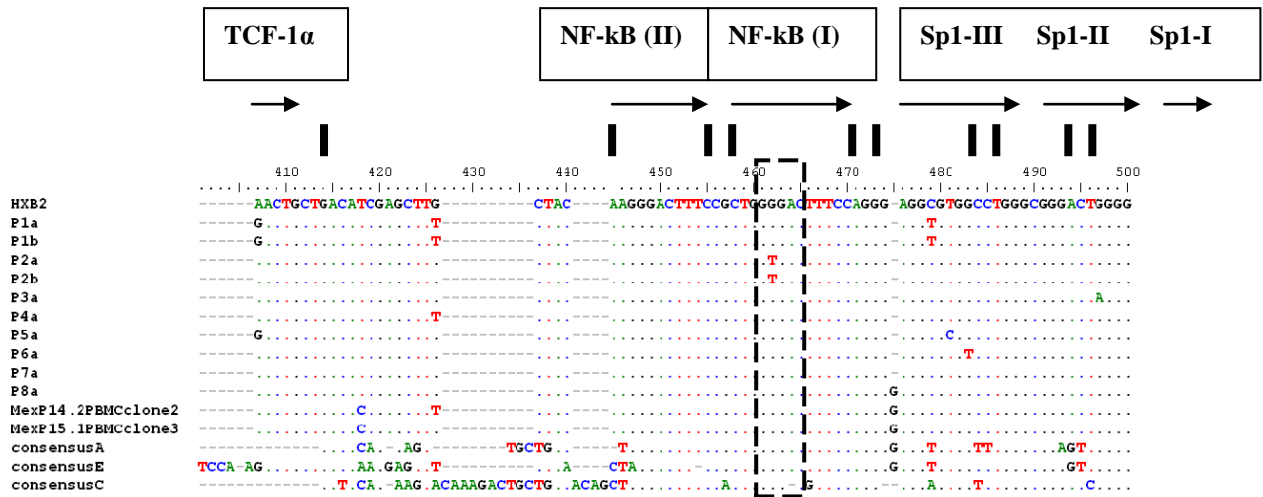
Secuencias de la región *nef*/LTR

Para conocer si existían mutaciones, deleciones o inserciones que afectarían la transcripción viral en el DNA proviral detectado, analizamos la secuencia de la región reguladora *nef*/LTR. La región que abarca la región *nef*/LTR fue amplificada por un PCR anidado y el Amplicón se visualizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Todas las muestras de los niños dieron un producto de PCR de aproximadamente 500 pares de bases. El tamaño del producto fue similar entre todas las

muestras y con respecto al del control IIIBLAV, indicándonos que no se presentaban deleciones o inserciones que pudieran ser detectadas mediante su separación en geles de agarosa.

Se obtuvo la secuencia de la región reguladora *nef*/LTR en el DNA proviral de las células de los niños y se compararon con la del virus prototipo HXB2 (Figura 16).





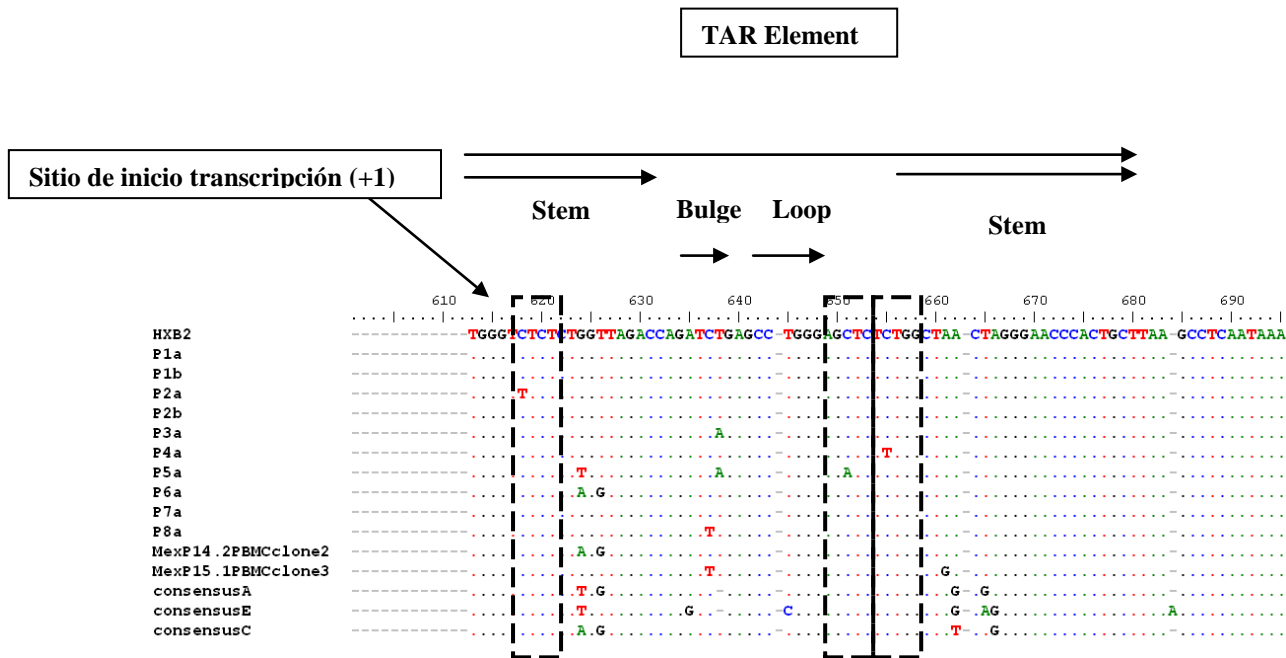


FIG. 16. Secuencias nucleotídicas de LTR alineadas con el virus de referencia HXB2. Las secuencias son indicadas por la clave del paciente y la muestra secuencial. Secuencias de pacientes mexicanos y de consensos A, E y C también son incluidos en el análisis. Las rayas indican identidad con el virus de referencia, mientras que los puntos indican gaps con el fin de preservar la alineación. Los sitios de unión a factores de transcripción y los elementos de TAR se indican con flechas. Las mutaciones no reportadas encontradas se indican en cuadros con líneas discontinuas.

Las secuencias nucleotídicas entre -295 a -121 presenta una identidad del 96%. Mientras que las secuencias entre -120 a +80 presentaron 98% de identidad. Estos resultados concuerdan con datos reportados en virus de otros niños y adultos infectados con el VIH-1^{114,115}.

Todas las secuencias obtenidas muestran mutaciones puntuales, las cuales se encuentran principalmente en la región de traslape con el gen *nef* (-295 a -121). Las mutaciones encontradas en los sitios de unión a los factores de transcripción como el factor nuclear de células T activadas (NFAT-1 y 2) y al factor de células T 1 α (TCF-1 α) han sido reportadas en otros pacientes infectados con el VIH-1¹¹⁶. Los sitios de unión al factor de enlace de respuesta Ras (RBF-1) y de eritroblastoma 26 (Ets-1) se conservaron 100%. En cambio la mutación encontrada en el sitio de enlace del factor estimulador (USF-1) en el niño P6 no ha sido reportada.

La otra región es una secuencia no traducida (-120 a +80). La mutación encontrada en el sitio de

unión al factor SP-1(3) en esta región también ha sido reportada. Sin embargo las mutaciones en el sitio de unión del factor nuclear (NF-kB-1) en el niño P2 y en el sitio de enlace de la proteína Tat (TAR) en los niños P2, P4 y P5 no han sido descritas. Cabe señalar que las mutaciones encontradas en TAR se ubican en la secuencia denominada tallo (stem) que es una región importante en la estructura secundaria de TAR, estas mutaciones aún no se han reportado en otros aislados virales. Las mutaciones encontradas en la región bulge en los niños P3, P5 y P8 han sido descritas en otros aislados virales Gomez 2000, Dossier DE 1991. Estos cambios modifican la estructura secundaria de TAR, sin embargo la importancia in vivo de estas mutaciones aún se desconoce. Por otro lado los sitios de unión a los factores NF-kB-2, SP-1(1), SP-1(2) así como de la caja TATA permanecieron sin cambios.

Relación filogenética de las secuencias *nef*/LTR.

La secuencias de la región reguladora *nef*/LTR del VIH amplificadas en las muestras de los niños fueron alineadas empleando el programa Clustal X. En esta alineación se incluyeron secuencias de virus prototipo y de aislados de pacientes principalmente del continente americano del VIH-1 subtipo B, así como secuencias consenso del subtipo A, C y E. Con esta alineación se desarrollo un análisis filogenético empleando el método de distancias Neighbor Joining en el programa MEGA2 versión 3.1. El árbol filogenético creado indica que el DNA del VIH detectado en los niños son virus del subtipo B (fig 17). Las dos secuencias del niño P1 (P1a y P1b) se agruparon en una misma rama junto con una secuencia proveniente de Estados Unidos. La secuencia del niño P3 (P3a) se agrupó con otras secuencias mexicanas reportadas en GeneBank. Las secuencias del niño P2 (P2a y P2b) se localizaron en una rama junto con las secuencias de los demás niños en estudio. En los casos en que se secuenciaron dos muestras diferentes de un mismo niño (P1 y P2) se observa que P1a y P1b se agrupan en un mismo cluster, igual que P2a y P2b, datos que apoyan los hallazgos de detección del VIH en estos niños.

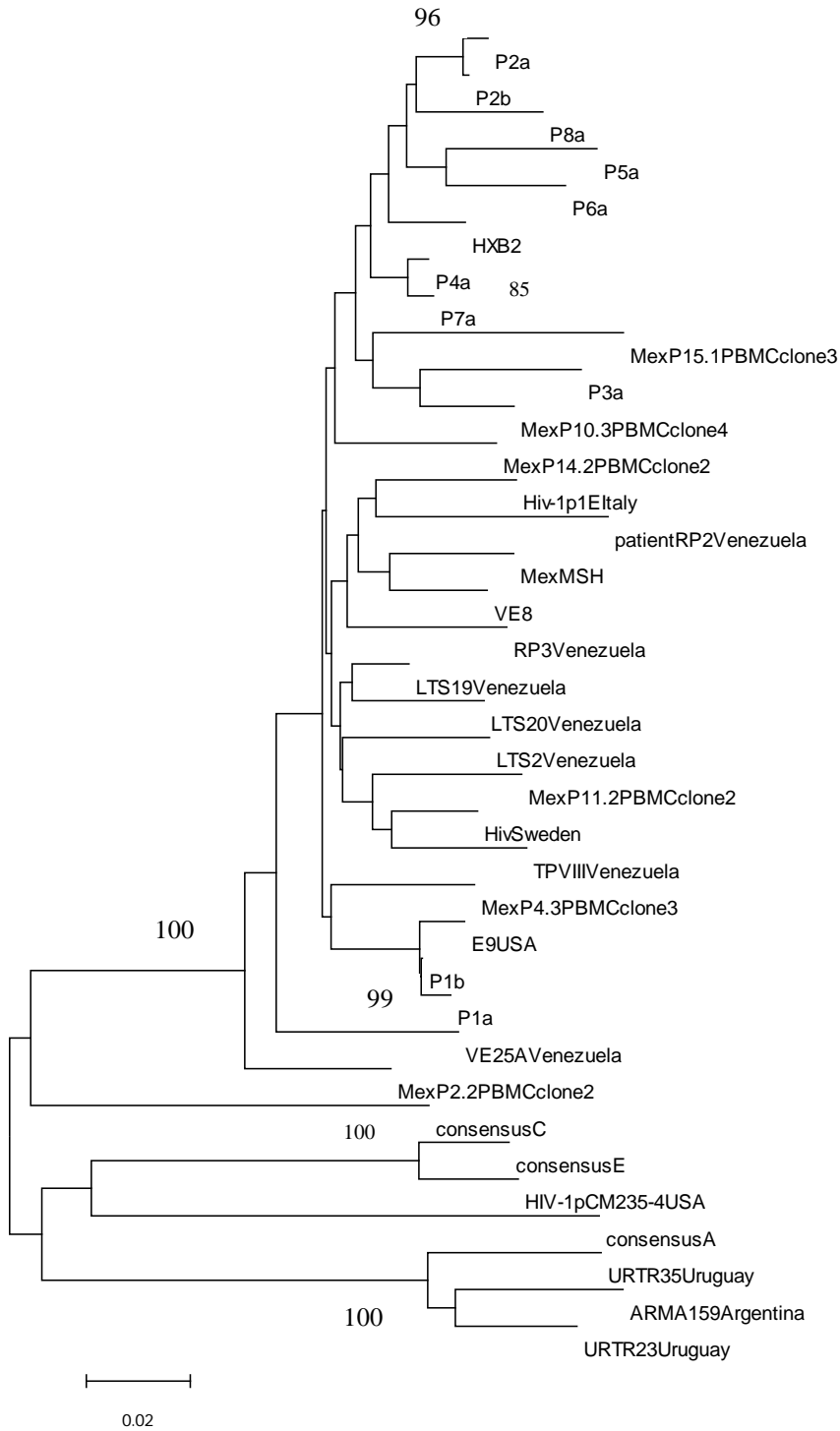


Fig. 17. Relación filogenética de las secuencias de *nef*/LTR de los niños expuestos seronegativos. Un árbol filogenético fue realizado empleando el método de distancia neighbor-joining. Se indican en las ramas los valores de bootstrap mayores a 70. El método para estimar las distancias genéticas fué Kimura 2-parametros. El nombre del paciente o asilado viral se indica en la rama correspondiente. Se incluyeron secuencias de aislados mexicanos, otros aislados subtipo B, así como secuencias consenso A, B (HXB2), C y E <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Discusión

Existen diversos reportes de niños y adultos los cuales permanecen seronegativos a pesar de tener posibles exposiciones al VIH-1¹¹⁷⁻¹²⁰. Este trabajo describe la presencia de DNA en las CMSP de 8 ocho niños con este tipo de exposiciones. Estos niños nacieron de madres infectadas por el VIH-1, no presentan síntomas clínicos de infección, ni respuesta de anticuerpos contra el virus, sin embargo se detectó DNA de VIH-1 en sus células.

La presencia de DNA viral fue confirmada por medio de amplificación de tres diferentes fragmentos con secuencias conservadas del virus que se localizan una en la región promotora del virus (*nef*LTR) y dos en el gen *gag*. Adicionalmente se realizó el análisis de aproximadamente 400 pares de bases de la secuencia *nef*LTR de cada uno de los niños y en dos casos (P1 y P2) dos diferentes muestras en diferentes tiempos. La alineación de las secuencias mostró cambios puntuales, principalmente en la región del gen *nef* en todas las secuencias de los niños. Estos cambios los hacen distinguibles y únicos con respecto a los aislados de los otros niños, de otros aislados mexicanos y del virus de referencia que se emplea en el laboratorio como control.

La secuencia *nef*LTR analizada es de 400 pb y es una región de las más conservadas del VIH, sin embargo existen diversos reportes que indican que es suficiente esta información para realizar estudios filogenéticos y estudios para rastrear posibles infecciones y transmisión^{121,122}.

Debido a esto nosotros realizamos el análisis filogenético con estas secuencias en donde se incluyeron secuencias de aislados mexicanos y de otros aislados subtipo B. El árbol resultante mostró que las secuencias de los niños pertenecían al subtipo B, que se agrupaban con las secuencias de otros aislados mexicanos y algo muy importante las dos secuencias de los niños P1 y P2 se agruparon cada par en una misma rama.

Una vez que se confirmó la presencia de DNA viral, el siguiente objetivo fue saber si se encontraba

de forma integrada o de forma episomal. Encontramos que en todos los niños el DNA estaba integrado y no se encontraron formas de DNA de 2-LTR episomales. En el aspecto del estado transcripcional del DNA proviral no logramos confirmar RNA mensajeros, estos resultados nos indican que el DNA proviral encontrado se encuentra inactivo transcripcionalmente. Hasta el momento en ninguno de los estudios publicados se había reportado el estado de integración del DNA de VIH detectado, ni el estado de expresión de los RNAm virales.

Esta forma de DNA integrada, transcripcionalmente inactiva se ha reportado en diversos estados de latencia in vivo e in vitro¹²³. Dichos estudios muestran que las células en latencia son linfocitos T CD4+ que presentan el marcador de memoria CD45RO y no presentan los marcadores de activación como CD69, CD25 y HLA-DR. Estas células se han denominado LT CD4+ de memoria en reposo⁹¹. Se ha estimado que el tiempo de vida media de las células de memoria en reposo con DNA proviral de VIH es de 45 meses¹²⁴. Estudios realizados con individuos infectados con el VIH-1 y que están sometidos a tratamiento antiretroviral eficiente (con carga viral en plasma indetectable) durante 2.5 años revelan que puede ser recuperado virus competente para la replicación en células de memoria en reposo^{125,126}. Por lo tanto estas células pueden representar un reservorio latente de VIH competente para la replicación. La frecuencia de los LT CD4+ de memoria en reposo con VIH puede ser tan baja como 0.05% y el total de estas células con DNA integrado es de 10^7 ¹²⁷. La detección persistente de DNA integrado en muestras secuenciales de niños entre 16 y 24 meses de edad realizada en nuestro estudio podría ser posible si las células que tuvieran el DNA viral fueran células de tiempo de vida larga de forma similar a las células de memoria en reposo. Otra característica de los LT CD4+ en reposo es que presentan una ineficiente o ausencia total de la transcripción. Esto se debe a falta de factores de transcripción como NFAT o NF- κ B¹²⁸, o a falla en la elongación transcripcional debido a la ausencia de factores celulares como ciclina T1 o CDK9 que interactúan con la proteína transactivadora TAT^{129,130}. En los LT CD4+ en reposo que se lleva a cabo la

transcripción viral, la mayor parte de RNAm reportados son multiprocesados, los cuales codifican para proteínas reguladoras y accesorias como TAT, NEF y REV. Además hay baja producción de RNAm sin procesamiento o con procesamiento sencillo, esto es debido a que presentan falla en la exportación de estos RNAm por una baja concentración de la proteína REV¹³¹. En nuestro estudio no fue posible confirmar la presencia de RNAm virales, ya que en los casos en que se amplificaron RNAm multiprocesados, no fueron reconocidos por la sonda específica que empleamos en el ensayo de Southerblot. Nuestros resultados nos indican que el DNA viral encontrado en estos niños está de forma integrada y no presenta actividad transcripcional, de forma similar como sucede en las células de memoria en reposo.

Debido a que en ningún niño se observó expresión de RNAm virales, se analizó la secuencia de la región promotora *nef*/LTR. En esta región buscamos cambios en las secuencias de unión a factores de transcripción. Solo se observaron mutaciones puntuales en los factores de transcripción USF-1 y NF-kB que no se han reportado anteriormente, sin embargo la importancia a nivel transcripcional queda aún por demostrarse. También se encontraron dos mutaciones en la secuencia TAR en la estructura denominada tallo (stem) las cuales aún no se han reportado. Otras mutaciones como las encontradas en la región bulge han sido descritas en otros aislados virales^{132,133}. De igual forma es necesario realizar ensayos funcionales para conocer las implicaciones de estas mutaciones en la función transactivadora de TAR.

Los resultados de este estudio sugieren que posiblemente las células con DNA viral detectadas se encuentren en latencia y por lo tanto no permitan la replicación viral y el establecimiento de la infección. Sin embargo no contamos con la cantidad de células suficientes para aislar LT CD4+ de memoria y por lo tanto no logramos saber con exactitud que tipo de células eran las que tenían DNA viral y de esta forma confirmar esta hipótesis. Posiblemente otros factores virales, celulares e inmunológicos estén involucrados en conjunto en este tipo de infecciones. La presencia de

mutaciones en genes reguladores y accesorios puede ser un posible factor a determinar. Investigaciones recientes han mostrado que el sitio de integración del VIH es importante para su expresión. También posibles cambios en la cromatina y modificaciones epigenéticas pueden estar involucradas en la inactivación transcripcional¹³⁴. La respuesta inmunológica de LT CD4 linfoproliferativa, así como una respuesta citotóxica y no citotóxica de los LT CD8+ pueden impedir el establecimiento de la infección¹³⁵.

A pesar de las evidencias presentadas en este trabajo, existe un estudio que sugiere que este tipo de infecciones son raras y que son debidas a contaminación en el proceso de la amplificación por PCR. En dicho estudio se analizaron y compararon secuencias de env de virus aislados de niños con infecciones silenciosas con secuencias de aislados virales de sus madres pero no se relacionaron filogenéticamente¹³⁶

Nuestros datos refutan lo anterior, apoyando y confirmando la detección de DNA de VIH en niños nacidos de madres infectadas. Sin embargo aún queda por dilucidar que células están infectadas y que mecanismos están involucrados en el no establecimiento de la infección. Por último nuestros datos sugieren una revisión extensa de las metodologías moleculares y serológicas en el diagnóstico de la infección por el VIH en niños nacidos de madres infectadas. De acuerdo a esto se hace necesario realizar pruebas como la de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), detectar casos como los reportados y darles un adecuado seguimiento.

Bibliografía

1. UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update: December 2006. UNAIDS/WHO. 2006.
Ref Type: Electronic Citation

2. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *Centers for Disease Control & MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **3**, (1981).
3. Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
4. Gallo, R.C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867 (1983).
5. UNAIDS. Global Estimates of HIV/AIDS Epidemic as of End 2005. UNAIDS. 2005.

Ref Type: Electronic Citation

6. Centro Nacional para la prevención y el control del VIH/SIDA. El SIDA en cifras 2006, El SIDA en el mundo, América Latina y el Caribe. 2006.

Ref Type: Internet Communication

7. Bryant, M. & Ratner, L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 523-527 (1990).
8. Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G. & Haseltine, W.A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 5781-5785 (1989).
9. Galloway, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F. & Trono, D. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**, 569-576 (1995).
10. Franke, E.K., Yuan, H.E. & Luban, J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**, 359-362 (1994).
11. Thali, M. *et al.* Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**, 363-365 (1994).
12. Harrison, G.P. & Lever, A.M. The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol.* **66**, 4144-4153 (1992).

13. Lapadat-Tapolsky, M. *et al.* Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic Acids Res.* **21**, 831-839 (1993).
14. Paxton, W., Connor, R.I. & Landau, N.R. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol.* **67**, 7229-7237 (1993).
15. Parkin, N.T., Chamorro, M. & Varmus, H.E. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol.* **66**, 5147-5151 (1992).
16. Ashorn, P. *et al.* An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 7472-7476 (1990).
17. Smerdon, S.J. *et al.* Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 3911-3915 (1994).
18. Bushman, F.D. & Craigie, R. Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 1339-1343 (1991).
19. Capon, D.J. & Ward, R.H. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 649-678 (1991).
20. Landau, N.R., Warton, M. & Littman, D.R. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* **334**, 159-162 (1988).
21. Hwang, S.S., Boyle, T.J., Lyster, H.K. & Cullen, B.R. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71-74 (1991).
22. Alkhatib, G. *et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958 (1996).
23. Goudsmit, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 4478-4482 (1988).
24. Camerini, D. & Seed, B. A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* **60**, 747-754 (1990).
25. Ruben, S. *et al.* Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* **63**, 1-8 (1989).

26. Feng,S. & Holland,E.C. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* **334**, 165-167 (1988).
27. Zhu,Y. *et al.* Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* **11**, 2622-2632 (1997).
28. Wei,P., Garber,M.E., Fang,S.M., Fischer,W.H. & Jones,K.A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**, 451-462 (1998).
29. Malim,M.H., Hauber,J., Le,S.Y., Maizel,J.V. & Cullen,B.R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-257 (1989).
30. Giver,L., Bartel,D.P., Zapp,M.L., Green,M.R. & Ellington,A.D. Selection and design of high-affinity RNA ligands for HIV-1 Rev. *Gene* **137**, 19-24 (1993).
31. Zapp,M.L., Hope,T.J., Parslow,T.G. & Green,M.R. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 7734-7738 (1991).
32. Fischer,U., Huber,J., Boelens,W.C., Mattaj,I.W. & Luhrmann,R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-483 (1995).
33. Schwartz,O., Marechal,V., Danos,O. & Heard,J.M. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol.* **69**, 4053-4059 (1995).
34. Heinzinger,N.K. *et al.* The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 7311-7315 (1994).
35. Schwartz,S., Felber,B.K., Fenyo,E.M. & Pavlakis,G.N. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol.* **64**, 5448-5456 (1990).
36. Klimkait,T., Strebel,K., Hoggan,M.D., Martin,M.A. & Orenstein,J.M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol.* **64**, 621-629 (1990).
37. Sheehy,A.M., Gaddis,N.C., Choi,J.D. & Malim,M.H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650 (2002).

38. Kwong,P.D. *et al.* Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-659 (1998).
39. Scarlatti,G. *et al.* In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* **3**, 1259-1265 (1997).
40. Sterjovski,J., Churchill,M.J., Wesselingh,S.L. & Gorry,P.R. HIV-1 entry inhibitors: classes, applications and factors affecting potency. *Curr. HIV. Res.* **4**, 387-400 (2006).
41. Kozak,S.L., Heard,J.M. & Kabat,D. Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol.* **76**, 1802-1815 (2002).
42. Kozak,S.L., Heard,J.M. & Kabat,D. Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol.* **76**, 1802-1815 (2002).
43. Cartier,C. *et al.* Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol. Chem.* **274**, 19434-19440 (1999).
44. Bukrinskaya,A., Brichacek,B., Mann,A. & Stevenson,M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp. Med.* **188**, 2113-2125 (1998).
45. Miller,M.D., Farnet,C.M. & Bushman,F.D. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol.* **71**, 5382-5390 (1997).
46. Zennou,V. *et al.* HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185 (2000).
47. Sherman,M.P., de Noronha,C.M., Heusch,M.I., Greene,S. & Greene,W.C. Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol.* **75**, 1522-1532 (2001).
48. Chen,H. & Engelman,A. The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 15270-15274 (1998).
49. Miller,M.D., Farnet,C.M. & Bushman,F.D. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol.* **71**, 5382-5390 (1997).
50. Wu,Y. & Marsh,J.W. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**, 1503-1506 (2001).

51. Adams,M. *et al.* Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 3862-3866 (1994).
52. Jones,K.A. & Peterlin,B.M. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 717-743 (1994).
53. Barboric,M., Nissen,R.M., Kanazawa,S., Jabrane-Ferrat,N. & Peterlin,B.M. NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **8**, 327-337 (2001).
54. Kao,S.Y., Calman,A.F., Luciw,P.A. & Peterlin,B.M. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**, 489-493 (1987).
55. Wei,P., Garber,M.E., Fang,S.M., Fischer,W.H. & Jones,K.A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**, 451-462 (1998).
56. Schwartz,S., Felber,B.K., Benko,D.M., Fenyó,E.M. & Pavlakis,G.N. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **64**, 2519-2529 (1990).
57. Powell,D.M., Amaral,M.C., Wu,J.Y., Maniatis,T. & Greene,W.C. HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 973-978 (1997).
58. Malim,M.H., Hauber,J., Le,S.Y., Maizel,J.V. & Cullen,B.R. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-257 (1989).
59. Cullen,B.R. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249**, 203-210 (1998).
60. Wilk,T. *et al.* Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **75**, 759-771 (2001).
61. Gottlinger,H.G., Sodroski,J.G. & Haseltine,W.A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 5781-5785 (1989).
62. Ono,A. & Freed,E.O. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13925-13930 (2001).

63. Quinn,T.C. *et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N. Engl. J Med.* **342**, 921-929 (2000).
 64. Baggaley,R.F., Boily,M.C., White,R.G. & Alary,M. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* **20**, 805-812 (2006).
 65. Baggaley,R.F., Boily,M.C., White,R.G. & Alary,M. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* **20**, 805-812 (2006).
 66. Scarlatti,G. Paediatric HIV infection. *Lancet* **348**, 863-868 (1996).
 67. Scarlatti,G. Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries. *AIDS Rev.* **6**, 67-78 (2004).
 68. Lyles,R.H. *et al.* Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect. Dis.* **181**, 872-880 (2000).
 69. Gurtler,L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* **348**, 176-179 (1996).
 70. UNAIDS 1997. HIV testing methods. UNAIDS Technical Update (UNAIDS Best Practice Collection Technical Update) . 2007.
- Ref Type: Electronic Citation
71. Centers for Disease Control and Prevention. Interpretation and Use of the Western-Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. *MMWR* **38**, 1-7 (1989).
 72. Gurtler,L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* **348**, 176-179 (1996).
 73. Newell,M.L. *et al.* Use of polymerase chain reaction and quantitative antibody tests in children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *J Med. Virol.* **47**, 330-335 (1995).
 74. Berger,A., Braner,J., Doerr,H.W. & Weber,B. Quantification of viral load: clinical relevance for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Intervirology* **41**, 24-34 (1998).
 75. Scarlatti,G. *et al.* Polymerase chain reaction, virus isolation and antigen assay in HIV-1-antibody-positive mothers and their children. *AIDS* **5**, 1173-1178 (1991).
 76. Newell,M.L. *et al.* Use of polymerase chain reaction and quantitative antibody tests in children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *J Med. Virol.* **47**, 330-335 (1995).

77. Scarlatti,G. *et al.* Polymerase chain reaction, virus isolation and antigen assay in HIV-1-antibody-positive mothers and their children. *AIDS* **5**, 1173-1178 (1991).
78. Rowland-Jones,S.L. & McMichael,A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 448-455 (1995).
79. Rowland-Jones,S.L. & McMichael,A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 448-455 (1995).
80. Clerici,M. *et al.* Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J Infect. Dis.* **165**, 1012-1019 (1992).
81. Beretta,A. *et al.* HIV-1-specific immunity in persistently seronegative individuals at high risk for HIV infection. *Immunol. Lett.* **51**, 39-43 (1996).
82. Rowland-Jones,S.L. & McMichael,A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 448-455 (1995).
83. Imagawa,D. & Detels,R. HIV-1 in seronegative homosexual men. *N. Engl. J Med.* **325**, 1250-1251 (1991).
84. Roques,P.A. *et al.* Clearance of HIV infection in 12 perinatally infected children: clinical, virological and immunological data. *AIDS* **9**, F19-F26 (1995).
85. Newell,M.L. *et al.* Detection of virus in vertically exposed HIV-antibody-negative children. *Lancet* **347**, 213-215 (1996).
86. Roques,P.A. *et al.* Clearance of HIV infection in 12 perinatally infected children: clinical, virological and immunological data. *AIDS* **9**, F19-F26 (1995).
87. Newell,M.L. *et al.* Detection of virus in vertically exposed HIV-antibody-negative children. *Lancet* **347**, 213-215 (1996).
88. Zhu,T. *et al.* Persistence of extraordinarily low levels of genetically homogeneous human immunodeficiency virus type 1 in exposed seronegative individuals. *J Virol.* **77**, 6108-6116 (2003).
89. Koning,F.A., van der Vorst,T.J. & Schuitemaker,H. Low levels of human immunodeficiency virus type 1 DNA in high-risk seronegative men. *J Virol.* **79**, 6551-6553 (2005).
90. Chun,T.W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188 (1997).

91. Siliciano,R.F. Latency and reservoirs for HIV-1. *AIDS* **13 Suppl A**, S49-S58 (1999).
92. Blankson,J., Persaud,D. & Siliciano,R.F. Latent reservoirs for HIV-1. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **12**, 5-11 (1999).
93. Pomerantz,R.J., Trono,D., Feinberg,M.B. & Baltimore,D. Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell* **61**, 1271-1276 (1990).
94. Seshamma,T., Bagasra,O., Trono,D., Baltimore,D. & Pomerantz,R.J. Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10663-10667 (1992).
95. Chun,T.W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188 (1997).
96. Chun,T.W. *et al.* In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat. Med.* **1**, 1284-1290 (1995).
97. Adams,M., Wong,C., Wang,D. & Romeo,J. Limitation of Tat-associated transcriptional processivity in HIV-infected PBMC. *Virology* **257**, 397-405 (1999).
98. Seshamma,T., Bagasra,O., Trono,D., Baltimore,D. & Pomerantz,R.J. Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 10663-10667 (1992).
99. Pomerantz,R.J., Seshamma,T. & Trono,D. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J Virol.* **66**, 1809-1813 (1992).
100. Siliciano,J.D. & Siliciano,R.F. Latency and viral persistence in HIV-1 infection. *J Clin. Invest* **106**, 823-825 (2000).
101. Hermankova,M. *et al.* Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Virol.* **77**, 7383-7392 (2003).
102. Jordan,A., Defechereux,P. & Verdin,E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J* **20**, 1726-1738 (2001).
103. Lassen,K., Han,Y., Zhou,Y., Siliciano,J. & Siliciano,R.F. The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med.* **10**, 525-531 (2004).

104. Lassen,K.G., Bailey,J.R. & Siliciano,R.F. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol.* **78**, 9105-9114 (2004).
105. Vazquez Perez,J.A., Basualdo Sigales,M.C., Reyes-Teran,G., Gudino Rosales,J.C. & Soler,C.C. Human Immunodeficiency Virus type 1 in seronegative infants born to HIV-1-infected mothers. *Virol. J* **3**, 52 (2006).
106. Dirección General de Epidemiología. anuarios de morbilidad 2007. Secretaría de Salud . 2007.

Ref Type: Electronic Citation

107. Travers,K.&K.P.J. Techniques in HIV Research. Aldovini A,W.B. (ed.), pp. 3-14 (Stockton Press, New York,1990).
108. Wu,Y. & Marsh,J.W. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**, 1503-1506 (2001).
109. Bukrinsky,M.I., Stanwick,T.L., Dempsey,M.P. & Stevenson,M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* **254**, 423-427 (1991).
110. Wu,Y. & Marsh,J.W. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**, 1503-1506 (2001).
111. Schwartz,S., Felber,B.K., Benko,D.M., Fenyo,E.M. & Pavlakis,G.N. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **64**, 2519-2529 (1990).
112. Pomerantz,R.J., Trono,D., Feinberg,M.B. & Baltimore,D. Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell* **61**, 1271-1276 (1990).
113. Schwartz,S., Felber,B.K., Benko,D.M., Fenyo,E.M. & Pavlakis,G.N. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **64**, 2519-2529 (1990).
114. Blackard,J.T. *et al.* Diversity of the HIV-1 long terminal repeat following mother-to-child transmission. *Virology* **274**, 402-411 (2000).
115. Rousseau,C., Abrams,E., Lee,M., Urbano,R. & King,M.C. Long terminal repeat and nef gene variants of human immunodeficiency virus type 1 in perinatally infected long-term survivors and rapid progressors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**, 1611-1623 (1997).
116. Los Alamos National Laboratory. **HIV Sequence Compendium 2005**. (2005).

117. Imagawa,D. & Detels,R. HIV-1 in seronegative homosexual men. *N. Engl. J Med.* **325**, 1250-1251 (1991).
118. Beretta,A. *et al.* HIV-1-specific immunity in persistently seronegative individuals at high risk for HIV infection. *Immunol. Lett.* **51**, 39-43 (1996).
119. Newell,M.L. *et al.* Detection of virus in vertically exposed HIV-antibody-negative children. *Lancet* **347**, 213-215 (1996).
120. Roques,P.A. *et al.* Clearance of HIV infection in 12 perinatally infected children: clinical, virological and immunological data. *AIDS* **9**, F19-F26 (1995).
121. Churchill,M.J. *et al.* Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source. *J Virol.* **80**, 1047-1052 (2006).
122. Zhang,L. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of long terminal repeat sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* **71**, 5608-5613 (1997).
123. Chun,T.W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188 (1997).
124. Siliciano,J.D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* **9**, 727-728 (2003).
125. Siliciano,J.D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* **9**, 727-728 (2003).
126. Finzi,D. *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**, 512-517 (1999).
127. Chun,T.W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188 (1997).
128. Gaynor,R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* **6**, 347-363 (1992).
129. Adams,M., Wong,C., Wang,D. & Romeo,J. Limitation of Tat-associated transcriptional processivity in HIV-infected PBMC. *Virology* **257**, 397-405 (1999).
130. Wei,P., Garber,M.E., Fang,S.M., Fischer,W.H. & Jones,K.A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**, 451-462 (1998).

131. Pomerantz,R.J., Seshamma,T. & Trono,D. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J Virol.* **66**, 1809-1813 (1992).
132. Mosier,D.E. Viral pathogenesis in hu-PBL-SCID mice. *Semin. Immunol.* **8**, 255-262 (1996).
133. Gomez-Roman,V.R. *et al.* nef/long terminal repeat quasispecies from HIV type 1-infected Mexican patients with different progression patterns and their pathogenesis in hu-PBL-SCID mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 441-452 (2000).
134. Jordan,A., Bisgrove,D. & Verdin,E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* **22**, 1868-1877 (2003).
135. Clerici,M. *et al.* Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J Infect. Dis.* **165**, 1012-1019 (1992).
136. Frenkel,L.M. *et al.* Genetic evaluation of suspected cases of transient HIV-1 infection of infants. *Science* **280**, 1073-1077 (1998).

Research

Open Access

Human Immunodeficiency Virus type I in seronegative infants born to HIV-1-infected mothers

Vázquez Pérez JA^{1,2,4}, Basualdo Sigales MC^{1,4}, Reyes-Terán G²,
Gudiño Rosales JC³ and Soler Claudín C*^{1,4}

Address: ¹Unidad de Servicios Para Diagnóstico y Referencia en VIH, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM/Secretaría de Salud del DF, México D.F., ²Centro de Investigaciones en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, D.F. Calzada de Tlalpan 4502 Mexico D.F., ³Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud, México D.F. Carpio 470 Sto Tomás México D.F. and ⁴Benjamín Hill 24 Col Condesa, Miguel Hidalgo 06100 México D.F.

Email: Vázquez Pérez JA - joevazpe@prodigy.net.mx; Basualdo Sigales MC - mbasualdo@yahoo.com.mx; Reyes-Terán G - reyesteran@iner.gob.mx; Gudiño Rosales JC - gudiño_64@yahoo.com.mx; Soler Claudín C* - csoler@prodigy.net.mx

* Corresponding author

Published: 29 June 2006

Received: 10 February 2006

Virology Journal 2006, 3:52 doi:10.1186/1743-422X-3-52

Accepted: 29 June 2006

This article is available from: <http://www.virologyj.com/content/3/1/52>

© 2006 Pérez JA et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Some individuals repeatedly exposed to Human Immunodeficiency Virus do not seroconvert and are resistant to HIV infection. Here, in a pediatric cohort of HIV seronegative infants born of HIV-infected mothers, we have studied eight non-breastfed children in whom viral DNA was detected in their PBMC. Our objective was to assess whether silent infection in these children can be explained by the presence of integrated viral DNA.

Methods: The presence of viral DNA was corroborated by nested PCR with primers for *gag* and the *nef/LTR* regions of HIV-1. Integration of HIV DNA into the host genome was assessed by an Alu-LTR PCR. Amplicons were sequenced and phylogenetic analyzes were done.

Results: HIV-1 DNA was detected in the earliest available PBMC sample from all eight infants, and two of them tested positive for HIV DNA at 2 years of age. Nested PCR resulted in the amplification of *gag*, *nef/LTR* and Alu-LTR fragments, which demonstrated that HIV-1 DNA was integrated in the host cell genome. Each individual has a characteristic sequence pattern and is different from the LTR sequence of HXB2 prototype virus and other Mexican isolates.

Conclusion: HIV-1 DNA was observed in PBMC from HIV exposed seronegative children in this pediatric cohort.

Background

Several studies have shown that some individuals repeatedly exposed to Human Immunodeficiency Virus Type 1 or its antigens are resistant to HIV infection [1-6]. Despite multiple exposures to HIV, several of these resistant subjects have no detectable anti-HIV IgG antibodies in serum but instead present high anti-HIV CD4+ cell lymphopro-

liferative activity and strong CD8 cell mediated antiviral responses [1,2]. Other studies have described rare cases of HIV-1 exposed seronegative individuals (ES) in whom HIV DNA has been detected in peripheral blood cells by PCR. These exposed seronegative individuals include health care personnel with accidental percutaneous exposure to infected blood, sexual partners of known HIV-1-

infected persons and infants born to HIV-1-infected mothers [3-6]. In case of the pediatric infections some of these children appear to have eliminated virus-infected cells [3], others continue to harbor cells with viral DNA for prolonged periods of time [4]. These antibody-negative, HIV-1 DNA-positive children have also been called "silent pediatric infections".

In this study, we report silent pediatric infection in 8 children born from HIV-1-positive mothers. Viral DNA could be amplified from their PBMC but we observed no evidence of viral replication or anti-HIV IgG antibodies in serum.

Methods

To examine the potential presence of HIV DNA in seronegative children born to HIV-1-infected mothers of the Mexico City Reference and Diagnostic Unit HIV Pediatric

Cohort, we selected 8 children on the basis of repeatedly negative virus culture and a positive HIV DNA PCR result in our laboratory. The children did not show any HIV/AIDS related symptoms and had never received antiretroviral treatment. Blood plasma HIV-1 RNA concentration (viral load) was negative in any children samples. Stored blood samples from each child were studied at different ages (Table 1). The study received approval of the Committee for Human Subject Research (Ministry of Health of México).

To detect HIV-1 sequences in PBMC, two nested polymerase PCR amplifications were used (GAG and nef/LTR). The initial amplification of DNA was performed using GAG1-GAG2 (5'TCCACCTATCCCAGTAGGAG3' and 5'GGTCGTTGCCAAAGAGTGAT3') or LTR1-LTR2 primers [7]. An aliquot (5 µL) of first round PCR product was then used as a template in a second PCR reaction with GAG3-

Table 1: Detection of HIV-1 LTR and GAG fragments in PBMC from seronegative infants born to HIV-1 infected mothers and controls.

Subject	No. Sample	Age (Months)	HIV antibodies	PCR		Integrated DNA
				LTR	GAG	Alu-LTR
P1	a	14	Negative	+	+	+
	b	15	Negative	+	+	+
	c	22	Negative	+	+	+
P2	a	3	Negative	+	+	+
	b	6	Negative	+	+	+
	c	11	Negative	-	-	-
	d	22	Negative	-	-	-
P3	a	18	Negative	+	+	+
	b	21	Negative	+	+	+
	c	29	Negative	-	-	-
P4	a	15	Negative	+	+	+
P5	a	16	Negative	+	+	+
	b	24	Negative	+	+	+
P6	a	24	Negative	+	+	+
	b	55	Negative	-	-	-
P7	a	20	Negative	+	+	+
	b	24	Negative	-	-	-
	c	29	Negative	-	-	-
P8	a	11	Negative	+	+	+
	b	14	Negative	-	-	-
NI*	NA	NA	Negative	-	-	-
IIIB°	NA	NA	NA	+	+	+
PINF°	NA	NA	Positive	+	+	+

*PBMC of noninfected children (NI) were used as a negative control.

°IIIBMolt cells and PBMC of HIV infected children (PINF) were used as a positive control in each experiment.

GAG4 (5'TAAAAGATGGATAATCCTGGG and 5'GCCAAAGAGTGATCTGAGGG3') or LTR3-LTR4 primers [7]. Controls for contamination (DNA of seronegative children) and for sensitivity (10 HIV copies) was added in each experiment in order to exclude all non-sensitive experiments. Different rooms were used for DNA extraction, PCR-buffer preparation, amplification and electrophoresis. Amplicons were never transferred to the area reserved for unamplified sequences. Thus, we cannot attribute positive PCR results to contamination. To detect integrated HIV-1 DNA, 2 µg of DNA were subjected to amplification by Alu-LTR PCR [8], using the Alu primer and HIV-1 LTR primer LTR4. After Alu-LTR PCR, a second round of PCR was performed with an aliquot equivalent

to 1/10 of the PCR products using LTR specific primer pair LTR3-UIRH4 (Fig 1). To examine the LTR/nef region, PCR amplicons of the second round (LTR3-LTR4) were sequenced [7].

Phylogenetic relationships were determined using the MEGA2 versión 3.1 software package. A Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method and tree was bootstrapped with 100 replications. We used the Kimura two-parameter model to calculate sequence variation within the LTR sequences.

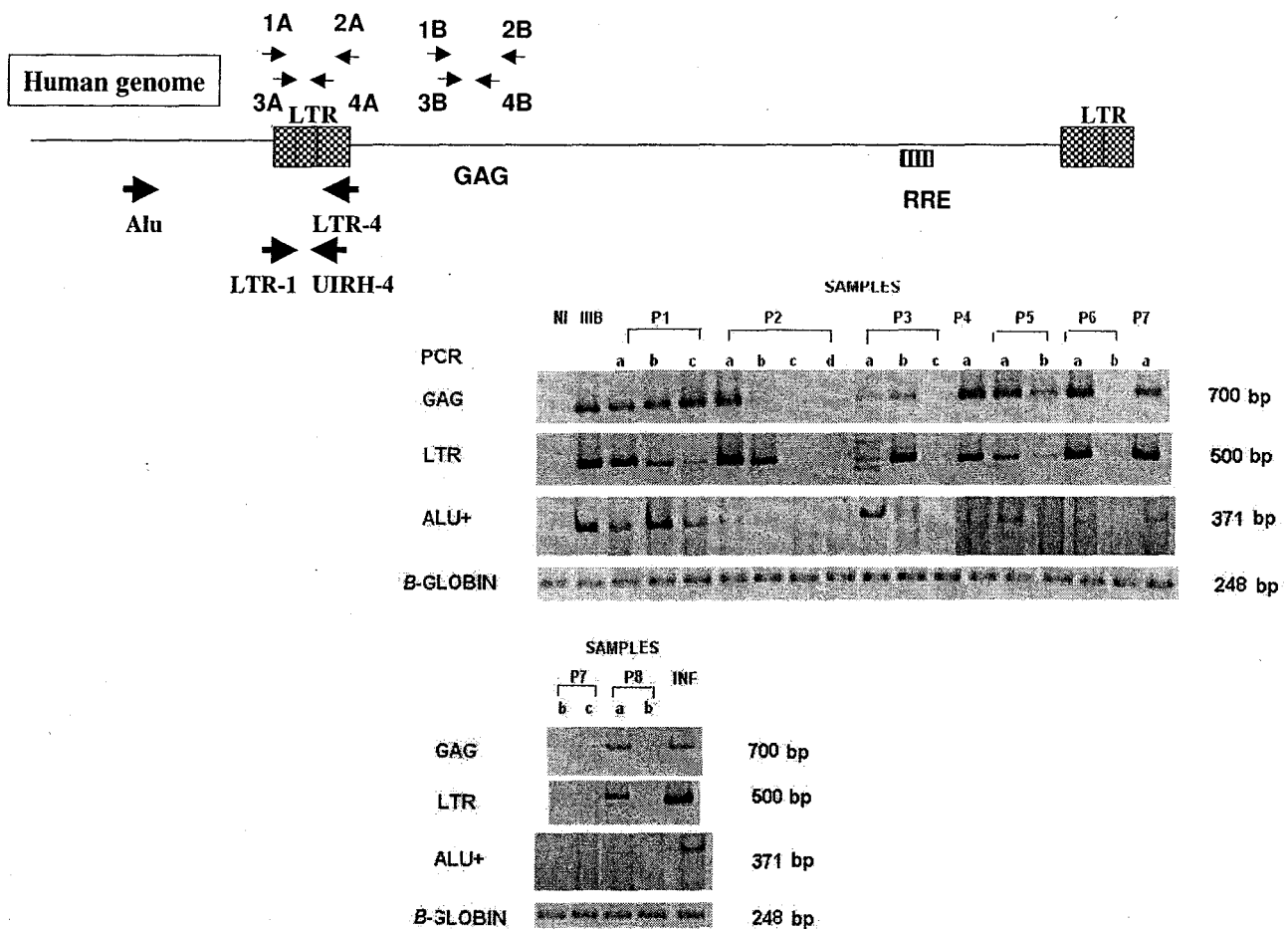


Figure 1
 Integrated HIV DNA in PBMC of Seronegative Children. (A) Schematic representation of PCR amplification of the HIV proviral genome. Primers used for detection of LTR (1A to 4A) and GAG (1B to 4B) fragments are indicated by small thin arrows. PCR amplifications (Alu/LTR-4) of existing Alu-HIV LTR junctions were subjected to a second round of PCR with HIV-1 LTR-specific primers LTR-1-UIRH-4 (thick arrows). (B) PCR amplifications from PBMC DNA of samples children: P1 (a-c), P2 (a-d), P3 (a-c), P4 (a), P5 (a-b), P6 (a-b), P7 (a-c) and P8 (a,b). IIIBMolt cells and PBMC of HIV infected children (PINF) were used as a positive control. PBMC of noninfected children (NI) were used as a negative control.

Results

Detection of HIV-1 DNA in exposed seronegative children
HIV-1 DNA was detected by the amplification of GAG and LTR fragments (Fig. 1). Based on these results, two groups of patients were observed: in the first group (children P1 and P5), persistent detection of both fragments (GAG and LTR) in sequential samples were detected; in the second group (children P2, P3, P4, P6, P7 and P8), in whom GAG and LTR fragments were detected in early samples, these viral genes were not detected in subsequent samples.

Integration of the HIV-1 genome detected in exposed seronegative children

All the PBMC samples with a positive gag and LTR fragment amplification also resulted in amplification of the Alu-LTR binding sequence (Fig. 1). These results confirmed the presence of HIV DNA and indicated that the viral DNA detected in the children was integrated into the host genome. Additionally total mRNA was extracted from PBMC and HIV-1 mRNA transcripts were amplified by reverse-transcriptase PCR (data not shown). The complete or unprocessed mRNA was not detected in any children samples.

nef/LTR sequences of eight children have a characteristic sequence pattern

The *nef*/LTR regulatory region sequence in the proviral DNA of the children's cells was obtained and compared to that of HXB2 prototype virus and consensus sequences of clades of A, C, and E. All sequences were shown by phylogeny to be more similar to the consensus of clade B (Fig 2). Each individual has a characteristic sequence pattern and is different from the LTR sequence of HXB2 prototype virus and other Mexican isolates [7]. Sequential analysis of *nef*/LTR sequences of samples of P1 and P2 children were done and Phylogenetic relationship were estimated. Sequences of sequential samples of P1 and P2 were grouped closely in the same cluster, supporting the closely relationship between these samples (fig 2). A variation of 4% was observed in the region overlapping the *nef* gene, between -295 and -121 bp. In contrast, the non-translated region, between -120 and +80 bp, presented a variation lower than 2%. These results are similar to data reported in other studies with AIDS patients [9].

Discussion

Cases of children who appear to have eliminated HIV infection are rare as most of them reported are due to contamination in the PCR processes. Moreover, these previous studies analyzed only *env* sequences of viruses isolated from children with apparent silent infections and their seropositive mothers, and no phylogenetic relation was found among the isolates [10]. In our study, the presence of the viral genome was confirmed by amplification of two different sequences in the conserved Gag/LTR

regions of the virus. Additionally, PCR contamination in our study is improbable since DNA extraction, first and second round amplification and separation of PCR products by electrophoresis were performed in different areas. Negative control of DNA of Non-Infected PBMC was included in every reaction and no amplification was shown (Fig 1).

It is also unlikely that cells from the mother were being a source of contamination. It has been shown that the passage of infectious agents or cells to the fetus is rather limited [11]. Even though there is some evidence that bidirectional traffic of cells, including leukocytes, may occur in human pregnancy [12], the frequency of such traffic determined was not consistent in previous studies [13]. Furthermore, in a mouse model the maternal cells were undetectable after 9 days postpartum [13]. In our case the earliest sample was taken at 3 month of age, and thus the presence of mother cells at this time in the children is improbable. Unfortunately It was not possible to analyze the sequence of the virus of the children's mothers in order to confirm relatedness. Nevertheless sequences of the *nef*/LTR region of the viruses analyzed showed HIV genetic diversity in our cohort among the children and with other Mexican virus isolates [7]. Additionally we demonstrate phylogenetic relationship between the sequential samples of two children P1 and P2. This agrees with the amplification of proviral DNA that comes from the subject, and makes less likely the possibility of contamination.

Conclusion

Our results indicate that the seronegative children studied here were exposed to HIV and had cells with proviral HIV. The particularly long period of time of detection of the viral genome suggests that proviral HIV can be present in cells with a very long half-life, probably in resting CD4+ T cells that keep HIV suppressed. Moreover we find no evidence of active or productive infection consistent of HIV viral load negative results and no detection of unspliced HIV RNA (data not shown) in any children sample. This indicates the possibility of dead end infection in patients that loose proviral DNA. These results suggests an extends revision in molecular diagnostic of HIV children infection specific in PCR of HIV DNA from peripheral blood mononuclear cell (PBMC), and detection of virus by PBMC co-culture in peripheral blood from the infant.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Gudiño Rosales JC helped to carried out the molecular genetic studies. Basualdo Sigales MC carried out the virus

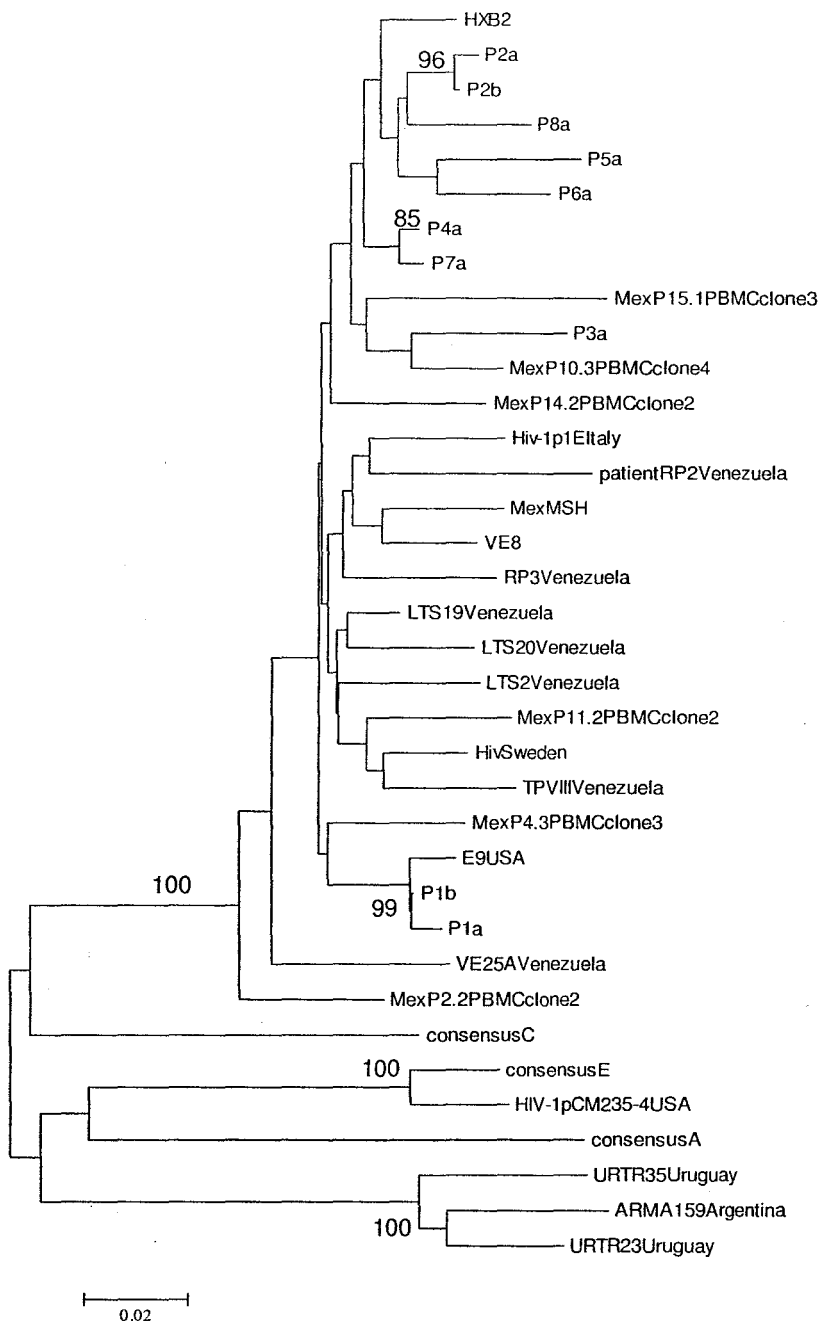


Figure 2

Phylogenetic relationship of LTR sequences from pediatric cohort of HIV seronegative infants. A neighbor-joining phylogenetic tree was generated from LTR sequences. Numbers at branch nodes indicate bootstrap proportions greater than 70 out of 100 bootstraps replicates. Kimura two-parameter method of estimating genetic distances was used. The patient identification is at the end of each corresponding branch. The LTR sequences of Mexican isolates (7), subtype B isolates and the consensus A, B (HXB2), C and E were included <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

culture of the Mexico City Reference and Diagnostic Unit HIV Pediatric Cohort. Reyes Teran G. participated in the design of the study. Soler C. conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. Vazquez Perez JA carried out the molecular genetic studies, participated in design of the study and coordination and drafts the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the present and previous members of the laboratory for helpful suggestions and for expert technical assistance, Isabel Pérez Monfort for help in preparing the manuscript, and Enrique Espinosa for careful reading and critical review of this manuscript. Funding for this research was provided by the Mexican Ministry of Health. VPJA (138542) was recipients of CONACYT fellowships.

References

1. Shearer GM, Clerici M: **Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us.** *Immunol Today* 1996, **17**:21-24.
2. Beretta A, Weiss SH, Rappocciolo G, Clerici M: **Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seronegative infection drug users at risk for HIV exposure have antibodies to HLA class I antigens and T cells specific for HIV envelope.** *J Inf Dis* 1996, **173**:472-476.
3. Roques PA, Gras G, Parnet Mathieu F, Mabondzo AM, Dollfus C, Narwa R, Marcé D, Tranchot-Diallo J, Hervé F, Lasfargues G, Courpoutin C, Dormont D: **Clearance of HIV infection in 12 perinatally infected children: clinical, virological and immunological data.** *AIDS* 1995, **9**:F19-F26.
4. Newell ML, Dunn D, De Maria A, Ferrazin A, De Rossi A, Giaquinto C, Levy J, Alimenti A, Ehrnst A, Bohlin AB, Ljung R, Peckman C: **Detection of virus in vertically exposed HIV-antibody negative children.** *Lancet* 1996, **347**:213-215.
5. Zhu T, Corey L, Hwangbo Y, Lee JM, Learn GH, Mullins JI, McElrath MJ: **Persistence of Extraordinarily Low Levels of Genetically Homogeneous Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Exposed Seronegative Individuals.** *J Virol* 2003, **77**:6108-6116.
6. Koning F, van der Vorst TJ, Schuitemaker H: **Low Levels of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA in High-Risk Seronegative Men.** *J Virol* 2005, **79**:6551-6553.
7. Gómez Román VR, Vázquez JA, Basualdo MC, Estrada FJ, Ramos-Kuri M, Soler C: **nef/Long terminal repeat quasispecies from HIV type 1 infected Mexican patients with different progression patterns and their pathogenesis in hu-PBL-SCID Mice.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, **16**:441-452.
8. Wu Y, Marsch JW: **Selective Transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA.** *Science* 2001, **293**:1503-1506.
9. Zhang L, Huang Y, Yuan H, Chen BK, James IP, Ho DD: **Genotypic and phenotypic characterization of long terminal repeat sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Virol* 1997, **71**:5608-5613.
10. Frenkel LM, Mullins JI, Learn GH, Manns-Arcuino L, Herring BL, Kalish ML, Steketee RW, Thea DM, Nichols JE, Liu SL, Harmache A, He X, Muthui D, Madan A, Hood L, Haase AT, Zupancic M, Staskus K, Wolinsky S, Krogstad P, Zhao J, Chen I, Koup R, Ho D, Roberts NJ Jr: **Genetic Evaluation of Suspected Cases of Transient HIV-1 Infection of Infants.** *Science* 1998, **280**:1073-1076.
11. Tscherning-Casper C, Papadogiannakis N, Anvret M, Stolpe L, Lindgren S, Bohlin AB, Albert J, Fenyó EM: **The trophoblastic epithelial barrier is not infected in full-term placentae of human immunodeficiency virus-seropositive mothers undergoing antiretroviral therapy.** *J Virol* 1999, **73**:9673-8.
12. Papadogiannakis N: **Traffic of leukocytes through the maternal fetal placental interface and its possible consequences.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1997, **222**:141-57.
13. Zhou L, Yoshimura Y, Huang Y, Suzuki R, Yokohama M, Okabe M, Shimamura M: **Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during preg-**

nancy and by breast-feeding after birth. *Immunol* 2000, **101**:570-581.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

