



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"PATRONES DE RESPUESTA INMUNE Y
NIVELES DE ANTIGENO EN PACIENTES
DE SIDA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE CARMEN GUDIÑO ROSALES

FALLA DE COPIEN

CIUDAD DE MEXICO

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

Resumen.....	1
-Introducción	
a) Historia.....	2
b) Características generales del virus.....	4
c) Organización del genoma viral.....	10
d) Ciclo de duplicación viral.....	14
e) Respuesta inmune a infección.....	18
f) Clasificación de la infección por HIV-1.....	21
-Objetivos.....	27
-Materiales y métodos	
a) Reactivos.....	24
b) Equipo.....	27
c) Muestras de suero.....	27
d) Detección de anticuerpos totales.....	29
e) Detección de antígeno.....	32
f) Detección de anticuerpos ENVA/CARF.....	35
g) Ensayos de Western-blot.....	37
-Resultados	
Nivel de anticuerpos y de antígenos/grupo.....	41
Gráfica de anticuerpos contra la envoltura.....	43
Gráfica de anticuerpos contra la cápsida.....	45
Gráfica de niveles de antígenos.....	46
Patrones de respuesta en Western-blot.....	48
Porcentaje de reacción a las diferentes proteínas virales por Western-blot.....	49
-Discusión.....	50
-Conclusiones.....	55
-Referencias.....	56

RESUMEN:

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ha tenido un gran impacto como un problema de salud a nivel mundial. Por desgracia, México no se ha escapado a este problema, y actualmente se encuentra entre los países con mayor incidencia de casos de SIDA en el Continente Americano.

Se realizó un estudio para determinar los patrones de respuesta inmune humoral, que se presentan en pacientes de SIDA en México, tratando de encontrar alguna relación entre los tipos de respuesta observados y el estadio clínico de los pacientes.

Para estudiar la respuesta de producción de anticuerpos, se utilizaron ensayos de ELISA y de Western-blot. El ELISA empleado, permite la detección por separado, de anticuerpos específicos contra la envoltura viral y contra la nucleocápside, mientras que con el Western podemos analizar la producción de anticuerpos contra todas las proteínas del virus. Además, se empleó un segundo ensayo de ELISA, el cual permite detectar los antígenos virales en la muestra de suero.

En las muestras de suero de este estudio, la respuesta de producción de anticuerpos contra las proteínas de la nucleocápside no se observa en todos los pacientes, y el análisis de los resultados de los Western-blot indican, que las proteínas virales no reconocidas por los sueros sin anticuerpos contra la nucleocápside, son p55 y p17.

No encontramos alguna relación entre los patrones de respuesta observados y el estadio clínico de los pacientes.

INTRODUCCION:

a) Historia

La aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) como un brote epidémico grave a nivel mundial, propició la movilización de la comunidad científica y médica, en la búsqueda del agente causal, así como en la investigación acerca del tratamiento y/o prevención de la enfermedad [1 a 7].

Las manifestaciones clínicas del SIDA, incluyen padecimientos que se conocían asociados a deficiencias inmunológicas congénitas, a casos de tratamientos con inmunosupresores, como en el caso de pacientes de transplantes, a víctimas de radiaciones (incluyendo radioterapia) y desnutrición [2 a 5,7]. Los principales padecimientos que se observaban en los enfermos eran: Sarcoma de Kaposi, infecciones por *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*, *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, Citomegalovirus, Virus de Herpes simple y otros tipos de infecciones oportunistas [4 a 7].

Entre las explicaciones que se trataban de dar a la repentina aparición de estos casos de inmunodeficiencia adquirida [5,7], se encontraba el hecho de que algunas infecciones virales pueden ser asociadas a inmunodeficiencias, como la infección por

Citomegalovirus (CMV) [9,9], aunque realmente no había suficiente evidencia para probar si éste era el agente causal de la inmunodeficiencia, o si ésta determinaba la infección por CMV [4,5]. Por otro lado, se invocó el efecto inmunosupresor que produce el consumo de ciertas drogas [10], o el posible efecto del empleo de estimulantes sexuales, como el nitrito de amilo, el cual se especula que puede provocar inmunosupresión. Al emplearse como estimulante sexual, el nitrito de amilo permite a un individuo tener relaciones con más parejas, o más relaciones con una misma, lo cual lo predispone a contraer un mayor número de enfermedades de transmisión sexual [4,11].

Harold W. Jaffe en 1983 [1], publicó un trabajo en el cual hizo un balance del estado en que se encontraba la epidemia, al reportarse los primeros 1,000 casos de SIDA en los Estados Unidos. En este trabajo quedó claro que el SIDA no era una enfermedad exclusiva de los grupos de homosexuales y/o drogadictos, ya que había un incremento real en la proporción de hemofílicos infectados por transfusión sanguínea, o productos sanguíneos contaminados, así como de parejas de heterosexuales que habían tenido relaciones con personas infectadas. El hecho de que se apreciara un incremento en los casos de infección por virus de SIDA entre los pacientes hemofílicos, es contraria a la idea de que el CMV pudiera ser el agente causal, ya que los estudios recientes han revelado que el CMV no se transmite por los productos sanguíneos utilizados en el tratamiento de la hemofilia [12].

En 1978, el grupo de investigación de Robert C Gallo [citado en 13], publicó un trabajo en el cual se describía el primer retrovirus humano, y estableció la asociación entre la infección por este virus (llamado HTLV-1), y algunas patologías asociadas a linfocitos, principalmente linfomas y leucemias.

Clinicamente se había demostrado que en los pacientes con SIDA, el número de linfocitos T, especialmente el subgrupo de células ayudadoras estaba drásticamente reducido [14].

El hecho de que el modo de transmisión de la infección por HTLV-1 y la transmisión del SIDA sea prácticamente el mismo, ya sea por contacto sexual, o por medio de productos sanguíneos [13 a 14], llevó a algunos investigadores a estudiar la posibilidad de que el HTLV-1 fuese el agente causal de la epidemia de SIDA.

Pese a que Gallo y su grupo aislaron partículas virales caracterizadas como HTLV-1 de un paciente con SIDA, sus resultados no les permitieron asegurar que éste virus fuera el responsable de la enfermedad [15 a 17].

En 1983, Luc Montagnier y sus colaboradores del Instituto Pasteur en Paris, reportaron el aislamiento de un retrovirus en un paciente con linfadenopatía asociada a SIDA (LAS), al cual llamaron LAV (por Lymphadenopathy-associated virus), diferente de los HTLV descritos por Gallo (HTLV-1 y 2) [18]. En este trabajo, la morfología de la nucleocápside del virus aislado se reportó como de forma cilíndrica, a diferencia de la forma esférica de la nucleocápside del HTLV-1, además de demostrarse que la concentración óptima de Mg++ requerida para el funcionamiento de

la enzima transcriptasa reversa (TR) era ligeramente menor que la óptima para el HTLV-1.

Aparte de las diferencias en la morfología entre el nuevo aislado viral y los HTLV descritos por Gallo, se demostró por ensayos de inmunoprecipitación e inmunofluorescencia, que los sueros de pacientes con SIDA tenían anticuerpos contra el nuevo virus aislado por Montagnier y su grupo, y sólo presentaban reacción cruzada con el antígeno p24 del HTLV-1. Sin embargo, los antisueros anti-HTLV-1 no reaccionaban con los antígenos del nuevo aislado viral [19,19].

En 1984, en el Instituto Nacional del Cáncer, en FIA, Gallo y su grupo lograron el aislamiento de retrovirus altamente citopáticos a los que describieron como variantes de los HTLV conocidos y los designaron con el nombre de HTLV-3 (diferenciados de HTLV-1 y 2 principalmente porque estos últimos no presentan un efecto citopático muy marcado). También describieron la morfología cilíndrica de la nucleocápside característica de este nuevo virus [18,20].

Este mismo grupo de investigadores desarrolló un sistema para la producción continua de retrovirus, por selección de una línea celular tolerante a las variantes altamente citopáticas de los HTLV-3 [21]. Una vez establecida esta línea celular, que permitió la producción de virus en grandes cantidades y de manera continua, se desarrollaron técnicas serológicas para la detección de individuos infectados, paso muy importante en el control de la dispersión del virus, pues permitió detectar individuos sin

sintomatología clínica, pero con infección, así como el control de la transmisión por sangre contaminada.

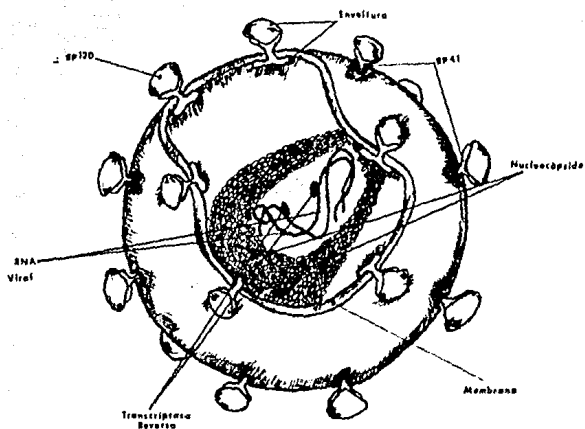
Con la descripción de los virus HTLV-III y LAV por Gallo y Montagnier respectivamente, así como del ARV (Aids-related virus) descrito más tarde por Levy [75], que resulta ser el mismo virus en los tres casos [18,23,24], se volvía confusa la nomenclatura de los trabajos publicados por diferentes autores. Por ello, en 1986 se nombró un subcomité en el Comité Internacional para la Nomenclatura de Virus (ICTV), para la unificación del nombre para el virus de SIDA. Se llegó al acuerdo de denominar desde entonces al HTLV/LAV/ARV con el nombre de HIV-1 o virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 [72,75].

b) Características generales del virus

La figura 1 muestra la morfología general del HIV-1, el cual pertenece al grupo de los lentivirus, dentro de la familia de los retrovirus [26]. Presenta una morfología esférica con un diámetro promedio de 139 nanómetros, un núcleo o nucleocápsida con forma de cono truncado, con un diámetro principal de 41 nanómetros. Su densidad de equilibrio en gradientes de sacarosa es igual a 1.16, que es característica de muchos otros retrovirus y posee además una enzima con actividad de transcriptasa reversa (TR) dependiente de Mg^{++} [13,19-21].

Estructuralmente el virus está formado por una envoltura lípo-protéica, con una unidad de membrana de origen celular, con

Fig. 1
MORFOLOGIA DEL VIH-1



Estructura general del virus de inmunodeficiencia humana. Se muestra la membrana lipídica con las glicoproteínas de envoltura asociadas a ella, la nucleocápside con forma cónica formada por múltiples moléculas de p24, y dentro de ella 2 moléculas de RNA de cadena sencilla y con una molécula de la enzima reverso-transcriptasa asociada a cada cadena.

2 proteínas virales asociadas: una glicoproteína extracelular de 120 Kd de peso molecular (gp120), que determina el tropismo del virus hacia células con el marcador CD4 (CD4), ya que esta proteína presenta gran afinidad por el receptor de membrana CD4, presente en los linfocitos T4 y es responsable en gran medida del efecto citopático que manifiestan las células con gran densidad de este receptor en su superficie cuando son infectadas [27 a 33], y una glicoproteína transmembranal de 41 Kd de peso (gp41) que es el sitio de anclaje a la membrana para la gp120 [28].

Estas dos proteínas se derivan de un precursor glicosilado de 160 Kd de peso molecular, codificado por un marco de lectura abierto de 2.5 Kb de longitud, que es procesado enzimáticamente y origina las gp120 y gp41.

De un precursor de 55 Kd de peso molecular se originan las proteínas que forman la nucleocápside de la partícula viral. Mediante la acción de alguna proteasa se corta en las proteínas: p17, que permanece asociada a la cara interna de la membrana viral; p24, que forma la nucleocápside y encierra las moléculas de RNA del genoma del virus y p15 la cual es procesada posteriormente en p7 y p9 y que al parecer interactúan directamente con el RNA [34 a 37].

Dentro de la nucleocápside se encuentran dos moléculas de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva que constituyen el genoma del virus.

Asociadas a las cadenas de RNA se encuentran moléculas de TK. Esta proteína está constituida por 2 polipéptidos, de 66 ó 51

Kd de peso (se puede encontrar en alguno de los dos pesos) [38,39,75], que presenta la función de DNA polimerasa RNA-dependiente; DNA polimerasa DNA-dependiente, y de ribonucleasa de híbridos DNA-RNA (ribonucleasa H), y una proteína de 31 Kd cuya función es la de integrasa/endonucleasa [39].

Además de las proteínas estructurales descritas arriba, el HIV-1 codifica para una serie de proteínas reguladoras esenciales para la duplicación viral [41,42]. De éstas últimas se han caracterizado una proteína de 15.5 Kd de peso que actúa como trans-activador "tat", activando los transcritos virales para su traducción, y una proteína de 20 Kd de peso "rev", que permite la translocación hacia el citoplasma, del RNA mensajero que codifica para las proteínas estructurales. La acción de ambas proteínas depende de dos secuencias blanco, y regulan, de manera positiva, la expresión de proteínas estructurales del virus.

En 1989, Renko y colaboradores [80,81], describieron una proteína presente en los linfocitos de humanos infectados con las cepas virales III-b, HYB-2 y HYB-3 del HIV-1, la cual está formada por la combinación de un fragmento de "env", el primer exón de "tat", y el segundo exón de "rev". Este producto presenta la actividad reguladora de las dos últimas proteínas.

Existe otra proteína codificada por el gen "vif", que aunque no ha sido caracterizada, se sabe que determina la infectividad del virus libre, ya que se ha observado que las partículas virales de cepas mutadas en este gen no son infectantes, aunque sí puede haber infección célula-célula; existe además otro gen

que codifica para un factor de expresión negativo "nef" y el que produce la proteína "sor", cuya función no es conocida [41 a 43].

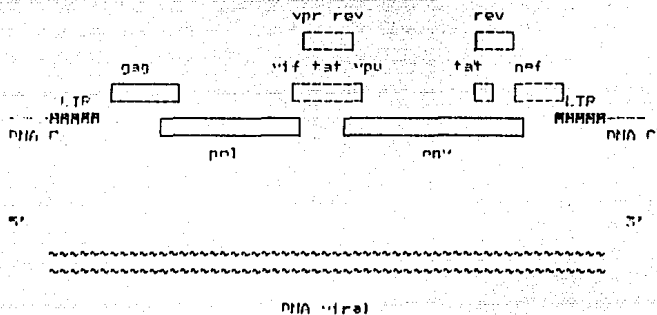
el Organización del genoma viral:

Marl A Muesing y colaboradores [24], determinaron la secuencia nucleotídica proviral del HTLV-3 presente en la línea celular HP así como la de los DNA complementarios (cDNA) que representan al RNA viral insertado en estas mismas células. Mediante hibridaciones contra el DNA total de los linfocitos infectados con LAV, se demostró que el HTLV-3 y el LAV (ahora HIV-1), son el mismo virus o variantes cercanamente relacionadas entre sí [18,21,24,75].

El genoma del HIV-1 (fig. 2), lo constituyen dos moléculas de RNA de cadena sencilla que tienen una longitud de 9.3 kilobases y presenta la disposición general de los retrovirus en sus genes; secuencias repetidas terminales largas (LTR) en los extremos, que flanquean los genes gag-pol-env en dirección 5'a 3' [40,43,44].

Los LTR tienen 700 bases (R) de largo, que se subdividen en las regiones U3, R y U5. Presentan varias secuencias reguladoras de la transcripción, características de los genomas de eucariotes, incluyendo un promotor de la transcripción (TATA-box), una región amplificadora de la misma (enhancer), así como la secuencia responsiva "TAP", para la proteína "tat", es decir aquella secuencia blanco sobre la que actúa una proteína para ejercer su efecto regulador, cualquiera que éste sea [43,44].

Fig. 2
ORGANIZACIÓN DEL GENOMA
DEL HIV-1



Organización del genoma del HIV-1 en su forma ya integrada al DNA de la célula hospedera. En la parte superior del diagrama se muestran los diferentes marcos de lectura, el nombre de cada gen, y su posición relativa respecto del DNA viral esquematizado en la parte baja de la figura.

El HIV-1 codifica para 3 genes de proteínas estructurales; "gag", "pol" y "env", así como para varios genes de proteínas reguladoras. Después del LTR, en dirección 3' se encuentra el gen "gag", con 1,437 R de largo que codifica para las proteínas de la nucleocápsida, y cuya región 3' se sobrelapa con la región 5' del gen "pol" en 130 R. El gen "pol", con una longitud de 3,035 B, codifica para las enzimas virales; la transcriptasa reversa (TR), que existe como 2 proteínas de diferente tamaño (p66 y p51) y una endonucleasa integrasa (p31) [74,77, citados por 75].

El tercer gen de proteínas estructurales, con 2,588 B codifica para las proteínas de la envoltura viral; gp160 (precursor) gp120 (proteína extramembranal) y gp41 (proteína transmembranal) y es seguido por el LTR del extremo 3' [43,44].

En la región central del genoma del HIV-1 se encuentran varios marcos de lectura para los genes reguladores. El gen "vif" que codifica para una proteína de 21, kD pero cuya función se desconoce. Existe un marco de lectura para el gene "vpr", cuyo producto proteínico no se ha descrito [43,44,75].

Las proteínas reguladoras "tat" y "rev" son codificadas por un mismo segmento del genoma viral, pero en diferentes marcos de lectura, y son genes fragmentados, cuyos segundos exones se sobrelapan con una región del gen "env".

Aun cuando no se conoce con exactitud la manera en que actúan estas proteínas, se sabe que "tat" necesita de una secuencia responsiva TAR que se encuentra en el LTR. Algunos estudios demostraron una interacción directa entre "tat" y su

secuencia responsiva a nivel de RNA [78]. Por otro lado Laspiá y cols [77], en ensayos "in vitro" encontraron que la estructura terciaria de TAP a nivel de DNA es importante para una interacción con "tat", y sugieren que puede incrementar el inicio de la transcripción y estabilizar el alargamiento, evitando la terminación temprana del transcrito [76 a 78].

Al igual que para "tat", se ha encontrado que "rev" actúa a nivel del núcleo celular [78]. Para la actividad de esta proteína se necesita de una secuencia responsiva (RRE) la cual se encuentra dentro del gen "env".

El análisis de la localización de los mRNA que presentan la secuencia RRE, en ausencia o presencia de "rev" ha demostrado que "rev" actúa como regulador del transporte hacia el citoplasma de los mRNA para proteínas estructurales, aunque se especula que además de la secuencia responsiva, es necesario que reconozca sitios de procesamiento o edición del RNA (splicing) para que funcione [79].

Recientemente se ha descrito la proteína "tev" de 28 Kd de peso la cual es reconocida por anticuerpos monoespecíficos tanto para "tat" como para "rev" [80]. La secuencia de dicha proteína muestra que está construida a partir del primer exón de "tat", una parte de "env" y el segundo exón de "rev".

Esta proteína muestra actividad funcional tanto de "tat", como de "rev" y se ha encontrado en células infectadas con las cepas IIIb, HY82 y HY83 del HIV-1 [80]. Existen además otras dos

proteínas cuya función se desconoce, las cuales han sido llamadas "nrf" y "vpu" [43-44].

d) Ciclo de duplicación viral:

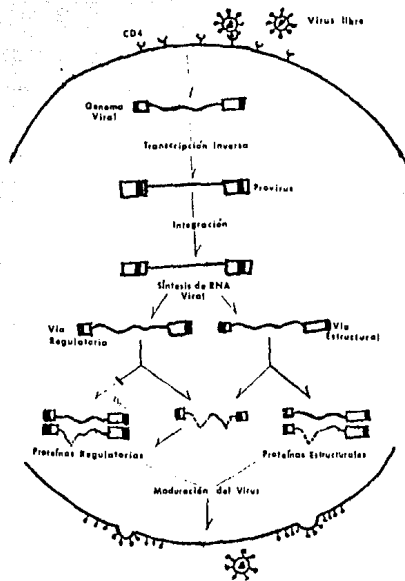
El ciclo de duplicación del HIV-1 en un individuo (fig 3), comienza con la entrada de partículas virales al torrente sanguíneo, en donde existe la posibilidad de que la partícula vírica encuentre una célula susceptible de ser infectada. Mediante la interacción de la proteína de la envoltura viral gp120 y el receptor celular CD4 [31,32,52], el virus y la célula hospedera quedan en contacto estrecho.

A partir de esta interacción, y con la participación de otros factores no bien caracterizados, las membranas de la célula y el virus se fusionan y de esta manera penetra la nucleocápside viral al citoplasma de su hospedero [33].

Una vez en el citoplasma, la nucleocápside se desintegra y son liberados el RNA y la enzima TR. Después de una serie de procesos entre los cuales destaca la unión de un tRNA-Lys como "primer" o sitio de inicio para la polimerización, a uno de los extremos del genoma del virus y la duplicación de ambos extremos del RNA para completar la estructura U3-R-U5 de los LTR [52], se inicia la síntesis de DNA por la TR que toma como molde el RNA genómico viral; a esto sigue la degradación de la hebra de RNA del híbrido DNA-RNA mediante la actividad RNAsa H de la misma enzima, la duplicación de la cadena de DNA y la integración del

Fig. 3

CICLO DE DUPLICACION VIRAL



El ciclo de producción de partículas virales desde la interacción de virus libre con una célula susceptible; la integración del genoma viral al DNA del hospedero; las vías de expresión del genoma viral y la generación de partículas recién sintetizadas a partir de la membrana plasmática de la célula ya infectada (basado en Bryan y Warner [71]).

provirus en el genoma del hospedero mediante la acción de la integrasa (p31), que también está codificada por el gene "pol" [52,53]. La célula queda así permanentemente infectada y con el virus integrado en forma latente.

Después de un periodo variable en el cual el virus integrado permanece latente en la célula infectada, el genoma viral comienza a expresarse, transcribiendo y traduciendo los genes tanto estructurales como reguladores. Se cree que esta expresión es provocada por algún estímulo antigénico sobre la célula, que en condiciones normales desencadena la síntesis de RNA celular, pero en células infectadas, ésta síntesis es principalmente de RNA viral, utilizando la maquinaria enzimática celular para la transcripción.

Al parecer la expresión temprana de los genes virales desemboca en la síntesis de las proteínas reguladoras [71]. Se han encontrado una gran variedad de mRNAs producidos por procesamiento de transcritos de casi la totalidad del genoma viral, de los cuales se originan los mensajeros para las diferentes proteínas reguladoras. El análisis de los diferentes mensajeros para estas proteínas, ha revelado hasta 9 diferentes transcritos para la producción de las proteínas "tat", "rev", y "nef" (tres para cada proteína), aunque el significado funcional de ello aun no se conoce [78,80,81].

En la expresión tardía del virus se producen las proteínas estructurales. De un transcrito viral de casi la longitud total del provirus, se sintetiza el precursor de las proteínas de

envoltura, que es glicosilado en el aparato de Golgi y posteriormente cortado en las unidades gp120 y gp41. Estas proteínas se integran en la membrana de la célula infectada.

De un segundo transcrito viral que incluye los genes "gag" y "pol", se sintetizan las proteínas de la nucleocápside, así como las enzimas virales [38,54,55]. Este transcrito viral es traducido como un precursor de 180 Kd de peso, el cual se une en un extremo a la membrana celular.

Mientras el precursor permanece anclado a la membrana, parece madurar una proteasa codificada por este mismo marco de lectura, entre las regiones 3' de "gag" y 5' de "pol" [56], la cual permite su propio procesamiento (autocatálisis) así como el de las diferentes proteínas de la nucleocápside. Ello determina la maduración de las proteínas p17 que queda unida a la membrana, la p24 que forma la cápside del virus y la ruptura de p15 en p7 y p9 que se asocian a dos moléculas de RNA de 9.3 Kb que son acarreadas hacia la nucleocápside en formación.

Conforme madura la nucleocápside se va construyendo una nueva partícula viral, la cual es liberada por exocitosis, así se puede transmitir la infección a otras células [41,42,44,75].

La interacción célula-célula es una forma alternativa de transmisión de la infección; ésta consiste en la interacción de células infectadas, que están expresando las proteínas de envoltura del virus, con células no infectadas, mediante el mismo proceso de reconocimiento entre la gp120 viral y el receptor CD4. De esta manera ambas células quedan en condiciones de formar

puentes citoplásmicos, lo que permite el paso del RNA y las enzimas virales de la célula infectada a la no infectada en donde se repiten los fenómenos antes descritos.

El Respuesta inmune a infecciones

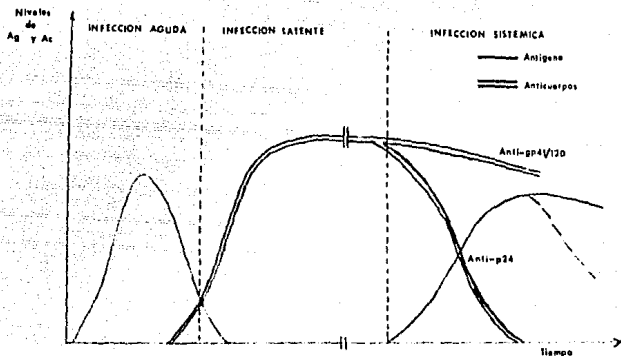
Uno de los numerosos enfoques con que se ha tratado de abordar el estudio de la epidemia de SIDA, ha sido el establecer una relación entre la presencia o ausencia de algún parámetro inmunológico y la progresión de la enfermedad.

Los parámetros más frecuentemente empleados hasta ahora como marcadores pronóstico de la infección, incluyen el conteo diferencial de subgrupos de linfocitos; la relación T4/TR; los títulos de neopterina y de β -2-microglobulina en suero; los niveles de γ -globulinas, hemoglobina y plaquetas, la tasa de sedimentación de eritrocitos y algunos otros parámetros, aunque ninguno parece ser el definitivo y en estudios clínicos se busca determinar varios de ellos que en combinación puedan aportar mejores datos sobre las condiciones del enfermo [57-57].

Otros parámetros que han sido estudiados y que prometen dar mejores resultados para su empleo como marcadores pronóstico son la presencia de anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas virales, así como la presencia de antígeno viral circulante en el suero de los pacientes [58].

En la figura 4 se muestra una gráfica hipotética que trata de relacionar la presencia del antígeno circulante, y los niveles de anticuerpos específicos contra la nucleocápsida y contra la

Fig. 4
 ANTIGENO/ANTICUERPOS EN LA INFECCION
 POR VIRUS DE SIDA



Curva teórica que muestra la evolución de la presencia de antígeno y de anticuerpos contra la envoltura y contra la nucleocápside viral conforme progresa la infección.

envoltura viral conforme evoluciona el paciente desde el momento de la infección.

Este diagrama describe de manera breve tres fases en la historia natural de la enfermedad:

En la primera, que algunos autores llaman infección aguda, la cual comprende desde el momento de la infección, hasta la seroconversión del individuo y que dura generalmente entre 6 y 8 semanas, se puede determinar la presencia de antígeno antes de que sea posible la detección de anticuerpos, como evidencia serológica de la infección [22-23,45-46,52]. Sin embargo, Ranki y colaboradores [45], establecieron que puede existir un periodo de hasta 18 meses durante el cual no es posible la detección de antígeno circulante, ni de anticuerpos contra las proteínas estructurales del virus, aunque si la de anticuerpos contra los productos de los genes "vpu" y "nef" [46].

En la segunda fase, denominada infección latente, que puede durar desde unos meses hasta varios años (de 3 a 10 o tal vez más), los niveles de antígeno circulante disminuyen hasta desaparecer totalmente y en cambio la presencia de anticuerpos anti-HIV son la evidencia serológica de la infección. Los trabajos de Min-Ji Chou y colaboradores [47], así como de otros autores indican que los primeros anticuerpos en producirse son contra la envoltura viral, además de que es posible detectar la producción de anticuerpos contra otras proteínas virales [44].

En trabajos realizados sobre muestras de pacientes en Estados Unidos, se a reportado que los niveles de anticuerpos

contra la nucleocápside viral son muy elevados en los individuos asintomáticos y se considera que el incremento de los niveles de antígeno circulante, acompañado de una disminución en los niveles de anticuerpos contra la nucleocápside marca la transición del período de infección latente al de infección sistémica (4P a 51,53 a 561, que es la tercera fase de la enfermedad e incluye a los pacientes con sintomatología de complejo relacionado a SIDA (CPA) y a enfermos de SIDA.

f) Clasificación de la infección por HIV-1

Dado el espectro tan amplio de las manifestaciones clínicas del SIDA, además del rápido crecimiento en el conocimiento del virus y de la enfermedad, se hizo necesario el establecer un sistema de clasificación de los diferentes estadios clínicos.

En la tabla I se hace una comparación entre las divisiones que hace el sistema de clasificación propuesto por los Centros de Control de Enfermedades (CDC), principalmente por razones de política de salud pública, planeación de actividades de control-prevención, reporte de casos y estudios epidemiológicos, y sus equivalencias con el sistema propuesto por el centro hospitalario Walter Reed de Washington, Estados Unidos, diseñado principalmente para estudios clínicos e investigación.

TABLA I

Sistema CDC		Sistema Walter Reed (WR)	
GRUPO	CARACTERISTICAS	GRUPO	CARACTERISTICAS
CDC I	Infección aguda	WR-0	Exposición al virus
CDC II	Infección asintomática	WR-1	T4 = 800 cel/mm ³ , seropositivos.
CDC III	Linfadenopatía generalizada persistente	WR-2	T4 = 500-400 cel/mm ³
CDC IV	Otras enfermedades	WR-3	T4 <400>200 cel/mm ³ Disfunción. Inmunológica.
A	Enfermedad constitutiva	WR-4	Anergia cutánea parcial
B	Enfermedad neurológica		
C-1	Enfermedades secundarias especificadas para SIDA en el CDC.	WR-5	T4 <200 cel/mm ³ Anergia total, infecciones persistentes
C-2	Otras enfermedades por infecciones,	WR-6	T4 <100 cel/mm ³ Infecciones crónicas o diseminadas
D	Cánceres secundarios		
F	Otras condiciones		

El propósito del presente trabajo fue el de estudiar la respuesta de producción de anticuerpos contra las diferentes proteínas virales, en dos grupos de pacientes mexicanos. El primer grupo incluyó a pacientes con síntomas tempranos de la infección, que caen dentro de los estadios WP-3 o 4 de este sistema de clasificación, y el segundo, a pacientes con síntomas avanzados, y que caen dentro de los estadios WP-5 o 6. Además se intentó encontrar una relación entre los patrones de respuesta observados y el estadio clínico de los pacientes.

OBJETIVOS:

1) Objetivo general:

Contribuir a la caracterización de la epidemia de SIDA en la población mexicana.

2) Objetivos específicos:

Determinar los patrones de respuesta inmune humoral de pacientes mexicanos ante los diferentes antígenos del HIV-1.

Establecer si existe una relación entre los patrones de respuesta observados y el estadio en que se encuentra el paciente.

MATERIALES Y METODOS:**a) Reactivos:**

Detección de anticuerpos totales con el ensayo "Abbott recombinant HIV-1 EIA", laboratorios Abbott, Chicago, Illinois.

Cada ensayo contiene:

-Esferas de poliestireno recubiertas de antígenos de la envoltura y de la nucleocápside, del HIV-1.

-Suero testigo positivo, con antibióticos.

-Suero testigo negativo, con antibióticos.

-Conjugado enzimático; anticuerpos de cabra anti IgG humana (0.01 µg/ml), con peroxidasa de rábano en amortiguador tris con antibióticos.

-Amortiguador diluyente del conjugado, con sueros bovino y de cabra, y antibióticos (composición no especificada).

-Amortiguador diluyente de muestras (composición no especificada), con sueros bovino y de cabra, y antibióticos.

-Tabletas (12.8 mg/tableta) de Orto-fenilendiamina (OPD).

-Amortiguador de dilución de OPD; (citatos y Fosfatos, concentración no especificada), con 0.02 % de peróxido de hidrógeno.

Detección de anticuerpos específicos contra las proteínas de la envoltura y contra las de la nucleocápside, con el ensayo "Abbott ENVA/CORF HIV-1 EIA" (laboratorios Abbott, Chicago, Illinois).

El ensayo contiene:

- Esfemas de poliestireno recubiertas de antígenos de la envoltura del HIV-1
- Esfemas de poliestireno recubiertas de antígenos de la nucleocápside del HIV-1.
- Suero testigo positivo, con antibióticos.
- Suero testigo negativo, con antibióticos.
- Conjugado enzimático; anticuerpos humanos contra la envoltura viral (0.01 µg/ml), con peroxidasa de rábano, en amortiguador HEPES con antibióticos.
- Conjugado enzimático; anticuerpos humanos contra la nucleocápside viral (0.01 µg/ml), con peroxidasa de rábano, en amortiguador HEPES con antibióticos.
- Amortiguador diluyente de muestras; citrato sódico (concentración no especificada), con antibióticos.
- Tabletas (12.8 mg/tableta) de Orto-fenilendiamina (OPD).
- Amortiguador de dilución de OPD; (citratos y Fosfatos, concentración no especificada), con 0.02 % de peróxido de hidrógeno.

Detección de antígenos del HIV-1, con el ensayo: "Abbott HTLV-III Antigen EIA", (Laboratorios Abbott, Chicago, Illinois).

El ensayo contiene:

- Esfemas de poliestireno recubiertas de anticuerpos humanos anti-HIV-1.

- Anticuerpos de conejo anti- HIV-1 (0.1 $\mu\text{g/ml}$), con azida de sodio (0.1 %).
- Conjugado enzimático de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo.
- Amortiguador diluyente de muestras con detergente (triton X-100), con azida de sodio (0.1 %).
- Muestra testigo positivo, antígenos del HIV-1 con azida de sodio (0.1 %).
- Muestra testigo negativo, plasma humano con azida de sodio.
- Tabletas de DPD.
- Amortiguador de dilución de DPD.

Detección de anticuerpos específicos por Western-blot, el material necesario es el siguiente:

- Tiras de papel de nitrocelulosa transferidas con los antígenos del HIV-1.
- Amortiguador (PBS). Se prepara una solución (10x) 0.01M de fosfato de sodio dibásico y 0.15M de NaCl. Se diluye a la cantidad a emplear, con agua destilada y se ajusta el pH a 7.0 con una solución de fosfato monobásico 0.01M y NaCl 0.15M.
- Amortiguador de lavado: tween-20 al 0.2% en PBS.
- Amortiguador de dilución de muestras: albúmina bovina sérica al 1% en amortiguador de lavado.
- Anticuerpos de bovino biotinilados, anti-IgG humana (laboratorios Amersham, Gran Bretaña).
- Complejo de peroxidasa de rábano, con biotina-estreptoavidina (laboratorios Amersham, Gran Bretaña).

Sustrato enzimático, 5,3'-diaminobenzidina (Laboratorios Sigma, Estados Unidos).

El Western-blot comercial utilizado fue el ensayo "HIV-1 Western Blot", de los laboratorios Organon Tekniva, Bélgica, y emplea los mismos reactivos pero producidos por el fabricante.

b) Equipos:

-Lector de ELISA; Analizador Quantum II, Laboratorios Abbott, Chicago, Illinois.

-Sistema de lavado "pentawash", laboratorios Abbott, Chicago, Illinois.

-Cámaras de incubación con carriles, laboratorios Bio-Rad, Estados Unidos.

c) Muestras de suero.

Los sueros de 56 pacientes de SIDA fueron analizados para determinar la presencia de anticuerpos anti-HIV, así como de antígenos virales.

De estas muestras, 4º son la muestra basal de pacientes con linfadenopatía generalizada persistente, que han sido incluidos en un protocolo de investigación para determinar el efecto del medicamento antiviral Ribavirina (5º a 67), en pacientes de SIDA. Treinta y tres de ellas corresponden a pacientes tratados en el Hospital Universitario de Guadalajara y 16 son de pacientes del Hospital 2º de Noviembre del ISSSTE.

Todos ellos pertenecen a los niveles 3 o 4 del sistema Walter Reed de clasificación para los diferentes estadios de la infección (homologables a los estadios III tardío y IVa del sistema CDC). El perfil inmunológico general de estos pacientes es con un hematocrito mayor a 30 ppm una cuenta leucocitaria total superior a 1500 cel/mm³ y linfocitos T4 en cantidades menores a 500 y mayores a 200 cel/mm³.

Siete muestras de suero provienen de pacientes del Hospital de PEMEX de la Ciudad de Mérida, todos ellos en los estadios 5 ó 6 del sistema Walter Reed.

Se utilizaron como testigo negativos, sueros de individuos sanos negativos a la presencia de anticuerpos anti-HIV-1, así como al antígeno viral, y como testigo positivos, sueros de individuos asintomáticos con títulos elevados de anticuerpos contra la nucleocápside y contra la envoltura viral, excepto para el ensayo de detección de antígeno, ya que en este caso, se emplearon las muestras testigo del ensayo correspondiente, las cuales contienen antígenos virales producidos por cultivo de células infectadas.

Se emplearon 3 tipos de ensayos de ELISA, realizándolos según las condiciones señaladas por el fabricante y con los reactivos proporcionados por el mismo.

El principio teórico de estos ensayos se basa en tener un soporte inerte, en este caso esferas de poliestireno, recubiertas con los antígenos del HIV-1.

Las esferas se incuban con una muestra de suero diluida en un amortiguador adecuado, para efectuar una reacción antígeno-anticuerpo en caso de que la muestra sea positiva. Si ha ocurrido dicha reacción, ésta se hace evidente al incubar nuevamente, con un conjugado enzimático de anticuerpos contra inmunoglobulinas humanas, a los cuales se les ha acoplado la enzima peroxidasa de rábano, con biotina y añadiendo un sustrato cromógeno para la enzima.

La reacción cromógena se puede analizar por técnicas de espectrofotometría, y dependiendo de los valores de absorbancia de las muestras testigo, positivas y negativas, se establece un criterio que define si una muestra es positiva o negativa.

d) Ensayo de anticuerpos totales por ELISA.

Como ensayo preliminar, en todas las muestras se determinó la presencia de anticuerpos totales anti-HIV-1, para discriminar entre posibles muestras que fueran negativas. Se empleó el ensayo comercial: "Abbott recombinant HIV-1 EIA" (Laboratorios Abbott, Chicago, Illinois).

Método:

Primera incubación:

-Se pipetea 10 microlitros de la muestra de suero dentro de una cavidad de la placa de reacción, (como control de calidad de los reactivos del ensayo, el testigo negativo se corre por triplicado y el positivo por duplicado, según recomendaciones del fabricante).

-Se añaden 400 microlitros de amortiguador diluyente de muestra a cada pozo (ver reactivos).

-Se agrega una esfera de poliestireno recubierta de antígenos de envoltura y de la nucleocápside del HIV-1 a cada pozo de la placa de reacción, se cubre la placa con un papel adhesivo y se agita para deshacer burbujas de aire.

-Se incuba la placa de reacción a $40^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por 30 ± 2 minutos.

-Se remueve el papel adhesivo y se aspira el líquido de cada pozo en una trampa de vacío con un desinfectante adecuado, como Benzal concentrado.

-Se lava cada esfera 3 veces con 4 a 6 ml de agua desionizada cada vez. En este caso se utilizó el sistema de lavado automático Pentawash, que emplea una bomba Gast para suministro de la solución de lavado y una bomba Gorman-Rupp para aspiración, de los Laboratorios Abbott, (Chicago, Illinois).

Segunda incubación:

-Se añaden 200 microlitros del conjugado enzimático diluido (ver reactivos), en cada pozo que contiene una esfera.

-Se cubre con un nuevo papel adhesivo y se remueven las burbujas de aire atrapadas.

-Se incuba a $40^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por 30 ± 2 minutos.

-Se retira el papel adhesivo y se aspira el líquido.

-Cada esfera se lava por tres veces con 4 a 6 ml de agua

desionizada en el Pentawash y el exceso de agua de lavado es aspirado.

Desarrollo del color:

-Las esferas se transfieren a tubos de ensayo debidamente etiquetados.

-Se pipetea 300 microlitros de una solución de OPP (2.5 mg/ml), que contiene peróxido de hidrógeno a cada tubo con una esfera, así como a 2 tubos blancos, para la calibración del espectrofotómetro (blancos de sustrato).

-Se incuban a temperatura ambiente (20 ± 5 C) por 30 ± 2 minutos en obscuridad para que se efectue la reacción enzimática.

-Se detiene el desarrollo del color al añadir 1 ml de ácido sulfúrico 1 N.

Lectura de los resultados:

-Se calibra a ceros el Analizador Quantum II, empleando uno de los tubos con blanco de sustrato.

-Se determina la absorbancia de los sueros testigo, positivos y negativos, a 492 nanómetros y se calcula el valor de corte que define si una muestra es positiva o negativa. Este valor se obtiene con la fórmula:

$$Lc = CN + 0.1 (CP) \text{ en donde:}$$

Lc = línea de corte

CN = Densidad óptica (OD) promedio de los controles negativos

CP = OD promedio de los controles positivos

- Se determina la absorbancia de las muestras.
- Los valores de DO obtenidos en el ensayo se tabularon para su análisis posterior.

e) Prueba de detección de antígenos

La detección de antígenos del HIV-1 se llevó a cabo por medio de el ensayo inmunoenzimático tipo "sandwich"; "Abbott HTLV-III Antigen EIA" producido por Laboratorios Abbott, Chicago, Illinois.

Método:

Primera incubación:

- Se Pipetea 20 microlitros de amortiguador diluyente de muestras en los pozos de una placa de reacción.
- Se añaden 200 microlitros de suero testigo o de muestra problema (el testigo positivo se corre por triplicado y el negativo por duplicado) a cada cavidad de la placa.
- Se agrega una esfera recubierta con anticuerpos humanos anti-HIV-1, al fondo de cada cavidad que contiene una muestra de suero.
- Se cubre con un papel adhesivo y se eliminan las burbujas de aire atrapadas, agitando suavemente la placa.
- Se incuba la placa a temperatura ambiente ($20^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$) durante 16-20 horas.
- Se retira el papel adhesivo y se aspira el líquido de las cavidades en una trampa de vacío conectada a un recipiente con desinfectante (Benzal).

-Cada esfera es lavada tres veces con 4 a 6 ml de agua desionizada.

-Se elimina por aspiración el exceso de líquido de la placa de reacción.

Segunda incubación:

-Se distribuyen 200 microlitros de solución de anticuerpos de conejo anti-HIV-1, (ver reactivos), a cada esfera en la placa.

-Se cubre con nuevo papel adhesivo y se eliminan las burbujas de aire atrapadas.

-Se incuba a $40^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 4 horas \pm 10 minutos.

-Se retira el papel adhesivo y se aspira el líquido en la trampa de vacío.

-Se repite el proceso de lavado y aspirado del exceso de líquido de la placa.

Tercera incubación:

-Se distribuyen 200 microlitros del conjugado de anticuerpos de cabra, anti-IgG de conejo con peroxidasa de rábano dentro de pozo (ver reactivos).

-Se cubre con papel adhesivo y se eliminan las burbujas atrapadas.

-Se incuba a $40^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 2 horas \pm 10 minutos.

-Se retira el papel adhesivo y se aspira el líquido de las cavidades en la trampa de vacío.

-Se repite el proceso de lavado.

-Se elimina el exceso de agua de la placa de reacción.

Desarrollo del color:

-Las esferas son transferidas a tubos de ensayo debidamente identificados.

-Se pipetea 300 microlitros de solución de OPD (2.5 mg/ml), recién preparada a cada tubo que contiene una esfera, y a dos tubos vacíos para la calibración del Analizador Quantum.

-Se incuba a temperatura ambiente ($20^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$) durante 30 ± 2 minutos en la oscuridad.

-Se agrega 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo incluyendo los blancos de sustrato.

Lectura de los resultados.

-Se calibra el analizador Quantum a ceros, empleando un blanco de sustrato

-Se determina la absorbancia de los testigos positivos y negativos a 492 nanómetros y se calcula la línea de corte con la fórmula:

$L_c = CN + 0.05$ en donde:

L_c = línea de corte

CN = $\overline{00}$ promedio de los controles negativos

-Se determina la absorbancia de las muestras.

-Los valores de $\overline{00}$ obtenidos se tabulan para su análisis posterior.

f) Detección de anticuerpos específicos ENVA/CORE

Para la detección de anticuerpos específicos contra la envoltura y contra la nucleocápside del HIV-1, por separados, se utilizó el ensayo inmuno-enzimático de tipo competitivo; "Abbott ENVA/CORE HIV-1 EIA" de Laboratorios Abbott, Chicago, Illinois.

Método:

Preparación de la placa de reacción ENVA:

- Se distribuyen 20 microlitros de amortiguador diluyente de muestras en las cavidades de la placa de reacción.
- Se pipetea 50 microlitros de suero problema o de suero control (a) control negativo se corre por triplicado y el positivo por duplicado).
- Se distribuyen 200 microlitros de la dilución del conjugado enzimático de anticuerpos humanos anti-env, con peroxidasa de rábano (ver reactivos).
- Se agrega una esfera recubierta con antígenos de envoltura del HIV-1 a cada pozo que contenga una muestra de suero o un control.
- Se cubre con un papel adhesivo.
- Se eliminan las burbujas atrapadas al golpear suavemente la placa de reacción.

Preparación de la placa de reacción CORE:

- Se distribuyen 20 microlitros de diluyente de muestras en el fondo de las cavidades de la placa.

- Se agregan 50 microlitros de suero problema o de suero control (se emplea el mismo número de controles que para la reacción ENVA).
- Se añaden 200 microlitros de dilución del conjugado enzimático de anticuerpos humanos anti-core con peroxidasa de rábano a cada pozo de la placa (ver reactivos).
- Se agrega cuidadosamente una esfera recubierta de los antígenos HIV-1 de la nucleocápside a cada cavidad.
- Se cubre con un papel adhesivo.
- Se eliminan las burbujas de aire atrapadas golpeando suavemente la placa de reacción.

Incubación:

- Las placas de reacción de ambos sistemas se incuban a temperatura ambiente durante 18 a 22 horas.
- Se retira el papel adhesivo y se aspira el líquido de las cavidades en una trampa de vacío que contiene un desinfectante adecuado (Benzal).
- Se lava cada esfera con agua desionizada tres veces con 4 a 6 ml de agua cada vez.
- Se elimina el exceso de líquido de la superficie y de las cavidades de la placa por aspiración.
- Las esferas se transfieren a tubos de ensayo debidamente etiquetados.

Desarrollo del color:

- Se pipetea 300 microlitros de solución de OPD (2.5 mg/ml) a cada tubo que contiene una esfera, así como a dos tubos vacíos para calibrar el Analizador (blancos de sustrato).
- Se cubren e incuban a temperatura ambiente ($20^{\circ} \pm 5^{\circ}C$) durante 30 ± 2 minutos, en la oscuridad.
- Se detiene la reacción enzimática con 1 ml de ácido sulfúrico 1 N en cada tubo y en los blancos de sustrato.

Lectura de los resultados:

- Se ajusta a ceros de OD el Analizador Quantum II con un blanco de sustrato (el mismo blanco para ambos sistemas).
- Se determina la absorbancia de los testigos positivo y negativo a 492 nanómetros y se calcula la línea de corte según la fórmula:

$$Lc = CN (0.5) + CP (0.5)$$
en donde:
CN = OD promedio de los controles negativos
CP = OD promedio de los controles positivos
- Se lee la absorbancia de las muestras y de los controles a 492 nanómetros.
- Los valores de OD de las muestras se tabulan para su análisis posterior.

η) Ensayos de Inmuno-electrotransferencia (Western-Blot)

Se utilizó el ensayo comercial "HIV-1 Western-Blot", producido por los Laboratorios Organon Teknika, Bélgica, y en algunas muestras Western-blot fabricados en el laboratorio, para

la detección de anticuerpos contra los diferentes antígenos del HIV-1 en las muestras de suero.

Teoría del ensayo:

Los antígenos del HIV-1 se separan por su peso molecular al correrse por electroforesis en un gel de acrilamida al 12.5% con dodecil-sulfato de sodio (SDS) y se transfieren por difusión a una membrana de nitrocelulosa.

Se cortan tiras de 0.4 cm de ancho, de la hoja de papel de nitrocelulosa y se incuban con muestras de suero para que los anticuerpos de las muestras reaccionen con los antígenos presentes en la membrana.

La reacción antígeno-anticuerpo se observa mediante la incubación de cada tira con una dilución de un complejo de anticuerpos de conejo anti-IgG humana con biotina, seguida de otra con peroxidasa de rábano y avidina, y se hace reaccionar con un sustrato cromógeno en este caso el sustrato es Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

El análisis de las muestras se realiza visualmente al determinar la presencia de bandas específicas de los antígenos virales en las tiras ensayadas.

El ensayo comercial se efectuó según las especificaciones del fabricante (Laboratorios Organon), las cuales básicamente son las mismas que para el Western preparado por nosotros.

Método del Western-blot:

-Se preparan las soluciones de dilución (amortiguador de PBS pH 7.0 con 0.2 % de tween-20 y 1 % de albúmina bovina sérica) y de lavado (PBS con tween-20 al 0.2%).

-Se llenan los datos de una hoja de registro de Western, en que se anotan los sueros problema y los sueros control que van a correrse.

-Se corta el número necesario de tiras de 4 mm de ancho de una hoja de nitrocelulosa con los antígenos del virus, se numeran y se colocan en las charolas de corrimiento del ensayo (charolas de Rin-Rad).

Primera incubación:

-Se agregan 2.5 ml de amortiguador de dilución a cada carril de la charola de reacción que tiene una tira.

-Se añaden 15 microlitros de la muestra de suero a cada tira en el carril correspondiente según la hoja de registro.

-Se cubre la charola con plástico adherente y se incuba por 60 +/- 5 minutos a 37° +/- 1 °C.

-Se aspira el líquido de los carriles en una trampa de vacío con desinfectante (Benzal concentrado).

-Se lava cada tira con 3 ml de amortiguador de lavado en agitación (150 rpm) durante 5 minutos por tres veces.

Segunda incubación:

-Se añaden 2 ml de una dilución de 1:500 de anticuerpos de

ternera anti-IgG humana en complejo con biotina (Laboratorios Amersham, Gran Bretaña).

-Se cubre con plástico adherente y se incuba por 60 +/- 5 minutos a 37° +/- 1 °C.

-Se repite el proceso de lavado.

Tercera incubación:

-Se agregan 2 ml de una dilución 1:500 de complejo de peroxidasas de rábano picante biotinilada y con estreptoavidina (Laboratorios Amersham, Gran Bretaña).

-Se cubre e incuba por 60 +/- 5 minutos a 37° +/- 1 °C.

-Se repite el proceso de lavado.

-Se da un lavado más con amortiguador PBS y en agitación (150 rpm).

Desarrollo de las bandas:

-se añade a cada carril 2 ml de reactivo de revelado, (dilución 1:2,000 de tetrahidrocloreuro de diamino-benzidina y 1:2,000 de peróxido de hidrógeno en PBS pH 7.0).

-Se deja reaccionar por 2 a 3 minutos y la reacción se detiene al lavar con agua desionizada.

-Las tiras se secan al aire, sobre una hoja de papel filtro.

-Una vez secas, se colocan en hojas de registro debidamente identificadas para cada muestra de suero ensayada y se procede a su interpretación visual.

RESULTADOS:

Los ensayos de ELISA para cada corrida efectuada fueron estandarizados, de la siguiente manera:

Lr/DOm para los ensayos de detección de anticuerpos (ENVA/CORE)

DOm/Lc para el ensayo de detección de antígeno en donde:

DOm = Absorbancia de la muestra

Lc = Línea de corte del ensayo

Esto además de permitirnos corregir parte del error experimental al realizar el mismo ensayo para muestras diferentes en días distintos, nos permite expresar los resultados en términos de niveles relativos de anticuerpos para cada muestra.

La tabla II muestra el promedio y los valores máximo y mínimo de los niveles relativos de anticuerpos contra la envoltura y contra la cápsida, los niveles relativos de antígeno y el número de muestras incluido en los diferentes grupos de sueros según su estadio clínico.

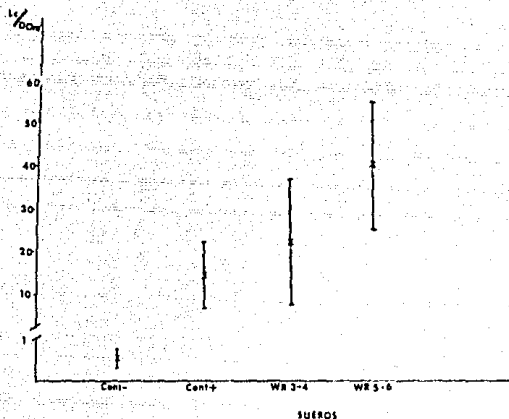
TABLA II
 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE ELISA

GRUPOS	N ^o	ACPS-ENV			ACPS-CORE			ANTIGENO		
		PROMEDIO	INTERVALO		PROMEDIO	INTERVALO		PROMEDIO	INTERVALO	
CONT (-)	10	0.589	0.432	1.040	0.589	0.429	0.674	0.314	0.278	0.800
CONT (+)	4	15.527	4.327	27.300	11.588	5.677	18.200	3.160	1.54	6.000
WR 3-4	49	23.553	2.737	81.800	11.011	0.600	140.000	0.436	0.302	4.470
WR 5-6	7	31.750	13.950	58.400	11.811	0.499	36.720	1.111	0.377	4.742

Niveles relativos de anticuerpos contra la envoltura (anti-env), contra la cápsida del virus (anti-core) y niveles de antígeno por grupo de sueros estudiados. Se muestran el promedio y los valores máximo y mínimo de los cocientes DOc/DOm y DOm/DOc para los ensayos de detección de anticuerpos y de antígeno para los 4 grupos de suero respectivamente.

En la gráfica 1 se hace una comparación de los niveles relativos de anticuerpos contra la envoltura viral, para los cuatro grupos de sueros estudiados, graficándose el promedio y la desviación estándar de los cocientes Lc/DOm . Se observa que hay una tendencia hacia el aumento en el nivel de anticuerpos al avanzar el estadio de la enfermedad, con valores promedio de $Lc/DOm = 15.6 (+/- 7.5)$, $23.5 (+/- 14.6)$ y $31.7 (+/- 15.2)$ para los grupos testigo positivo, estadios WR 3-4 y WR 5-6 respectivamente.

Gráfica 1
NIVELES DE ANTI-ENV POR GRUPO



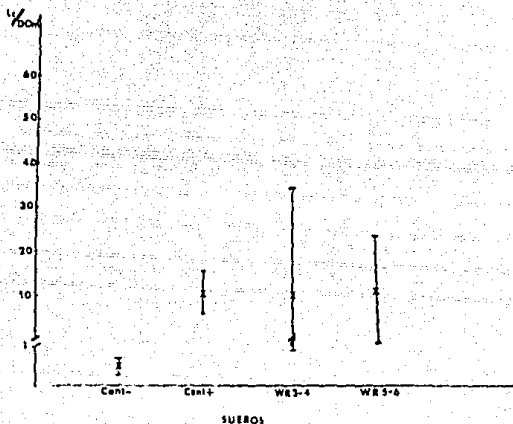
Comparación de los niveles de anticuerpos contra la envoltura viral por grupo estudiado. Se grafica el promedio (X) y la desviación estándar (línea vertical) de los valores Lc/DOm para cada uno de los grupos de suero. Notese el rompimiento en la escala vertical para graficar los datos del grupo testigo negativo.

La gráfica 2 muestra la misma comparación realizada para los niveles de anticuerpos contra la nucleocápside. En el presente estudio los anticuerpos contra la cápside viral se mantienen en el mismo nivel tanto en individuos asintomáticos, como en pacientes con síntomas avanzados de la enfermedad. Los valores del cociente Lc/ODn para los grupos testigo positivo, WR 3-4 y WR 5-6 son de 11.6 (+/- 4.7), 11.0 (+/- 24.5) y 11.8 (+/- 12.0) respectivamente.

La comparación de los niveles de antígeno para los sueros estudiados muestra un incremento en la presencia de este marcador al avanzar la enfermedad. En la gráfica 3 se observa que en promedio el nivel de antígeno en las muestras de pacientes en estadio avanzado es mayor que el de pacientes con sintomatología temprana. Los niveles relativos de antígeno son 0.636 (+/-0.453), 1.111 (+/-1.530) y 3.16 (+/-2.024) para los grupos WR 3-4, WR 5-6 y testigos positivos respectivamente.

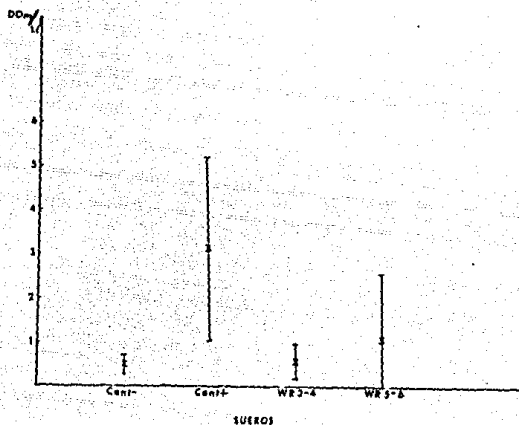
En los ensayos de Western-blot las tiras de nitrocelulosa empleadas en cada muestra, fueron interpretadas visualmente para determinar la presencia de anticuerpos contra las proteínas gp160, gp120 y gp41 (del gen "env"), p66, p51 y p31 (del gen "pol") y p55, p24 y p17 (del gen "gag") según el criterio (+) para positivos, (-) negativos y (+/-) indefinidos para cada una de las bandas virales específicas, que se compararon con las bandas de un suero testigo positivo y un testigo negativo de referencia.

Gráfica 2
NIVELES DE ANTI-CORE POR GRUPO



Se hace una comparación de los niveles de anticuerpos contra la cápside, graficando el promedio y la desviación estándar del cociente ODc/ODm para cada grupo de sueros. La escala para graficar los valores del grupo testigo negativo se marca con un rompimiento en el eje vertical.

Grafica 3.
NIVELES DE ANTIGENO POR GRUPO



Se comparan los niveles de antígeno en las muestras de pacientes en estadios temprano y avanzado de la enfermedad, el nivel promedio (DDm/DDC) de antígenos es mayor en los pacientes con sintomatología avanzada, respecto de pacientes en estadios tempranos.

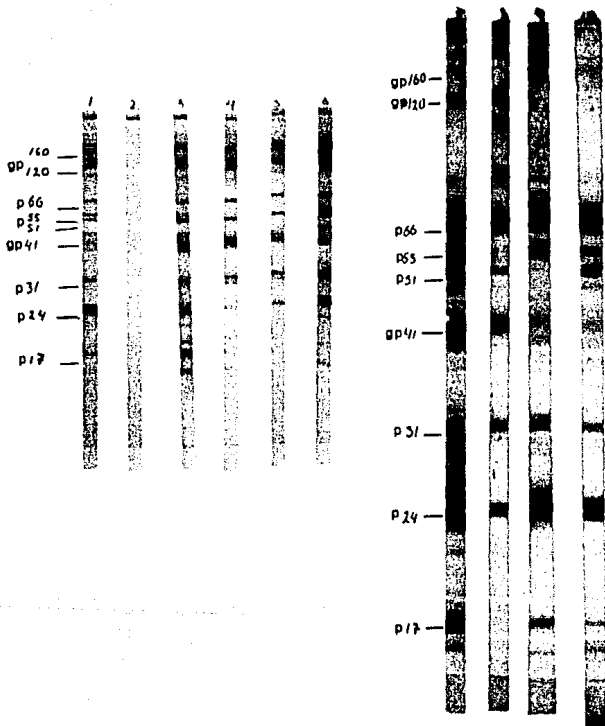
La figura 5 muestra los diferentes patrones de respuesta obtenidos por Western-blot, tanto con un ensayo comercial, como con tiras de nitrocelulosa para Western-blot preparadas en el laboratorio. Las tiras corresponden al suero testigo positivo (1), testigo negativo (2), una muestra reactiva a todas las proteínas virales (3), muestra no reactiva a p55 (4), y muestras con diferente patrón de respuesta a las proteínas del gen "gag" (5 a 10). Las tiras 1 a 6 fueron corridas con el ensayo comercial de Laboratorios Organon y 7 a 10 corridas en Western preparado en el laboratorio.

En la tabla III se observan los resultados de los análisis de Western-blot de las muestras, en donde tenemos el porcentaje de sueros que fueron reactivos a las diferentes proteínas virales para los dos grupos de pacientes estudiados.

En el grupo de sueros en estadio WR 3-4, el 100% de ellos presenta anticuerpos contra todas las proteínas de los genes "env" y "pol", mientras en el grupo WR 5-6 el 100% fue reactivo a las proteínas de envoltura y a dos productos del gen "pol" (p66 y p31) pero solo el 86% (6/7) presentó anticuerpos contra la proteína p51. En ambos grupos, es contra las proteínas del gen "gag" en donde encontramos mayor variación en los patrones de respuesta inmune. 84% de los sueros en estadio WR 3-4 y 71% de estadio WR 5-6 presentan respuesta contra el precursor p55, en los dos grupos el 100% es reactivo contra p24 mientras que contra p17 reaccionan el 57% de sueros WR 3-4 y 71% de los WR 5-6.

Fig. 5

PATRONES DE RESPUESTA POR WESTERN-BLOT



(1), testigo positivo (2), testigo negativo, (3 a 6), muestras positivas a anticuerpos anti HIV-1 con el ensayo comercial de Laboratorios Organon; (7 a 10), muestras positivas con Western-blot preparado en el laboratorio.

TABLA III
 REACCIONES OBTENIDAS EN WESTERN-BLOT

PROTEINAS VIRALES

gp160 gp120 66 p55 p51 gp41 p31 p24 p17

	gp160	gp120	66	p55	p51	gp41	p31	p24	p17
WR 3-4	100%	100%	100%	82%	100%	100%	100%	100%	57%
WR 5-6	100%	100%	100%	71%	86%	100%	100%	100%	71%

Respuesta inmune ante los diferentes antígenos del HIV-1 por western-blot. Se muestra el porcentaje de reactividad que presentaron los sueros de pacientes a las distintas proteínas virales.

DISCUSIÓN.

El presente trabajo forma parte del proyecto general "Caracterización molecular de la epidemia de SIDA en México" a cargo de la Dra Carmen Soler Claudín, realizándose en el laboratorio de Virología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en colaboración con la Dirección General de Epidemiología, de la Secretaría de Salud, La Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud.

Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar cuales son los antígenos virales del HIV-1 más frecuentemente reconocidos por los sueros de pacientes mexicanos, tanto en estadios tempranos como en estadios avanzados de la enfermedad, se trató de encontrar alguna relación entre la presencia y/o ausencia de marcadores en suero y el estado clínico de los pacientes.

Los reportes anteriores sugieren que existe una relación directa entre la presencia de antígenos, la ausencia o un bajo título de anticuerpos contra la nucleocápside viral y el grado de desarrollo de la enfermedad (48 a 51, 53 a 56).

El total de sueros de pacientes fue analizado para tratar de establecer si existe esta relación en nuestro estudio. En la tabla IV se observa el número de muestras con o sin anticuerpos contra la cápside, y/o antígenos, para los dos grupos de sueros de pacientes.

Al realizar una prueba estadística (chi cuadrada), no encontramos diferencias estadísticamente significativas que indiquen una relación entre la presencia de antígeno/ausencia de anti-core y el estadio clínico del paciente ($\chi^2 = 1.596$ gl = 3 p = 0.001). Sin embargo, debemos tomar en cuenta que el tamaño de la muestra es pequeño, sobre todo el número de sueros de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad.

Tabla IV
RELACION ENTRE EL ESTADIO CLINICO Y LA PRESENCIA DE
ANTICUERPOS ANTI-CORE Y DE ANTIGENO

ESTADIO	CORE (-)	CORE (+)	CORE (-)	CORE (+)
	AGN (-)	AGN (-)	AGN (+)	AGN (+)
WR 3-4	6	39	2	2
WR 5-6	1	5	1	0

Por otra parte, no podemos descartar la posibilidad de que los pacientes en WR 3-4 que no presentan anticuerpos contra la cápside y/o tienen antígenos virales, se encontraran en un periodo de transición hacia el estadio WR 5 al momento de tomar la muestra, aún cuando todavía no presentaban síntomas o alguna otra señal que indique estadios más avanzados de la enfermedad.

Al realizar una prueba estadística (chi cuadrada), no encontramos diferencias estadísticamente significativas que indiquen una relación entre la presencia de antígeno/ausencia de anti-core y el estadio clínico del paciente ($\chi^2 = 1.596$ $g_l = 3$ $p = 0.001$). Sin embargo, debemos tomar en cuenta que el tamaño de la muestra es pequeño, sobre todo el número de sueros de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad.

Tabla IV

RELACION ENTRE EL ESTADIO CLINICO Y LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-CORE Y DE ANTIGENO

ESTADIO	CORE (-)	CORE (+)	CORE (-)	CORE (+)
	AGN (-)	AGN (-)	AGN (+)	AGN (+)
WR 3-4	6	39	2	2
WR 5-6	1	5	1	0

Por otra parte, no podemos descartar la posibilidad de que los pacientes en WR 3-4 que no presentan anticuerpos contra la cápside y/o tienen antígenos virales, se encontraran en un periodo de transición hacia el estadio WR 5 al momento de tomar la muestra, aún cuando todavía no presentaban síntomas o alguna otra señal que indique estadios más avanzados de la enfermedad.

Aunque los resultados de la gráfica 2 señalan que el nivel promedio de anticuerpos contra la nucleocápside se mantiene desde el período de asintomatía, hasta fases tardías de la infección, debe hacerse notar que en los sueros de individuos asintomáticos (sueros testigo empleados), el 100% de éstos (6/6) presentan anticuerpos contra la cápside, mientras que un 16% (8/49) y un 28% (2/7) de los sueros de pacientes en estadios WR 3-4 y WR 5-6, respectivamente resultaron negativos a la presencia de este marcador, datos que apoyan los resultados de otros trabajos [48-51, 53-56, 67-69].

La correlación entre la presencia de antígeno y la ausencia de anticuerpos contra la nucleocápside en el suero de pacientes se muestra en la tabla V. Aunque esta relación no es absoluta, ($\chi^2 = 3.866$, $p = 0.001$ $g1 = 1$), un 60% (3/5) de las muestras positivas a antígeno no presentan anticuerpos contra la nucleocápside además, de las 2 muestras antígeno (+)/anti-core (+) en una de ellas el valor Lc/DDm es muy bajo (1.345), esto es, el nivel de anticuerpos es casi nulo.

Tabla IV

RELACION ENTRE LA PRESENCIA DE ANTIGENO Y ANTI-CORE EN
SUEROS DE PACIENTES

	CORE (+)	CORE (-)
AGH (+)	2	3
AGH (-)	44	7

Por otra parte, en el presente trabajo observamos que al analizar los sueros de individuos asintomáticos, contra los sueros de pacientes con sintomatología temprana o síntomas avanzados de la enfermedad, los niveles promedio de anticuerpos contra la envoltura del virus se incrementan de manera notable. Esta observación no ha sido reportada anteriormente, aunque no tenemos una explicación para dichos resultados.

Tanto por el método de ELISA como por el de Western-blot, se encontró que la mayor variación en la respuesta inmune es contra las proteínas de la cápside del virus.

Por ambos métodos, en el 100 % de sueros se detectaron anticuerpos contra las proteínas de la envoltura. En el análisis de Western-blot, contra las proteínas del gen "pol" sólo 1 de 56 sueros no presentó anticuerpos contra p51.

Al analizar por Western-blot la respuesta contra "gag", el 80 % de sueros presentó anticuerpos contra p55, 100 % contra p24 y un 66 % contra p17. De los 9 sueros negativos en los ensayos de ELISA a anticuerpos contra la nucleocápside, por Western-blot 3 son negativos a p17, 2 a p55 y 4 a ambas proteínas. Además, 8 sueros negativos a p55 y/o p17 en Western-blot son ELISA positivos pero con valores muy cercanos a la línea de corte.

En 2 casos los resultados son claramente contradictorios, ya que tenemos 2 sueros ELISA negativos a proteínas de la cápside (Lc/DDm <1), pero presentan las tres bandas correspondientes a las proteínas de "gag" en el ensayo de Western-blot. Para este resultado no tenemos explicación hasta el momento.

El encontrar un 100% de respuesta contra la proteína p24, detectado mediante los ensayos de Western-blot, difiere de lo reportado para Estados Unidos, en donde se ha observado que al avanzar la enfermedad, el nivel de anticuerpos contra p24 decrece hasta su desaparición total en estadios tardíos de la infección [48 a 51, 53 a 56].

Retomando los objetivos planteados para la realización del presente trabajo, se ha logrado avanzar en los siguientes aspectos:

Se puede observar que existen variaciones en la producción de anticuerpos contra las proteínas virales, principalmente de la nucleocápsida, en los sueros de pacientes incluidos en este trabajo.

No se encontró un patrón de respuesta inmune humoral que esté relacionado con el estadio clínico del paciente.

Es necesario el continuar con el desarrollo de investigación sobre el problema del SIDA en México, pero además, que el trabajo se haga de manera integral, entre las diversas áreas que abordan el problema, solo así se logrará la caracterización y quizás el control de la epidemia.

CONCLUSIONES:

- La presencia de antígeno y la ausencia de anticuerpos contra la cápside viral marcan una diferencia entre sueros de pacientes asintomáticos y de las muestras de los pacientes de este estudio, pero no parecen ser un índice del grado de evolución de la enfermedad.

- En nuestro estudio no son los anticuerpos contra la proteína p24 los que disminuyen de título, sino los anticuerpos contra p55 y/o p17.

- En nuestros resultados, los niveles de anticuerpos contra la envoltura viral se incrementan conforme progresa la infección.

REFERENCIAS:

1-Jeffe, H.W. D.J. Bergman, R.M. Selik. (1983), Acquired Immune Deficiency Syndrome in the United States: The first 1000 Cases, *J Infect Dis.* 2:339-345

2-Centers of Disease Control, (1981), *Pneumocystis pneumonia*, Los Angeles, *MMWR*. 30:250-252

3-Centers of Disease Control Task Force on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections, (1982). Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections, *N Engl J Med.* 306:248-252

4-Durack, D.T., M.B. and D. Phil, (1981), Opportunistic infections and Kaposi's Sarcoma in Homosexual Men, *NEW ENGL J Med.* 305 (24):1465-1467

5-Gottlieb, M.S. et al. (1981), *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men: Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency, *N Engl J Med.* 305 (24):1425-1431

6-Nasur, H. et al. (1981), An Outbreak of Community-acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Initial Manifestation of Cellular Immune Dysfunction, *N Engl J Med.* 305 (24):1431-1438

7-Siegel, F.P. et al. (1981), Severe Acquired Immunodeficiency in Male Homosexuals, Manifested By Chronic Perianal Ulcerative Herpes Simplex Lesions, *N Engl J Med.* 305 (24):1439-1444

8-Hamilton, J.R. et al. (1976), Synergistic Effect on Mortality in Mice with Murine Cytomegalovirus and *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, or *Candida albicans* infections, *Infection and Immunity.* 14:982-989

9-Carney, W.P. et al. (1981), Analysis of T Lymphocyte Subset in Cytomegalovirus Mononucleosis, *J Immunol.* 126:2114-2116

- 10-McDonough, R.J. et al. (1980), Alteration of T and Mill Lymphocyte Frequencies in the Peripheral Blood of Human Opiate Addicts: in vivo evidence for opiate receptor sites on T Lymphocytes, J. Immunol. 125:2539-2543
- 11-Goode, E., Troiden, F.R. (1979), Amyl-nitrite use Among Homosexual Men, Am. J. Epidemiol. 113:1067-1069
- 12-Webster, A. et al. (1980), Cytomegalovirus Infection and Progression Towards AIDS in Haemophiliacs With Human Immunodeficiency infection, Int. Lancet, 2:63-66
- 13-Gallo, R.C. (1984), in Human T-Cell Leukemia Viruses, Cold Spring Harbor Press, Oxford, page. 1-8
- 14-Jean, L. Marz, (1983), Human T-Cell Leukemia Virus Linked to AIDS, Science, 220 :806-809
- 15-Gallo, Robert, C. et al. (1983), Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), Science, 220 :865-867
- 16-Essex, M. et al. (1983), Antibodies to Cell Membrane Antigens Associated With Human T-Cell Leukemia Virus in Patients With AIDS, Science, 220 :859-862
- 17-Gelmann, E.P. M. Popovic, et al. (1983), Proviral DNA of a Retrovirus, Human T-Cell leukemia Virus, in two Patients With AIDS, Science, 220 :862-865
- 18-Barre-Sinoussi, F. et al. (1983), Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), Science, 220 :868-871
- 19-Montagnier, L. (1984), in Human T-Cell Leukemia Viruses, Cold Spring Harbor Press, Oxford, page.363-379
- 20-Gallo, R.C. et al. (1984), Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS, Science, 224 :500-503
- 21-Popovic, M. et al. (1984), Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and pre-AIDS, Science, 224 :497-500
- 22-Schupbach, J. et al. (1984), Serological Analysis of a Subgroup of Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) Associated with AIDS, Science, 224 :503-505
- 23-Sarngadharan, M.G. et al. (1984), Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS, Science, 224 :506-508

- 24-Muesing, A.M. et al. (1985), Nucleic Acid Structure and Expression of the Human AIDS/Lymphadenopathy Retrovirus, *Nature*, 313:450-458
- 25-Coffin, J. et al. (1986), Letter to the Editor, *Science*, 232:1607
- 26-Clavel, F. et al. (1986), A New Human Retrovirus from West African Patients With AIDS, *Science*, 233:343-346.
- 27-Allan, J.S. et al. (1985), Major Glycoprotein Antigens That Induce Antibodies in AIDS Patients Are Encoded by HTLV-III, *Science*, 229:1091-1094
- 28-Berlin, F. et al. (1985), Virus Envelope Proteins of HTLV-III Represents Major Target Antigen for Antibodies in AIDS Patients, *Science*, 228:1094-1096
- 29-Sodroski, J. et al. (1986), Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity, *Nature*, 322:470-474
- 30-Kowalski, M. et al. (1987), Functional Regions of the Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *Science*, 237:1351-1355
- 31-Gattentau, J. and R.A. Weiss, (1988), The CD4 Antigen: Physiological Ligand and HIV Receptor, *Cell*, 52:631-633
- 32-Siliciano, R.F. et al. (1988), Analysis of Host-Virus Interactions in AIDS with Anti-gp120 T Cell Clones: Effect of HIV Sequence Variation and a Mechanism for CD4+ Cell Depletion, *Cell*, 54:561-575
- 33-Maddon P.J. et al. (1988), HIV Infection Does Not Require Endocytosis of Its Receptor, CD4, *Cell*, 54:865-874
- 34-Essex, M. et al. (1985), Antigens of Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus, *Ann Int Med*, 103(5):700-703
- 35-Fleener, CH. et al. (1988), Characterization of Human Immunodeficiency Virus gag/pol Gene Products Expressed by Recombinant Vaccinia Viruses, *Virology*, 166:339-349
- 36-Casay, J.M. et al. (1985), Human T-Cell Lymphotropic Virus Type III: Immunologic Characterization and Primary Structure Analysis of the Major Internal Protein, p24, *J Virol*, 55(2):417-423
- 37-Ghrayeb, J. et al. (1986), Human T-Cell Lymphotropic Virus Type III (HTLV-III) Core Antigens: Synthesis in *Escherichia coli* and Immunoreactivity with Human Sera, *DMB*, 5(2):97-99

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

59

38-Cheng, Y. et al. (1987), Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase, J Biol Chem. 262 (5) :2187-2189

39-Farmerie, W.G. (1987), Expression and Processing of the AIDS Virus Reverse Transcriptase in *Escherichia coli*, Science, 236 :309-308

40-Guyader, M. et al. (1987), Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2, Nature, 326 :662-669

41-Braddock, M. et al. (1989), HIV-1 TAT "Activates" Presynthesized RNA in the Nucleus, Cell, 58 :269-279

42-Emerman, M. et al. (1989), The rev Gene Product of the Human Immunodeficiency Virus Affects Envelope-Specific RNA Localization, Cell, 57 :1155-1165

43-Muesing, M.A. et al. (1985), Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus, Nature, 313 :450-458

44-Ostrove, J.M. et al. (1987), Activation of the Human Immunodeficiency Virus by Herpes Simplex Virus Type 1, J Virol, 61 (12) :3726-3732

45-Ranki, A. et al. (1987), Long Latency Precedes Overt Seroconversion in Sexually Transmitted Human Immunodeficiency-Virus Infection, The Lancet, 9 :589-593

46-Gaines, H. et al. (1987), Respuesta de Anticuerpos en la Infección Primaria por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, The Lancet, (Ed. Esp.), 11(4) :290-294

47-Min-Ji Chou et al. (1988), Antibody Responses in Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Hemophiliacs, J Infect Dis. 157(4) :805-811

48-Weber, J.W. et al. (1987), Human Immunodeficiency Virus Infection in Two Cohorts of Homosexual Men: Neutralising Antibody and Association of Anti-Gag Antibody with Prognosis, The Lancet, 1 :119-127

49-Scrupbauch, et al. (1985), Antibodies to HTLV-III in Swiss Patients with AIDS and pre-AIDS and in groups at risk for AIDS, N Engl J Med. 312 :265-270

50-Franchini, G. et al. (1987), Spectrum of Natural Antibodies Against five HTLV-III Antigens in Infected Individuals: Correlation of Antibodies Prevalence with Clinical Status, Blood, 69 :437-441

- 51-Orgad, S. et al. (1987), Antibodies to HIV in Israeli Homophiles, Relationship Between Serological Profile and Disease Development, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 3 :323-332
- 52-Matson, J.D. et al. (1987), *Molecular Biology of the Cell, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.*, pp 936-945
- 53-Leffers, J.J. et al. (1988), Letter to the Editor, *The Lancet*, 5 :1220-1221
- 54-Fuchs, D. et al. (1988), Predicting AIDS, *Br Med J*, 297 :1543
- 55-Gerda, G. et al. (1987), Letter to the Editor, *The Lancet*, 9 :282-283
- 56-Leffers, J.J. et al. (1987), Letter to the Editor, *The Lancet*, 9 :283
- 57-Weh, P. et al. (1988), Natural Killer Cell Activity as a Prognostic Parameter in the Progression to AIDS, *J Infect Dis*, 157 (4): 851-857
- 58-Helle, P.M. et al. (1988), Clinical Importance of HIV Antigen and HIV Core Markers in Persons Infected With HIV (letter to the editor), *The N Engl J Med*, 5 :1204-1205
- 59-Austin, P.F. et al. (1983), Sensitive Radioimmunoassay for the Broad-Spectrum Antiviral Agent Ribavirin, *Antim Ag Chemoth*, 24 (5): 696-701
- 60-Frikkson, R. et al. (1977), Inhibition of Influenza Virus Ribonucleic Acid Polymerase by Ribavirin Triphosphate, *Antim Ag Chemoth*, 11 (6): 946-951
- 61-Rosham, R.R. et al. (1979), The Broad Spectrum Antiviral Agent Ribavirin Inhibits Capping of mRNA, *Bioch Bioph Res Com*, 89 (3): 830-836
- 62-McCormick, J.R. et al. (1984), Ribavirin Suppresses Replication of Lymphadenopathy-Associated Virus in Cultures of Human Adult T Lymphocytes, *The Lancet*, Dic. 15: 1367-1369
- 63-Sidwell, P.W. et al. (1972), Broad-Spectrum Antiviral Activity of Virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, *Science*; 177: 705-706
- 64-Streeter, D.J. et al. (1973), Mechanism of Action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, (Virazole), a New Broad-Spectrum Antiviral Agent, *Proc Natl Acad Sci USA*; 70 (4): 1174-1178

- 65-Willis, P.C. et al. (1978), Adenosine Kinase Initiates the Major Route of Ribavirin Activation in a Cultured Human Cell Line, Proc Natl Acad Sci USA; 75 (7): 3042-3044
- 66-Yamada, Y. et al. (1988), Action of the Active metabolites of Tiazofurin and Ribavirin on Purified IMP-Dehydrogenase, Biochemistry; 27: 2193-2196
- 67-Allain, J.P., et al. (1987), Long-term Evaluation of HIV Antigen and Antibodies to p24 and gp41 in Patients with Hemophilia: Potential Clinical Importance, N. Engl. J. Med. 317 :1114-1121
- 68-Allain, J.P. et al. (1986), Serological Markers in Early Stages of Human Immunodeficiency Virus Infection in Haemophiliacs, The Lancet, Nov 29 :1233-1236
- 69-Deborah, P.A. et al. (1987), Correlation of Serum HIV Antigen and Antibody With Clinical Status in HIV-Infected Patients, J Med Virol, 22 :357-363
- 70-Goudsmit, J. et al. (1987), Antigenemia and Antibody Titers to Core and Envelope Antigens in AIDS-Related Complex and Subclinical Human Immunodeficiency Virus Infection, J Infect Dis, 155 (3) :558-560
- 71-Bryan, R.C. and C.G. Warner. (1989), Regulatory Pathways Governing HIV-1 Replication, Cell, 58 :423-426
- 72-Coffin J. et al. (1985), Human Immunodeficiency Viruses, eter, Science, 232 :697
- 73-CDC US, Department of Health Science and Human Services, (1986), Classification System for Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus Infection, Ann Int Med, 10 :234-237
- 74-Mosquera O.C. (1989), Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida, Laborat-Acta, vol. 1 (4) :30-39
- 75-Levy, J.A. (1989), AIDS, Marcel Dekker Inc. New York, 632 pp
- 76-Berkhout, B. et al. (1989), Tat Trans-Activates the Human Immunodeficiency Virus through a Nascent RNA Target, Cell; 59 :273-282
- 77-Laspia, M.F. et al. (1989), HIV-1 Tat Protein Increases Transcriptional Initiation and Stabilizes Elongation, Cell; 59 :283-292
- 78-Rosen, C.A. G.N. Pavlakis, (1990), Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression, AIDS, 4 :499-509

79-Chang, D.A. P.A. Sharp, (1990), Regulation by HIV Rev Depends upon Recognition of Splice Sites, *Cell*, 59 :789-795

80-Benko, D.M. et al. (1990), A Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protein, tev Shares Sequences with tat, env and rev Proteins, *J Virol*, 64 (6) :2505-2510

81-Shwartz, S. et al. Cloning and Functional Analysis of Multiply Spliced mRNA Species of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *J Virol*, 64 (6) :2519-2529