



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

7
rey

RELACION INMUNE Y MOLECULAR ENTRE
LOS VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 Y TIPO 2

T E S I S
Que para obtener el Grado Académico de
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P r e s e n t a
NINA VALADEZ GONZALEZ

Directora de Tesis:
M. en C. CARMEN SOLER CLAUDIN

México, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

003466

7
24

INSTITUTO NACIONAL Y UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MEXICO
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS
ELECTRICAS Y ELECTRONICAS

INSTITUTO NACIONAL Y UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MEXICO
CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS
ELECTRICAS Y ELECTRONICAS

DR. V. BLADEZ GONZALEZ

Director de Tesis

MEXICO, D. F.

•Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la SS.

•La síntesis del péptido se realizó bajo la asesoría de la Dra. Gohar Gevorkian en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM..

A mi hija:

CLAUDIA RAQUEL

Con todo mi amor.

A mis padres José Valadez y Candelaria González por el cariño y gran apoyo que me han brindado siempre.

A mis hermanos: Miriam, Alex y Erik por su cariño.

A mis primos: Rosalía, Ramón y Díthel.

Agradecimientos:

A la Dra. Carmen Soler por el apoyo incondicional que me brindó durante el desarrollo de este proyecto y por su amistad.

Al Dr. Fernando Puerto por su amistad y el apoyo incondicional que me ha brindado siempre.

Al Dr. Carlos Larraalde por las facilidades prestadas para realizar la síntesis del péptido y el análisis de imágenes en su laboratorio.

A la Dra. Gohar Gevorkian por su asesoría en la síntesis del péptido.

A la Q.F.B. María del Carmen Basualdo por haber realizado los ensayos de radioinmunoprecipitación.

A la Dra. Georgina Gurrola por la asesoría técnica brindada, para cortar el péptido de la resina.

A la Ing. Quim. Tzipe Govezensky por su asesoría para realizar el análisis de imágenes.

Al M. en I.B.B. José Gudiño por su gran amistad y su asesoría en el manejo de los programas de computación.

A mis amigos: Gabriela García, Patricia Alcantara, Amine Barquet, Joaquín Escandón, Fernanda Martínez, Claudia Gómez, Angélica López, Roberto Vázquez, Gerardo Kono, Alejandro Padilla, Mónica Viveros, María del R. González y Marilyn Puerto.

INDICE

RESUMEN	1
I INTRODUCCION.	
Antecedentes	3
Epidemiología de la infección por HIV-2	4
Morfología	4
Biología	5
Manifestaciones Clínicas	5
Clasificación de la infección por HIV	7
Genoma viral	8
Ciclo viral	10
Antigenicidad	11
Similitud en las proteínas de HIV-1 y HIV-2	13
II OBJETIVOS	15
III MATERIAL Y METODOS	
Material Biológico	16
Ensayo de inmunofluorescencia para control de cultivos celulares	16
Preparación de antígeno de HIV	17
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	17
Preparación de nitrocelulosas para inmunoblot	18
Inmunoblot	20
Titulación de sueros	20
Radioinmunoprecipitación	21
Ensayo Liatek HIV-1+2	23
Preparación de suero de conejo hiperinmune anti HIV-2	24
Síntesis química del péptido	24
Ensayo inmunoenzimático con el péptido	26
Ensayo de inhibición por competencia con el péptido	26
Análisis estadístico	27
IV RESULTADOS	
Respuesta inmune humoral hacia HIV-2	28
Reactividad con HIV-2 por vía de infección	30
Reactividad con HIV-2 respecto al estado clínico	30
Radioinmunoprecipitación de proteínas de HIV-2	31
Resultados del ensayo Liatek HIV 1+2	32
Titulación de sueros por IB	33
Análisis teórico de la glicoproteína transmembranal	34
Comparación de secuencias de HIV-1 y HIV-2	36
Antigenicidad del epitopo II de HIV-2	38
Reactividad con el péptido de HIV-2	39
Inhibición por competencia con el péptido de HIV-2	41
V DISCUSION	42
VI CONCLUSIONES	46
VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

RESUMEN

Desde la identificación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se han identificado 2 tipos de HIV, el HIV-1 aislado en 1983 que se encuentra distribuido en todo el mundo y el HIV-2 el cual se aisló por primera vez en 1986 y que se encuentra básicamente restringido al oeste de África con pocos casos confirmados en otras partes del mundo y cuyo origen se pudo documentar también en el oeste de África.

HIV-1 y HIV-2 presentan propiedades biológicas y organización genómica similares. Las proteínas codificadas por los genes *gag* y *pol* de HIV-1 y HIV-2 muestran un alto grado de conservación del genoma lo cual se refleja en un alto grado de reactividad serológica cruzada. Las glicoproteínas de la envoltura son menos conservadas y la seroreactividad contra las glicoproteínas de los 2 tipos de HIV, hasta hace poco tiempo era considerada como sugestiva de una infección con los 2 tipos de HIV.

Desde 1987, algunos países han reportado casos de reacciones cruzadas con las glicoproteínas de envoltura, en especial con la gp 110 de HIV-2, sin embargo, muy pocos de estos estudios reportan reacciones cruzadas entre las glicoproteínas transmembranales de los 2 tipos de HIV. Una excepción son los estudios de África Occidental, donde la infección con HIV-2 tiene una de las prevalencias más altas registradas, en los cuales se reporta una reactividad del 3 al 14%.

Resultados preliminares obtenidos con sueros mexicanos positivos a HIV-1, a los cuales se les realizó Inmuno Blot (IB) con antígeno de HIV-2, muestran una reactividad del 30% con la glicoproteína transmembranal de este virus y en ninguno de estos casos se ha confirmado infección con los 2 tipos de HIV.

Los objetivos de este proyecto fueron: determinar la presencia de reacciones con HIV 2 en sueros de individuos Mexicanos positivos a HIV 1, con que proteínas de HIV 2 se presentaba la reactividad y que regiones o epitopos de dichas proteínas son las que están involucradas en dicha reacción.

Se realizó IB con antígeno de HIV-2 a 492 sueros HIV-1 positivos y 162 sueros HIV-1 negativos que se utilizaron como controles.

En el análisis de los IB realizados encontramos que en el grupo de seropositivos a HIV 1 (388) el 79% de los sueros presentó reactividad con por lo menos una proteína de HIV 2. El grupo control de seronegativos a HIV-1 únicamente presentó un 1.8% de reactividad y ésta solo se observó con la proteína p24. La reactividad observada con las diferentes proteínas de HIV-2 fue p24 (71%), glicoproteína transmembranal (24%) y gp110 (9%)

Al hacer la correlación de la presencia de reacciones con HIV-2 con la vía de transmisión de la infección, observamos que en el grupo de transmisión sexual el 81% de los sueros presenta reacción y en el grupo de transmisión sanguínea el 39%.

Se realizó una titulación a los sueros que presentaron reactividad fuerte con la glicoproteína transmembranal de HIV-2, en la cual se observó una mayor reactividad con antígeno de HIV-1 que con el de HIV-2, aunque algunos sueros reaccionaron con el antígeno heterólogo a diluciones altas.

Con el ensayo comercial Liatek HIV-1 + 2 se descartó la infección con los 2 tipos de HIV.

Se compararon las secuencias de la glicoproteína transmembranal de ambos tipos de HIV, observando que los 2 dominios reportados en la literatura como fuertes inductores de anticuerpos, presentan una similitud en la región del dominio inmunodominante I del 77.7% y en el dominio II del 72%. Con el ensayo Liatek se eliminó la participación del epítipo I en las reacciones observadas y se propuso el epítipo II como probable responsable de la reactividad cruzada observada.

Se sintetizó un péptido que representa el epítipo II de la glicoproteína transmembranal de HIV-2, se probaron 10 sueros que presentaron reactividad con esta proteína por IB, encontrando que todos los sueros reaccionaron con este péptido y en ensayos de competencia con el péptido en solución se logró inhibir en un gran porcentaje la reactividad con dicho péptido.

Con este estudio se descartó la infección con los dos tipos de HIV. Las reacciones con HIV-2 de los sueros Mexicanos positivos a HIV-1 son de reactividad cruzada. Esta reactividad cruzada es más prevalente en el grupo de individuos infectados por vía sexual. Se encontró una mayor reactividad cruzada contra la glicoproteína transmembranal de HIV-2 que la reportada en la literatura para otras regiones geográficas. Se demostró la participación del epítipo II de la glicoproteína transmembranal en la reactividad cruzada observada.

I

INTRODUCCION

1) Antecedentes.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) constituye sin duda la primera pandemia de la segunda mitad del siglo XX. Detectado en 1981, sus orígenes hay que buscarlos en el Africa Central, donde probablemente se produjo la primera infección de un ser humano, quizá en la década de los 50. Se cree que desde esa zona se propagó al Caribe y posteriormente a Estados Unidos y Europa. Solo en América del Norte podría haber actualmente unos 2 millones de personas infectadas. En las áreas endémicas de Africa y el Caribe la situación es mucho más grave, en algunas zonas podría ser demasiado tarde para impedir la muerte de un número alto de personas (1,2).

A los 3 años de haberse detectado la enfermedad ya se había demostrado en forma inequívoca que el agente causal del SIDA era el tercer retrovirus humano conocido, el HTLV-III (Virus linfotrópico de células T humanas), también llamado LAV (Virus asociado a linfadenopatía) y actualmente conocido como HIV (virus de inmunodeficiencia humana) (3).

En 1985, el grupo de Essex aisló de un mono verde africano un virus emparentado con el HTLV-III, denominado STLV-III o SIV (Virus de la inmunodeficiencia de simio), el cual podría ser el antecesor del virus causante del SIDA.

No obstante que el STLV-III es el retrovirus animal más parecido al HTLV-III, su parentesco no es especialmente notable, ya que por estudios genéticos realizados, se ha demostrado que la similitud de las secuencias de nucleótidos entre el STLV-III y el HTLV-III es del orden del 50%. En ambos virus la organización del genoma es virtualmente idéntica. Las excepciones más notables se refieren al gen *vpx* de STLV-III ausente en HTLV-III. Además el virus de simio no es patogénico para sus hospederos habituales (4,5).

En 1985 se aisló un nuevo retrovirus humano el HTLV-IV, de individuos del Africa Occidental, el cual puede corresponder al eslabón perdido entre el HTLV-III y el STLV-III ya que esta muy emparentado con el STLV-III y aunque no se ha definido muy bien su patogenidad, infecta al hombre (6-8).

Más tarde, de la misma región de Africa se aislaron 2 virus muy emparentados con el HTLV-IV, los cuales si causan deficiencia inmunológica en el hombre, son el LAV-2 y el SBL-6669 (9,10).

Actualmente al HTLV-III y virus relacionados se les conoce como HIV-1 (Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1) y al grupo de HTLV-IV, LAV-2, SBL-6669 y virus relacionados como HIV-2 (Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 2) (11).

Al igual que otros retrovirus, el material genético de los virus de la inmunodeficiencia humana es RNA de una sola cadena. Cuando el virus entra a una célula, la enzima viral transcriptasa reversa utiliza ese RNA como molde para sinteti-

zar una molécula de DNA de doble cadena. Este penetra al núcleo de la célula y se integra en sus cromosomas, donde se replica conjuntamente con el DNA de la célula hospedera (12).

2) Epidemiología de la infección por HIV-2.

El HIV-2 es un virus que es más prevalente en el Oeste de Africa. El país con la prevalencia más alta es Guinea-Bissau. Se han encontrado otros casos en Senegal, en las islas de Cabo Verde, y en algunos países situados más al este como Guinea, Malí, Burkina Faso, la República Central Africana y Costa de Marfil (7). En los países de Africa Central, Ecuatorial y del Este en los cuales la infección con HIV-1 ha alcanzado proporciones endémicas, la infección con HIV-2 es muy baja (13). Existen reportes de individuos con un perfil sugestivo de infección doble con HIV-1 y HIV-2, el suero de estos pacientes reacciona fuertemente con las proteínas de envoltura de ambos virus. Sin embargo, los resultados del análisis en ensayos de competencia o con péptidos específicos de algunos sueros que presentan doble reactividad sugieren que esta reactividad no siempre debe ser considerada como una infección doble (14-17), aunque esto no significa que no es posible la infección mixta, ya que existen reportes de casos en los cuales se ha confirmado la infección con los 2 tipos de HIV por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por aislamiento de ambos tipos de virus (18-20). También es posible la infección de células *in vitro* con ambos tipos de HIV. Debido a la alta frecuencia de recombinación genética entre retrovirus relacionados, es posible teóricamente que se originen cepas recombinantes de estas infecciones dobles, sin embargo, aún no han sido demostrados estos virus recombinantes(21).

La diseminación del HIV-2 fuera del Oeste de Africa parece estar muy limitada. Se han reportado varios casos en Francia, Portugal, Alemania Occidental, España y en la India (22-27). La mayoría de estos casos se encontraron en individuos que se infectaron en el Oeste de Africa, pero también se ha encontrado en otros que nunca han viajado a esta parte del mundo, y pertenecen a grupos de alto riesgo para infección por HIV. En Estados Unidos solo se han reportado 32 casos de infección con HIV-2 (28-30), 2 casos en Canadá (31) y 2 casos en Brasil (20).

3) Morfología.

Los HIV pertenecen a la subfamilia de los Lentivirus, cuyo virus prototipo es el virus Visna (32). Ultraestructuralmente los 2 tipos de HIV son muy parecidos. Las partículas virales son de forma esférica, de aproximadamente 100 nm de diámetro. El núcleo o "core" de la partícula tiene forma de cono truncado y puede observarse por microfotografías como una zona densa. La nucleocápside se encuentra rodeada de una membrana lipídica con protuberancias proteicas que en algunos casos pueden observarse por microscopía.

El núcleo o "core" esta formado principalmente por la proteína p24 que se encuentra rodeando a 2 moléculas de RNA de cadena sencilla que se encuentran asociadas a la proteína p9 y al complejo enzimático de la transcriptasa reversa. La nucleocápside se completa con la proteína p17. Esta partícula nucleoproteica se rodea de una membrana lipídica, la cual obtiene por gemación a través de la membrana de la célula huésped. En esta membrana se encuentran 2 glicoproteínas de origen viral: la glicoproteína transmembranal, embebida en la membrana y que sirve de anclaje para la glicoproteína externa que forma las protuberancias características de estos virus (33,34).

Aunque existe una gran variabilidad entre cepas, aún tratándose del mismo virus, se ha observado que el HIV-2 muestra protuberancias más prominentes que el HIV-1, y la estabilidad de estas protuberancias se ha relacionado con la patogenicidad de la cepa. Las cepas virales que liberan más glicoproteína externa de su superficie (por lo tanto en microscopía se presentan con menos protuberancias) parecen ser más patogénicas y menos inmunogénicas que aquellas que mantienen sus glicoproteínas unidas a la membrana (35).

4) Biología.

Al igual que el HIV-1, el HIV-2 infecta células que poseen la proteína CD4 en su superficie. A pesar de las diferencias encontradas entre las glicoproteínas de envoltura de ambos tipos de HIV, los dos virus utilizan la molécula CD4 como receptor (36).

La mayoría de los aislados de HIV-2 son citopáticos in vitro, inducen formación de sincicios y muerte celular. Sin embargo, la intensidad de este efecto citopático es variable dependiendo del tipo celular y del aislado.

Se han reportado aislados con baja citopaticidad (37,38), pero es poco claro si ésta se correlaciona con una baja patogenicidad in vivo. Existen pocos aislados de HIV-2 en estudio y es necesario realizar una investigación más amplia de las características biológicas de este virus, que incluyan aislados de diferentes pacientes con diferentes cuadros clínicos.

5) Manifestaciones clínicas.

El estado de salud de los individuos de los cuales se aísla un virus es uno de los medios de evaluar el potencial patogénico del mismo. El HIV-2 ha sido aislado de individuos sanos y de pacientes con SIDA. Aunque hay reportes de casos de asociación de infección con HIV-2 y SIDA (35,39-41), sin embargo, estos estudios no proporcionan evidencias sobre la relación entre exposición al HIV-2 y el desarrollo del cuadro clínico del SIDA (42).

A pesar de haber mucha similitud en el cuadro clínico de SIDA entre los casos de infección con HIV-1 y HIV-2, se ha reportado un periodo de latencia clínica más largo en individuos infectados con HIV-2 (43-45). Estudios realizados en

Francia de donadores sanguíneos infectados con HIV-2 y los receptores de sus productos sanguíneos, han documentado un período de infección con HIV-2 de 14 a 16 años sin signos de inmunodeficiencia (44,46). Hay reportes de casos de SIDA por HIV-2 con sobrevida estable de por lo menos 3 años después del diagnóstico de SIDA (43). En un estudio comparativo de casos de SIDA por HIV-1 y HIV-2, realizado por Le Guenno (47) en el hospital militar de Senegal, reporta una sobrevida dos veces mayor en casos de SIDA por HIV-2 en comparación con los casos por HIV-1. Si se considera que la sobrevida de un caso de SIDA por HIV-1 en este hospital es de aproximadamente 6 meses, la diferencia encontrada es muy importante. Gody y cols. (45) también reportan una sobrevida mayor en casos de SIDA por HIV-2 en Costa de Marfil.

Marlink y cols. (48) realizaron un estudio en prostitutas del Oeste de Africa, en el cual no encuentran diferencias entre el grupo de seropositivas a HIV-2 y el grupo control de seronegativas, en cuanto a signos asociados a SIDA y linfadenopatía generalizada. Posteriormente se realizó una evaluación similar en Gambia (49) en el cual encuentran que la frecuencia de linfadenopatía generalizada en el grupo de prostitutas seropositivas a HIV-2 es 3 veces mayor que en el grupo control de seronegativas. Los resultados de un estudio de comunidad realizado en Guinea Bissau mostraron que el grupo de seropositivos a HIV-2 presenta disminución de las cuentas de linfocitos CD4+ y de la relación CD4+ CD8, en comparación con el grupo control de seronegativos, y que en los seropositivos que además presentaban linfadenopatía estos valores eran más bajos que en los seropositivos sin linfadenopatía (50).

En 1991 se llevó a cabo una investigación con un grupo de prostitutas de Gambia, en el cual compararon el estado inmunológico del grupo de seropositivas a HIV-1 con el grupo de seropositivas a HIV-2, en el cual encontraron que ambos grupos presentan alteración de la respuesta inmune, sin embargo en el grupo de seropositivas a HIV-2 el porcentaje de linfocitos CD4+ y la relación CD4+ CD8+, son significativamente más altos, y el porcentaje de CD8+ es más bajo, en este estudio se muestra que el HIV-2 es menos patogénico que el HIV-1 (51).

Max Essex y cols. reportan en 1994 (52), los resultados de un estudio clínico prospectivo que comprende de 1985 a 1993, realizado con mujeres infectadas con HIV-1 o con HIV-2, en el cual encontraron que las infectadas con HIV-1 tienen el 67% de probabilidad de tener una sobrevida de 5 años sin síntomas de SIDA en comparación con el 100% en las infectadas con HIV-2. La frecuencia de progresión hacia cuentas anormales de linfocitos CD4+ fue significativamente menor en el grupo de infecciones con HIV-2 que en los casos de HIV-1. Otros resultados de este estudio sugieren que la infectividad por vía sexual es de 5-9 veces menor en HIV-2. Otros estudios sobre transmisión perinatal reportan que la eficiencia de transmisión vertical es 15 a 20 veces menor en HIV-2 (53-56).

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que HIV-1 y HIV-2 tienen comportamiento biológico diferente, uno de los determinantes de estas diferencias podría ser una menor carga viral en HIV-2 (57), lo que se ha determinado en base a estudios de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por aislamiento viral, aunque también se proponen otros factores propios del virus o del hospedero que

podrían afectar la virulencia del HIV-2, para lo cual es necesario realizar más estudios sobre las diferencias biológicas básicas de estos dos virus.

6) Clasificación de la infección por HIV.

Dado el espectro tan amplio de las manifestaciones clínicas del SIDA, además del rápido aumento en el conocimiento del virus y de la enfermedad, se hizo necesario establecer un sistema de clasificación de los diferentes estadios clínicos. En la tabla 1 se presenta una comparación entre los estadios que considera 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(58), y sus equivalencias con el sistema propuesto por el centro hospitalario Walter Reed de Washington, E. U., diseñado principalmente para estudios clínicos y de investigación (59).

SISTEMA CDC		SISTEMA WALTER REED	
GRUPO	CARACTERISTICAS	GRUPO	CARACTERISTICAS
		WR-0	Exposición al virus
CDC I	Infección aguda	WR-1	T4 = 800 cel/mm ³ , seropositivos
CDC II	Infección asintomática	WR-2	T4 = 500-400 cel/mm ³
CDC III	Linfadenopatía generalizada persistente	WR-3	T4 < 400 > 200 cel/mm ³ Disfunción inmunológica
CDC IV	Otras enfermedades	WR-4	Anergia cutánea parcial
A	Enfermedad constitutiva		
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		
E	Otras condiciones		

Tabla 1.- Comparación de los sistemas de clasificación de la infección por HIV propuestos por los Centros de Control de Enfermedades (CDC) y el hospital Walter Reed.

7) Genoma viral.

El genoma de los HIV es RNA de una sola cadena, de tipo positivo, de alto peso molecular. En la figura 1 se presentan los genomas de los 2 tipos de HIV los cuales se caracterizan por tener 3 genes: *gag*, *pol* y *env* que codifican para proteínas estructurales del virus. En ambos extremos del genoma se encuentran las regiones terminales LTR que tienen funciones reguladoras. Además ambos tipos de HIV tienen 6 genes que codifican para proteínas reguladoras (60-63).

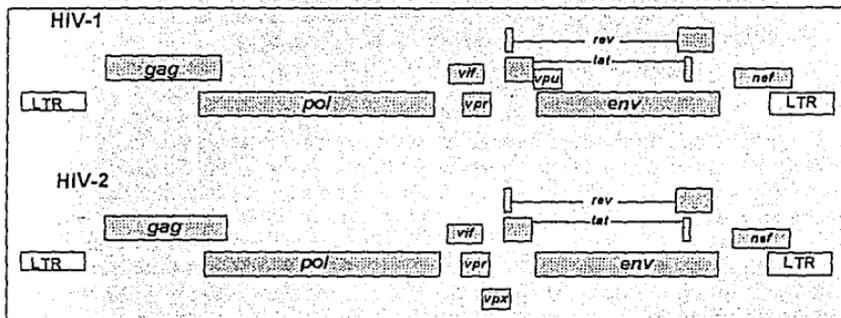


Figura 1.- Comparación esquemática de los genomas de HIV-1 y HIV-2.

En HIV-1 los genes estructurales codifican para proteínas que forman la partícula viral o que tienen actividades enzimáticas indispensables para su replicación. El gene *gag* codifica para una proteína *p55*, que es el precursor de las proteínas de la nucleocápside del virus (*p24*, *p17* y *p15*); *pol* tiene la información para las enzimas transcriptasa reversa (*p51*, *p66*), integrasa (*p31*) y proteasa (*p10*) y *env* codifica para un precursor glicosilado, *gp160* que es procesado en la glicoproteína externa de membrana (*gp120*) y la glicoproteína transmembranal (*gp41*).

Los genes que codifican para proteínas reguladoras se pueden agrupar en 2 clases: 1) genes que producen proteínas esenciales para la replicación del HIV (*tat* y *rev*) y 2) genes que realizan funciones accesorias que afectan la replicación y/o la infectividad (*vif*, *nef*, *vpr*, *vpu* en HIV-1 y *vpx* en HIV-2) (64,65).

Tres de los genes reguladores *tat*, *rev* y *nef*, juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión viral.

El gen *tat* codifica para una proteína activadora, esta compuesto de 2 secuencias codificadoras que se encuentran separadas en el genoma, y que tienen la información genética para producir una proteína difusible de 86 aa, la cual con la interacción de las secuencias de los LTR's, aumenta la expresión de los genes de HIV y por lo tanto la producción de nuevas partículas virales. La proteína *tat* interactúa con una secuencia nucleotídica corta, localizada dentro del LTR 5' de los transcritos de RNAm del HIV (66-73). De estudios realizados con los produc-

tos del gen *tat* de ambos tipos de HIV se ha observado que la proteína *tat* de HIV-1 actúa igual en los LTR's de los 2 tipos de HIV, mientras que la proteína equivalente en HIV-2 no es activa en el LTR de HIV-1. Esta activación cruzada incompleta ha sido atribuida al hecho de que el LTR de HIV-2 además del grupo de secuencias blanco que son comunes a ambos virus, tiene secuencias únicas que sólo son responsivas para el transactivador producido por él mismo (74).

El gen *rev* (regulador de la expresión de proteínas virales), al igual que *tat* esta formado por 2 exones que codifican para una proteína de 116 aa. Esta proteína es esencial para regular el procesamiento del RNA y el transporte del RNA completo del núcleo al citoplasma (75-79).

El gen *nef* (regulador negativo) produce una proteína cuya función es disminuir o detener la expresión viral. Su secuencia responsiva se encuentra en el LTR. Se cree que *nef* también funciona ayudando al HIV a permanecer latente dentro del DNA de la célula huésped (80-83).

El balance de la acción de los productos reguladores de *tat*, *rev* y probablemente *nef* determina que el virus se exprese en un momento determinado y por lo tanto controla el desarrollo de la infección y el que ésta sea controlada, latente o lítica (84). Este fenómeno de regulación positiva/negativa está relacionado con la patogenicidad de las distintas cepas.

La proteína producida por el gen *vif* se encuentra en las partículas virales maduras (85,86) es muy conservada entre las distintas cepas (aún de HIV-2) y si muta no se afecta la replicación viral. Se ha probado que la proteína codificada por *vif* controla la actividad de las partículas virales libres (87), las cuales disminuyen considerablemente su capacidad infectiva si el gen sufre mutaciones.

En cuanto al producto de *vpr*, hay muy poca información, se sabe que induce anticuerpos en individuos infectados y parece estar involucrado en el aumento de la producción de virus (88,89).

Los 2 tipos de HIV tienen un sexto gen regulador, *vpu* en HIV-1 y *vpx* en HIV-2, este último también se encuentra en SIV (65,90,101). El producto del gen *vpu* parece estar relacionado con el fenómeno de ensamblaje y liberación de partículas virales de las células infectadas (101).

La proteína *vpx* se encuentra asociada a las partículas maduras y aunque se desconoce su función, recientemente se ha visto que las partículas virales producidas por una clona de HIV-2 mutada en el gen *vpx* no pueden infectar linfocitos humanos frescos y si pueden infectar células de líneas tumorales CD4⁺(104).

Además de los marcos de lectura, todos los genomas tienen unas regiones llamadas repetidos terminales largos (LTR) esenciales para la transcripción reversa, la integración y la transcripción del DNA viral (65).

Regiones genómicas definidas en el LTR 5'

R: Secuencia directamente repetida (12-250 bases, 97 en HIV-1) la cual, durante la síntesis de DNA forma un puente para transferencia de la cadena creciente de un extremo del genoma al otro.

U5: Secuencia única (80-200 bases, 82 en HIV-1) adyacente a R.

PB (de *primer binding site*): Sitio de unión para el RNA de transferencia (tRNA) que se utiliza como iniciador para la síntesis del DNA viral. En el caso de HIV, el

iniciador es el tRNA^{Lys} y el sitio de unión consiste invariablemente de 18 bases complementarias a este tRNA.

Región Líder. Es la secuencia entre el PB y el inicio de *gag*. Usualmente tiene 2 funciones: es el sitio donador para el procesamiento del mensajero y además tiene una señal importante para el ensamble de los viriones.

Regiones genómicas definidas en el LTR 3'

PP (tracto de polipurina): Un grupo de 10 o más residuos de G y A que marcan el sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva de DNA.

U3: Región única en el RNA próxima al extremo 3' que varía en longitud desde 200 a 453 bases. Cuando se ha formado el DNA proviral, el LTR 5' adquiere esta región, que consiste principalmente de secuencias relacionadas con el inicio y la regulación de la transcripción.

R: El extremo 3' del RNA viral contiene una segunda copia de la secuencia repetida idéntica a la del extremo 5'.

Todos los elementos de los LTRs de HIV-2 son más largos que en HIV-1, U5 es de 125, U3 556 y R 173 pares de bases y en HIV-1 son de 82, 456 y 97 pares de bases respectivamente (116).

El análisis de los productos de transcripción de HIV-2 indica que estos son similares a los del HIV-1; un RNAm de 9 Kb que corresponde al transcrito completo y 3 tipos de RNAm procesados que son de 5, 4.5 y 2 Kb respectivamente.

En los viriones el genoma está presente en 2 copias unidas una a la otra por apareamiento de bases en múltiples puntos, se cree que la presencia de 2 copias permite un alto nivel de reparación del daño de una sola cadena de RNA relativamente frágil (117,118).

8) Ciclo viral.

La infección empieza con la unión del virus a través de su glicoproteína externa gp120 a un receptor celular, que se ha identificado como la molécula CD4 (91,93). La presencia de esta proteína en una célula marca su susceptibilidad a ser infectada por el HIV.

El dominio de gp120 responsable de la interacción con CD4 está localizado en la zona carboxilo terminal de la molécula, alrededor del aa 400. La unión de gp120 a CD4 es el primer paso del ciclo y la fusión subsecuente de las membranas requiere de la membrana viral, posiblemente gp41 y de otros factores celulares. Recientemente se ha encontrado que uno de estos factores es la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), también conocida como CD26 (105). Esta proteasa de serina corta sus substratos en secuencias específicas, las cuales están altamente conservadas en el asa de V3 de HIV-1, HIV-2 y SIV.

Una vez en el citoplasma, la nucleocápside se desintegra y son liberados el RNA y la enzima transcriptasa reversa. Después de una serie de procesos entre los cuales destacan la unión de un tRNA^{Lys} como iniciador de la polimerización, a uno de los extremos del genoma viral, y la duplicación de ambos extremos del RNA para completar la estructura U3-R-U5 de los LTR, se inicia la síntesis de

DNA por la TR que utiliza como molde el RNA genómico viral; a esto sigue la degradación de la hebra de RNA del híbrido DNA-RNA mediante la actividad RNAasa H de la misma enzima; la duplicación de la cadena de DNA y la integración del provirus en el genoma del hospedero mediante la acción de la integrasa (p31) que también está codificada por el gen *pol* (94,95). La célula queda así permanentemente infectada y con el virus integrado en forma permanente.

Después de un periodo variable, en el cual el virus integrado permanece en estado de latencia 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, se realiza simultáneamente la síntesis 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 (96). Se han encontrado una gran variedad de RNAm producidos por procesamiento de transcritos de casi la totalidad del genoma viral, de los cuales se originan los mensajeros para las diferentes proteínas reguladoras. (97-99)

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 envoltura, que es glicosilado en el aparato de Golgi y posteriormente es 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 (100-102). Este transcrito viral es traducido como un precursor de 180 kD, el cual se une en un extremo a la membrana celular. Mientras el precursor permanece anclado a la membrana, la proteasa, codificada por este mismo marco de lectura (103), madura a través de un proceso de autocatálisis y permite el procesamiento de las diferentes proteínas de la nucleocápside, p17 queda unida a la membrana, p24 forma la cápside del virus y p15 se corta 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 formando una nueva partícula viral, la cual es liberada por exocitosis, la cual es capaz de transmitir la infección a otras células (75,76,104,107).

9) Antigenicidad.

Todas las proteínas codificadas por los genes estructurales de ambos tipos de HIV son inmunogénicas *in vivo* (tabla 2).

De estudios realizados para ver el grado de reactividad cruzada entre HIV-2 y HIV-1, se encontraron anticuerpos contra proteínas codificadas por los genes *gag* y *pol* de HIV-1 en la mayoría de gente infectada con HIV-2. En estos estudios no se encontró reactividad cruzada con las glicoproteínas de la envoltura (108).

GEN	PROTEINA				FUNCION
	HIV-1		HIV-2		
<i>gag</i>	p55	p18	p55	p16	Proteínas de la nucleocápside
		p24		p24	
		p15		p12	
<i>pol</i>		p12	p12		Proteasa
		p66/51		p66	Transcriptasa reversa
		p31		p31	Integrasa
<i>env</i>	gp160	gp120	gp140	gp110	Glicoproteína externa
		gp41		gp32/41	Glicoproteína transmembranal
<i>vpr</i>		p18		p12	Desconocida
<i>vpu</i>		p15		-	Liberación partículas virales
<i>vpx</i>		-		p15	Desconocida
<i>vif</i>		p23		p25	Factor de infectividad viral
<i>tat</i>		p14		p11	Regulador +. Transactivador
<i>rev</i>		p19		p14	Modulador de la expresión de proteínas estructurales
<i>nef</i>		p27		p28	Regulador negativo temprano

Tabla 2.- Productos proteicos y funciones de los genes estructurales y reguladores de HIV-1 y HIV-2. *vpx solamente esta presente en HIV-2, en substitución de vpu que es exclusivo de HIV-1.

Se ha observado que como sucede con otros virus, las proteínas de su parte interna son las que más se conservan y son grupo específicas. En cambio las proteínas de la envoltura son las que se conservan menos y son específicas de tipo (1).

Los estudios de neutralización han mostrado que una gran proporción de sueros HIV-2 positivos son capaces de neutralizar aislados de HIV-2 y además algunos aislados de HIV-1. En cuanto a la neutralización de aislados de HIV-2 por sueros positivos a HIV-1, existe un poco de controversia, ya que en un estudio realizado por Weiss y cols. (109), encuentran que los sueros positivos a HIV-2 pueden neutralizar cepas de HIV-1 y de HIV-2, aunque con el virus heterólogo el título de neutralización es menor, y que los sueros positivos a HIV-1 únicamente neutralizan cepas de HIV-1. En otros estudios Blenda Bottiger, utilizando otra metodología encuentra que la neutralización cruzada es bidireccional, y que con el virus heterólogo los títulos de neutralización son menores (110).

Se han probado casos de infecciones dobles con HIV-1 y HIV-2 en pacientes de Africa, donde ambos tipos de virus son endémicos, (16,18,19). Sin embargo, en otros países como Estados Unidos, Francia, Italia, Inglaterra y algunos países de América Latina como Brasil, Honduras y Chile, se han reportado casos

de reacciones cruzadas entre las glicoproteínas de envoltura en especial con gp110 de HIV-2, en individuos en los cuales únicamente ha sido confirmada la infección con HIV-1 (17,15,111-114).

10) Similitud en las proteínas de HIV-1 y HIV-2.

Al comparar las secuencias de aa de HIV-1 y HIV-2 se ha observado que las proteínas más conservadas son las codificadas por los genes *gag* y *pol* (58 y 59% de similitud respectivamente).

En la tabla 3 se presentan los datos de similitud encontrados al comparar las secuencias de aa de los productos proteicos de los genes estructurales y reguladores de HIV-1 y HIV-2. Como puede observarse, la proteína estructural que presenta menor similitud tanto entre cepas de HIV-1 divergentes (americana y africana) como con HIV-2 es la gp externa. Esta glicoproteína presenta pequeñas regiones de alta similitud, las cuales están localizadas en zonas altamente conservadas entre diferentes aislados de HIV-1 y que podrían corresponder a dominios funcionalmente importantes para la infectividad viral.

La glicoproteína transmembranal de todos estos virus es un poco más conservada que la gp externa, ya que presenta una similitud del 45% entre HIV-1 y HIV-2 y entre aislados de HIV-1 su variabilidad es menor.

REGION	HIV-1USA/HIV-1AFR	HIV-1USA/HIV-2ROD
LTR	85%	30-40%
GAG	90%	58%
POL	95%	59%
ENV	72-80%	42%
gp externa	75-80%	39%
gp transmembranal	85%	45%
tat	70%	43%
rev	52%	45%
nef	63%	38%
vif	83%	35%
vpr	65%	53%

Tabla 3. Similitudes observadas en aminoácidos de diferentes regiones del HIV. Las cepas de HIV-1 que se comparan son HIV-1/MN (USA) y HIV-1/ELI (AFR). La secuencia de HIV-2 corresponde a la cepa HIV-2/ROD.

En México se ha encontrado un 7% de reactividad cruzada con la glicoproteína externa y un 30% con la glicoproteína transmembranal gp32 de HIV-2 en sueros HIV-1 positivos, no habiéndose confirmado en ningún caso infección doble (115).

Estos resultados indican que hay epítomos comunes entre las glicoproteínas de envoltura de HIV-1 y HIV-2, y que el grado de reactividad entre personas infectadas con HIV-1 varía de un individuo a otro, lo cual podría deberse a dife-

rencias en las cepas de HIV-1 o a diferencias en la respuesta inmunológica individual en estos países, en especial en el grupo de países de América Latina en los cuales únicamente se han probado dos casos de infección doble en Brasil.

En este trabajo consideramos importante definir si las reacciones cruzadas entre HIV-1 y HIV-2 observadas en México son debidas a que las cepas virales que circulan en nuestro país son más parecidas a HIV-2 o es parte de la respuesta inmune individual de cada región, lo cual nos ayudaría para evaluar si vacunas diseñadas para otros países podrían ser útiles en nuestro país o si es necesario desarrollar vacunas más específicas de acuerdo a las cepas virales que circulan en cada región.

II

OBJETIVOS

- **Determinar la presencia de reacciones con el HIV-2 en sueros de individuos mexicanos positivos a HIV-1.**
- **Estudiar la reactividad de estos sueros contra la proteína transmembranal de HIV-2.**
- **Establecer los posibles epítomos involucrados en la reactividad hacia la glicoproteína transmembranal de HIV-2.**

III

MATERIAL Y METODOS

1) Material Biológico.

SUEROS.- Se seleccionó un grupo de 654 sueros de individuos mexicanos, de los cuales 492 son positivos y 162 negativos a HIV-1. De los seropositivos se obtuvieron datos sobre vía de transmisión, edad, sexo y estado clínico.

VIRUS.- Se utilizaron las cepas MS de HIV-2 proporcionada por la Dra. Phyllis Kanki y la cepa IIIb/LAV de HIV-1 establecidas permanentemente en células Molt.

Estas cepas se mantienen en cultivo en medio RPMI 1640 con 10% de SFB, 1% de antibióticos/antimicóticos, a 37°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad subcultivándose 2 veces por semana.

2) Ensayo de inmunofluorescencia para control de cultivos celulares.

- Tomar una muestra de 1-2 ml del cultivo 1 o 2 días después del subcultivo.
- Centrifugar a 1250 rpm durante 5 min.
- Remover el sobrenadante(SN), lavar las células con 5 ml de PBS.
- Tirar el SN y resuspender las células en 1 ml de PBS.
- Colocar por duplicado 15 µl de la suspensión en los pozos de una laminilla de microscopía. Procesar en paralelo células no infectadas como control. Dejar secar toda la noche en la campana de bioseguridad.
- Fijar la laminilla con acetona fría durante 10 min, dejar secar y procesar o guardar a -70°C hasta su utilización.
- Diluir el suero positivo utilizado para detección 1:4 en PBS y añadir 20 µl a cada pozo.
- Incubar en una cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
- Lavar la laminilla con PBS 2 veces por 5 min con agitación. Hacer un tercer lavado con agua bidestilada y dejar secar al aire. Los lavados se desechan en solución desinfectante.
- Diluir el conjugado anti-IgG humana fluoresceinado 1:40 en PBS y colocar 20 µl en cada pozo.
- Incubar en una cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
- Lavar con PBS 2 veces por 5 min.
- Colocar la laminilla en una caja de Koplín con 50 ml de agua bidestilada y 500 µl de azul de Evans al 0.04% e incubar 10 min, a temperatura ambiente. Lavar con agua destilada y dejar secar.
- Montar la laminilla con gliceraldehído al 50% en PBS. Observar con microscopio de fluorescencia inmediatamente, o almacenar a 4°C en la oscuridad.
- El verde manzana brillante indica unión específica de los anticuerpos mientras que el rojo, amarillo o verde claro indican un resultado negativo (161).

3) Preparación de antígeno de HIV.

Expandir los cultivos a 6 botellas F75, con un volumen de 30 ml cada una, a una densidad de 500,000 cel/ml. Incubar 72 hrs, a 37°C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Cosechar el sobrenadante (SN), centrifugando los cultivos a 2500 rpm por 10 min.

Filtrar el SN a través de una membrana de 0.45 µm, centrifugar el SN sobre un colchón de 3 ml de sacarosa al 20% por 2 hrs a 25,000 rpm. Tirar el SN y dejar secar la pastilla viral. Añadir 200 µl de solución de lisis a cada tubo y agitar; juntar todos los lisados en un solo tubo y mezclar bien. Separar 50 µl para la cuantificación de proteínas. Añadir 200 µl de solución de muestras 2X por cada tubo, hacer alícuotas de 400 µl y congelar a -20°C hasta su uso (161).

SOLUCIONES

Solución de sacarosa al 20%

20 g de Sacarosa en 100 ml de PBS. Filtrar por una membrana de 0.22 µm.

Solución de lisis

Tris HCl	0.05 M
NaCl	0.15 M
SDS	0.1 %
Tritón X-100	1 %
Ac. deoxicólico	1 %
PMSF	1 mM

Solución de muestras 2X (10 ml)

Tris HCl 0.5 M pH 6.8	3.2 ml
SDS 10%	4 ml
Glicerol	2 ml
DTT	0.308 g
Azul de bromofenol	0.25 %
Agua bidestilada	0.8 ml

4) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Los métodos colorimétricos utilizan una curva estándar construida a partir de diferentes concentraciones conocidas de una proteína de referencia en este caso albúmina sérica bovina (BSA). El valor de absorbancia determinado para la muestra problema se interpola en la curva, permitiendo conocer su concentración.

El método de Bradford modificado presenta varias ventajas sobre otros métodos, como es la rapidez de su realización y la utilización de cantidades pequeñas del reactivo comercial BIO-RAD *Protein Assay*. Este método se basa en el viraje proporcional del azul brillante de coomassie G-250 con respecto a la concentración de proteínas. El colorante se une a residuos de arginina y en menor proporción a histidina, lisina, triptófano y fenilalanina (119).

Procedimiento.

1.- Se construye una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/ml y se hacen diluciones de las muestras problema tal y como se indica en la siguiente tabla.

TUBO	PROT. STD. (µl)	MUESTRA PROBLEMA (µl)	AGUA (µl)	REACTIVO BIO-RAD (µl)
1	0	0	800	200
2	5	0	795	200
3	10	0	790	200
4	15	0	785	200
5	20	0	780	200
6	0	5	795	200
7	0	10	790	200

- 2.- Leer cada muestra en un espectrofotómetro a 595 nm.
- 3.- Graficar los datos de la curva patrón (1-5).
- 4.- Interpolar los datos de la muestra problema.

5) Preparación de nitrocelulosas para el inmunoblot.

1.- Preparación de geles discontinuos de poliacrilamida (161).

La concentración final de acrilamida determina el rango de pesos moleculares que pueden separarse adecuadamente en un gel. Para separar antígenos de HIV se emplea una concentración final de acrilamida de 12.5% en el gel resolutor y de 3% en el gel concentrador, en una cámara Miniprotean II.

Gel resolutor.

Agua desionizada	3.35 ml
Tris HCl 2 M pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
Acrilamida	4.0 ml
Desgasificar 15 min	
Persulfato de amonio 10%	50 µl
Temed	5 µl

Gel concentrador.

Agua desionizada	3.05 ml
Tris HCl 0.5M pH 6.8	1.25 ml
SDS 10%	50 µl
Acrilamida/Bis 30%	0.65 ml
Desgasificar 15 min	
Persulfato de amonio 10%	25 µl
Temed	5 µl

SOLUCIONES:

Acrilamida 30% bis acrilamida 0.8%.

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Aforar con agua dd a	100 ml

Tris-Cl 2M pH 8.8.

Tris Base	24.2 g
Ajustar a pH	8.8
Aforar con agua dd a	100 ml

Tris-Cl 0.5 M pH 6.8.

Tris-Cl	6.05 g
Aforar con agua dd a	100 ml
Ajustar a pH	6.8

Solución de corrida 5X.

Tris Base	15 g
Glicina	72 g
SDS	5g
Aforar con agua dd a	1000 ml

Solución de transferencia 10 X.

NaCl	29.2 g
EDTA	6.724 g
Tris-Base	12.11 g
Aforar con agua dd a	1000 ml

Solución de bloqueo.

Albumina bovina en PBS.	
BSA	3 g
PBS	100 ml

Solución de lavado.

Tween 20	0.2 ml
PBS	100 ml

Solución de dilución para anticuerpos.

Solución de lavado	100 ml
BSA	1 g

Procedimiento.

- Verter 6.8 ml de la mezcla de acrilamida de gel resolutor.
- Añadir en la superficie amortiguador de pH del gel resolutor (Tris HCl 2 M pH 8.8) diluido 1:5 en agua bidestilada (dd).
- Dejar polimerizar 1 hr.
- Tirar la solución amortiguadora y enjuagar con agua dd.

- Añadir el gel concentrador y colocar el peine adecuado.

- Polimerizar por lo menos 30 min.

Cargado de la muestra.

- Quitar con cuidado el peine.

- Enjuagar los pozos con solución de corrida 1X y secar con papel absorbente.

- Incubar el antígeno a 60°C, por 30 min, 250 µg de proteínas totales por cada gel para geles preparativos.

- Colocar los geles en la cámara y añadir solución de corrida 1X.

- Cargar con cuidado la muestra de antígeno en toda la zona del gel. En el carril control cargar el marcador de peso molecular (5 µl de marcador preteñido azul o rainbow).

Corrida del gel.

- Aplicar 60 mA de corriente.

- Observar el colorante y parar la corrida cuando éste llegue a uno o dos mm del borde inferior.

2.- Transferencia de los antígenos separados a papel de nitrocelulosa.

- Cortar 2 pedazos de nitrocelulosa (NC), ligeramente mayores que los geles.

- Remojar las NC en solución de transferencia 1X por lo menos 30 min.

- Sacar el gel, desechar el gel concentrador y lavar el gel resolutor con solución de transferencia 3 veces por 10 min cada vez con agitación ligera.

- Preparar el sandwich de transferencia de la siguiente manera:

- Colocar una hoja de papel aluminio Papel aluminio.

- Poner encima una hoja de envoltura de plástico "Ega pack".

- Colocar un vidrio ligeramente mayor que el gel.

- Poner 3 hojas de papel filtro, mojadas con solución de transferencia.

- Colocar una hoja de NC.

- Acomodar el gel sobre la NC y marcarla.

- Colocar una segunda NC, 3 papeles filtro gruesos y otro vidrio.

- Cerrar el paquete con el "Ega pack" y el papel aluminio.

- Colocar 10 kg de peso encima y dejar transfiriendo por 48 hrs.

3.- Bloqueo de las nitrocelulosas.

- Abrir el sandwich, marcar la segunda NC.

- Colocar las NC en un charola con solución de bloqueo e incubar a 37°C, una hora, con agitación.

- Lavar 3 veces por 5 min con solución de lavado.

- Dejar secar las NC entre 2 hojas de papel filtro grueso.

- Se corta el carril de marcadores de peso molecular.

- Congelar a -20°C hasta su uso.

Control de las NC ya transferidas.

Cada hoja de NC debe controlarse para comprobar la cantidad y calidad de antígeno, para ello se cortan dos tiras de cada hoja y se realiza el procedimiento completo de inmunoblot con un suero control positivo y uno negativo.

6) Inmunoblot.

Preparación:

- Cortar tiras de 3 mm de ancho, numerarlas y colocarlas en una charola.
- Añadir a cada canal de la charola 1 ml de solución de dilución.
- Poner 10 μ l del suero correspondiente a los canales de la charola, incluir un suero control positivo y uno negativo.
- Cubrir la charola, incubar a 37°C, por una hora, con agitación.
- Aspirar los sobrenadantes en una trampa con desinfectante.
- Lavar las tiras con solución de lavado, una vez rápidamente y dos veces por 5 min, con agitación.
- Diluir el anticuerpo anti IgG humana biotinilado, en solución de dilución 1:1000.
- Añadir 1 ml del anticuerpo diluido a cada canal.
- Incubar a 37°C, por una hora, con agitación.
- Al terminar la incubación, tirar la solución y lavar las tiras 3 veces con solución de lavado, por 5 min, con agitación.
- Diluir el complejo estreptavidina peroxidasa 1:500 en solución de dilución y añadir 1 ml a cada canal.
- Incubar a 37°C, por una hora, con agitación.
- Al terminar la incubación, tirar la solución y lavar las tiras 3 veces con solución de lavado, por 5 min, con agitación.
- Lavar una vez más con PBS por 5 min, con agitación.
- Preparar el reactivo de revelado diaminobenzidina (DAB) al 0.05% en PBS y peróxido de hidrógeno al 0.05%.
- Añadir 1 ml de la solución de revelado a cada canal, agitar manualmente y observar la aparición de bandas en el control positivo.
- Al aparecer las bandas claramente en el control tirar la solución y lavar las tiras 3 veces con agua destilada para parar la reacción.
- Dejar secar las tiras en papel absorbente y posteriormente proceder al análisis de las mismas.

7) Titulación de sueros.

Para la titulación se utilizan NC con 250 μ g de proteínas totales de las cepas IIIb/HIV-1 y MS/HIV-2 crecidas en la línea celular Molt.

- Las NC previamente evaluadas con suero control positivo y negativo, se cortan en tiras de 3 mm de ancho. Se utilizan 7 por cada suero de cada una de las cepas.
- Se realizan diluciones de los sueros problema con solución de dilución 1:100; 1:500; 1:1,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:50,000 y 1:100,000.
- Se colocan las tiras en los canales de las charolas y se añade 1 ml de la dilución de suero correspondiente.
- Incubar una hora, a 37°C, con agitación.
- Lavar las tiras con solución de lavado 1 vez rápidamente y 2 veces, por 5 min, con agitación.

- Añadir a cada canal 1 ml de anti-IgG humana biotinilada diluida 1:1000 con solución de dilución.
- Incubar una hora, a 37°C, con agitación.
- Lavar con solución de lavado 3 veces, por 5 min, con agitación.
- Añadir 1 ml del complejo estreptavidina peroxidasa diluido 1:500 con solución de dilución.
- Incubar una hora a 37°C, con agitación.
- Lavar con solución de lavado 3 veces, por 5 min con agitación y 1 vez con PBS, por 5 min.
- Añadir 1 ml de la solución de revelado diaminobenzidina al 0.05% en PBS y peróxido de hidrógeno al 0.05%.
- Al aparecer las bandas claramente en el control tirar la solución y lavar las tiras 3 veces con agua destilada para parar la reacción.
- Dejar secar las tiras en papel absorbente y luego analizar los patrones de bandas obtenidos.

8) Radioinmunoprecipitación.

Debe considerarse la cepa de virus que se esta empleando, por ejemplo, la cepa IIIb/Molt (HIV-1) se marca muy bien y se obtienen buenos resultados con 1×10^6 células/reacción. Para obtener resultados similares con la línea Ms/Molt (HIV-2) se necesitan 2×10^6 cel/reacción.

Marcaje de las células:

El mejor tiempo para marcar es dos días después de subcultivar.

- 1.- Las células se crecen en RPMI 1640 con SFB 20 % y 1% de antibióticos. Deben estar en fase log (densidad de 1 millón de cel/ml) y en el segundo día, después del subcultivo (161).
- 2.- Lavar las células una vez con RPMI-1640 libre de cisteína y/o metionina.
- 3.- Preparar el medio de marcaje: isótopo+RPMI a 1 mCi/ml. Resuspender las células lavadas en medio libre de cisteína/metionina, con 20 % de SFB, 1% de antibióticos, 0.1 mCi/ml de ³⁵S Cisteína y/o ³⁵S Metionina. La mejor densidad de células para marcar es de 1×10^6 /ml. No debe haber mas de 20×10^6 células por frasco. La vida media del ³⁵S es de 90 días.
4. Marcar por 6-8 hrs para HIV-1 o para HIV-2.

Preparación del lisado celular.

1. Centrifugar las células a 1500 rpm durante 5 min, retirar el medio con cuidado y descartar en desechos radiactivos.
2. Lavar las células dos veces, con PBS pH 7.0, estéril, frío. Asegurar que quede lo mas seco posible, se puede usar un hisopo para secar los lados del tubo.
3. Lisar las células con solución de lisis, agregando 200 µl. de esta solución, por cada millón de células. Pipetear o agitar vigorosamente por varios minutos en hielo.
4. Centrifugar el lisado por 1 hr, a 35,000 rpm

5. Puede congelarse a -70°C , o usarse inmediatamente.

Inmunoprecipitación.

- 1.- Preaclaramiento (Opcional): Poner 100 μl de un suero negativo a 1 ml de proteína A sefarosa por 30 min. Incubar el lisado con 1 ml de proteína A sefarosa por cada 5 ml de lisado, por al menos 4 horas, o toda la noche a 4°C en agitación. Centrifugar para separar las perlas y guardar el sobrenadante.
- 2.- Lavar la proteína A sefarosa con PBS.
- 3.- Incubar 10 μl de suero con 100 μl de proteína A sefarosa, por 30 min, a temperatura ambiente.
- 4.- Añadir el lisado directamente, e incubar toda la noche, con agitación a 4°C .
- 5.- Lavar 3 veces con solución de lavado de RIPA con detergentes (3 ml por tubo) Agitar cada tubo antes de centrifugar a 2000 rpm por 2-3 min. Aspirar la solución de lavado cada vez, con cuidado de no quitar las perlas. En el último lavado usar solución de lavado de RIPA sin detergentes. Aspirar todo el líquido después de este último lavado.
- 6.- Resuspender las perlas en 60 μl de solución de muestra 1X. Para correr marcadores de peso molecular preteñidos, añadir 10 μl de marcador a 10 μl de solución de muestra y hervir con las muestras.
- 7.- Hervir las muestras por 2 minutos y centrifugar los tubos de nuevo a 2000 rpm por 2-3 min antes de cargar el gel.

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

- 1.- Se utiliza un sistema estándar de geles discontinuos. Para obtener la mejor separación de las glicoproteínas de envoltura, usar un gel al 10%. Para ver mejor las proteínas de bajo peso molecular utilizar un gel al 12.5%.
- 2.- Lavar los pozos del gel concentrador muy bien con solución de corrida y cargar las muestras con cuidado de no poner las perlas. Para un peine de 20 pozos no poner más de 15 μl y para uno de 15 pozos no más de 20 μl de muestra.
- 3.- Correr los geles aplicando 15 mA en el gel concentrador y 25mA en el resolutor.
- 4.- Fijar el gel toda la noche.

Secado del gel y exposición en la placa.

- 1.- Poner el gel en fijador por 1 hr en agitación.
- 2.- Lavar en agua por 30 min.
- 3.- Secar a 80°C con vacío por 1 hr.
- 4.- Exponer el gel en una placa SB-5 Kodak por lo menos 3 días a -70°C .
- 5.- Revelar la placa hasta que se vean bandas oscuras, lavar varias veces y fijar por 30 min, dejar la placa 30 min en agua, secar a temperatura ambiente.

9) Ensayo Liatek HIV 1+2.

- Colocar las tiras en los canales de la charola.
- Añadir 1 ml de diluyente de muestras (incluido en el estuche), a cada canal, excepto a los de los controles positivos y negativos.
- Añadir 10 µl de los sueros problema a los canales correspondientes.
- A los canales de los controles positivo y negativo añadir 1 ml de la muestras correspondientes proporcionadas en el estuche.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar cada tira con 1 ml de solución de lavado, 3 veces por 1 min, con agitación.
- Añadir a cada canal 1 ml de anti IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:100 en el diluyente de muestras del estuche.
- Incubar 30 min a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar cada tira con 1 ml de solución de lavado, 3 veces por 1 min, con agitación.
- Añadir a cada canal 1 ml de solución de sustrato BCIP (bromocloro-indolilfosfato).
- Incubar 30 min a temperatura ambiente con agitación.
- Aspirar el líquido y añadir 1 ml de solución de paro (ácido sulfúrico 0.1 mol/l) a cada canal.
- Incubar de 10 a 30 min a temperatura ambiente con agitación.
- Poner las tiras a secar en papel absorbente para posteriormente interpretar los resultados.

Soluciones del estuche Liatek HIV-1 + 2.

Diluyente de muestras

Solución de fosfatos con cloruro de sodio, tritón, estabilizadores de proteínas y 0.1% de azida de sodio.

Conjugado concentrado

Anti IgG humana (cadenas H+L), marcada con fosfatasa alcalina en solución de Tris con estabilizadores de proteínas y 0.1% de azida de sodio, utilizar diluida 1:100 en el diluyente de conjugado.

Diluyente de conjugado

Solución de fosfatos con cloruro de sodio, tritón, estabilizadores de proteínas y 0.1% de azida de sodio.

Sustrato BCIP concentrado

Solución de bromocloro-indolilfosfato en dimetil formamida para ser diluida 1:100 antes de su uso.

Diluyente de sustrato

Solución de Tris con cloruro de sodio.

Solución de paro

Ácido sulfúrico 0.1 mol/l.

Solución de lavado 5X

Solución de fosfato con cloruro de sodio, tritón y 0.5% de azida de sodio, para ser diluida 1:5 con agua destilada.

10) Preparación de suero de conejo hiperinmune anti HIV-2.

- Se utilizan 2 conejos albinos, Nueva Zelanda, hembras, de 3 Kg.
- La preparación del antígeno de HIV-2 fue igual que el que utilizado para el IB.
- Sangrar por la vena marginal de la oreja para obtener el suero preinmune.
- Inocular 500 µg de antígeno de la cepa MS/HIV-2 con adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea en 5 puntos de inoculación en la región dorsal del conejo. Para cada conejo se preparan 500 µl de antígeno (500 µg de proteínas totales) + 500 µl de PBS + 1 ml de adyuvante completo de Freund y se homogeneiza.
- Procesamiento de la sangre: pasar un aplicador por las paredes del tubo para desprender el coágulo. Incubar a 37°C, 30 min, centrifugar a 1500 rpm por 10 min, separar el suero, allicuotar y marcar como suero normal de conejo. Guardar a 4°C.
- Una semana después se inocula con la misma cantidad de antígeno con adyuvante incompleto de Freund, por vía intramuscular en 2 sitios de inoculación.
- Las siguientes 3 inoculaciones se realizan con intervalos de 1 semana con la misma cantidad de antígeno sin adyuvante por vía intramuscular. En estas ocasiones antes de la inoculación se sangra por la vena marginal de la oreja para probar los sueros obtenidos por IB y ver la reactividad con las proteínas de HIV-2.
- Una semana después de la última inoculación se sangra de nuevo por la oreja para determinar el momento del sangrado completo.
- 2 días después del último sangrado se sangra a blanco, primero por la oreja y luego por punción intracardiaca. Se obtuvieron 90 ml de sangre de cada conejo.
- El proceso de la sangre es similar en todos los casos y el último suero se filtra por una membrana de 0.22 µm y se guarda en viales estériles a -20°C.

11) Síntesis química del péptido.

Se realizó por el método en fase sólida descrito por Barany y Merrifield (120), empleando como soporte una resina de poliestireno-divinilbenceno clorometilada (0.90 meq Cl/g). El primer aminoácido (aa) acoplado fue valina, con su grupo amino (NH₂) bloqueado por el grupo tertbutiloxycarbonil (t-boc), con la finalidad de evitar la reacción con dicho grupo.

Para acoplar la valina a la resina se utilizó el método descrito por Gisin en 1973, que consiste en obtener una sal de cesio del aa que se va a acoplar.

Preparación de la sal de cesio de boc-val.

- 1.- Disolver 500 mg de CsCO₃ en 1 ml de agua desionizada grado HPLC.
- 2.- Disolver 220 mg de Boc-Val en 1 ml de metanol absoluto + 1 ml de agua y ajustar a pH 7 con el CsCO₃ y evaporar con vacío el metanol y el agua.
- 3.- Liofilizar durante 4 hr.

Acoplamiento a la resina.

- 1.- Disolver el liofilizado anterior en dimetilformamida (DMF) y añadir 500 mg de la resina, dejar a 50°C con agitación durante 72 hrs.

2.- Lavar la resina con DMF, 2 veces, por 1 min; DMF al 80% en agua, 2 veces por 1 min; metanol 2 veces, por 1 min y por último con CH_2Cl_2 dos veces, por 1 min. Secar con vacío.

3.- Para determinar la cantidad de aa acoplado, utilizar 10 mg de la resina. Añadir ácido trifluoroacético (TFA) al 50% en CH_2Cl_2 dejar en agitación suave, a temperatura ambiente, durante 30 min. Lavar con CH_2Cl_2 3 X 1 min. Neutralizar con diisopropiletilamina (DIEA) al 10% en CH_2Cl_2 , 2 veces, por 1 min. Lavar con CH_2Cl_2 , 5 veces, por 1 min.

Tratar con una solución de ácido pícrico 0.1M en CH_2Cl_2 , 2 veces, por 3 min. Lavar con CH_2Cl_2 , 5 veces, por 2 min. Agregar DIEA 10%, 4 veces, por 2 min, colectando esta solución y aforar a 50 ml con metanol, esta es la solución patrón. Diluir la solución patrón 1:10 con metanol. Leer DO a 358 nm y calcular la cantidad de aa acoplado a la resina.

Acoplamiento del siguiente aminoácido.

1.- Remover el grupo t-boc de la valina mediante tratamiento con TFA al 50%, 1 vez, por 2 min y 1 vez, por 30 min, a temperatura ambiente, con agitación suave.

2.- Lavar con CH_2Cl_2 e isopropanol y neutralizar con DIEA 10%.

3.- Agregar el siguiente aa en este caso ácido aspártico, en un exceso de 2 eq, utilizando 2 eq de diclorohexilcarbodiimida (DCC) como agente acoplante. El ácido aspártico tiene bloqueado su extremo NH_2 por el grupo t-boc y su cadena lateral por el grupo benzil éster. De esta forma se logra que el aa añadido reaccione a través de su extremo COOH con el extremo NH_2 del aa unido a la resina, formándose así el enlace peptídico.

4.- Cada paso de acoplamiento se controla haciendo reaccionar alícuotas de péptido de los distintos pasos, con ninhidrina. Si la prueba resulta negativa (amarillo), esto indica la ausencia de grupos NH_2 libres, si es positiva (azul) indica la presencia de grupos NH_2 reactivos. Cuando el resultado de la prueba es positivo, indicando que el acoplamiento no es total, se repite el ciclo, acoplándose nuevamente el mismo aa hasta que la prueba resulte negativa. Después se realiza un ciclo de acetilación con anhídrido acético al 10% en CH_2Cl_2 para bloquear los grupos NH_2 aún libres. Este procedimiento se repite tantas veces como aa tenga el péptido a sintetizar, sólo que en cada caso se utiliza el aa correspondiente a la secuencia deseada.

Cuando el aa para acoplar es glutamina o asparagina no se utiliza DCC, se utilizan ésteres activos p-nitrofenil. Los grupos protectores utilizados son: Lys (2 Br Z), Glu (Obzl), Ser (Bzl), Met (O), Tyr (2Br Bzl), Trp (Form), Asp (OBzl).

Al finalizar la síntesis química del péptido éste se libera de la resina mediante tratamiento con ácido fluorhídrico (HF), sulfuro de dimetilo (DMS), p-cresol y p-tiocresol (25:65:7.5:2.5, v/v), a 0°C , durante 2 horas, los solventes se quitan con vacío. Tratar la resina con HF y p-cresol (9:1), a 0°C , durante 1 hora, los solventes se retiran con vacío y el remanente se trata con éter para quitar los residuos de los solventes. El péptido se solubiliza en ácido acético al 5% en agua

desionizada y se separa de la resina por filtración. Después el péptido se liofiliza y se guarda a 4 °C.

Para eliminar los residuos de los solventes y las sales, resultantes del corte con HF, el péptido se solubiliza en bicarbonato de amonio 0.1M y se filtra en una columna de sefadex G-15, utilizando como eluyente bicarbonato de amonio 0.1M. Se liofiliza y se guarda a 4 °C hasta su utilización en los ensayos inmunoenzimáticos.

12) Ensayo inmunoenzimático con el péptido.

Preparar una solución de 200 µg de péptido en 5 ml de solución de carbonatos pH 9.6 y añadir 50 µl a cada pozo de una microplaca de titulación (Maxisorp Nunc). Incubar a 37 °C, toda la noche, sin tapar la placa. Bloquear los espacios no ocupados por el péptido, añadiendo 300 µl de suero fetal bovino(SFB), incubar a 37°C, toda la noche. Retirar el SFB, lavar con solución de lavado (PBS/0.2% Tween-20), 3 veces, por 5 min, con agitación. Preparar las diluciones de los sueros con solución de dilución (PBS/0.2% Tween-20, 10% SFB). Los sueros de conejo se utilizaron 1:100 y los sueros humanos 1:10. Añadir 50 µl de la dilución de los sueros a los pozos correspondientes. Incubar 1 hr, a 37 °C. Retirar las diluciones de los sueros con vacío a una trampa con desinfectante. Lavar con solución de lavado, 300 µl por pozo, 5 veces, por 5 min, con agitación. Añadir 50 µl por pozo, de suero anti-IgG humana (o anti IgG de conejo), conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:20,000 en solución de dilución. Incubar 1 hr, a 37°C. Lavar con solución de Tris-NaCl, 300 µl por pozo, 5 veces, por 5 min, con agitación. Para amplificar la reacción se utilizó un sistema de amplificación de ELISA (GIBCO). Este proporciona un sustrato para fosfatasa (NADPH), del cual se añaden 50 µl a cada pozo, incubar 15 min, a temperatura ambiente. El estuche también proporciona enzimas amplificadoras (alcohol deshidrogenasa y diaforasa), las cuales se diluyen en solución de dilución del amplificador y se agregan 50 µl por pozo. Incubar 15 min, a temperatura ambiente. Parar la reacción con H₂SO₄ 0.3M. Leer la densidad óptica (DO) a 490 nm. La línea de corte se definió, como el promedio de los sueros negativos a HIV-1, más 3 desviaciones estándar.

13) Ensayo de inhibición por competencia con el péptido.

Se disuelve el péptido en ácido fórmico al 60%, se neutraliza inmediatamente con una solución de Tris-NaCl, ajustando a pH 8.0, con NaOH. Se deja a una concentración final de 700 µg/ml.

Preparar las diluciones de los sueros (humanos y de conejo), con diferentes concentraciones de péptido, desde 3 µg, hasta 10 µg, por 50 µl de volumen final. Incubar a 37 °C, por 2 hr.

Preparar una solución de 200 µg de péptido en 5 ml de solución de carbonatos pH 9.6 y añadir 50 µl a cada pozo de una microplaca de titulación (Maxisorp Nunc). Incubar a 37 °C , toda la noche, sin tapar la placa. Bloquear los espacios no ocupados por el péptido, añadiendo 300 µl de SFB, incubar a 37°C, toda la noche. Retirar el SFB, lavar con solución de lavado, 3 veces, por 5 min con agitación.

Preparar diluciones de los sueros, con solución de dilución, sin adsorber con péptido. Añadir a la placa 50 μ l/pozo, de las diluciones de los sueros correspondientes, adsorbidos con péptido y no adsorbidos. Incubar 1 hr a 37°C. Retirar las diluciones de los sueros con vacío a una trampa con desinfectante. Lavar con solución de lavado (300 μ l por pozo), 5 veces por 5 min con agitación. Añadir 50 μ l por pozo, de anti-IgG humana (o anti IgG de conejo) conjugada, con fosfatasa alcalina, diluida 1:20,000 en solución de dilución. Incubar 1 hr a 37°C. Lavar con solución de Tris-NaCl, 300 μ l por pozo, 5 veces, por 5 min con agitación. Se añaden 50 μ l/pozo, del sustrato (NADPH), incubar 15 min a temperatura ambiente. Agregar 50 μ l de amplificador (alcohol deshidrogenasa y diaforasa), incubar 15 min a temperatura ambiente. Parar la reacción con H₂SO₄ 0.3M. Leer DO a 490 nm.

14) Análisis Estadístico.

El análisis estadístico se realizó con la prueba de la Chi cuadrada (χ^2), empleando la siguiente formula:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(f_o - f)^2}{f} \right]$$

donde: f = frecuencia teórica y f_o = frecuencia observada.

IV

RESULTADOS

1) Respuesta inmune humoral hacia HIV-2.

Para evaluar la reactividad hacia las diversas proteínas de HIV-2 de sueros colectados en México se estudió un grupo de 492 sueros pertenecientes a individuos positivos a HIV 1 demostrado por ELISA e inmunoblot (IB), de los cuales se conoce su vía de infección y su estado clínico y 162 sueros negativos a HIV-1, que fueron empleados como control. A los 654 sueros seleccionados se les realizó inmunoblot empleando la cepa MS de HIV tipo 2 como antígeno viral.

En el análisis de los IB para HIV-2 encontramos que en el grupo de seropositivos a HIV-1 el 79% de los sueros presentó reactividad con por lo menos una proteína de HIV-2. En el grupo control de seronegativos a HIV-1 únicamente se encontró un 1.8% de reactividad. Los datos se presentan en la Tabla 4.

INMUNIDAD HACIA HIV-1	REACTIVIDAD CON HIV-2 (%)
492 POSITIVOS	388 (79)
162 NEGATIVOS	3 (1.8)
654 TOTAL	391 (59)

Tabla 4. Respuesta inmune humoral de 654 sueros con antígeno de HIV-1 y HIV-2.

Al analizar los IB que presentaron reactividad con HIV-2, encontramos que el 71% de los sueros HIV-1 positivos reconocen la proteína de cápside p24, la glicoproteína transmembranal (gp32) es reconocida por el 24% de los sueros y la glicoproteína externa gp110 solamente es reactiva con el 9% de los sueros. Tabla 5.

PROTEINA DE HIV-2	SUEROS REACTIVOS	% DE REACTIVIDAD CON HIV-2
p24	352	71%
gp32	119	24%
p55	176	36%
p66	62	13%
gp110	44	9%
gp32 y/o gp110	144	29%

Tabla 5.- Análisis de la reactividad de 492 sueros HIV-1 positivos con antígeno de la cepa MS de HIV-2.

En la figura 2 se presentan algunas tiras de IB mostrando la reactividad de varios de los sueros HIV-1 positivos con antígeno de la cepa MS/HIV-2.

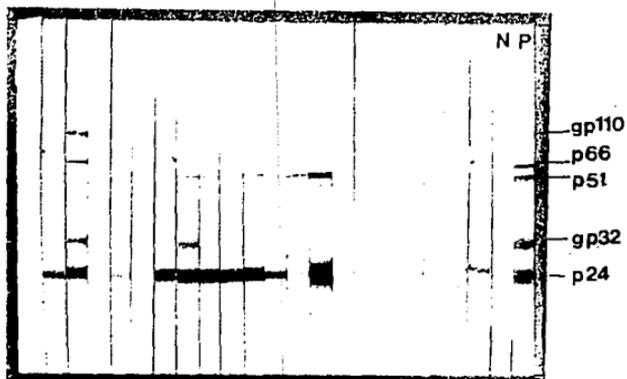


Figura 2.- Reactividad de varios sueros HIV-1 positivos con antígeno de la cepa MS de HIV-2 por IB. (N) suero negativo a HIV, (P) suero HIV-2 positivo.

2) Reactividad con HIV-2 por vía de infección.

Nuestro grupo de 492 seropositivos a HIV-1 incluye 401 muestras de personas infectadas por transmisión sexual, 41 infectadas por transmisión sanguínea y 50 de los que se desconoce la vía de infección.

Al analizar la presencia de reactividad con HIV-2, encontramos que en el grupo de transmisión sexual el 81% de los sueros presenta reacción con por lo menos una proteína de HIV-2, mientras que en el grupo de transmisión sanguínea esta reactividad es de 39%.

VIA DE TRANSMISION	SUEROS REACTIVOS CON HIV-2/TOTAL	PORCENTAJE DE REACTIVIDAD
SANGUINEA	16/41	39%
SEXUAL	324/401	81%

Tabla 6.- Reactividad con HIV-2 de 442 sueros HIV-1 positivos de los que se conoce la vía de infección.

El análisis estadístico muestra que la reactividad hacia HIV-2 en el grupo de individuos infectados sexualmente es significativamente mayor (X^2 ; $p < 0.005$) que en el grupo de infectados por transmisión sanguínea.

3) Reactividad con HIV-2 respecto al estado clínico.

En la Tabla 7 se muestra la relación de la reactividad con HIV-2 respecto al estado clínico de los pacientes, encontramos que en los estadios de asintomáticos y linfadenopatía el porcentaje de reactividad es muy similar, siendo en promedio del 84.5 %, mientras que en el grupo de pacientes con SIDA es significativamente menor (31%).

Al separar del grupo de 74 pacientes de SIDA aquellos que como síntoma primordial presentaban síndrome de desgaste se observa que dicho grupo presenta una reactividad intermedia, más cercana a los asintomáticos y con linfadenopatía que al resto de los pacientes con SIDA.

ESTADO CLINICO	REACTIVIDAD CON HIV-2	PORCENTAJE DE REACTIVIDAD
ASINTOMATICOS	94/111	84%
LINFADENOPATIA	12/14	85%
SIDA	23/74	31%

Tabla 7.- Reactividad con HIV-2 de 199 sueros de que se conoce el estado clínico.

4) Radioinmunoprecipitación de proteínas de HIV-2.

Las metodologías más utilizadas para reportar reacciones cruzadas entre retrovirus, son el IB y radioinmunoprecipitación (RIPA). En el IB los antígenos son presentados al anticuerpo en forma de estructura primaria, sobre un soporte inerte (p. ej. nitrocelulosa); en el caso de RIPA el antígeno se presenta en su estructura terciaria, en solución; o sea que en el IB los anticuerpos reconocen epítomos lineales y en RIPA los epítomos que se reconocen son conformacionales.

Empleando RIPA se observa la precipitación de los precursores de las glicoproteínas, de las glicoproteínas externas, de los precursores de las proteínas del gen gag y de la proteína p24 de ambos tipos de HIV. Con esta metodología no se puede apreciar inmunoprecipitación de las glicoproteínas transmembranales.

Se realizó RIPA a 22 sueros positivos a HIV-1 de un grupo de individuos a los cuales se les realizó un estudio serológico completo (159). Se utilizó como antígeno una cepa de HIV-1 (IIIB/LAV) y dos cepas de HIV-2 (MS y LP). De estos 22 sueros, 18 presentaban reactividad con al menos una proteína de HIV-2 en el IB y 11 de las muestras tenían reacción con las glicoproteínas de envoltura de HIV-2.

Todos estos sueros al ser corridos en RIPA precipitaron el precursor de las glicoproteínas (gp160) y la glicoproteína externa (gp120) de HIV-1, mientras que con respecto a HIV-2 solo el 68% de los sueros (15/22) inmunoprecipitaron al precursor de las glicoproteínas (gp140) y el 41% (9/22) precipitaron la glicoproteína externa (gp110).

Los 11 sueros que por IB presentaban reacción con las glicoproteínas de envoltura de HIV-2 inmunoprecipitaron el precursor de las glicoproteínas (gp140) y solo 6 de los 11 precipitan a la glicoproteína externa (gp110) del HIV-2.

De los otros 11 sueros que no presentaron reactividad con las glicoproteínas de HIV-2 por IB, 5 (45%) inmunoprecipitaron al precursor de las glicoproteínas de HIV-2 y solo en un caso se pudo observar la precipitación de la glicoproteína externa. Consideramos que el número de muestras es pequeño para poder sacar conclusiones, aunque estos datos concuerdan con los reportados en otros estudios similares (151,162).

5) Resultados del ensayo Liatek HIV 1+2.

Para descartar una infección con los 2 tipos de HIV se empleo el estuche comercial Liatek HIV-1+2, el cual se utiliza para la detección diferencial de anticuerpos hacia HIV-1/HIV-2. Esta basado en el inmunoensayo en línea de Innogenetics (distribuido por Organon Técnica); tiene proteínas recombinantes de HIV-1 (p17, p24 y p31) y péptidos sintéticos correspondientes a epitopos de gp41 de HIV-1 y de gp36 de HIV-2. En este ensayo esta representado el dominio inmunodominante principal de la glicoproteína transmembranal de HIV-2 (aa 583-603), el cual se ha reportado como muy específico para discriminar entre anticuerpos dirigidos hacia HIV-1 y HIV-2 (121, 122).

Esta prueba se realizó de acuerdo a las instrucciones del productor. Se corrieron 20 sueros positivos a HIV-1 que presentaban una fuerte reactividad con la gp32 de HIV-2 por el ensayo de IB con el antígeno MS/HIV-2. De los sueros probados, ninguno mostró reactividad con el péptido correspondiente a HIV-2 (figura 3). Con estos resultados podemos inferir que el epítipo representado en el péptido sintético de la gp36 de HIV-2 incluido en este ensayo no es el que nos está produciendo la reactividad observada con HIV-2 por IB.

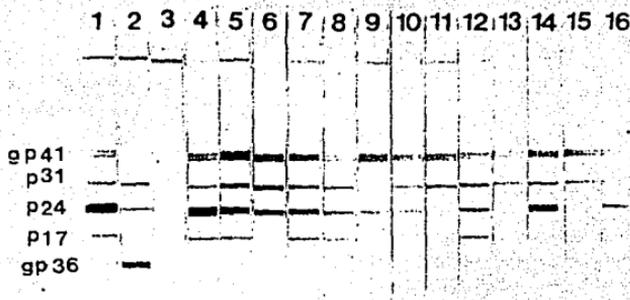


Figura 3. Resultados del ensayo Liatek HIV 1+2. (1) control positivo del estuche; (2) suero HIV-2 positivo; (3) control negativo del estuche; (4-16) sueros HIV-1 positivos que presentaron reacción fuerte con la glicoproteína transmembranal de HIV-2 en el IB. gp 36 corresponde al péptido de HIV-2.

6) Titulación de sueros por IB.

Como método de estudio de la reactividad observada contra HIV-2 en pacientes infectados con HIV-1, se empleó la cuantificación de la reacción contra antígenos homólogos y heterólogos. Para ello se realizaron una serie de diluciones de 10 de los sueros que presentaban una alta reactividad con HIV-2 y se corrieron IB contra tiras de nitrocelulosa conteniendo cantidades cuantificadas de proteínas de antígenos homólogos (HTLV-IIIb/LAV) o de antígenos heterólogos (MS/HIV-2).

Las diluciones probadas fueron de 1:100 hasta 1:100,000. En la Tabla 8 se muestran los datos de la máxima dilución donde se detectó visualmente reactividad con el antígeno respectivo.

En los datos de la Tabla 8 puede observarse que algunos sueros como el O066 reconocen varias proteínas de HIV-2 hasta diluciones 1:50,000 y encontramos un suero, el F031 que reconoce a la p24 de HIV-2 a un título mayor que a la proteína correspondiente de HIV-1.

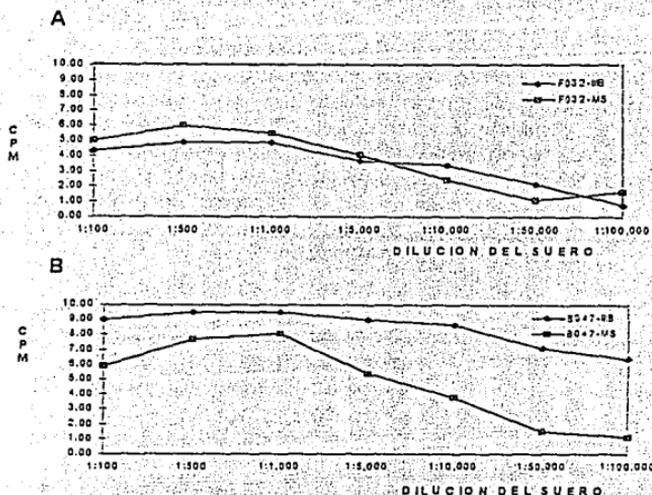
CLAVE SUERO	p24 HIV-1/HIV-2*	gp41/gp32 HIV-1/HIV-2	p55 HIV-1/HIV-2	p66 HIV-1/HIV-2	gp120/gp110 HIV-1/HIV-2
A880	5/5	7/3	4/1	6/0	7/0
A896	5/1	7/3	0/0	5/0	7/2
A972	7/5	7/3	7/0	7/0	7/2
B047	7/0	7/5	0/0	7/0	7/4
O439	7/7	7/2	7/5	7/0	7/0
O066	7/6	7/6	3/0	7/5	7/6
D978	0/5	7/3	6/4	6/6	5/0
D982	6/5	7/5	0/0	6/5	3/0
F031	6/7	7/2	7/6	7/6	0/0
F032	0/5	7/5	0/0	6/0	0/0

Tabla 8. Titulación de 10 sueros HIV-1 positivos que presentan reactividad con HIV-2. Las diluciones se codificaron por números: 1) 1:100; 2) 1:500; 3) 1:1,000; 4) 1:5,000; 5) 1:10,000; 6) 1:50,000; y 7) 1:100,000. * Los datos indican la máxima dilución donde se detecta visualmente reacción con antígeno de HIV-1, sobre la máxima dilución donde se observa reactividad con el antígeno correspondiente de HIV-2.

Las tiras de IB de la titulación se cuantificaron con el programa AMBIS 212 Radioanalytical Imaging System, en el laboratorio del Dr. Carlos Larralde con la ayuda de la Ing. Quím. Tzipe Govezensky. El análisis se enfocó a la región correspondiente a la glicoproteína transmembranal de ambos tipos de HIV, encontrando 2 grupos, en el grupo 1 los sueros se comportan de manera similar con los dos tipos de virus (HIV-1 y HIV-2), y se presenta en los sueros: A896, O066, D982, F031, F032, A972, (gráfica 1-A) y en el segundo grupo la reactividad con

HIV-2 declina más rápido que con HIV-1, este tipo de comportamiento lo presentan los sueros: A880, O439, D978, B047 (gráfica 1-B).

PERFILES DE REACCIÓN CONTRA HIV-1 Y HIV-2



Gráfica 1.- Datos de cuantificación con el programa AMBIS 212 de la banda correspondiente a la glicoproteína transmembranal en IB de HIV-1 (IIIb) y de HIV-2 (MS). Gráfica A, suero F032 representando la reactividad observada en el grupo 1. Gráfica B, suero B047, representando la reactividad del grupo 2.

7) Análisis teórico de la glicoproteína transmembranal.

Debido a la alta reactividad encontrada contra la glicoproteína transmembranal (TMP), y al hecho de que ésta no estaba previamente reportada en la literatura como característica de la reactividad cruzada entre estos dos retrovirus y después de descartar infección dual, nos enfocamos a realizar un estudio teórico sobre esta glicoproteína y las posibles regiones de la misma que pudieran ser responsables de este fenómeno.

La TMP del HIV es relativamente invariable, presentando conservación de más del 80% a nivel de aminoácidos entre diferentes aislados y sin regiones de hipervariabilidad(123). Esta glicoproteína transmembranal del HIV sirve como anclaje para la proteína de envoltura gp120 y juega un papel crítico en la infectividad

(124-126). La mitad amino terminal de la molécula es presentada en la superficie de la partícula viral de células infectadas.

En términos generales, esta glicoproteína es una porción altamente inmunogénica del virus, los anticuerpos inducidos por ella, son demostrables desde etapas tempranas de la infección y persisten en las etapas terminales de la enfermedad (127-128).

En el gen de esta proteína puede encontrarse un codón de término temprano en la región que corresponde al dominio citoplásmico (36,37), lo cual explica el tamaño menor de las proteínas transmembranales encontradas en ciertos aislados de HIV-2 (33,43). Se desconoce si la presencia de proteínas transmembranales de diferente tamaño en sistemas celulares *in vitro* indica una mezcla de cepas virales o una sola cepa de virus capaz de modular la expresión del codón de término transmembranal.

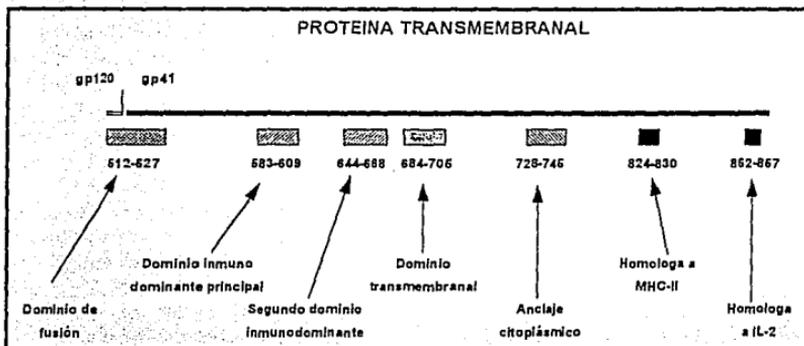


Figura 4.- Regiones identificadas en la glicoproteína transmembranal de HIV-1. El sistema de numeración de aa corresponde al asignado por Myers y cols., a la cepa HXB2 de HIV-1(129).

A diversas regiones de la glicoproteína transmembranal ilustradas en la Figura 4 se les han asignado distintas funciones biológicas e inmunológicas, entre las cuales se incluyen:

1) El dominio de fusión en el extremo amino de la molécula (aa 512-527), el cual es parcialmente responsable de la infección célula-célula y de efectos citopáticos de fusión y citólisis (130).

2) El dominio inmunodominante primario o principal (epitopo I) (aa 583-609), que comprende la región del puente disulfuro entre las cisteínas 598 y 604 (131-135), el cual se sabe que induce anticuerpos que median citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (132-134).

3) Otro segundo dominio inmunogénico (epitopo II) (aa 644-668), que se encuentra en una región previa al dominio transmembranal (132-136), del cual, por estudios realizados con anticuerpos monoclonales, se ha reportado que pue-

de ser aún más efectivo en mediar la ADCC que los anticuerpos generados contra el epitopo I (137).

En un estudio realizado con 10 anticuerpos monoclonales humanos contra ambos epitopos inmunodominantes I y II, se observó que 4 de éstos potencian la infección viral dependiente de anticuerpos mediada por complemento (C'-ADE) (138-139). Por lo tanto, los epitopos de la TMP pueden inducir gran variedad de anticuerpos con una multitud de funciones inmunológicas, y aún más, un sólo epitopo o "grupo de epitopos" puede originar anticuerpos con funciones biológicas aparentemente contradictorias (ADCC y C'-ADE).

4) El dominio transmembranal (aa 684-705), compuesto de aminoácidos altamente hidrofóbicos (124).

5) Una región hidrofílica posterior a la región transmembranal (aa 728-745), la cual probablemente sirve como anclaje intracitoplásmico (123), hacia el cual han sido mapeados algunos anticuerpos con actividad neutralizante (139,140).

6) Una región de 6 aminoácidos (aa 824-830) la cual es homóloga a un péptido del extremo amino terminal del antígeno de clase II' del MHC de leucocitos humanos (142).

7) Y finalmente, una región de 5 aminoácidos en el extremo carboxilo de la proteína (aa 852-857), que es homóloga a una secuencia amino terminal de interleucina 2 (143).

Péptidos sintéticos derivados del dominio inmunodominante principal han mostrado alta especificidad y sensibilidad en la detección de anticuerpos en el suero de pacientes infectados con HIV-1 o con HIV-2, y han permitido el desarrollo de pruebas de tamizaje que discriminan entre los anticuerpos en respuesta a HIV-1 y 2 (R23,24,25). En ambos tipos de HIV el epitopo mínimo reconocido es de 7 aminoácidos flanqueados en su extremo amino y carboxilo por cisteínas, el cual está localizado en HIV-1 del aa 603 al 609 (144-146).

8) Comparación de secuencias de HIV-1 y HIV-2.

En nuestro estudio de reactividad hacia HIV-2 hemos empleado la cepa MS de HIV-2, de la cual aún no se conoce su secuencia, por lo que decidimos comparar las secuencias reportadas de la TMP de varias cepas de HIV-2 para determinar el grado de conservación entre las mismas y compararlas con la secuencia de la TMP de la cepa IIIb (XB2) de HIV-1 que utilizamos en este estudio. Las secuencias de aminoácidos se obtuvieron de la base de datos de los Alamos (147) y el análisis de similitud se realizó con el programa *Pustell sequence analysis programs (secuenci) version 4.0. International Biotechnologies, Inc.*

La comparación entre las cepas de HIV-2 nos mostró una gran conservación de aminoácidos en esta proteína, del orden del 90% y en algunas regiones, en especial, en la mitad amino terminal de la proteína, que es donde se encuentran localizados los epitopos inmunodominantes I y II propuestos como fuertes inductores de anticuerpos, de hasta 100% (tabla 9).

ST 524/573	GAASLTLSAQSR	TL	LAGI	V	Q	Q	Q	Q	Q	L	D	V	V	K	R	Q	E	M	L	R	L	T	V	W	G	T	K	N	L	Q	A	R	V																										
ROD 530/579																									
NIH 521/570																									
ISY 522/571																									
BEN 529/578																									
GH1 521/570																									
ST 574/523	T	A	I	E	K	Y	L	K	D	Q	A	L	N	S	W	G	C	A	F	R	Q	V	C	P	T	T	V	P	W	V	N	D	T	L	T	P	D	W	N	N	M	T	W	Q	E	W	E	Q	R										
ROD 560/529	
NIH 571/520	
ISY 572/521	
BEN 579/525	
GH1 571/520	
ST 524/573	I	R	N	L	E	A	N	I	S	E	S	L	E	Q	A	D	I	Q	E	K	N	M	Y	E	L	O	K	L	N	S	W	D	V	F	G	N	W	F	O	L	T	S	W	I	K	Y	I	Q	Y										
ROD 530/579
NIH 521/570
ISY 522/571
BEN 529/578
GH1 521/570
ST 574/723	G	V	I	V	G	I	V	L	R	I	V	I	V	V	V	C	M	L	S	R	L	R	K	G	Y	R	P	V	F	S	S	P	P	A	Y	F	Q	I	H	I	K	D	R	E	Q														
ROD 560/729
NIH 571/720
ISY 572/721
BEN 579/728
GH1 571/720
ST 724/773	P	A	R	E	T	E	E	D	V	G	N	S	V	G	N	W	W	P	P	I	R	Y	I	H	F	L	I	R	Q	L	I	R	L	N	R	L	N	R	L	N	I	C	R	D	L	L	S	R											
ROD 739/779
NIH 721/770
ISY 722/771
BEN 729/778
GH1 721/738
ST 774/523	S	F	Q	T	L	Q	L	S	Q	S	L	R	R	A	L	T	A	V	R	D	W	L	R	F	N	T	A	Y	L	Q	Y	G	G	E	W	I	O	E	A	F	R	A	F	A	R	A	T	G	E										
ROD 789/529
NIH 771/520
ISY 772/521
BEN 779/525
ST 524/559	T	L	T	N	A	W	R	G	F	W	G	T	L	G	I	G	R	G	I	L	A	V	P	R	R	I	R	O	G	A	E	I	A	L	L																								
ROD 530/565
NIH 521/556
ISY 522/557
BEN 529/564

Tabla 9.- Alineación de las secuencias de la glicoproteína transmembranal de 6 cepas de HIV-2, se utilizó como referencia la cepa ST. (-) indica el mismo aa, (.) indica deleciones, (x) indica el extremo carboxilo de la proteína. La región enmarcada con doble línea corresponde a la región del epítipo inmunodominante principal y la enmarcada con línea sencilla corresponde al dominio secundario.

Debido a que observamos una gran conservación entre las cepas de HIV-2 en la mitad amino terminal, decidimos utilizar la cepa GH1 de HIV-2 para hacer la comparación con el HIV-1 en la búsqueda de posibles regiones responsables de las reacciones cruzadas observadas en nuestro trabajo, ya que esta cepa tiene una TMP del mismo tamaño que la utilizada en el estudio.

Al comparar la región amino terminal de la TMP de esta cepa con el HIV-1 utilizando el programa *secuenci*, encontramos que en la región que comprende el epítipo I de HIV-1 la mayor similitud encontrada es del 59% y corresponde a los aa 573-599 de la cepa GH1 de HIV-2, mientras que en la región del epítipo II la mayor similitud es del 48% y abarca del aa 629 al 652 de HIV-2. Cuando se realizó la comparación con un programa diferente, el Pcgene (*Pcgene version 7.0 Intelligent, Inc.*), el porcentaje de similitud aumentó en el epítipo I al 77.7% y en el II al 72%, ya que este programa considera conservados los aminoácidos que son del mismo grupo y no cambian la conformación final de la proteína.

XB2 531/550	GAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLOARI
GH1 521/570	...L.SA.S.T.A...QQ.DVVKR.EN.N...T.N...V
XB2 581/625	LAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWHHTTW
GH1 571/618	T.K...A.NS...AFROV.H...VNDLSLSPDWNMTWDEWE
XB2 629/650	WDREINNYTSLIHSLIEESONQOEKNEQELLELOKWAFLNWNWPFNITNWL
GH1 615/665	V..YLEANISO...EQA..I...Y..QK.NS.DVFG...DL.S.I

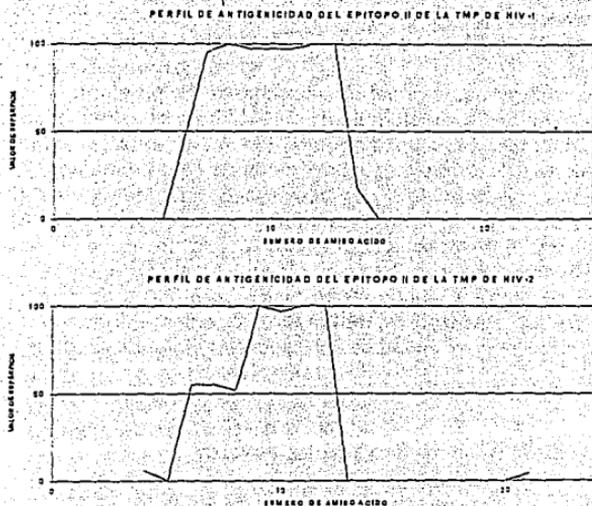
Tabla 10.- Alineación de las secuencias de aminoácidos de la mitad amino terminal de la glicoproteína transmembranal de la cepa XB2 de HIV-1 y la cepa GH1 de HIV-2, utilizando como referencia la cepa XB2 (-) indica el mismo aa, (*) Indica deleciones. La región enmarcada con doble línea corresponde a la región del epítipo inmunodominante principal (epítipo I) y la enmarcada con línea sencilla corresponde al dominio secundario (epítipo II).

Con el Liatek HIV-1+2, se descartó la participación del epítipo I en la reactividad observada, ya que este se encuentra representado en el péptido de HIV-2 (aa 583-603) incluido en este ensayo, por lo que nos enfocamos a hacer el análisis de la región correspondiente al epítipo II para evaluar su posible participación en las reacciones observadas.

9) Antigenicidad del epítipo II de HIV-2.

Para determinar la antigenicidad de la región correspondiente al epítipo II en los 2 tipos de HIV, empleamos el método desarrollado por Parker Guo y Hodges (148), con el programa *Surface Plot*, en este programa combinan tres métodos para predecir la antigenicidad de una proteína, los cuales son: hidrofiliidad, accesibilidad y movilidad, que son presentados en una gráfica compuesta y consideran que las regiones que presentan un perfil de antigenicidad (valor de super-

ficie) superior al 50%, tienen una gran probabilidad de ser inmunogénicos. Como puede observarse en la gráfica 2, la región correspondiente al epítipo II de la TMP de ambos virus, presentan en la parte media, un grupo de aminoácidos que tienen un valor de superficie del 100%, lo cual nos indica que son bastante antigénicos y nos permite inferir que este dominio puede estar involucrado en la reactividad observada en sueros HIV-1 positivos hacia la glicoproteína transmembranal de HIV-2.



Gráfica 2.- Datos de la predicción de antigenicidad del epítipo II de la glicoproteína transmembranal de HIV-1 y HIV-2 realizada con el programa *Surface Plot*.

10) Reactividad con el péptido de HIV-2.

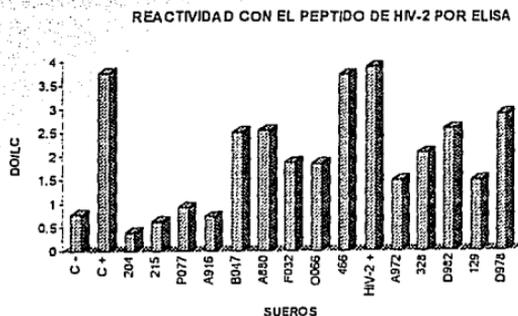
Para demostrar o descartar la participación de este epítipo se realizó la síntesis del péptido correspondiente al segundo dominio inmunodominante de la glicoproteína transmembranal de HIV-2. La secuencia sintetizada es: NH₂-ser, leu, glu, gln, ala, gln, ile, gln, gln, glu, lys, asn, met, tyr, glu, leu, gln, lys, leu, asn, ser, trp, asp, val-COOH.

Para montar y estandarizar un ELISA para probar el péptido sintético se empleó un suero de conejo hiperinmune anti HIV-2, preparado contra el virus MS. Una vez estandarizada la técnica, se empleó un suero humano HIV-2 positivo, se obtuvo del estuche comercial *HIV-1/HIV-2 ELISA Test (Ortho Diagnostic Systems)*, el cual se utilizó para comparar con los sueros humanos HIV-1 positivos que presentaban reacción cruzada.

El péptido se probó en ensayos de ELISA con sueros humanos negativos a retrovirus, 1 suero HIV-2 positivo, con 2 sueros positivos a HIV-1 que no presentaron reacción cruzada con ninguna proteína de HIV-2 en IB (P077, A916) y con 10 sueros que presentaron reacción cruzada con la TMP por IB (A880, B047, F032, O066, 466, 129, 328, D978, A972 y D982). Como control se empleó el suero hiperinmune de conejo anti HIV-2 y suero de conejo normal.

Para poder comparar los ensayos de ELISA de las diferentes corridas se utilizó la relación DO/LC, donde DO = Absorbancia de la muestra y LC = Línea de corte del ensayo. La línea de corte de cada ensayo se obtuvo con el promedio de los sueros negativos más tres desviaciones estándar. Todas las muestras se corrieron por duplicado.

El promedio de absorbancia de los sueros negativos en los ELISAS con el péptido sintetizado de HIV-2 correspondiente al epítipo II fue 0.506 con una desviación estándar de 0.112, la absorbancia del suero HIV-2 positivo fue 7.7 veces el promedio de los sueros negativos, mientras que en los sueros HIV-1 positivos que no presentaron reactividad con la glicoproteína transmembranal de HIV-2 por IB la absorbancia obtenida es en promedio 1.6 veces el promedio de los negativos. Los sueros que si presentaban reactividad con la glicoproteína transmembranal por IB dieron un valor promedio de 4.5 veces el de los negativos, con un valor mínimo de hasta 2.9 veces y un valor máximo de 7.3 veces. Estos datos nos permiten diferenciar los sueros HIV-1 positivos que no presentaron reactividad por IB con HIV-2 (1.6 veces) de aquellos en que si se observó reacción (4.5 veces).



Gráfica 3. Resultados de los ensayos de ELISA contra el péptido de HIV-2. (C -): suero de conejo normal; (C +): suero hiperinmune de conejo anti HIV-2; (HIV-2 +): suero humano anti HIV-2; (204) y (215) sueros humanos negativos a HIV; (P077) y (A916): sueros humanos HIV-1 positivos sin reacción contra el HIV-2 por IB y el resto son sueros humanos con reactividad contra la glicoproteína transmembranal de HIV-2 en IB.

11) Ensayos de inhibición por competencia con el péptido de HIV-2.

Para determinar la especificidad de la reacción observada por ELISA, se realizaron ensayos de inhibición preincubando el suero con péptido en solución (10 µg/50µl del suero diluido) antes de realizar el ELISA.

Los resultados obtenidos muestran un promedio de absorbancia para los sueros negativos de 0.733 con una desviación estándar de 0.089; el suero HIV-2 positivo dio una absorbancia 0.98 veces el promedio de los sueros negativos; en los sueros HIV-1 positivos que no presentaron reacción con la glicoproteína transmembranal de HIV-2 por IB el valor promedio de la absorbancia obtenida es 0.74 veces el promedio de los sueros negativos; finalmente, en los sueros HIV-1 positivos que presentaron reactividad por IB el valor promedio fue 1.05 veces el promedio de los sueros negativos, con un rango de 1.44 a 0.635 veces.



Gráfica 4. Resultados de los ensayos de inhibición. Se emplearon 10 µg del péptido. Las barras claras corresponden a sueros sin péptido, las barras oscuras corresponden a los sueros con péptido. (C -): suero de conejo normal; (C +): suero hiperinmune de conejo anti HIV-2; (HIV-2 +): suero humano anti HIV-2; (204) y (215) sueros humanos negativos a HIV; (P077) y (A918): sueros humanos HIV-1 positivos sin reacción contra el HIV-2 por IB y el resto son sueros humanos con reactividad contra la glicoproteína transmembranal de HIV-2 en IB.

Como se puede observar en la gráfica 4, los sueros humanos negativos presentaron un ligero aumento en la absorbancia en los ensayos de competencia con el péptido, lo cual no puede considerarse como error experimental ya que se realizaron varios ensayos y en todos los casos el resultado fue el mismo. En los sueros HIV-1 positivos que presentaron reactividad con la glicoproteína transmembranal de HIV-2 el promedio de inhibición fue de 67% de la reactividad original con un rango de 58% a 88%. El suero HIV-2 positivo se inhibió 82% y en el caso de los sueros que no presentaron reacción con la glicoproteína transmembranal en IB se encontró una inhibición del 34%.

DISCUSION

A partir del conocimiento de que el SIDA puede ser causado por 2 tipos de HIV y de que en México únicamente se habían reportado casos de infección con el HIV-1, se decidió hacer un estudio de vigilancia continua de la aparición del HIV tipo 2 en nuestro país. Hasta el momento no hemos detectado ningún caso de infección con HIV-2, o infecciones mixtas, pero al realizar el análisis de la respuesta de sueros mexicanos HIV-1 positivos, con antígeno de HIV-2, encontramos reactividad importante con varias de las proteínas de este otro retrovirus. Cuando iniciamos este estudio en 1989, los reportes publicados indicaban la presencia de reactividad contra proteínas de los genes *gag* y *pol*, y solamente con la gp110 codificada por el gen *env* de los virus tipo 2 en individuos infectados con HIV-1 (15,108). Sin embargo, nuestros datos mostraron una reactividad con la glicoproteína transmembranal del HIV-2 no reportada hasta ese momento. Estos resultados nos llevaron a realizar un estudio más profundo de estas reacciones.

Primeramente hicimos un análisis detallado de la reactividad presentada en los IB, observando que solo el 1.8% de los sueros negativos a HIV-1 presentaban alguna reacción, mientras que los sueros correspondientes a individuos HIV-1 positivos mostraban reactividad en 79% de los casos. Estos datos nos permitieron inferir que la respuesta observada en los IB de HIV-2 estaba relacionada con la infección con otro retrovirus heterólogo y que no era una respuesta de tipo inespecífico de la población en estudio.

La proteína de HIV-2 para la que se ha reportado mayor reactividad en sueros HIV-1 positivos es la p24 codificada por el gen *gag*; con respecto a las glicoproteínas de membrana, diversos estudios desde 1987 (15,108,150,151) indican un promedio de 10% en estas reacciones. En un estudio realizado por Bottiger y cols. (151) en el que reportan 10% de reactividad entre las glicoproteínas de envoltura de ambos tipos de HIV, ellos observaron que cuando utilizaban IB de manufactura propia la reactividad hacia la glicoproteína transmembranal de HIV-2 estaba presente, mientras que al emplear IB comerciales dicha reactividad desaparecía y aumentaban las reacciones con la glicoproteína externa. Estos datos concuerdan con los de otras publicaciones en las cuales, utilizando anticuerpos monoclonales contra la glicoproteína transmembranal de HIV-1, demuestran que la glicoproteína externa de las tiras de IB comercial son en realidad múltiplos de la glicoproteína transmembranal (152,153).

En nuestro estudio encontramos que la proteína más reconocida por los sueros HIV-1 positivos es la p24. En el caso de muestras de individuos negativos la reactividad encontrada es solo contra esta proteína p24, lo cual concuerda con los datos reportados previamente (149). Además nuestros datos muestran un 29% de reactividad con las glicoproteínas codificadas por el gen *env*. Analizando esa reactividad hacia las dos glicoproteínas por separado (externa y transmembranal) observamos que nuestra positividad con la glicoproteína externa es del 9% similar

a la reportada en la literatura, sin embargo la reactividad de 24% que encontramos hacia la glicoproteína transmembranal es muy superior a los datos reportados previamente, incluso empleando IB como los nuestros o en estudios similares realizados en países de África Occidental donde la infección con HIV-2 tiene una de las prevalencias más altas. En estos estudios reportan reactividades que van del 3 al 14% entre las glicoproteínas transmembranales de ambos tipos de HIV (154,155).

Al evaluar cuantitativamente los anticuerpos que reconocen a las proteínas de HIV-2, en especial hacia la glicoproteína transmembranal, encontramos que en todos los casos, la reactividad con el antígeno homólogo fue mayor, aunque algunos sueros reaccionaron con el antígeno de HIV-2, a diluciones muy altas, o sea que estos sueros tienen una gran cantidad de anticuerpos que reconocen a esta glicoproteína.

Al cuantificar, con ayuda del programa AMBIS 212, la banda correspondiente a la glicoproteína transmembranal en las tiras de IB, observamos que se distinguen dos tipos de comportamiento en los sueros; en el primero la reacción con los dos antígenos es similar, mientras que en el segundo la reactividad con el antígeno heterólogo es menor desde un inicio y disminuye más rápidamente que con el antígeno HIV-1 (ver gráfica 1).

La determinación realizada con el Liatek nos permitió descartar la participación del epitopo I de la glicoproteína transmembranal en las reacciones observadas.

Considerando que la región del epitopo II es muy conservada, con una similitud del 72% (tabla 10) y que es una región expuesta en la superficie y con un alto índice de inmunogenicidad (gráfica 2), se propone que podría estar involucrada en la reactividad observada hacia la TMP de HIV-2.

Para probar esta hipótesis se realizó la síntesis de un péptido que representa el epitopo II de la glicoproteína transmembranal de HIV-2, en el análisis de los resultados obtenidos al probar este péptido en ensayos inmunoenzimáticos, encontramos que todos los sueros que se titularon por IB, reaccionaron con él. Cuando se probaron sueros HIV-1 positivos que no habían presentado reactividad hacia la glicoproteína transmembranal en IB, los valores obtenidos eran muy cercanos a la línea de corte.

Con los ensayos de inhibición por competencia con el mismo péptido, se confirmó que la reactividad que se observa, es bastante específica, ya que se logra inhibir la reacción en un gran porcentaje.

Los resultados anteriores demuestran, como estaba reportado (132,134,138,139), que el epitopo II, representado en este péptido, es inmunogénico y nos permite inferir que está involucrado en las reacciones que se observan hacia la glicoproteína transmembranal de HIV-2. El empleo de este péptido en inmunoensayos nos permite diferenciar los sueros positivos a HIV-1 que presentan reacción cruzada con la glicoproteína transmembranal de HIV-2, de aquellos que no presentan dicha reacción.

Al relacionar la presencia de reacción con cualquiera de las proteínas de HIV-2 y la vía de transmisión, encontramos una reactividad mayor, estadística-

mente significativa, en el grupo de individuos infectados sexualmente que en el grupo de transmisión sanguínea.

También encontramos una correlación significativa de la reactividad hacia HIV-2 y el estado clínico de los individuos infectados con HIV-1. El grupo de pacientes de SIDA presenta una menor reactividad con HIV-2 que la encontrada en los grupos de asintomáticos y pacientes que presentan linfadenopatía.

Ante todos estos resultados podemos proponer algunas posibles explicaciones, ninguna de las cuales excluye necesariamente a las otras.

La primera opción sería que los individuos estudiados estuvieran infectados con ambos tipos de HIV, lo cual en este estudio se descartó con el ensayo de Liatek HIV 1+2 (121, 122).

Otra explicación sería que estos individuos estuvieran infectados con un tipo distinto de HIV, hecho que ha sido observado previamente con otros retrovirus animales (156, 157). Esta hipótesis es apoyada con los resultados obtenidos en el análisis de las reacciones cruzadas por vía de transmisión, en el cual observamos que el grupo de individuos infectados por transmisión sexual presenta una reactividad cruzada mayor que el grupo que se infectó por vía sanguínea, lo cual podría indicar que las cepas que se transmiten por vía sexual sean diferentes a las de transmisión sanguínea. Otros estudios realizados en el laboratorio también apoyan esta hipótesis. En uno de ellos se determinó si los sueros mexicanos positivos a HIV-1, reaccionaban igual con las glicoproteínas de 2 cepas de HIV-1, una es la cepa prototipo HTLV-IIIb/LAV y la otra es un aislado mexicano de 1989, la cepa C20-1. En este estudio se observó que los sueros de individuos infectados por transmisión sanguínea, reconocen mejor la glicoproteína externa del aislado C20-1 y que los sueros de personas infectadas por vía sexual, reaccionan igual con la glicoproteína externa de ambos virus (158).

En otro estudio realizado en el laboratorio, en el cual se caracterizó la región variable 3 de la glicoproteína externa de varias cepas de aislados mexicanos, se encontró que existen por lo menos 2 genotipos de virus circulando en la población mexicana infectada con HIV-1, uno de estos grupos corresponde a 3 aislados de pacientes infectados por transmisión sexual, los cuales al compararlos con los subtipos consenso descritos a nivel mundial, se agrupan con las secuencias consenso de los subtipos B, D y E característicos de virus aislados en América, África Central y Tailandia. Al otro grupo pertenecen 2 aislados de pacientes hemofílicos, los cuales no se pueden agrupar con ninguno de los subtipos consenso reportados y se incluyen dentro de los virus no clasificables (159). Todos estos resultados apoyan la teoría de que las cepas que se introdujeron al inicio de la epidemia en México, a través de las 2 principales vías de transmisión, son de orígenes diferentes. Las diferentes reactividades de cada uno de estos grupos, sexual y sanguíneo, contra proteínas de HIV-2, refuerzan la hipótesis de que los virus son distintos.

Una tercera posibilidad, es la reactividad inmunológica cruzada entre determinantes antigénicos lineales o conformacionales, compartidos por los dos tipos de virus, lo cual hemos probado con los ensayos realizados con el péptido

sintético que representa una región inmunodominante de la glicoproteína transmembranal del HIV-2.

Curiosamente, en el estudio ya mencionado realizado por Bottiger y cols. (151), ellos encuentran una reactividad cruzada del 29% al comparar la reacción de sueros HIV-2 positivos con las glicoproteínas de HIV-1, mientras que como ya se mencionó la reactividad cruzada de sueros HIV-1 positivos con glicoproteínas del HIV-2 es solo del 10%. En nuestro estudio encontramos 29% de reactividad cruzada en sueros HIV-1 positivos con las glicoproteínas de envoltura de HIV-2, igual a las reacciones que presentan los sueros de individuos infectados con cepas de HIV-2.

Estos resultados aunados a la respuesta observada con el péptido de HIV-2, apoyan la hipótesis de que las cepas de HIV-1 que están circulando en el grupo de individuos infectados por transmisión sexual en México se parecen más a cepas de HIV-2, por lo menos en lo que respecta a las glicoproteínas, que las cepas de HIV-1 que predominan en otros países.

PERSPECTIVAS.

Este trabajo abre una serie de perspectivas una de las cuales se enfoca al área de desarrollo de estuches de diagnóstico mixto que actualmente ya se están utilizando en México ante la posible diseminación del HIV-2 en nuestro país, ya que con estos datos es necesario hacer una evaluación de cada uno de estos estuches analizando el tipo de antígeno que utilizan y la posibilidad de que los resultados obtenidos en cuanto a HIV-2 sean reales y no sean producto de reacciones como las que se reportan en este estudio.

Por otro lado la parte básica de este trabajo es terminar de analizar las regiones comunes entre estos retrovirus, lo cual a largo plazo nos podrían llevar a la generación de cepas de HIV recombinantes en las cuales se podría utilizar la propiedad del HIV-2 de ser menos patogénico que el HIV-1.

Otra posible área de enfoque sería el empleo de estos datos en estudios de epidemiología molecular y el análisis de variabilidad viral de las cepas de HIV en relación a su posible origen de introducción en nuestro país.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VI

CONCLUSIONES:

1. Con nuestros datos podemos descartar, hasta ahora, la presencia de infección por HIV-2 en nuestro país.
2. Los sueros de individuos HIV-1 positivos en México presentan una alta reactividad con proteínas del HIV-2.
3. En especial la reactividad observada contra la glicoproteína transmembranal del HIV-2 es más alta que lo reportado hasta ahora para otras partes del mundo.
4. Descartamos que en las reacciones cruzadas observadas este involucrado el epítipo inmunodominante primario de la glicoproteína transmembranal del HIV-2.
5. Demostramos que uno de los epítipos que participan en esta reactividad es el epítipo inmunodominante II de la glicoproteína transmembranal del HIV-2.
6. La reactividad cruzada es más prevalente en el grupo de individuos infectados por vía sexual.
7. Se propone que nuestros resultados pueden deberse a: que en algunos casos hay menor exposición de este epítipo II debido ya sea a la vía de transmisión o a la cepa viral, o que las cepas de HIV-1 circulantes en distintos grupos poblacionales (infectados por distintas vías de transmisión) sean diferentes y en algunos casos más parecidos al HIV-2 en sus glicoproteínas.

VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gallo RC. The AIDS Virus. *Scientific American*. 1987;256:46-56.
2. Essex M, Kanki PJ. The Origins of the AIDS Virus. *Scientific American*. 1988;259:44-51.
3. Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science*. 1983;220:868-871.
4. Kanki PJ, Alroy J, Essex M. Isolation of T-Lymphotropic Retrovirus related to HTLVIII/LAV from wild-caught african green monkeys. *Science*. 1985;230:951-4.
5. Daniel MD, Li Y, Naidu YM, et al. Simian Immunodeficiency Virus from african green monkeys. *Journal of Virology*. 1988;62:4123-8.
6. Kanki PJ, Barin F, M'Boup S, et al. New Human T-Lymphotropic Retrovirus Related to Simian T-Lymphotropic Virus Type III (STLV-III_{AGM}). *Science*. 1986;232:238-43.
7. Kanki PJ, M'Boup S, Ricard D, et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 4 and the Human Immunodeficiency Virus in West Africa. *Science*. 1987;236:827-31.
8. Hirsch VM, Olmsted RA, et al. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 1989;339:389-91.
9. Albert J, Bredberg U, et al. A new Human Retrovirus isolated of West African origin (SBL-6669) and its relationship to HTLV-IV, LAV-2 and HTLVIIIb. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1987;3:3-10.
10. Franchini G, Collalti E, et al. Genetic analysis of a new subgroup of Human and Simian T-Lymphotropic Retroviruses: HTLV-IV, LAV-2, SBL-6669 and STLV-III_{AGM}. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1987;3:11-17.
11. Gallo RC, Wong-Staal F, Montagnier L, et al. HIV/HTLV nomenclature. *Nature*. 1988;333:504
12. Wong-Staal F, Gallo RC. Human T-Lymphotropic Retroviruses. *Nature*. 1985;317:395-403.
13. Quinn, TC, Mann JM, Curran JW, Plot P. AIDS in Africa: An epidemiologic paradigm. *Science*. 1986;234:955-63.
14. Ouattara A, Groupe Ivoirien de travail sur le SIDA, Rey MA, Brun-Vezinet F, De Thé G. HIV-1 and HIV-2 are present in AIDS patients in Ivory coast. Paper presented at the Third International Conference on AIDS. Washington, D.C. 1-5 June, 1987.
15. Tedder RS, Hughes A, et al. Envelope cross reactivity in western blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. *Lancet*. 1988;2: 927-30.
16. Rey F, Salaun D, et al. HIV-I and HIV-II double infection in Central African Republic. *Lancet*. 1986;2:1391-2.
17. Rey MA, Girard PM, et al. HIV-1 and HIV-2 double infection in french homosexual male with AIDS-related complex. *Lancet*. 1987;1: 388-9.
18. Evans LA, Odehourf K, et al. Simultaneous isolation of HIV-1 and HIV-2 from an AIDS patient. *Lancet*. 1988;2:1389-91.
19. Rayfield M, De Cock K, et al. Mixed Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection in an individual: Demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*. 1988;158:1170-6.
20. Pieniazek D, Peralla JM, Ferreira JA, et al. Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. *AIDS*. 1991;5:1293-9.
21. Coffin JM. Structure and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypothesis. *Journal of General Virology*. 1979;42:1-26.
22. Brucker G, Brun-Vezinet F, Rosenheim M, et al. HIV-2 Infection in two homosexual men in France (letter). *Lancet*. 1987;1:223.
23. Benito-García A, Faña A, Ayres L, Avillez F. HIV-2 seroprevalence among the population attending the AIDS reference laboratory in Portugal (abstract M:C: 3019) VII International Conference on AIDS. Florence, June 16-21, 1991.

24. Simon F, Puel J, Hammer R, et al. HIV-2 in 2 European hemophilic patients (abstract T.B.P. 109) V International Conference on AIDS. Montreal, June 4-9, 1989.
25. Marguart K, Muller P, Brede H. HIV-2 in West Germany. *AIDS*. 1988;2:141-2.
26. Carballo E, Aguilera A, Regueiro B, Barrio E. Infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 en 2 marineros del noroeste de España. *Med. Clin. (Barc)*. 1994;102:101-3.
27. Rubsamén-Waigmann H, Breisen HV, Manlar JK, et al. A Spread of HIV-2 in India. *Lancet*. 1991;337:550-1
28. O'Brien TR, George JR, Holmberg SD. Human Immunodeficiency virus type 2 infection in the United States: epidemiology, diagnosis, and public health implications. *JAMA*. 1992;267:2775-9.
29. CDC. Testing for antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 2 in the United States. *MMWR*. 1992;41:1-9.
30. Myers RA, Patel JD, Mehsen JJ. Identifying HIV-2 Seropositive Individuals by Reevaluating HIV-1 Indeterminate Sera. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome*. 1992;5:417-23.
31. Neuman PW, O'Shaughnessy MV, Lepine D, et al. Laboratory diagnosis of the first cases of HIV-2 infection in Canada. *Can. Med. Assoc. J.* 1989;140:125-8.
32. Gonda MA, Wong-Staal F, et al. Sequence Homology and Morphologic Similarity of HTLV-III and Visna Virus, a Pathogenic Lentivirus. *Science*. 1985;227:173-7.
33. Gallo RC, Sallahuddin SZ, Popovic M, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;224:500-3.
34. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, et al. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS, and pre-AIDS. *Science*. 1984;224:497-500.
35. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West-African patients with AIDS. *Science*. 1986;233:343-6.
36. Sattenlau QJ, Clapham PR, Weiss RA, et al. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, and HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS*. 1988;2: 101-5.
37. Kong LI, Lee SW, Kappes JC, et al. West African HIV-2 related retrovirus with attenuated cytopathicity. *Science*. 1988;240:1525-9
38. Evans LA, Moreau J, Odehour A, et al. Characterization of a non cytopathic HIV-2 strain with unusual effects on CD4 expression. *Science*. 1988;240:1522-5.
39. Clavel F, Masinho K, Chamaret S, et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *New England Journal of Medicine*. 1987;316:1180-5.
40. Brun-Vezinet F, Rey MA, Katlama C, et al. Lymphadenopathy-associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. *Lancet*. 1987;1:128-32.
41. Ayanian JZ, Maguire JH, Marink RG, et al. HIV-2 infection in the United States. *New England Journal of Medicine*. 1989;320:1422-3.
42. Romieu Y, Marink R, Kanki PJ, et al. HIV-2 link to AIDS in West Africa. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome*. 1990;3:220-30.
43. Mabey DCW, Tedder RS, Hughes ASB, et al. Human retroviral infections in The Gambia: prevalence and clinical features. *British Medical Journal*. 1988;296:83-6.
44. Ancelle R, Blety O, Baglin AC, et al. Long incubation period for HIV-II infection. *Lancet*. 1987;1:688-9.
45. Gody M, Ouattara SA, De Thé G. Clinical experience in relation to HIV-1 and HIV-2 infection in rural hospital in Ivory Coast, West Africa. *AIDS*. 1988;2:433-6.
46. Duffort G, Couroue AM, Ancell-Park R, et al. No clinical signs 14 years after HIV-2 transmission via blood transfusion. *Lancet*. 1988;2:510.
47. LeGuenno B, Sarthou JL, Berlioz C, et al. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infections in a hospital in Dakar, Senegal. 4th International Conference on AIDS. Stockholm, Sweden. June, 1988.
48. Marink R, Ricard D, M'Boup S, et al. Clinical, hematological, and immunological evaluation of individuals exposed to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2). *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1988;4:137-48.

49. Pepin J, Dunn D, Gaye Y, et al. HIV-2 infection among prostitutes working in the Gambia: association with serological evidence of genital ulcer diseases and with generalized lymphadenopathy. *AIDS*. 1991;5:69-75.
50. Lisse IM, Poulsen AG, Aaby P, et al. Immunodeficiency in HIV-2 infection: a community study from Guinea-Bissau. *AIDS*. 1990;4:1263-6.
51. Pepin J, Morgan G, Dunn D, et al. HIV-2-induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV-1. *AIDS*. 1991;5:1165-72.
52. Marlink R, Kanki PJ, Thior Y, et al. Reduced Rate of Disease Development After HIV-2 Infection as Compared to HIV-1. *Science*. 1994;265:1587-90.
53. Poulsen AG, Kvinesdal B, Aaby P, et al. Prevalence of and mortality from Human Immunodeficiency Virus Type 2 in Bissau, West Africa. *Lancet*. 1989;2:827-30.
54. Morgan G, Wilkins HA, Pepin J, et al. AIDS following mother-to-child transmission of HIV-2. *AIDS*. 1990;4:879-82.
55. Matheron S, et al. *Lancet*. 1990;335:110
56. Poulsen AJ, Kvinesdal BB, Aaby P, et al. Lack of evidence of Vertical Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 2 in a sample of the General Population in Bissau. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome*: 1992;5:25-30.
57. Simon F, Matheron S, Tamalet C, et al. Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS*. 1993;7:1411-7.
58. CDC. Classification system for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infections. *MMWR*. 1986, 35:334-9.
59. Redfield RR, Wrigt DC, Tramont EC. The Walter Reed staging classification for HTLV-III/LAV infection. *N. Eng. J. Med.* 1986, 314:131-2.
60. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*. 1985;313:277-84.
61. Wain-Hobson S, Sonigo P, Vartanian JP, et al. Nucleotide sequence of the AIDS virus LAV. *Cell*. 1985;40:9-17.
62. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*. 1985;313:450-8.
63. Sanchez-Pezcador R, Power MD, Barr PJ, et al. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science*. 1985;227:484-92.
64. Wong-Staal F. Molecular Biology of Human Immunodeficiency Viruses. Current Topics in AIDS. 1989. Gottlieb MS, Jeffries DJ, Mildvan D, Pinching AJ, Quinn TC, Weiss RA (ed) Vol. 2, pp 81-102. John Wiley & Sons.
65. Haseltine WA, Wong-Staal F. The Molecular Biology of the AIDS Virus. *Scientific American*. 1988;259:34-42.
66. Jakobovits A, Smith DH, Jakobovits EB, Capon DJ. A discrete element 3' of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-1 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV transactivator. *Mol. Cell. Biol.* 1988;8:2555-61.
67. Feinberg MB, Jarret RF, Aldovini A, et al. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*. 1986;46:807-17.
68. Wrigth CM, Felber BK, Paskalis H, Paviakis GN. Expression and characterization of the trans-activator of HTLV-III/LAV virus. *Science*. 1986;234:988-92.
69. Rosen CA, Sodroski JG, Goh WC, et al. Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III. *Nature*. 1986;319:555-59.
70. Cullen BR. Trans-activation of the human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell*. 1986;46:973-82.
71. Hauber JA, Perkins A, Heimer EP, Cullen BR. Trans-activation of the human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987;84:6364-8.
72. Braddock M, Chambers A, Wilson W, et al. HIV-1 tat 'activates' presynthesized RNA in the nucleus. *Cell*. 1989;58:269-79.
73. Braddock M, Thorburn AM, Chambers A, et al. A nuclear translational block imposed by the HIV-1 U3 region is relieved by the Tat-TAR interaction. *Cell*. 1990;62:1123-33.

74. Emerman M, Guyader M, Montagnier L, et al. The specificity of the HIV-2 transactivator is different from that of HIV-1. *EMBO Journal*. 1987;7:3755-60.
75. Emerman M, Vazeus R, Paden K. The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell*. 1989;57:1155-65.
76. Malim MH, Hauber J, Le SY, et al. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 1989;33:254-7.
77. Hammarskjöld ML, Helmer J, Hammarskjöld B, et al. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product. *Journal of Virology*. 1989;63:1959-66.
78. Felber BK, Hadzopoulos-Cladaras, Cladaras C, et al. Rev protein human immunodeficiency virus type 1 affects stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989;86:1495-9.
79. Chang DD, Sharp PA. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell*. 1989;59:789-95.
80. Franchini G, Robert-Guroff M, Ghayeb J, et al. Cytoplasmic localization of the HTLV-III 3' *orf* protein in culture T cells. *Virology*. 1986;155:593-9.
81. Fisher AG, Ratner L, Mitsuya H, et al. Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science*. 1986;223:655-9.
82. Luciw PA, Cheng-Mayer C, Levy JA. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: The *orf-B* region down regulates virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987;84:1434-8.
83. Ahmad N, Venkatesan S. *Nef* protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*. 1988;241:1481-5.
84. Garret DE, Tiley LS, Cullen BR. Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 *vif* and *vpr* products. *Journal of Virology*. 1991;65:1553-7.
85. Lee TH, Coligan JE, Allan JS, et al. A new HTLV-III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science*. 1986;231:1546-9.
86. Arya SK, Gallo RC. Three novel genes of human T lymphotropic virus type III. Immune reactivity of their products with sera from acquired immunodeficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986;83:2209-13.
87. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, et al. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with *src* gene deletions. *Science*. 1986;231:1549-53.
88. Wong-Staal F, Chanda P, Ghayeb J. Human Immunodeficiency Virus: the sixth gene. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1987;3: 33-39.
89. Cohen EA, Terwilliger EF, Proulx Y. Identification of HIV-1 *vpr* product and function. *Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome*. 1990;3:11-8.
90. Soler-Claudin C. Biología de los virus de inmunodeficiencia humana. *LAB-acta*. 1989;1:24-27.
91. Dalgleish A, Beverly P, Clapham P, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-6.
92. Klatzman D, Champagne E, Chamaret S, et al. T lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*. 1984;312:767-8.
93. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in immune system and the brain. *Cell*. 1986;47:333-48.
94. Watson JD, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 1987. The Benjamin/Cummings publishing company Inc pp 936-45.
95. Lefrere, et al. (letter to the editor). *Lancet*. 1988;5:1220-1.
96. Bryan RC, Warner CG. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell*. 1989;58:423-6.
97. Rosen CA, Pavlakis GN. Tat and rev: positive regulators of HIV gene expression. *AIDS*. 1990;4:499-509.
98. Benko DM, et al. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, *Tev* shares sequences with *tat*, *env* and *rev* proteins. *Journal of Virology*. 1989;64:2505-18.
99. Shwartz, S. et al. 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. 1990;64:2519-29.
100. Cheng Y, GINGER, E.D., Kenneth F.B., et al. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:2187-9.

101. McCune JM. HIV-1: The infective process in vivo. *Cell*, 1991;64:351-363.
102. Cullen, B.R. Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *Journal of Virology*. 1991;65:1053-6.
103. Peng C, Ho BK, Chang NT. Role of human immunodeficiency virus type 1 specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *Journal of Virology*. 1989;63:2550-6.
104. Shibata R, Miura T, Hayami M, et al. Mutational Analysis of the Human Immunodeficiency Virus Type-2 (HIV-2) Genome in Relation to HIV-1, and Simian Immunodeficiency Virus SIV_{AD8}. *Journal of Virology*. 1990;64:742-7.
105. Callebaut C, Krust B, Jacolet E, Hovanessian AG. T Cell Activation Antigen CD26, as a Co-factor for entry of HIV in CD4+ Cells. *Science*. 1993;262:2045-50
106. Ostrove JM, Leonard J, Weck KE et al. Activation of the human immunodeficiency virus by herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, 1987;61:3726-3732.
107. Levy, J.A. AIDS. Marcel Dekker Inc. New York, 632 pp.
108. Barin F, Denis F, Baillou A, et al. A HTLV-III related human immunodeficiency retrovirus, HTLV-IV: analysis of cross reactivity with the human immunodeficiency virus (HIV). *Journal of Virological Methods*. 1987;17:55-61.
109. Weiss RA, Clapham PR, Weber JN, et al. HIV-2 antisera cross-neutralize HIV-1. *AIDS*. 1988;2:95-100.
110. Bottiger B, Karlsson A, et al. Cross-Neutralizing antibodies against HIV-1 (HTLV-IIIb and HTLV-IIIIRF) and HIV-2 (SBL-6669 and a new isolate SBL-K135). *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1989;5:525-533.
111. Cortes E, Detels R, et al. HIV-1, HIV-2 and HTLV-1 Infection in high risk groups in Brazil. *New England Journal of Medicine*. 1989;320:953-958.
112. Beach RS, Mantero-Atienza E, et al. HIV Infection in Brazil. *New England Journal of Medicine*. 1989;321:830.
113. Espejo RT, Uribe P. *New England Journal of Medicine*. 1989;321:830-831.
114. O'Brien TR, Heyward W, et al. *New England Journal of Medicine*. 1989;321:831-832.
115. Valadez N, Soler C. HIV-2 transmembrane glycoprotein cross reactive antibodies in mexican HIV-1 positive sera. (Abs.) IXth International Conference on AIDS. Berlin, Germany. 1993;1:211.
116. Guyader M, Emmerman M, Sonigo P, et al. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*. 1987;326:662-9.
117. Hu WS, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science*. 1990;250:1227-33.
118. Hu WS, Temin HM. Genetic consequences of packing two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;83:1556-1560.
119. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Nature*. 1976;329:21
120. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963;85:2149-54.
121. Pollet E. Confirmation and Differentiation of HIV-1 and HIV-2 Antibodies. *European Clinical Laboratory*. 1991;June:10.
122. Fransen K, Pollet DE, Peeters M, et al. Evaluation of a Line Immunoassay for Simultaneous Confirmation of Antibodies to HIV-1 and HIV-2. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 1991;10:939-46
123. Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, et al. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *Journal of Virology*. 1987;61:570-578.
124. Gallaheer, WR; Ball JM, Gary RF, et al. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1989;5:431-40.
125. Kowalski M, Potz J, Basiripour L, et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. 1987;237:1351-5
126. Reitz MS, Wilson C, Naugle C. Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell*. 1988;54:57-63.

127. Barin F, McLane MF, Allan JS, et al. Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. *Science*. 1985;228:1094-8.
128. Neurath AR, Strick N, Taylor P, et al. Search for epitope-specific antibody responses to the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1990;6:1183-92.
129. Myers G, Rabson AB, Berzofsky JA, et al. Human retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, N. Mex. 1990.
130. Galleher WR. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell*. 1987;50:327-8.
131. Gnann JJ, Schwimbeck PL, Nelson JA, et al. Diagnosis of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 1987;156:261-7.
132. Goudsmit J, Melen RH, Brasseur R. Map of sequential B-cell epitopes of the HIV-1 transmembrane protein using human antibodies as probes. *Intervirology*. 1990;31:327-38.
133. Klasse PJ, Pipkorn R, Blomberg J. Presence of antibodies to a putatively immunosuppressive part of human immunodeficiency virus (HIV) envelope glycoprotein gp41 is strongly associated with health among HIV-positive subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988;85:5225-9.
134. Xu J-Y, Gorny MK, Palker T, et al. Epitope Mapping of two Immunodominant Domains of gp41, the Transmembrane Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1; Using Ten Human Monoclonal Antibodies. *Journal of Virology*. 1991;65:4832-8.
135. Narvanen A, Korkkolainen M, Kontio S, et al. Highly immunoreactive antigenic site in a hydrophobic domain of HIV-1 gp41 which remains undetectable with conventional immunochemical methods. *AIDS*. 1988;2:119-123.
136. Schrier RD, Gnann JW Jr, Langlois AJ, et al. B- and T-lymphocyte responses to an immunodominant epitope of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 1988;62:2531-6.
137. Tyler DS, Stanley SD, Zolla-Pazner S, et al. Identification of sites within gp41 that serve as targets for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*. 1990;145:3276-82.
138. Robinson WE Jr, Gorny MK, Xu J-Y, et al. Two immunodominant domains of gp41 bind antibodies which enhance human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro. *Journal of Virology*. 1991;65:4169-76.
139. Robinson WE Jr, Kawamura T, Gorny MK, et al. Human monoclonal antibodies to the human immunodeficiency type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein gp41 enhance HIV-1 infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990;87:3185-9.
140. Chanh TC, Dreesman GR, Kanda P, et al. Induction of anti-HIV neutralizing antibodies by synthetic peptides. *EMBO Journal*. 1986;5:3065-71.
141. Evans DJ, McKeating J, Meredith JM, et al. An engineered poliovirus chimera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature*. 1989;339:385-8.
142. Golding HF, Robey FA, Gates FT, et al. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus 1 gp41 and human MHC class II B₁ domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patients' sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome. *J. Exp. Med.* 1988;167:914-923.
143. Bost KL, Pascual DV. Antibodies against a peptide sequence within the HIV envelope protein cross-reacts with human interleukin-2. *Immunol. Invest.* 1988;17:577-86.
144. Oldstone MBA, Tishon A, Lewicki H, et al. Mapping the Anatomy of the Immunodominant Domain of the Human Immunodeficiency Virus gp41 Transmembrane Protein: Peptide Conformation Analysis Using Monoclonal Antibodies and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.
145. Gnann JW, McCormick JB, Mitchell S, et al. Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science*. 1987;237:1346-8.
146. Gnann JW, Nelson JA, Oldstone MBA. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 1987;61:2639-41.

147. Myers G, Rabson AB, Josephs SF, et al. Human retroviruses and AIDS, a compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences. In Human Retroviruses and AIDS. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos N.M. 1989.
148. Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry*. 1986;25:5425-31.
149. Haist S, März J, Wolf H, Modrow S. Reactivities of HIV-1 gag-Derived Peptides with Antibodies of HIV-1-Infected and Uninfected Humans. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1992;8:1909-17.
150. De Cock KM, Porter A, Kouado J, et al. Cross reactivity on Western blots in HIV-1 and HIV-2 infections. *AIDS*. 1991;5:859-63.
151. Bottiger B, Karlsson A, Andreasson P-A, et al. Envelope Cross- Reactivity between Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2 Detected by Different Serological Methods: Correlation between Cross-Neutralization and Reactivity against the Main Neutralizing Site. *Journal of Virology*. 1990;64:3492-9.
152. Fenovillet E, Bianes N, Gluckman JC. gp160 of commercial HIV Western Blots Is not gp160 env: should criteria for seropositivity be revised? *AIDS*. 1991;5:770
153. Parekh BS, Pau Ch-P, Granade TC, et al. Oligomeric nature of transmembrane glycoproteins of HIV-2: procedures for their efficient dissociation and preparation of Western blots for diagnosis. *AIDS*. 1991;5:1009-13.
154. Cot MC, Poulain M, Delagneau JF, et al. Dual HIV-1 and HIV-2 infection in West Africa supported by synthetic peptide analysis. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1988;4:239-41.
155. Foucault C, López O, Jourdan G, et al. Double HIV-1 and HIV-2 seropositivity among blood donors. *Lancet*. 1987;2:165-6.
156. Hartley JW, Wolford NK, Old LJ, et al. A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977;74: 789-92.
157. Elder JH, Gautsch JW, Jensen FC, et al. Biochemical evidence that MCF murine leukemia viruses are enveloped (env) gene recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977;74:4676-80.
158. Soler C, Basualdo MC, Rico G, et al. HIV heterogeneity in blood and sexual infected Mexican patients. Seventh International Conference on AIDS. Florence Italy. 1991.
159. Soler C, Gudiño JC. A 11 años de su descubrimiento ¿Que sabemos del virus de inmunodeficiencia humana?. Salud Pública de México. 1995. En prensa
160. Soler C, Basualdo MC, Rico G. Heterogeneidad y reacciones cruzadas de sueros de pacientes mexicanos por radioinmunoprecipitación de proteínas de HIV-1 y HIV-2. Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. 1991.
161. Aldovini A, Walker BD. Techniques in HIV Research. *Stockton press*. 1990. New York.
162. Espejo RT, Uribe P. Immunoprecipitation of Human Immunodeficiency Virus type 2 Glycoproteins by Sera Positive for Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28:2107-10.