

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

11

CARACTERIZACION DE VARIANTES MEXICANAS DE LA SECUENCIA TERMINAL REPETIDA LARGA (LTR) DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1).

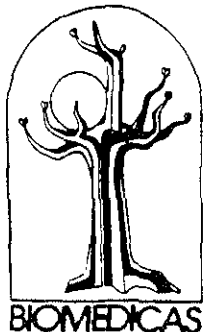
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

VICTOR RAUL GOMEZ ROMAN



BIOMEDICAS

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mi Familia, por heredarme sus genes y sus virtudes.
Gracias, Papá, Mamá, Miguel, Ivette, Alicia, Molly, Amparo, Henry, Pamela y Hoyt.*

A Hugo, por todo lo que aún nos espera...

A Carmen, por tu fuerza y carácter.

A Carlos Arias y Jaime Berumen, por haber integrado mi Comité Tutorial. Gracias por todo su apoyo y por haberse interesado genuinamente en mi trabajo.

A María del Carmen Basualdo, porque verdaderamente honras el apellido de Académico en tu profesión de Técnico, por el gusto de haber trabajado contigo.

A mis amigos: Pepe, Mara, Karina y Manuel, por escucharme e impulsarme.

A mis compañeros: Amine, Liz, Silvina, Susana, Octavio, José, Fernanda, Joel, Laura, Guillermo, Erika, Claudia, Patricia, Luz María y Sergio.....porque de todos he aprendido algo.

A los miembros de la Cohorte de la Ciudad de México, por todo su entusiasmo y su altruismo.

RESUMEN

La región Terminal Repetida Larga (LTR) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) funciona como un sitio de control y regulación de la transcripción viral *in vivo* e *in vitro*. Con el fin de caracterizar la secuencia LTR de variantes mexicanas del HIV-1, se extrajo el DNA de la sangre periférica de un paciente "no progresor" y de cinco donadores HIV-1 seropositivos inscritos en la Cohorte de la Ciudad de México. Así, se amplificaron, clonaron y secuenciaron fragmentos del LTR de una longitud de 505 pb. Las secuencias obtenidas correspondieron al Subtipo B del HIV-1, manifestándose una identidad del 97.65% en la región no-codificante del LTR. En las secuencias correspondientes al "no progresor", se observaron dos mutaciones puntuales en el tallo del elemento de respuesta a la transactivación (TAR), dando origen a dos posibles estructuras secundarias alternas de TAR-RNA. En las secuencias correspondientes a un paciente con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), se observó una deleción de 18 pb en el sitio de unión al Factor Nuclear de Linfocitos T Activados (NFAT-1). Esta deleción es genéticamente inestable *in vivo*, ya que no se manifestó en una de las siete muestras de sangre periférica del paciente.

Para determinar si las mutaciones que se observan *in vivo* repercuten en la función promotora del LTR, se seleccionaron seis secuencias mutantes y éstas se subclonaron en vectores de expresión de luciferasa (pGL2-Basic). Los plásmidos recombinantes, denominados pGL2-LTRMex, se transfectaron en células linfocíticas Jurkat, en la ausencia y presencia del transactivador viral Tat. No se observaron diferencias significativas al comparar la actividad transcripcional basal de las variantes mexicanas con la actividad basal del LTR prototipo (pNL4-3), $p > 0.05$. Sin embargo, bajo los efectos de Tat, las variantes mexicanas del LTR manifestaron una actividad transcripcional equiparable o mayor a la del LTR prototipo. Aún las variantes con la deleción de 18 pb, así como aquellas con las mutaciones en el tallo de TAR, mostraron una actividad significativamente superior, $p < 0.05$. Ni las mutaciones puntuales, ni las deleciones, ni los polimorfismos observados lograron reprimir la actividad transcripcional dependiente de Tat.

Este estudio demuestra que las deleciones y mutaciones que ocurren *in vivo* en el LTR no le son forzosamente perjudiciales al virus y pueden ser genéticamente inestables, argumentando así, en contra de la producción de vacunas del HIV-1 atenuadas por deleciones en *neff*/LTR.

SUMMARY

The Long Terminal Repeat (LTR) of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) serves as a site for the control and regulation of viral transcription *in vivo* and *in vitro*. In order to characterize HIV-1 LTR variants from Mexico, DNA was extracted from the peripheral blood of a long-term non-progressor and from five other patients enrolled in the Mexico City Cohort. Thus, 505 bp-LTR fragments were PCR amplified, cloned and sequenced from each patient. The resulting LTR sequences corresponded to the B subtype of HIV-1, with an overall identity of 97.65% along the non-coding region. In the LTR sequences derived from the non-progressor, two point mutations were observed within the stem of the trans-activation response element (TAR), giving rise to two possible and alternative TAR-RNA secondary structures. In the LTR sequences derived from an AIDS patient, a novel 18 bp deletion was observed within the binding site for the Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT-1). The 18 bp deletion is genetically unstable *in vivo*, as it was not observed in one of seven sequential blood samples taken from this patient.

In order to determine whether these *in vivo* deletions and mutations have any impact on the promoter function of the LTR, mutant sequences were selected and subcloned into pGL2-Basic, a luciferase reporter vector. The resulting constructs, pGL2-LTRMex, were used to transfect Jurkat T cells in the absence or presence of the viral transactivator, Tat. At basal levels of transcription, the Mexican LTR sequences displayed a transcriptional activity which was indistinguishable from that of the positive control (pNL4-3), $p > 0.05$. However, in the presence of Tat, all Mexican LTR sequences displayed either similar or higher levels of transcriptional activity when compared to the control. Unexpectedly, the LTR sequences with an 18 bp deletion and even the LTR sequences with point mutations which allegedly perturb the TAR-RNA secondary structure, resulted in at least a two-fold increase in transcriptional activity ($p < 0.05$). Neither the point mutations, nor the 18 bp deletion, nor the observed polymorphisms were able to repress Tat-dependent LTR transcriptional activity.

The present work demonstrates that *in vivo* LTR deletions and mutations are not necessarily deleterious to the virus and can be genetically unstable. Thus, these observations would argue against the production and safety of *neff*-LTR-truncated strains of HIV-1 as suitable vaccine candidates.

Índice

Sección	página
1. Introducción	1
1.1 Clasificación del HIV-1	2
1.2 Morfología de la partícula viral madura	3
1.3 Ciclo de replicación viral	5
1.4 Organización genómica del DNA proviral y ubicación del LTR	11
1.5 Organización y función <i>in vitro</i> del HIV-1 LTR	12
1.6 Los ensayos de genes reporteros como modelo de estudio del LTR	15
1.7 Efectos del transactivador Tat en la actividad del LTR	16
1.8 Efectos de las citocinas y mitógenos en la actividad del LTR	16
1.9 Importancia del LTR <i>in vivo</i>	
1.9.1 Historia natural de la infección por el HIV-1	21
1.9.2 Factores asociados a la lenta evolución clínica	23
1.9.3 Variabilidad del LTR <i>in vivo</i> avances y errores en los modelos de estudio	24
2. Justificación	26
3. Objetivos	27
4. Material y Métodos	28
5. Resultados	40
6. Discusión	56
7. Bibliografía	64

2. 1.1 Clasificación del HIV-1.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) contiene dos cadenas sencillas de RNA de polaridad positiva [1]. Debido a que una de estas cadenas se retrotranscribe a DNA por medio de la enzima viral denominada transcriptasa reversa, el HIV pertenece a la familia *Retroviridae* [2]. Al HIV también se le clasifica dentro del género de los *lentivirus*, ya que la patología causada por éstos generalmente se asocia con periodos largos de incubación y con manifestaciones degenerativas del sistema nervioso central o del sistema inmune [3]. El aspecto cónico de la cápside viral también distingue morfológicamente al HIV como un *lentivirus*, ya que el resto de los retrovirus humanos contienen una cápside en forma de cubo [2, 4].

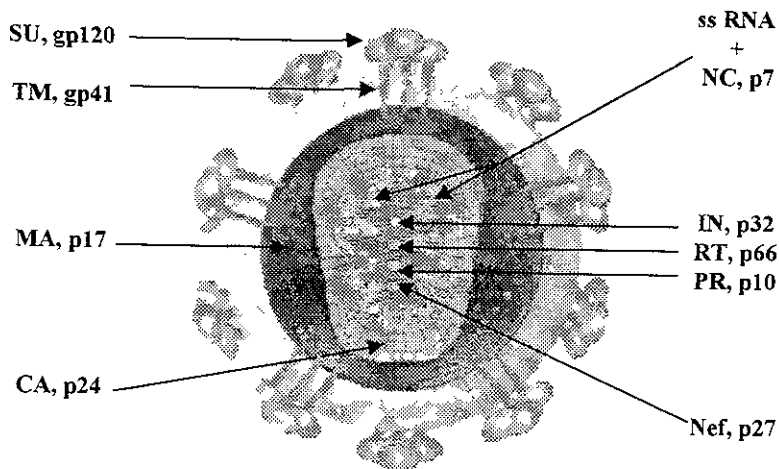
En base a la *variabilidad genética y antigénica*, se han definido dos tipos del HIV: el tipo 1 y el tipo 2 [5]. Aunque ambos tipos participan como agentes etiológicos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), solo comparten una homología genética por debajo del 50% [6, 7]. El HIV-2 también difiere del HIV-1 en cuanto a su epidemiología [8], historia natural de la infección [9, 10] y varios aspectos biológicos [11]. Este trabajo se enfoca en el estudio del HIV-1.

1.2 Morfología de la partícula viral madura.

Al igual que otros lentivirus, el HIV-1 tiene un diámetro de aproximadamente 120 nm [3]. La superficie está compuesta por una bicapa lipídica o envoltura que proviene de la célula hospedera y que acarrea proteínas humanas tales como los complejos *mayores de histocompatibilidad*, entre otras [12]. Incrustados en la envoltura, se encuentran 72 picos en forma de perilla (Figura 1.1) que están formados por el complejo trimerico (SU-TM)₃. La glicoproteína de superficie (SU, gp120) se encuentra expuesta hacia el exterior y permanece anclada a la glicoproteína transmembranal (TM, gp41) a través de dominios hidrofóbicos y enlaces no covalentes [13].

Hacia el interior de la partícula, se encuentra la matriz viral, una capa que sostiene la estructura del virus y que a su vez está constituida de aproximadamente 2,000 copias de la proteína p17 (MA) [13]. Dentro de la matriz, se encuentra la cápside antes mencionada, cuya forma de cono está compuesta por la proteína p24 (CA). La cápside contiene dos cadenas sencillas de RNA (ssRNA) que constituyen el genoma viral. Estas cadenas sencillas de polaridad positiva (mRNA codificante) se encuentran físicamente asociadas a las proteínas de la nucleocápside (NC, p7). La proteasa (PR), la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN) son tres enzimas que el HIV-1 utiliza durante su ciclo de replicación y también se encuentran dentro de la cápside viral. Por último, las proteínas Nef, Vif y Vpr se encuentran dentro de las partículas virales, aunque su ubicación exacta es variable según la madurez de la partícula viral [13, 14].

(A)



(B)

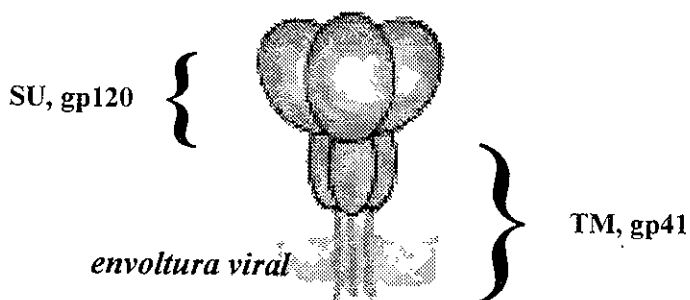


Figura 1.1. Esquema de una partícula madura del HIV-1. (A) Se muestran diez de los 72 picos en forma de perilla que sobresalen de la envoltura viral. (B) Cada pico está compuesto por el complejo trimérico (SU-TM)₃.

3 Ciclo de replicación viral.

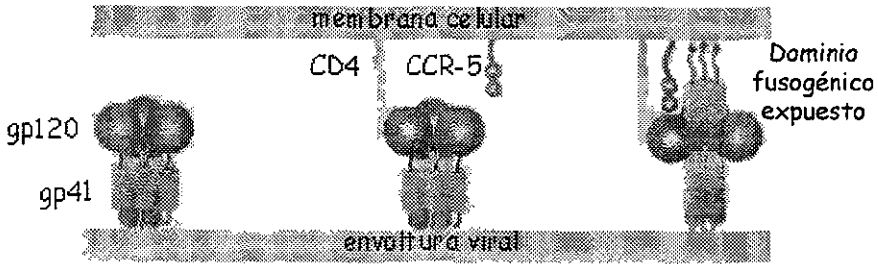
El ciclo de replicación viral se divide en dos partes la fase temprana y la fase tardía. La fase temprana comienza en la interacción entre el virus y la célula susceptible e involucra todos los procesos que culminan en la integración del genoma viral al DNA cromosomal de la célula. La fase tardía comienza en la transcripción y expresión regulada del provirus integrado e involucra todos los procesos que culminan en la gemación y maduración de las partículas virales [13].

3.1 Fase Temprana.

En el modelo actual de infección de linfocitos y monocitos, la glicoproteína de superficie (SU, gp120) se une al receptor CD4 en la membrana de la célula susceptible. La unión prolongada entre gp120 y la molécula CD4 causa cambios conformacionales en gp120 que potencian su afinidad hacia correceptores celulares tales como la fusina (en el caso de los linfocitos) ó el CCR5 (en el caso de los monocitos). En conjunto, las interacciones entre gp120, CD4 y los correceptores celulares inducen el desdoblamiento de la proteína transmembranal (TM, gp41), exponiendo así su dominio fusogénico en el extremo amino-terminal. Mediante este mecanismo del "resorte cargado" (Figura 1 2(A)), parecido al de la hemaglutinina-A del virus de la influenza, se inicia la fusión con la membrana celular para iniciar el proceso de penetración [15].

Se ha descrito un mecanismo alterno de fusión (Figura 1 2(B)), en el cual la interacción prolongada entre gp120, CD4 y los correceptores celulares desprende a la glicoproteína de superficie, separándola del complejo (SU-TM)₃. Este desprendimiento permite que la proteína transmembranal TM se reacomode y oriente su dominio fusogénico hacia la membrana celular [16]. Teóricamente, ambos mecanismos son posibles y no son necesariamente excluyentes [13].

(A)



(B)



Figura 1.2. Mecanismos alternos de fusión de la envoltura viral con la membrana celular. La interacción prolongada entre gp120, CD4 y CCR-5 provoca (A) la distensión del "resorte" fusogénico de gp41 ó (B) el desprendimiento de gp120 y la reorientación del dominio fusogénico hacia la membrana celular.

Posterior a los eventos de fusión y penetración, el virus se desnuda, eliminando su envoltura y depositando su genoma de RNA en el citoplasma (Figura 1.3). Para que se lleve a cabo la retrotranscripción, se requiere que una molécula de tRNA^{Lis} celular se hibride al RNA viral y así sirva como iniciador de la cadena nascente de cDNA [17]. La transcriptasa reversa (RT) se activa y, mediante una serie de saltos combinados con su actividad de RNAsaH y de polimerasa, produce cDNA viral de doble cadena [1, 17]. Se ha demostrado que tanto la proteína accesoria Vif, así como la proteína de la nucleocápside p7 (NC) aumentan la eficiencia de la retrotranscripción *in vitro* mediante la estabilización y el acomodamiento de las moléculas de RNA [13, 18].

Una vez que se produce el cDNA viral de doble cadena, éste forma un complejo de preintegración, asociándose físicamente con proteínas celulares de alta movilidad (HMG-1) y con cuatro proteínas virales: RT, MA, Vpr e IN [19] (Figura 1.3). La proteína Vpr conecta el complejo de preintegración a la maquinaria de importación nuclear de la célula y por medio de un proceso de transporte activo que requiere trifosfato de adenosina (ATP), el complejo de preintegración se transloca al núcleo celular [20]. Dentro del núcleo, el cDNA viral puede permanecer de forma extracromosomal hasta por cuatro semanas en células quiescentes [21], ó bien puede integrarse al genoma cromosomal de células activadas en sitios aleatorios mediante la actividad catalítica de la integrasa (IN, p32) [22]. Se produce, entonces, lo que se define como un provirus del HIV-1.

1.3.2 Fase Tardía.

El primer paso de la fase tardía del ciclo de replicación viral es la síntesis de transcritos virales y la traducción de los mismos para producir proteínas virales. Los primeros transcritos que se producen son RNA mensajeros cortos que se editan por el mecanismo de *splicing* y corresponden a las proteínas reguladoras del virus: Tat, Rev y Nef [23]. Una vez traducida, la proteína Tat funciona como el transactivador viral (ver Sección 1.7) y se encarga de estimular la producción de transcritos virales tardíos que son más largos y que dan lugar a las proteínas estructurales y a las enzimas del virus [24].

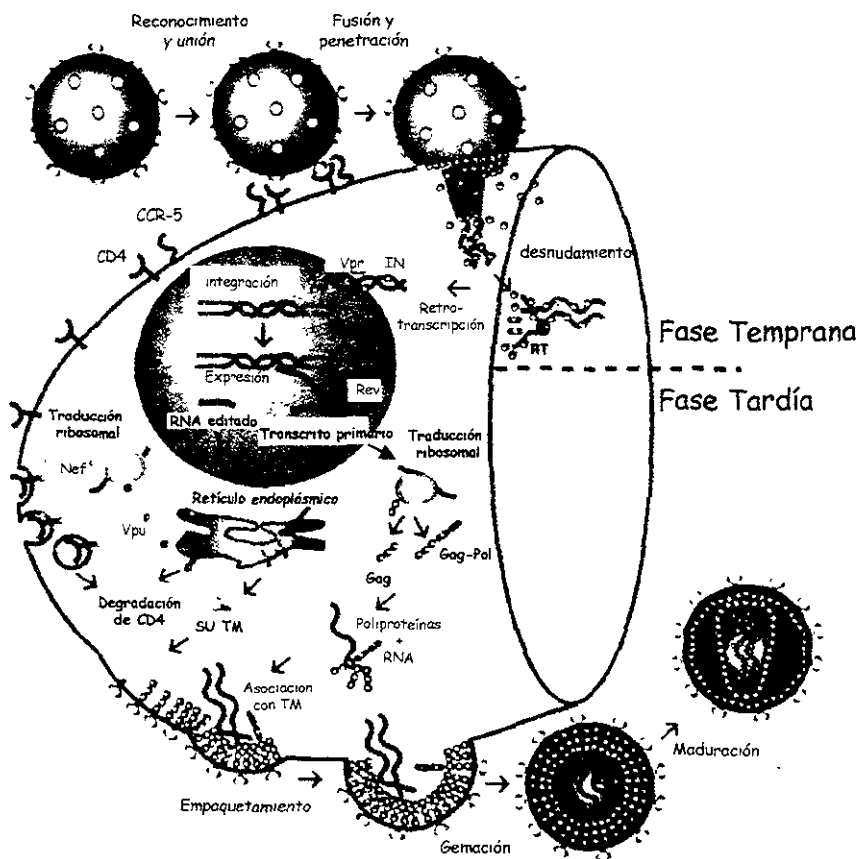


Figura 1.3. Esquema del ciclo de replicación del HIV-1. La fase temprana comienza en el reconocimiento del receptor CD4 y culmina en la integración del genoma proviral. La fase tardía comienza en la producción de transcritos virales y termina en la formación de partículas virales maduras [13].

El transcrito viral correspondiente a los genes de la envoltura (*env*) es un transcrito editado por *splicing* que se traduce en ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE), formando la poliproteína precursora gp160. Ésta se oligomeriza en trímeros precusores (gp160)₃ que pasan a glicosilarse en el aparato de Golgi [15]. En el trayecto hacia la membrana celular, los trímeros precusores son cortados por proteasas celulares [25], dando origen a los complejos triméricos (SU-TM)₃ ó (gp120-gp41)₃ que forman los picos de la envoltura mencionados anteriormente (Figura 1.1(B)) La molécula CD4 también se sintetiza en los ribosomas asociados al RE, para evitar que ésta secuestre a los trímeros precusores antes de que salgan hacia el Golgi, la proteína viral Vpu se le une con una alta afinidad y acarrea los complejos CD4-Vpu hacia proteosomas de ubiquitina, asegurando así su degradación [26] Asimismo, las moléculas CD4 que se encuentran en la superficie de una célula infectada también se degradan dentro de endosomas Esto lo logra la proteína reguladora Nef, ya que primero se une al CD4 expresado en la membrana y luego se une al factor celular AP-2, el cual estimula la formación de endosomas recubiertos de clatrina [27]

Por otro lado, también existe un transcrito viral primario que no está editado por *splicing* y que contiene toda la información de genes estructurales y reguladores Este transcrito contiene la secuencia RRE (Rev response element) cuya estructura secundaria de RNA tiene una alta afinidad hacia la proteína viral Rev [23]. Rev no solo se une a la secuencia RRE sino que también recluta factores celulares como la exportina-1 y así facilita el transporte del transcrito primario a través del poro nuclear y hacia el citoplasma [28]. De esta forma, el transcrito primario puede permanecer en el citoplasma hasta ser empaquetado en una nueva partícula viral o bien puede ser procesado por ribosomas libres (no asociados al RE) para dar lugar a las proteínas estructurales y reguladoras.

Al procesarse en los ribosomas libres, el transcrito primario se traduce en lo que se denomina la poliproteína Gag. Frecuentemente, también ocurren cambios en el marco de lectura dentro del ribosoma y esto da origen a la poliproteína precursora Gag-Pol Ambas poliproteínas están miristiladas en su extremo amino-terminal y ello facilita que se asocien con el dominio intracelular de la proteína transmembranal TM [29], que para este entonces ya está ubicada en la membrana celular en forma de los complejos triméricos (SU-TM)₃ Se calcula que entre 1,200 y 2,000 copias de la proteína

precursora de Gag se asocian físicamente con dos transcritos virales primarios y posteriormente éstos se empaquetan con los 72 picos o trímeros (SU-TM)₃ [13]. De esta forma, se ensambla y gema una nueva partícula viral inmadura (Figura 1 3)

Posterior al proceso de gemación, la proteasa viral (PR) se desprende de la poliproteína Gag-Pol mediante un mecanismo autocatalítico [30] e inmediatamente empieza a cortar el resto de las poliproteínas empaquetadas. Así, se produce la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN) al igual que las proteínas de la matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). Mediante un proceso de maduración, las proteínas estructurales se van cortando y acomodando sucesivamente [31], generando así una partícula viral madura cuya morfología ha sido descrita con anterioridad.

Cabe señalar que existen por lo menos otros dos factores importantes en la morfogénesis de la partícula viral infecciosa. la incorporación de la ciclofilina celular-A y el empaquetamiento de la proteína Vif. En cuanto a la ciclofilina-A, se ha demostrado que su empaquetamiento en la partícula viral es imprescindible para que las partículas del HIV-1 sean infecciosas (las partículas del HIV-2 no la requieren) [32]. En el caso de Vif, se ha calculado que se empaquetan de 7 a 100 copias de esta molécula en algunas partículas virales [33] y ello resulta en un incremento de la infectividad, dependiendo de la línea celular en la que se produzcan los virus. A pesar de este efecto tan evidente en la infectividad viral, Vif sigue siendo la única proteína viral cuya función en el ciclo de replicación viral aún no se esclarece del todo.

1.4 Organización genómica del DNA proviral y ubicación del LTR.

El genoma proviral del HIV-1 se encuentra integrado mediante enlaces covalentes en sitios aleatorios de los cromosomas humanos. En su totalidad, mide aproximadamente 9.8 kb y contiene tres distintos marcos de lectura que codifican varias proteínas estructurales y reguladoras (Figura 1.4). El genoma viral se encuentra flanqueado por la secuencia terminal repetida larga (LTR, Long Terminal Repeat), la cual es redundante y se repite en la misma orientación en los extremos 5' y 3'. Los LTR (de aproximadamente 550 pb) funcionan como un punto focal en donde se controla la replicación viral [34] y aunque ambos son idénticos en secuencia, el 5' LTR está involucrado en los procesos de inicio y regulación de la transcripción viral, mientras que el 3' LTR funciona en procesos post-transcripcionales tales como la poliadenilación y la edición de transcritos virales [1]. Es importante destacar que el 3' LTR traslapa con el marco de lectura del gen *nef*, compartiendo una secuencia denominada *nef*-LTR.

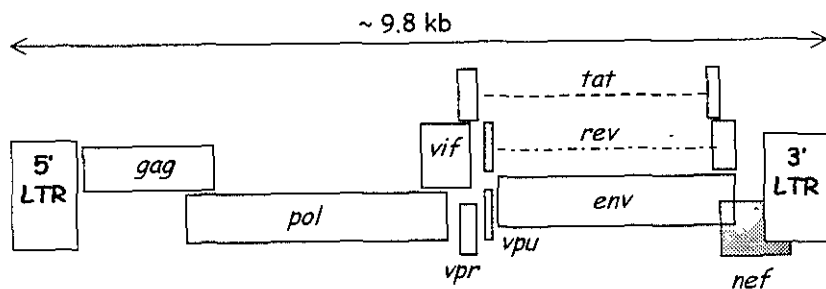


Figura 1.4. Esquema del genoma proviral del HIV-1. Los genes estructurales y reguladores se encuentran flanqueados por la secuencia terminal repetida larga (LTR). El gen *nef* traslapa con el 3' LTR.

1.5 Organización y función in vitro del HIV-1 LTR.

Experimentos basados en mutagénesis del HIV-1 han definido tres componentes principales del LTR [35]. Estos son las regiones U3, R y U5, tal como se muestran en la Figura 1.5. El inicio de la transcripción ocurre en la Guanina que se encuentra en el límite entre la región U3 y la región R; a este sitio se le denomina el "sitio +1". A partir de este sitio, la región entera R-U5 se transcribe y se incorpora como una secuencia líder de mRNA en todos los transcritos virales [1]. Esta secuencia líder de RNA contiene el elemento de respuesta a la transactivación (TAR, *Trans-Activation Response element*), cuya estructura secundaria estabiliza los complejos de inicio y elongación transcripcional (ver Sección 1.7).

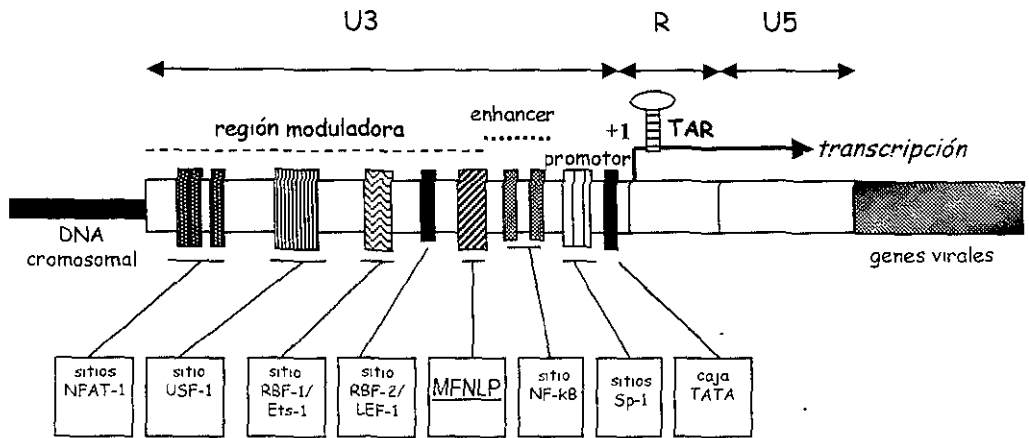


Figura 1.5. Organización genómica del HIV-1 LTR. Se observan las regiones U3, R y U5. Dentro de U3, se encuentran secuencias consenso que sirven como sitios de unión a factores celulares de transcripción.

La región U3 es la más extensa dentro del LTR y se subdivide en otras tres regiones: (i) el promotor, (ii) la región aumentadora (*enhancer*) y (iii) la región moduladora. La región promotora contiene la caja TATA y los sitios de unión a Sp-1; por lo tanto, dirige a la RNA-polimerasa celular en el proceso de la transcripción basal. Adyacente a la región promotora, se encuentra la región de elementos aumentadores, la cual se encarga de la transcripción inducible de los genes virales. Esta región contiene una duplicación de 10 pares de bases (GGG ACT TTC C), comúnmente llamada “el sitio NF- κ B” (Nuclear Factor-kappa B) y participa en la transcripción viral en respuesta a mitógenos, citocinas, señales de activación y otros estímulos inmunológicos [1, 23, 35]. Por último, la región moduladora se encarga de la transcripción regulada y contiene múltiples secuencias en *cis* que sirven como sitios de unión a diversos factores celulares tales como NFAT-1, USF-1, RBF-1, RBF-2, LEF-1 y Ets-1, entre otros [35]. Este es un ejemplo clásico de evolución convergente, ya que el HIV ha incorporado en su LTR todas estas secuencias en *cis* que normalmente funcionan como promotores celulares en linfocitos T ó en macrófagos. En el Cuadro 1, se identifican los factores de transcripción que se unen a la región U3. Se señala su función en células no infectadas del sistema inmune y su papel en la transcripción del HIV-1 en células infectadas.

El polimorfismo MFNLP (*Most Frequent Naturally-occurring Length Polymorphism*) es una inserción de 15 a 34 pb que contiene una duplicación del sitio RBF-2. Este polimorfismo se encuentra en aproximadamente 38% de las secuencias LTR [36].

Cuadro 1
Diversos factores celulares de transcripción se unen a secuencias
en *cis* dentro de la región U3 del HIV-1 LTR.

Factor celular de transcripción	Secuencia a la que se une ^a	Función habitual en linfocitos T ó macrófagos.	Función <i>in vitro</i> relacionada a la transcripción del HIV-1	Refs.
NFAT-1 (Nuclear Factor of Activated T cells)	-283 a -199	Aumenta la transcripción de IL-2 en el linfocito T como respuesta a diversos mitógenos y al anticuerpo anti-CD3	Reprime la transcripción viral.	[37,38]
USF-1 (Upstream Stimulatory Factor)	-167 a -162	Dobla la estructura del DNA, compete con la cromatina y expone regiones promotoras esenciales para la transcripción. Facilita la transcripción del gen FcγRIII en macrófagos	USF dobla la estructura del LTR al pegarse Sin embargo, <i>deleciones en este sitio</i> incrementan la transcripción viral	[38]
RBF-1, RBF-2 (ras binding factors)	-147 a -143, -129 a -121	Participan en la cascada de transducción de señales que se genera al estimular el receptor CD4	Los RBF's son sensibles a las tirosin-cinasas y activan la transcripción viral.	[39,40]
Ets-1 (Erythroblastoma twenty six)	-146 a -144 (antisentido)	Indispensable para la diferenciación de timocitos. Regula la transcripción de la IL-3, del GM-CSF y de la cadena alfa del receptor de la IL-2	Ets-1 activa la transcripción viral.	[41]
LEF-1 (Lymphoid Enhancer-binding Factor)	-134 a -130 (antisentido)	Participa en la transcripción de los genes que codifican el TCR	La cromatina reprime la transcripción a partir del LTR, pero este efecto se inhibe al añadir LEF-1	[42,43]

^a Sitio correspondiente a la enumeración de nucleótidos de la clona molecular HIV_{1XB2}, un virus prototipo.

1.6 Los ensayos de genes reporteros como modelo de estudio del LTR.

Debido a que el LTR funciona como un promotor viral, el ensayo clásico de biología molecular que se utiliza para examinar su actividad transcripcional es el ensayo de genes reporteros mediante una transfección transitoria (Figura 1.6). En breve, este ensayo consiste en cuatro pasos: (i) clonar la secuencia LTR en la posición y orientación adecuada dentro de un plásmido que exprese algún gen reportero como CAT (cloranfenicol acetil-transferasa) ó luc (luciferasa proveniente de la luciérnaga *Photinus pyralis*), (ii) transfectar células con el plásmido recombinante, (iii) incubar las células transfectadas de 24 a 48 horas para permitir que los factores de transcripción dirijan la expresión del gen reportero y (iv) medir la expresión del gen reportero mediante ensayos enzimáticos.

En base a este modelo y mediante mutagénesis dirigida, se ha logrado un mapeo muy preciso del LTR para definir las regiones esenciales y las regiones moduladoras que se mencionan con anterioridad [35, 44]. Asimismo, se ha logrado comparar la actividad transcripcional de LTRs silvestres provenientes de distintas zonas geográficas y de distintos tipos de pacientes [36, 45, 46]. Una de las ventajas de este modelo *in vitro* es que nos permite manipular las condiciones bajo las cuales se expresa el gen reportero, ya que durante la incubación de 24-48 horas, se pueden añadir (o restar) factores celulares o proteínas virales. De tal forma, se han evidenciado los efectos de la proteína Tat y de algunas citocinas en la actividad promotora del LTR.

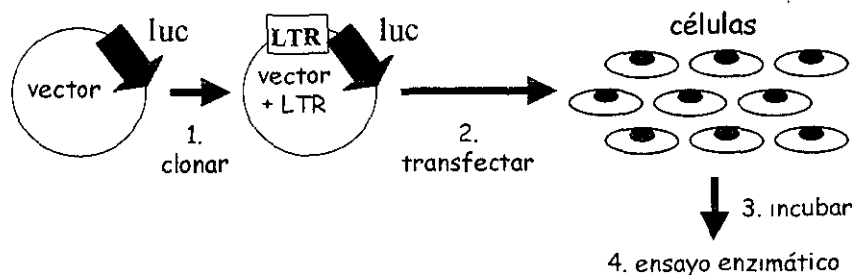


Figura 1.6. Ensayo de luciferasa para determinar la actividad del LTR. Se realiza una transfección transitoria con el plásmido reportero y se utiliza el extracto celular para medir la expresión de luciferasa.

1.7 Efectos del Transactivador Tat en la actividad del LTR.

Una de las primeras observaciones que se hicieron mediante ensayos de genes reporteros fue que la actividad promotora del LTR era mil veces mayor en células infectadas que en células sanas [47]. Esto indicaba dos posibilidades: que la infección viral incrementaba la cantidad de factores celulares de transcripción y éstos a su vez incrementaban la actividad del LTR ó bien que el virus producía factores virales propios que activaban considerablemente su transcripción. Posteriormente, se demostró que la segunda posibilidad era la más probable, ya que se identificó una proteína viral de 86 amino ácidos en cuya presencia la transcripción aumentaba de diez a cien veces *in vitro* [48]. A esta proteína se le llamó el transactivador viral Tat.

Mediante ensayos de genes reporteros refinados por mutagénesis, se demostró que los primeros 59 pares de bases de la región R del LTR eran indispensables para que Tat ejerciera su efecto transactivador [49]. En un inicio, se pensó que la proteína Tat interactuaba directamente con estos 59 pb de DNA, pero pronto se descubrió que la interacción no era proteína-DNA sino proteína-RNA [50]. Al mRNA codificado por estos 59 pb se le denominó la secuencia "TAR" (*Trans-Activation Response element*). Mediante un mapeo aún más preciso, se demostró que TAR se doblaba en una estructura secundaria de RNA bien definida (Figura 1.7) y que Tat se pegaba específicamente a la primera protuberancia (*bulge*) de tal estructura con una afinidad impresionante ($K_d=1.2 \times 10^{-10}$ M) [51].

El mecanismo de transactivación del LTR se describe en la Figura 1.7. Los primeros transcritos virales se producen mediante la actividad basal del LTR y su interacción con la RNA-polimerasa-II celular. Sin embargo, debido a la elongación abortiva, solo se logran mRNA's muy cortos que corresponden a las proteínas reguladoras Tat, Rev y Nef (Figura 1.7(A)) [1, 23]. Una vez que Tat se traduce, ésta reingresa al núcleo y se une a la ciclina-T celular (*cyc-T*). La unión con *cyc-T* incrementa la afinidad de Tat hacia TAR y se produce el complejo *cyc-T/Tat/TAR* en el transcrito viral naciente [24]. Por otro lado, el asa de TAR (*TAR loop*) interactúa físicamente con la proteína-quinasa-9 dependiente de la ciclina-T (*Cdk9, Cyclin-T-dependent protein kinase-9*). Al acercarse y coincidir, la *Cdk-9* y *Cyc-T* se asocian y forman el complejo P-TEFb (*Positive Elongation Factor b*). A su vez, P-TEFb fosforila a la RNA-pol-II y la mantiene funcionando sobre el transcrito naciente

(Figura 1.7(B)) [52]. Así, la estructura secundaria de TAR no solo es indispensable en la estabilización de los complejos de inicio de la transcripción sino que además favorece la elongación transcripcional

Se ha demostrado que algunas mutaciones puntuales dirigidas al tallo de TAR afectan la estructura secundaria del RNA y ello resulta en una menor actividad transcripcional dependiente de Tat [53] Recientemente, se ha demostrado que estas alteraciones en la estructura secundaria de TAR también pueden afectar los procesos de la retrotranscripción [54] y el empaquetamiento viral [55, 56], lo cual sugiere que el RNA de TAR está involucrado en las etapas temprana y tardía del ciclo de replicación viral [57].

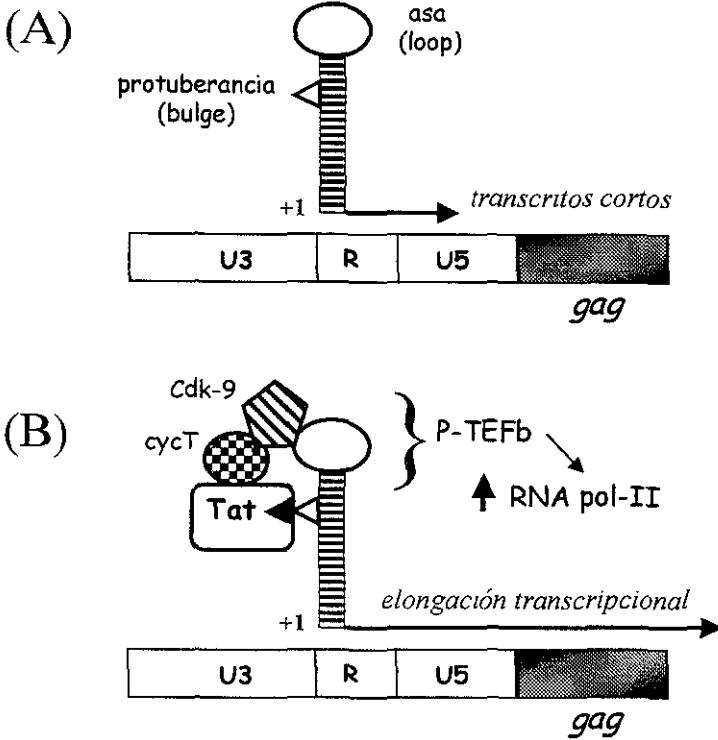


Figura 1.7. Mecanismo de transactivación del LTR. (A) La transcripción basal genera transcritos cortos que, después de editarse y empalmarse, corresponden a Tat, Rev y Nef. (B) Tat se une a la protuberancia de TAR y facilita la formación del complejo P-TEFb, manteniendo activa a la RNA polimerasa II.

1.8 Efectos de las citocinas y mitógenos en la actividad del LTR.

Cuando se aisló el HIV-1 por vez primera, se observó que la interleucina-2 (IL-2) incrementaba la replicación del virus en linfocitos T [58]. Esta fue la primera observación que indicó que las citocinas influían en la replicación del HIV-1 *in vitro*. De hecho, se ha demostrado que la IL-2 ejerce efectos mitogénicos que no solo provocan la linfoproliferación sino que también incrementan la transcripción del HIV-1 mediante los sitios NFAT-1 y TCF-1 α via el LTR [59]. Algunas otras citocinas que modulan la replicación del HIV-1 son: (i) las proinflamatorias tales como la IL-1 y el TNF- α , las tipo Th1 como la IL-2 y el IFN- γ , (iii) las tipo Th2 como la IL-4 y la IL-10 y (iv) otras como el GM-CSF [59, 60]. El mecanismo de regulación transcripcional que ejercen las citocinas en el LTR se describe en la Figura 1.8, utilizando el modelo del TNF- α . Al unirse a su receptor, el TNF- α dispara la activación de la fosfolipasa C, generando una serie de eventos que culminan en la translocación de factores celulares al núcleo. La unión de NFAT-1 y NF- κ B al LTR induce la transcripción de genes virales (o genes reporteros, en el caso del modelo descrito con anterioridad) [60-62].

La observación de que algunas citocinas estimulan la transcripción viral mediante el LTR ha generado la hipótesis de que algunas otras citocinas o factores celulares pudiesen reprimir la replicación del HIV-1 a través del mismo promotor. En efecto, se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ liberan un factor soluble y no citotóxico que inhibe la transcripción del virus en linfocitos T CD4+ sin lisarlos [63, 64]. A tal factor (o conjunto de factores) se le conoce como CAF (CD8+ Antiviral Factor) y a pesar de que no se le ha podido identificar ni aislar, se sabe que actúa mediante el LTR [64, 65]. En un principio, se postuló que CAF no era más que el conjunto de tres β -quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES) [66]; sin embargo, los datos actuales sugieren que CAF es distinto a tales quimiocinas simplemente porque CAF ejerce sus efectos a través del LTR y las quimiocinas no [67]. Por ello, se cree que se trata de un factor aún desconocido cuyos beneficios terapéuticos serían importantes.

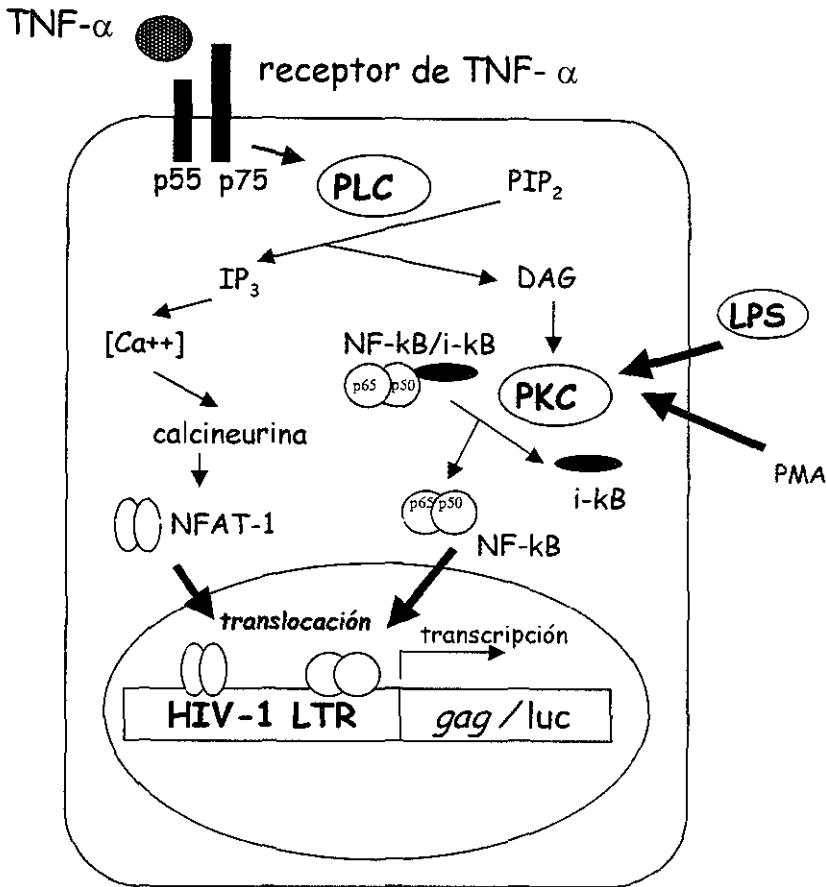


Figura 1.8. El TNF- α induce la activación de la transcripción del HIV-1 en macrófagos y monocitos infectados. Al unirse a su ligando, el receptor del TNF- α activa la fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la formación de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ induce un incremento en la concentración total de calcio intracelular, lo cual activa la calcineurina, una fosfatasa que a su vez desfosforila a NFAT-1. Por otro lado, el DAG activa la proteína-quinasa C (PKC), la cual libera al NF- κ B de su inhibidor (i- κ B). Por último, NF- κ B y NFAT-1 se translocan al núcleo de la célula infectada y se unen al HIV-1 LTR, activando así la transcripción de genes virales o reporteros. Efectos similares se han observado en respuesta a los lipopolisacáridos (LPS) ó a mitógenos que activan el HIV-1 LTR en células monocíticas.

1.9 Importancia del LTR *in vivo*.

Debido al papel fundamental que tiene la secuencia LTR en el ciclo de replicación viral *in vitro*, ha surgido el interés en examinar la función y variabilidad natural de esta secuencia. Los estudios al respecto se enfocan en la posible relación entre la historia natural de la infección por el HIV-1 y la variabilidad del LTR *in vivo*.

1.9.1 Historia natural de la infección por el HIV-1.

La historia natural de la infección por el HIV-1 se describe en la Figura 1.9. La mayoría de los pacientes infectados con el virus manifiesta una pérdida significativa, constante y progresiva de sus linfocitos TCD4+ [68]. Al año y medio de haberse infectado, el número absoluto de linfocitos TCD4+ empieza a registrarse como anormal [69], es decir, por debajo de las 500 células por μL de sangre. Se estima que el tiempo que transcurre entre la infección y el desarrollo de SIDA es de aproximadamente 10 años en los pacientes que no reciben tratamiento antirretroviral [70].

Sin embargo, existen otros dos grupos muy importantes dentro de la población infectada con el virus. (i) los pacientes de evolución rápida y (ii) los pacientes de larga sobrevida. Los pacientes de evolución rápida constituyen menos del 5% de la población infectada y son aquellos que desarrollan síntomas graves y fallecen tan pronto como a los dos años de haberse infectado [71]. Diversos factores contribuyen a la evolución rápida y entre ellos destacan los siguientes: bajo título de anticuerpos contra las proteínas virales [72], anticuerpos con baja actividad neutralizante [73], anticuerpos que aumentan la infección vía receptores Fc [74], carga viral elevada que no disminuye después de la infección aguda [71] y asociaciones con algunos haplotipos del MHC [75].

En el otro extremo, existen los pacientes de larga sobrevida, también llamados no-progresores (*long term non-progressors*, *LTNPs*), progresores lentos (*long-term slow progressors*) ó pacientes de lenta evolución clínica. Éstos constituyen menos del 10% de la población infectada con el virus y se definen como aquellos que, después de un mínimo de 10 años de infección, permanecen en un estado totalmente asintomático, con niveles normales de linfocitos TCD4⁺ y con una carga viral baja aún sin haber recibido tratamiento antiviral [76]. Estos casos poco comunes de lenta evolución clínica se han

reportado a nivel mundial y se pretende estudiar a los pacientes detalladamente con el fin de identificar los factores precisos que los distinguen del resto de la población afectada por el virus. A la fecha, se han identificado varios factores que se describen en la siguiente sección

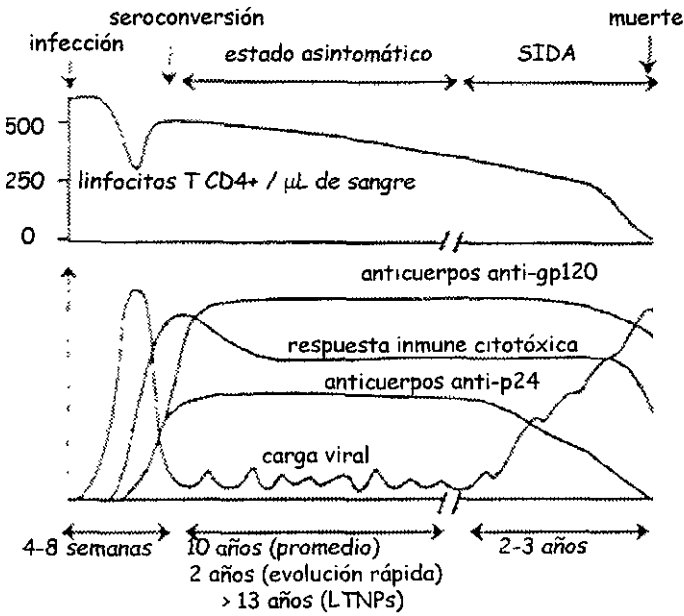


Figura 1.9. Historia natural de la infección por el HIV-1. El tiempo que transcurre entre seroconversión y SIDA es de más de 13 años en los pacientes progresores lentos (LTNPs).

1 9.2 Factores asociados a la lenta evolución clínica.

Es importante enfatizar que los LTNP no son un fenómeno aislado y su existencia se ha reportado en Australia [77], Estados Unidos [72, 73], Europa [71] y ahora en Latinoamérica [78] mediante el seguimiento de cohortes (grupos de pacientes monitoreados a lo largo de varios años) Aún cuando los factores asociados a la larga sobrevida han sido distintos en cada cohorte, todas coinciden en que los LTNP montan una respuesta inmune muy efectiva en contra del virus En algunos estudios, por ejemplo, se ha observado que los LTNP cuentan con títulos muy elevados de anticuerpos que neutralizan al HIV-1 [79] Otros estudios demuestran que estos pacientes también poseen linfocitos TCD8+ que, en algunos casos, son citotóxicos en contra de células infectadas [80], y en otros casos, liberan el factor soluble CAF descrito anteriormente [81].

Asimismo, existen factores genéticos propios de los LTNP que los predisponen a una evolución menos agresiva de la enfermedad. Algunos haplotipos de HLA, por ejemplo, se han asociado a la larga sobrevida en poblaciones estadounidenses y holandesas [75]. También se ha demostrado que el genotipo del correceptor CCR-5 del huésped influye en el desarrollo de la infección y enfermedad, ya que las personas que presentan la mutación Accr-5 en alguno de sus alelos del CXCR-5 manifiestan un retraso en desarrollar SIDA [82] Deleciones y mutaciones similares se han reportado en los genes de otros correceptores [83]; éstas también confieren cierto grado de protección versus la evolución clínica. Recientemente, también se han reportado algunas asociaciones entre la evolución lenta y polimorfismos en el promotor celular que dirige la expresión del CCR-5 [84]

Por otro lado, otros estudios se han enfocado en el análisis del genoma viral, sosteniendo la hipótesis de que la lenta evolución clínica se debe a una infección con cepas atenuadas del HIV-1 En la Cohorte de LTNP de Sydney, por ejemplo, se descubrió un grupo de siete LTNP que se infectaron con el HIV-1 al transfundirles productos sanguíneos contaminados que provenían de un mismo donador Durante los primeros 12 años de haberse infectado, tanto el donador como los pacientes transfundidos permanecieron en un estado asintomático, con carga viral indetectable y con niveles normales de linfocitos TCD4+ sin tratamiento antiviral [77]. Al examinar el genoma de los virus que portaban estos pacientes, se encontraron deleciones y mutaciones significativas en las regiones nef y LTR [85] Deleciones muy similares se han observado en un LTNP neoyorquino [86] y hasta en los

virus de inmunodeficiencia del simio (SIV, Simian Immunodeficiency Virus) que portan algunos monos Rhesus que no desarrollan SIDA [87]. Es muy importante recalcar, sin embargo, que tales mutaciones y deleciones no se han observado en otras cohortes [88, 89]. Por ello, la teoría actual es que efectivamente existen cepas atenuadas del HIV-1, aunque éstas no sean el único factor que contribuya a la larga sobrevivencia.

1.9.3 Variabilidad del LTR *in vivo*: avances y errores en los modelos de estudio

Debido a que el LTR es una de las regiones menos variables y más conservadas del genoma del HIV-1, las deleciones y mutaciones que se han detectado *in vivo* en esa región son dignas de llamar la atención. En la Cohorte de Linfadenopatía de la Ciudad de Vancouver, por ejemplo, se compararon las secuencias del LTR de 42 pacientes en distintas etapas de infección y se demostró que la identidad entre secuencias alcanzaba un 95% en la porción no-codificante del LTR (la región que no traslapa con nef) [36]. Éste es un porcentaje de identidad superior al reportado para cualquier otra región del genoma [90].

En el mismo estudio, se realizaron algunos ensayos de genes reporteros y sólo se detectaron diferencias en la actividad transcripcional de aquellos LTRs que manifestaban mutaciones puntuales en la región TAR. Sin embargo, cabe señalar cuatro omisiones importantes en los ensayos de actividad transcripcional de este estudio. (i) no se incluye un LTR prototipo (control positivo), (ii) se utiliza el gen de cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) como gen reportero, aún cuando el gen de luciferasa es de 30 a 1,000 veces más sensible [91] y por lo tanto hubiera detectado variaciones importantes entre LTRs, (iii) se realizan transfecciones transitorias utilizando DEAE-dextran, aún cuando los lípidos de transfección de nueva generación son menos citotóxicos y generan resultados más reproducibles en los ensayos [92-94] y (iv) no se ajustan los resultados a un control de transfección, por lo cual desconocemos si las diferencias reportadas son causadas por variaciones en la eficiencia de la transfección.

En otro estudio, se compararon las secuencias del LTR de ocho niños de ascendencia africana inscritos en la Cohorte del Hospital de Harlem en Nueva York, cuatro de ellos eran LTNPs pediátricos y los otros cuatro eran niños de evolución rápida [95]. Al igual que en el estudio anterior, se demostró

que la variabilidad del LTR era mínima en la región no codificante, manteniéndose intactos los sitios NF- κ B, Sp-1 y la caja TATA. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre las secuencias de los LTNP y las de los pacientes de evolución rápida. En ambos grupos se encontraron mutaciones significativas y deleciones que iban desde 8 hasta 341 pb en el LTR. Lamentablemente, en este estudio no se examinaron las secuencias de TAR. Tampoco se probó la función de los LTRs en un contexto de genes reporteros, por lo cual se desconoce si las mutaciones y deleciones encontradas tienen un impacto real en la transcripción viral.

En la Cohorte de LTNPs de Sydney que se menciona anteriormente, también se encontraron deleciones de hasta 120 pb y algunas duplicaciones a lo largo de los LTRs [85]. Las deleciones eliminaban varios sitios de unión a factores celulares de transcripción (NFAT-1, USF, TCF-1 α), mientras que las duplicaciones generaban nuevos sitios de unión a Sp-1 y a NF- κ B. Pese a la magnitud e importancia de estas variaciones, en este estudio tampoco se realizaron ensayos de genes reporteros y por ello se desconoce si las deleciones afectan la transcripción viral.

Por último, existe el estudio de la Cohorte de LTNPs en Nueva York [88], en donde se examinaron las secuencias y la función del LTR de ocho LTNPs. Solo se encontraron mutaciones puntuales significativas en el LTR de un paciente. Estas mutaciones (sustituciones repetidas de guaninas por adeninas, G \rightarrow A) aparecían a lo largo de los sitios NF- κ B, Sp-1 y la secuencia TAR. Al examinar la función promotora de los LTRs por medio de ensayos de genes reporteros, se demostró que la secuencia de este paciente era la única que no funcionaba adecuadamente, ya que los niveles de transcripción eran nulos, aún en la presencia de Tat. No obstante, estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que los ensayos de función transcripcional no se realizaron en células linfocíticas sino en células NIH-293, una línea celular adherente derivada de riñón humano (*human embryonic kidney cell line*) cuya relevancia a la patología del HIV-1 es mínima. Lamentablemente, en este último estudio, tampoco se compararon las secuencias de los LTNPs contra un fondo local de secuencias del LTR provenientes de pacientes con SIDA. Por ello, no podemos descartar que las mutaciones que impiden la función del LTR también se encuentran en pacientes con síntomas.

2. JUSTIFICACIÓN

En Latinoamérica, México es el segundo país con el mayor número de casos acumulados de SIDA (>45,133 hasta diciembre del 2000) [96]. A pesar de la magnitud de la epidemia, carecemos de información biomédica básica acerca de la variabilidad del HIV-1 en México. Solo existen algunos estudios preliminares al respecto y éstos se han enfocado en la caracterización de las regiones codificantes *gag* y *env* del genoma proviral [97-99]

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, han sido escasos los estudios a nivel mundial que examinen adecuadamente la variabilidad del LTR *in vivo* y su función en el contexto de la transcripción viral *in vitro*. Aún en los estudios más reconocidos, existen huecos de información en el análisis de las secuencias y en la interpretación de los resultados:

- En ninguno de los estudios mencionados se realizan predicciones de la estructura secundaria correspondiente a la secuencia de TAR.
- En la mayoría de los casos, se han omitido los ensayos de genes reporteros o éstos no se han realizado con la tecnología adecuada o las células pertinentes.
- En algunos casos, se han examinado las secuencias del LTR de no-progresores, pero éstas no se han comparado adecuadamente con secuencias de fondo local provenientes de pacientes con SIDA en la misma zona geográfica

Ante estos huecos de información y carencias metodológicas, surge el interés de **caracterizar variantes mexicanas de la secuencia LTR del HIV-1**. El estudio que se presenta a continuación se enfoca en el análisis detallado de la secuencia LTR de los virus que portan los pacientes mexicanos inscritos en la Cohorte de la Ciudad de México.

3. OBJETIVOS

El objetivo fundamental ha sido **caracterizar variantes mexicanas de la secuencia LTR del HIV-1**. Esto se ha realizado mediante los siguientes objetivos particulares:

1. Establecer una cohorte local de pacientes HIV-1 seropositivos e identificar presuntos LTNP's en México.
2. Extraer el DNA de las células mononucleares periféricas (*PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de pacientes seleccionados y amplificar, clonar y secuenciar el LTR proviral correspondiente.
3. Identificar mutaciones o deleciones significativas, tanto en sitios de unión a factores celulares de transcripción, así como en la secuencia TAR.
4. Realizar predicciones de la estructura secundaria del RNA de la secuencia TAR.
5. Realizar ensayos de genes reporteros con LTRs seleccionados, implementando una tecnología sencilla y reproducible en células linfocíticas.

4.1 Seguimiento de pacientes: monitoreo viral e inmunológico.

Se inició este estudio bajo el consentimiento informado de 12 pacientes masculinos infectados con el HIV-1 por vía sexual (Cuadro 4.1). Cuatro de ellos han estado infectados por más de 13 años, otros cuatro lo han estado durante más de 12 años y tres de ellos durante más de 11 años. Se incluyó asimismo un voluntario de seroconversión relativamente reciente, con 6 años de infección. El tiempo de infección se calcula en base a la fecha de la primera prueba de anticuerpos contra el HIV-1. Los pacientes acudieron a la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos (Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría de Salud) cada cuatro meses para realizarse las siguientes pruebas: carga viral (*Hybrid Capture II assay*; Digene, Beltsville, MD), conteo de linfocitos T CD4⁺ (*FACScount*; Becton Dickinson, San Jose, CA) y aislamiento viral por cocultivo.

Cuadro 4.1
Características de los pacientes inscritos en la Cohorte de la Ciudad de México

Paciente	Tiempo de infección (años)	Tiempo de TARV ^a (años)	Estado clínico CDC ^b	Linfocitos T CD4 ⁺ (N°/µL)	Aislamiento viral por cocultivo ^c	Carga viral en plasma ^d
P4	≥13	2	C	107-212	5/7	3.1-5.3
P10	≥13	5	A	555-779	7/8	≤2.7-4.4
P11	≥13	4	C	169-311	1/7	≤2.7-3.7
P14	≥13	2	A	462-1151	8/9	2.9-4.6
P8	≥12	3	A	375-799	4/6	3.8-5.1
P17	≥12	3	B	430-884	0/5	≤2.7-3.5
P19	≥12	3	A	412-554	0/5	≤2.7-4.0
P22	≥12	2	C	105-250	0/4	3.6-4.7
P2	≥11	4	A	533-801	3/5	3.5-4.3
P23	≥11	2	A	227-635	1/5	4.0-5.9
P21	≥11	2	C	86-191	5/5	5.1-6.0
P15	≥6	4	A	527-1045	0/5	3.0-3.6

^a TARV, Tratamiento antirretroviral

^b Clasificación según el *Centers for Disease Control*: A, asintomático, B, presenta síntomas relacionados a inmunodeficiencia, C, SIDA

^c número de aislamientos positivos / número de intentos de aislamiento

^d valor logarítmico de carga viral = log (copias de RNA viral/mL plasma)

Los valores que se muestran en el número absoluto de linfocitos T CD4⁺ y en la carga viral indican el rango de los datos observados durante el estudio

4.2 Muestras sanguíneas y aislamiento viral por cocultivo.

Se obtuvo sangre periférica de cada paciente por medio de punción de antebrazo, recolectando la sangre bajo condiciones estériles en tubos tipo Vacutainer™ con anticoagulante (EDTA). Una parte de la muestra se utilizó para las pruebas mencionadas anteriormente. La sangre restante se sometió a un gradiente de Ficoll-Hystopaque (Sigma), centrifugándose durante 30 minutos a 1,200 rpm y a temperatura ambiente. Se separaron las células mononucleares periféricas (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) y se lavaron en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, *phosphate buffered saline*). Una porción de las PBMC se utilizó para la extracción de DNA (Sección 4.3) y la otra porción se utilizó para el aislamiento viral por cocultivo (Figura 4.1).

El aislamiento viral por cocultivo se realizó de acuerdo a los lineamientos que rige el Manual de Virología para Laboratorios de HIV (*División of AIDS Virology Manual for HIV Laboratories*) de los Estados Unidos [100]. En síntesis, se mezclan 2×10^6 de PBMCs del paciente con 8×10^6 de PBMCs provenientes de donadores sanos, HIV-seronegativos. Estas últimas están previamente activadas con fitohemaglutinina-A (PHA-A). Los cocultivos se mantienen durante 8 semanas a 37°C, 5%CO₂, en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de antibióticos-antimicóticos e interleucina-2 recombinante (rIL-2, 20 U/mL). Todos los reactivos que se emplean para los cocultivos provienen de GIBCO™ (Grand Island, NY). Se añadieron 2×10^6 de PBMCs sanas cada 10 días como células alimentadoras. Se realizó el monitoreo de los cultivos semanalmente mediante un estuche que detecta antígenos virales en el sobrenadante (*HIVAG-1 monoclonal antibody to human immunodeficiency virus type 1*; Abbott Diagnostics, North Chicago, IL). Un aislamiento viral positivo se define en base a dos determinaciones positivas (>50 pg) y consecutivas de antígenos virales en el sobrenadante.

4.3 Extracción de DNA.

Se resuspendieron $1-3 \times 10^6$ de PBMCs en 200 µL de "Buffer de lisis A". Se añadieron 10µL de "Preparación Enzimática" y se incubó la mezcla a 55°C durante 12 horas. Posteriormente, se hirvieron las muestras durante 5 minutos. El lisado celular se centrifugó durante 15 minutos y el sobrenadante del mismo se sometió a extracciones orgánicas con fenol y cloroformo. Se recuperó el DNA mediante precipitación con etanol y se resuspendió en agua estéril. La cuantificación del DNA

se realizó leyendo la absorbancia de una dilución 1:50 a una longitud de onda de 260nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Genequant; Pharmacia Biotech).

Buffer de lisis A

Tris Hcl pH 8.5, 10mM

KCl, 50 mM

Tween-20, 0.45%

Nonidet P-40, 0.45%

Esterilizar y almacenar a -20°C

Preparación Enzimática

10mg/ml Proteinasa K

1 mg/ml RNasa

50mM Tris-HCl pH8.0

Almacenar a -20°C

4.4 Amplificación de la secuencia LTR por medio de la PCR.

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos del LTR a partir del DNA extraído de las PBMCs de los pacientes. En la primera vuelta de PCR, se utilizaron los oligonucleótidos LTR1 (5'-CAC ACA AGG CTA CTT CCC TGA-3') y LTR2 (5'-GAT CTC TAG TTA CCA GAG TCA-3'). Estos iniciadores amplifican un fragmento de 537 pb, desde la posición -395 a la +142 correspondientes al virus prototipo HIV_{HXB2} [101]. Se utilizó una Taq Polimerasa de baja tasa de error (Accuzyme, Biotline, UK) para disminuir la introducción de mutaciones por PCR. En el Cuadro 4.2 se muestra el protocolo que se utilizó en la reacción de PCR.

Cuadro 4.2
Protocolo de PCR para amplificar el HIV-1 LTR.

Reactivo	volumen
DNA (0.2 µg/µL)	5.0 µL
mezcla de dNTP's (1.25 mM cada uno)	8.0 µL
LTR 1 (20 pmol/µL)	1.0 µL
LTR 2 (20 pmol/µL)	1.0 µL
25 mM MgCl ₂	5.0 µL
10X PCR Buffer	5.0 µL
Accuzyme Taq DNA polimerasa (2.5U/µL)	0.2 µL
agua desionizada	24.8 µL
Total	50.0 µL

Para la segunda vuelta de la PCR, se diseñaron los iniciadores internos LTR3 (5'-CCC TGA TTA GCA GAA CTA CAC-3') y LTR4 (5'-GTC ACA CAA CAG ACG GGC ACA C-3') [78], que amplifican un fragmento de 505 pb, desde la posición -380 hasta la +125 del virus prototipo HIV_{HXB2}. El protocolo de la reacción de PCR en la segunda vuelta fue similar al de la primera vuelta, excepto que se añadió 1 µL de la primera reacción como DNA-templado y se ajustó el volumen de agua a

28 8µL. El Cuadro 4.3 muestra en detalle las condiciones de PCR que se programaron en el termociclador. Con el fin de obtener productos de PCR representativos, se realizaron tres PCRs independientes de cada paciente y éstas se mezclaron antes de proceder a los siguientes experimentos

Cuadro 4.3
Condiciones de PCR
para amplificar fragmentos del HIV-1 LTR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (mins segs)	Ciclos
1	94	4 .00	1
2 1	94	0 30	32
2 2	60	0 30	
2 3	72	0 .30	
3	72	7 00	1
4	4	∞	

4.5 Electroforesis preparativa y purificación de los productos de PCR.

Se tomaron 40 µL de la mezcla de las PCR y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2%. Posteriormente, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observaron los productos de PCR bajo la luz ultravioleta. Con una hoja de afeitar estéril, se cortaron las bandas correspondientes a los amplicones del LTR. Los cortes del gel se fundieron a 65°C durante 5 minutos y se purificó el DNA con la ayuda del estuche comercial Wizard™ PCR Preps DNA Purification System (No. Cat. A7170 Promega Corporation; Madison, WI).

4.6 Clonación del producto de PCR en el vector pUC18.

Una vez purificado del gel, el producto amplificado del LTR se resuspendió en agua estéril y se cuantificó por absorbancia a 260nm. Debido a que los iniciadores internos LTR3 y LTR4 habían sido fosforilados en los extremos 5', los productos amplificados también contenían fosfatos en esos extremos. Esto facilitó su inserción en el vector pUC18, el cual estaba previamente digerido con *SmaI* y desfosforilado con fosfatasa alcalina de bovino (*BAP*, No. Cat. 27-4860 Pharmacia Biotech). El producto de PCR purificado (inserto) se clonó en el vector pUC18 (*SmaI/BAP*) utilizando T4 DNA-ligasa (No. Cat. 020153 NBL Gene Sciences Ltd, Northumberland, UK). A esta reacción, se le añadió cloruro de hexamino-cobalto (Sigma) para incrementar la frecuencia de interacciones

moleculares entre el inserto y el vector. El Cuadro 4.4 muestra los componentes de la reacción de ligación, la cual se incubó 12-24 horas a 16°C.

Cuadro 4.4
Protocolo para clonar el LTR en el vector pUC18.

Reactivo	volumen
inserto-LTR (20-60 ng / μ L)	1.0 μ L
vector-pUC18 (100 ng / μ L)	1.0 μ L
T4 DNA ligasa (4U/ μ L)	1.0 μ L
10X T4 DNA ligase-buffer	1.0 μ L
10X Hexammincobalt(III)chloride-buffer	1.0 μ L
agua desionizada	5.0 μ L
Total	10.0 μ L

4.7 Transformación de *E. coli* JM109 competentes con productos de ligación.

Se añadieron 5 μ L de cada reacción de ligación a 100 μ L de *E. coli* JM109 competentes. Se incubó la mezcla (bacterias+DNA) sobre hielo durante 30 minutos y después se sometió a un choque térmico de 42°C durante 60 segundos. Enseguida, se incubaron las bacterias sobre hielo durante un minuto adicional justo antes de añadirles 500 μ L de medio Luria-Bertani (LB). Las bacterias transformadas se colocaron en una cámara a 37°C durante una hora, con agitación constante (~170rpm). Posteriormente, se tomaron 200 μ L de las bacterias transformadas y se sembraron en cajas de Petri con medio LB-agar suplementado con 100 μ g/mL ampicilina, 0.1mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) y 40 μ g/mL X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosida). Las cajas se incubaron a 37°C durante 16-24 horas.

4.8 Selección, amplificación y purificación de plásmidos recombinantes.

De las cajas Petri, se seleccionaron las presuntas colonias recombinantes de *E. coli* (de color blanco a causa de la interrupción del gen de lacZ). Éstas se cosecharon con un palillo estéril y se inocularon en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (50 μ g/mL). Las bacterias se incubaron a 37°C durante 16-24 horas con agitación constante (120 rpm). Al día siguiente, se cosecharon las bacterias por centrifugación y se sometieron a lisis alcalina para obtener minipreparaciones de los presuntos plásmidos recombinantes. Una vez recuperados y purificados, los

plásmidos se resuspendieron en 50µL de agua estéril y se tomó una alícuota (5µL) para verificar la presencia del inserto-LTR, sometiéndola a un ensayo de restricción con 2 unidades de *EcoRI* y 2 unidades de *HindIII*. A los plásmidos recombinantes verificados se les designó “pUC18 HIV-1 LTR.Mex.” y se les almacenó a -20°C

4.9 Secuenciación automatizada de los plásmidos pUC18.HIV-1.LTR.Mex.

La secuenciación del inserto-LTR se realizó mediante una PCR que incorpora nucleótidos marcados con fluorocromos a la cadena naciente de DNA (ABI Big Dye Cycle Terminator Mix; Perkin Elmer, Norwalk, CT). Para ello, se preparó la siguiente reacción:

Cuadro 4.5
Protocolo de PCR de secuenciación

Reactivo	volumen
pUC18.HIV-1.LTR.Mex (0.25 µg/µL)	2.0 µL
Big Dye Cycle Terminator Mix	8.0 µL
primer universal (forward/reverse; 10 pmoles/µL)	1.0 µL
agua desionizada	9.0 µL
Total	20.0 µL

La PCR de secuenciación se realizó en ambas direcciones utilizando los iniciadores universales M13 Forward/Reverse (United States Biochemical; Cleveland, OH), con el fin de abarcar los 505 pb del inserto bajo una resolución confiable. Se utilizó un secuenciador automático modelo 373A de Applied Biosystems (Foster City, CA), según las instrucciones del proveedor.

4.10 Análisis de las secuencias y predicción de estructuras secundarias de TAR.

Se revisó la calidad de las secuencias por medio de electroferogramas (Chromas, versión 1.43) y posteriormente se importaron las mismas a la base de datos del programa GCG (Genetics Computer Group, Madison, WI) utilizando el servidor del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron los programas *ChopUp*, *Reformat* y *Seqed* para editar las secuencias. El programa *Gelassemble* se utilizó para empalmar las secuencias sentido y antisentido. Para generar los alineamientos múltiples de secuencias de DNA, se utilizaron los programas *LineUp* y *PileUp*. Asimismo, el programa *Pretty* se utilizó para generar una secuencia mexicana consenso.

La predicción de estructuras secundarias de RNA de la región TAR se llevó a cabo utilizando la opción de *Squiggles* de los programas *mfold* y *plotfold* del GCG.

4.11 Subclonación en vectores de luciferasa.

Con el fin de examinar su función promotora *in vitro*, se seleccionaron algunas variantes mexicanas del LTR y se subclonaron en el vector pGL2-Basic (No. Cat. E1641. Promega Corporation, Madison, WI). Este plásmido reportero contiene el gen de luciferasa y solo lo expresa si se le inserta una secuencia promotora dentro del *polylinker* en la orientación adecuada.

Para preparar los insertos, las secuencias del LTR seleccionadas se reamplificaron utilizando los iniciadores *KpnI*-LTR3 (misma secuencia que LTR3, pero incorpora el sitio *KpnI* en el extremo 5') y LTR4, según el protocolo y las condiciones descritas en la Sección 4.3. El producto total de PCR se cortó a 37°C durante 6 horas, con 10U de las enzimas *KpnI* y *HindIII*, generando así un fragmento de 458 pb. Este inserto se sometió a electroforesis; se cortó del gel y se purificó como se describe en la Sección 4.4. El inserto mantiene todos los sitios necesarios para llevar a cabo la transcripción basal y la transcripción dependiente de Tat.

Por otro lado, 5 µg del vector pGL2-Basic también se cortaron a 37°C durante 6 horas, con 50U de las enzimas *KpnI* y *HindIII*, generando así un vector con extremos cohesivos y compatibles a los del inserto. Posteriormente, se ligaron el vector y el inserto (Figura 4.1), siguiendo el protocolo descrito en el Cuadro 4.6. La reacción se incubó de 12-24 horas a 16°C.

Cuadro 4.6

Protocolo para clonar el LTR en el vector pGL2-Basic.

Reactivo	volumen
inserto-LTR (20-60 ng / µL)	1.0 µL
vector-pGL2-Basic (100 ng / µL)	1.0 µL
T4 DNA ligasa (4U/µL)	1.0 µL
10X T4 DNA ligase-buffer	1.0 µL
10X Hexammincobalt(III)chloride-buffer	1.0 µL
agua desionizada	5.0 µL
Total	10.0 µL

Posteriormente, se tomó una alícuota de 5 µL de la ligación y se utilizó para transformar *E. coli* JM109, como se describe en la Sección 4.6. Del mismo modo, se seleccionaron las presuntas clonas recombinantes. Se expandieron y se purificaron los plásmidos correspondientes como se describe en la Sección 4.7. Se verificó la presencia del inserto mediante ensayos de restricción con las enzimas *KpnI*

y *HindIII* Los plásmidos que se generaron se denominaron “pGL2-LTR-Mex”. Con el fin de corroborar la identidad de las secuencias clonadas y de asegurar que no se introdujeron mutaciones en los procesos de PCR y de clonación, los plásmidos pGL2-LTR-Mex se secuenciaron como se describe en la Sección 4.8 utilizando los iniciadores gl-1 y gl-2 correspondientes al vector pGL2-Basic.

4.12 Transfección transitoria en la línea celular Jurkat.

Se obtuvo la línea celular linfocítica Jurkat Clone E6-1, a través del programa de reactivos y referencia de SIDA del NIH (*National Institutes of Health AIDS Reagent and Reference Program*, Bethesda, MD) Esta línea celular expresa el TCR y la molécula CD4; además contiene los factores celulares de transcripción representativos de los linfocitos T [102].

Para las transfecciones transitorias, se empleó el reactivo FuGene-6 (No Cat 1-815-091 Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Este reactivo contiene una mezcla de lípidos que forman complejos con el DNA, facilitando así su transporte hacia el interior de las células eucariontes [FuGene-6 Manual]

En tubos de polipropileno, se prepararon los complejos de co-transfección, según el siguiente protocolo.

Cuadro 4.7
Preparación de complejos de co-transfección.

Reactivo	BASAL	+ TAT
RPMI-1640	91.0 μL	91.0 μL
FuGene-6 Transfection Reagent	9.0 μL	9.0 μL
pGL2-LTR-Mex (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	3.5 μL	3.5 μL
pGL2-Basic (200ng/ μL)	1.0 μL	---
pSV-Tat-72 (200ng/ μL)	---	1.0 μL
pRSV- β -gal (200ng/ μL)	2.0 μL	2.0 μL
Total	106.5 μL	106.5 μL

Como se muestra en el cuadro, para los ensayos de transcripción BASAL, se incluyeron los plásmidos problema (pGL2-LTR-Mex), el control de transfección (pRSV- β -gal) y el control para ajustar la concentración total de DNA (pGL2-Basic) en los complejos de transfección.

Para los ensayos de transcripción dependiente de Tat, se sustituyó el pGL2-Basic por el plásmido pSV-Tat-72. Este plásmido también fue proporcionado por el NIH, expresa constitutivamente la proteína Tat y por lo tanto incrementa los niveles de transcripción *in vitro* [103]

El plásmido pRSV- β -gal expresa constitutivamente la proteína beta-galactosidasa y sirve como un control de transfección (ver Sección 4.14)

Después de mezclar los componentes de los complejos de transfección, éstos se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, los complejos se añadieron gota a gota a células Jurkat previamente sembradas a una densidad de 1×10^6 cels/mL/pozo en cajas de poliestireno de seis pozos (Corning). Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C, 5% CO₂.

4.13 Ensayos de expresión de luciferasa.

A las 48 horas de incubación, se cosecharon las células por centrifugación a 1,200 rpm y se lavaron dos veces en PBS (sin calcio y sin magnesio). Se resuspendieron en 180 μ L de buffer de lisis (*Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity*, No. Cat. 1669-893. Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron los lisados celulares y se recolectó el extracto celular en alícuotas de 80 μ L en tubos de poliestireno (Falcon). Utilizando un luminómetro de inyección automática (Automated Luminescence Laboratories, modelo 2010), se añadieron 100 μ L de sustrato (luciferina diluida en buffer de ensayo, mismo estuche de Roche No. Cat. 1669-893) y se leyó la intensidad de luz emitida en un lapso de 30 segundos (Figura 4.1). Los valores se reportaron como unidades relativas de luz (RLUs, *relative light units*)

4.14 Ajuste de los resultados con valores de expresión de β -gal.

Debido a que la eficiencia de transfección suele variar de un ensayo a otro, es necesario ajustar los resultados del ensayo de luciferasa mediante un control interno de transfección. Este control además sirve para descartar que las diferencias observadas en la actividad transcripcional no sean producto de la variabilidad o error inter-ensayo. En este caso, se utilizó como control el plásmido pRSV- β -gal, que codifica la β -galactosidasa.

El ensayo de β -gal se realizó con una de las alícuotas que se recolectaron del extracto celular a las 48 horas post-transfección. Se utilizó el siguiente protocolo

Cuadro 4.8**Protocolo para el ensayo de β -galactosidasa.**

Reactivo	volumen
extracto celular	80.0 μ L
Buffer "Z"	450.0 μ L
Solución de ONPG	100.0 μ L
β -mercaptoetanol	50.0 μ L
Total	680.0 μ L

Buffer "Z"

100 mM NaH₂PO₄, pH 8.0
 10 mM KCl
 1 mM MgSO₄
 almacenar a 4°C

Solución de ONPG

O-nitrofenil- β -D-galacto-piranosida
 4 mg/mL en 100mM NaH₂PO₄, pH 8.0
 almacenar a -20°C

La reacción se incubó de 16 a 24 horas a 28°C y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 420nm. Los valores obtenidos se utilizaron como el denominador para dividir los valores de RLUs obtenidos del ensayo de luciferasa y así ajustar los resultados

4.15 Análisis estadístico.

Las transfecciones transitorias se realizaron por lo menos por triplicado para cada una de las secuencias problema y para la secuencia control. Se calculó el promedio, la varianza y la desviación estándar de la muestra por cada triplicado, cuadruplicado o quintuplicado. Para comparar los valores de actividad transcripcional entre el control y las muestras problema, se compararon los promedios y las varianzas de la muestra mediante la prueba de *t* de Student [104], probando $\alpha = 0.05$ y $\alpha = 0.01$. La hipótesis nula fue la siguiente: "no existe una diferencia significativa entre la actividad transcripcional de la secuencia control y la actividad transcripcional de la secuencia problema" ($H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$).

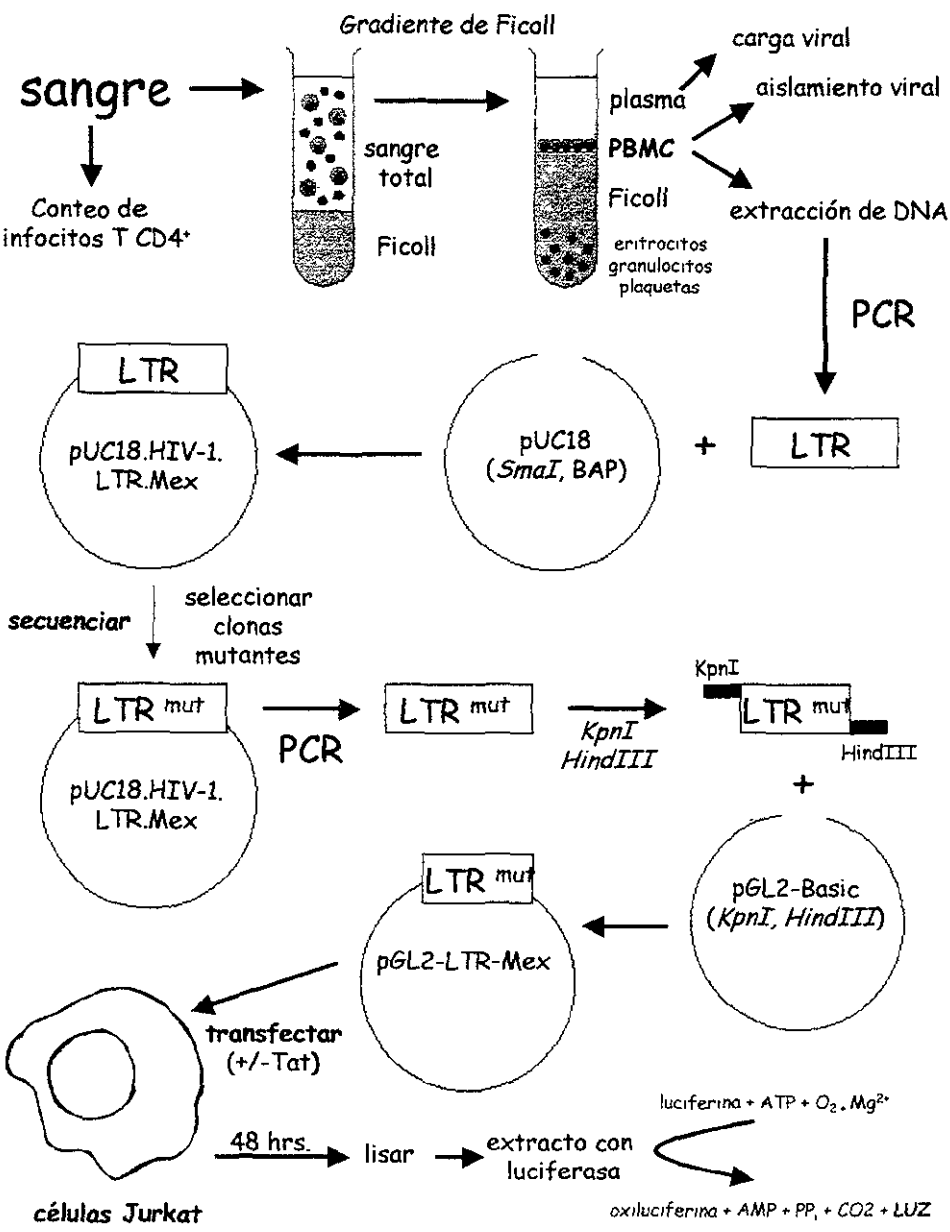


Figura 4.1. Diagrama de flujo de material y métodos.

5.1 Seguimiento de la Cohorte de la Ciudad de México.

Con la participación de los doce sujetos descritos en el Cuadro 4 1, se formó la primera cohorte de seguimiento de pacientes HIV-1 seropositivos de larga sobrevida en México. En base a su primera prueba de anticuerpos en contra del virus, once de estos pacientes han estado infectados por lo menos durante 11 años. En síntesis, se distinguieron dos grupos de pacientes: aquellos cuyo aislamiento viral fue negativo o poco frecuente (Pacientes 11, 15, 17, 19, 22 y 23) y aquellos cuyo aislamiento viral fue posible por lo menos en tres ocasiones distintas a lo largo de tres años de seguimiento (Pacientes 2, 4, 8, 10, 14 y 21). No se observaron asociaciones significativas entre la carga viral, el número absoluto de linfocitos T CD4⁺ y los resultados del aislamiento viral. Tampoco se observó alguna correlación entre el aislamiento viral y el tratamiento antiviral de los pacientes.

Al utilizar el criterio de LTNPs descrito en la Sección 1 9.1 [76], se dedujo que el paciente P14 era el único no-progresor en la cohorte debido a que satisfacía las siguientes características: (i) a 11 años de infección, permanecía asintomático, en la clasificación A del CDC; (ii) mantenía un nivel normal de linfocitos T CD4⁺, superior a las 450 células/ μ L de sangre; (iii) manifestaba una carga viral estable, con fluctuaciones por debajo de las 20,000 copias de RNA / mL de plasma y (iv) no había tomado ningún tipo de *tratamiento antiviral durante los primeros diez años de infección* (Cuadro 4 1) Los pacientes 2, 10, 15 y 17 también manifestaban un nivel normal de linfocitos T CD4⁺, pero no se les consideró como LTNPs debido a que ya habían tomado tratamiento antirretroviral

En la actualidad, a más de 14 años de infección, el paciente P14 permanece estable. Sin embargo, su carga viral ha fluctuado (≥ 4.2 log copias de RNA viral/mL plasma) y el número absoluto de sus linfocitos CD4⁺ ha disminuido levemente (~ 430 céls./ μ L). Este deterioro en los marcadores inmunológicos y virológicos del paciente coincide con observaciones que se han hecho en el seguimiento de otros LTNPs a nivel global. De tal forma, se ha comprobado que los LTNPs también se deterioran inmunológicamente, aunque este deterioro es paulatino y menos agresivo que en el resto de la población infectada [77].

5.2 Amplificación del LTR.

Se extrajo el DNA de las PBMCs de los doce pacientes de la Cohorte y se realizó una PCR anidada como se describe en la Sección 4.4. Los productos se sometieron a electroforésis en un gel de agarosa, se tñieron con bromuro de etidio y se observaron bajo luz ultravioleta. La Figura 5.1 muestra los productos de PCR de cada uno de los pacientes de la Cohorte. En todos los casos, se observa una banda del tamaño esperado de 505 pb, similar al control positivo (C+), lo cual indica que las secuencias LTR de estos pacientes no contienen inserciones o deleciones notables a simple vista.



Figura 5.1. Amplificación del LTR de los pacientes de la Cohorte. Se observan las bandas correspondientes a 505 pb.

5.3 Selección de pacientes para la caracterización del LTR.

Con el fin de caracterizar variantes mexicanas del LTR, se seleccionaron los productos de PCR de seis pacientes inscritos en la Cohorte. El seguimiento de estos pacientes se muestra en detalle en la Figura 5.2. El Paciente 14 (P14) se seleccionó por ser el único LTNP identificado en México. Como fondo local de comparación, se incluyeron tres pacientes asintomáticos P2, P10 y P15 (T CD4⁺ > 450 céls./μL) y dos pacientes diagnosticados con SIDA, P4 (T CD4⁺ < 200 céls./μL) y P11 (T CD4⁺ < 400 céls./μL)

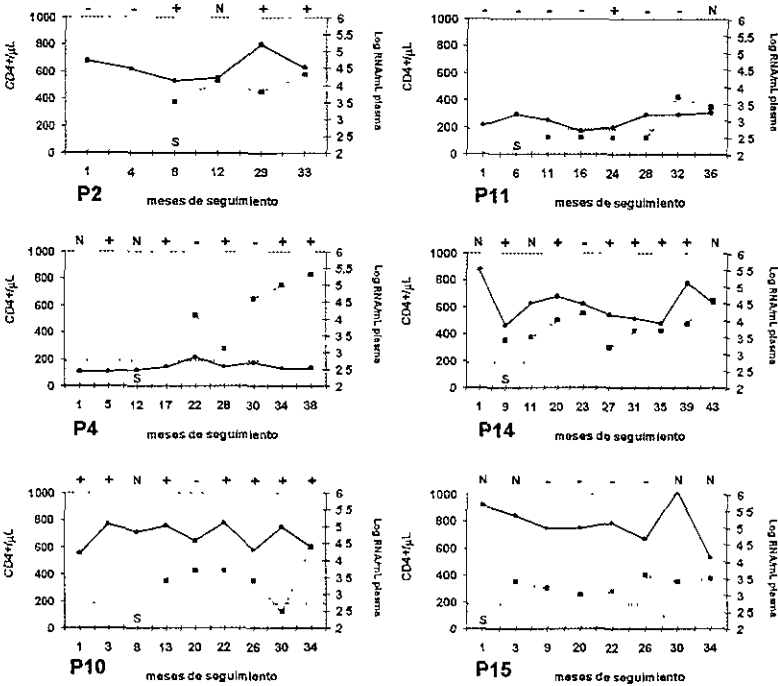


Figura 5.2. Seguimiento de los seis pacientes seleccionados para la caracterización del LTR. Se grafica el número absoluto de linfocitos T CD4⁺ (—), la carga viral (.....) y el nivel de detección del estuche de la carga viral (----). En el borde superior de cada gráfico, se muestran los resultados del aislamiento viral por cultivo: +, positivo; -, negativo; N, no realizado. La letra S identifica la muestra utilizada para la secuenciación del LTR.

5.4 Secuenciación del LTR.

Los productos de PCR de los seis pacientes seleccionados se purificaron y se insertaron en el vector pUC18, como se describe en las Secciones 4.6-4.8. Utilizando los métodos descritos en las Secciones 4.9-4.10, se secuenciaron y se analizaron 21 clonas recombinantes correspondientes a los seis pacientes seleccionados. La Figura 5.3 muestra el alineamiento múltiple de las variantes mexicanas del LTR.

En la porción del LTR que traslapa con el gen *nef*, de la posición -295 a la -121 (Figura 5.3(A)), las variantes mexicanas comparten una identidad del 84.74%. No obstante, en la porción no-codificante del LTR, de la posición -120 a la +80 (Figura 5.3(B)), las secuencias comparten una mayor identidad que alcanza el 97.65%. Esta discrepancia en la variabilidad de la porción codificante y no codificante del LTR coincide con observaciones previas reportadas por otros grupos de investigación [36-95]. Se ha postulado que estas dos porciones del LTR han evolucionado independientemente, la primera forzada a variar por presión inmunológica y la segunda sujeta a permanecer constante por su función esencial como promotor.

La secuencia mexicana de consenso (CONSENSUSMEXLTR) manifestó una identidad del 92% con la secuencia consenso de referencia global del Subtipo B del HIV-1 [90]. Esta similitud corrobora observaciones anteriores [97-99] que demuestran que el Subtipo B del HIV-1 circula en México

(A)

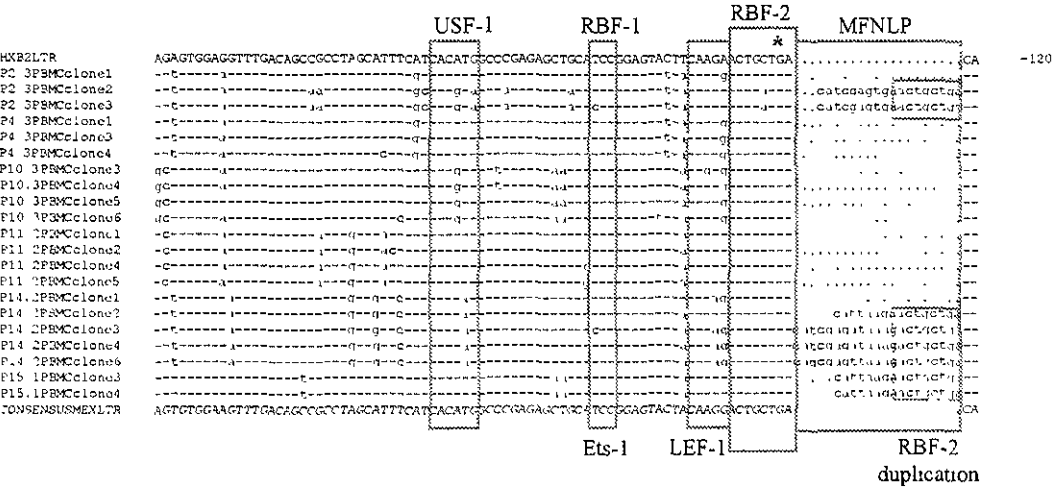
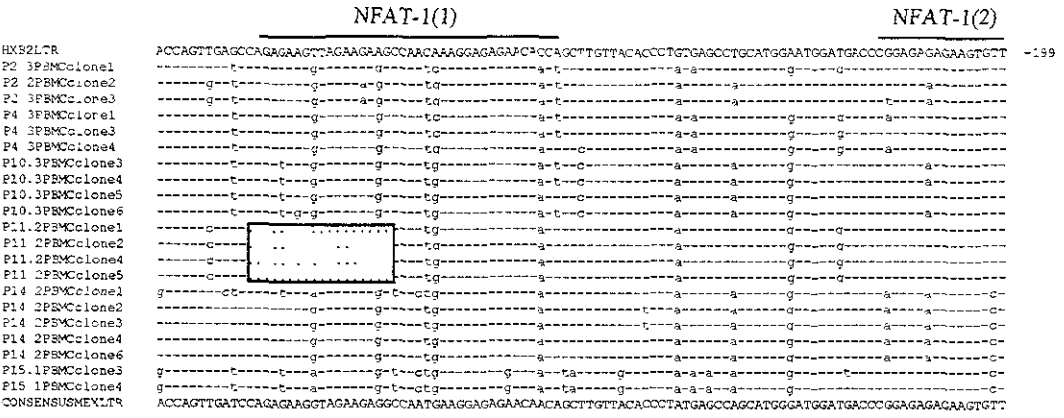


Figura 5.3. Alineamiento múltiple de las secuencias del LTR de acuerdo a la enumeración de nucleótidos del virus prototipo HXB2. Las secuencias se designan según el paciente, la toma de muestra y la clona (LTR amplificado de PBMC y clonado en pUC18). Los guiones indican identidad con el nucleótido de la secuencia HXB2. Los puntos generan huecos en la secuencia para preservar el alineamiento, indicando deleciones o polimorfismos. Se señalan los sitios de unión a factores celulares de transcripción y la deleción de 18 pb del paciente P11. (A) Nucleótidos de la posición -295 a la -121. (B) Nucleótidos de la posición -120 a la +80.

5.5 Delección del sitio NFAT-1 en la secuencia del P11.

El sitio de unión al factor NFAT-1 se encontró conservado en todas las variantes mexicanas, con excepción de aquellas correspondientes al paciente P11 (SIDA, CD4+ < 400 cels./μL). En esas variantes, se observó una delección de 18 pb (marcada en un rectángulo en la Figura 5.3(A)) que no se había reportado anteriormente en la literatura. Mediante una traducción de la secuencia, se predice que esta delección elimina seis amino ácidos dentro del marco de lectura de la proteína Nef (Figura 5.4(A)). A lo largo de varias muestras tomadas de este mismo paciente, se observó que la delección de 18 pb predominaba en la población proviral de sangre periférica, según secuenciación directa del producto de PCR (Figura 5.4(B)). No obstante, en la muestra P11.5PBMC-PCR, no se observó tal delección. Casualmente, esta fue la única muestra de la que se pudo aislar el HIV-1 del P11 (Figura 5.2). El virus aislado por cocultivo (P11.5cocu-PCR) tampoco mostró la delección de 18 pb.

(A)

	125		207
pNL4-3	QNYTPGGVRYPLTFGW	CYKLVPEPDKV	EEANKGENTSL
P2.3	-----P-----	F-----D-E--	K--E--NC--M-Q--
P4.3	-----I-----	L-----D-E--	Q--NC--I--E--
P10.3	-----T-----	W-----D-----	E--NC--M-Q--
P11.2	-----I-----	F-----E-----	N--M--E--Q--
P14.2	-----I-----	F-----A--I--	VTE--N--M-Q--
P15.1	-----I-----	F-----D--I--	VTE--DNI--INQ--
			Y-----V-K--N--R-----Y-D-*
			-----K--Q-K-----K--YRD-*
			-----H--I--M-----Y-D-*
			-----K--V-----K-----D-*
			-----Y-----M--K--Y--*

(B)

NFAT-1(1)

pNL4-3LTR	ACCAGTTGAACCAGAGCAAGTAGAAGA	GGCCAAATAAGGAGAGAAGAACAGCTTGT	TACACCCCTAT	-230
P11.1PBMC-PCR	tg	-----c-----	
P11.2PBMC-PCR	tg	-----c-----	
P11.2PBMCclone5	tg	-----c-----	
P11.4PBMC-PCR	tg	-----c-----	
P11.5PBMC-PCR	tg	-----c-----	
P11.5cocu-PCR	tg	-----c-----	

↑
HaeIII
sitio de restricción

Figura 5.4. (A) Secuencia parcial de la proteína Nef de acuerdo a la enumeración de amino ácidos del virus prototipo pNL4-3 (aa 125-207). Las secuencias se designan según el paciente y la toma de muestra. Los guiones indican identidad con el virus prototipo. Los puntos generan huecos en la secuencia para preservar el alineamiento, indicando la delección de 6 aa. (B) Variabilidad temporal en las secuencias del LTR del paciente P11. Se alinean las secuencias de acuerdo al virus prototipo. Se observa la delección de 18 pb en el producto de PCR de tres muestras distintas (P11.1, P11.2 y P11.4) y en la clona 5 de la muestra P11.2. La delección no se observa ni en el producto de PCR de la muestra P11.5, ni en el producto de PCR del virus cocultivado (P11.5 cocu). Se señala el sitio de restricción *HaeIII*.

Para distinguir las muestras que contenían la deleción de 18 pb, se diseñó un ensayo rápido de longitud de polimorfismos por fragmentos de restricción (*RFLP*, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando *HaeIII* y el producto de PCR (Figura 5 5(A)) Como se indica en la Figura 5.5(B), la deleción de 18 pb se observó en las primeras cuatro muestras secuenciales de este paciente (de Febrero de 1996 a Marzo de 1997) pero no en la quinta (Diciembre de 1997). La sexta y séptima muestras fueron tomadas en 1998 y volvieron a mostrar la deleción de 18 pb.

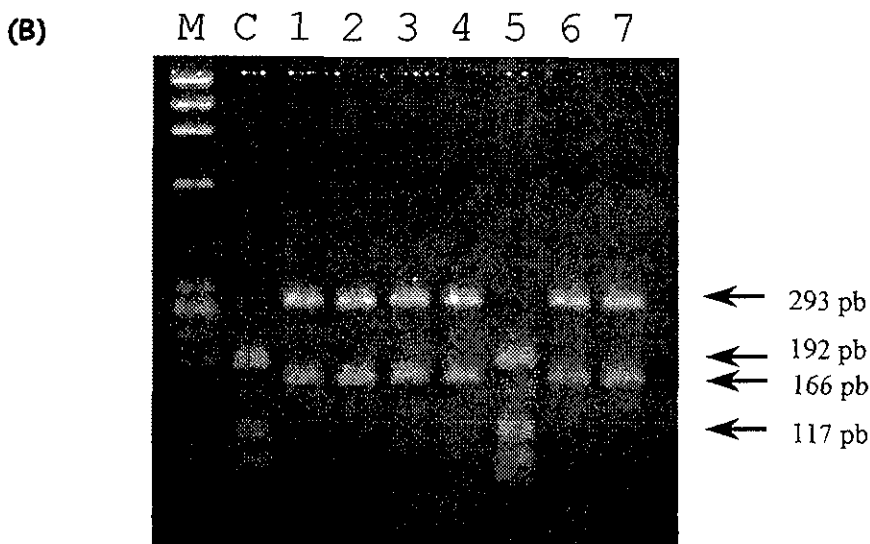
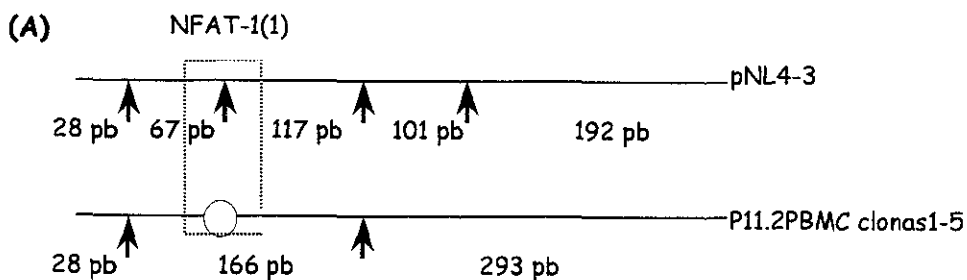


Figura 5.5 (A) Mapas de restricción del LTR digerido con *HaeIII*. Los mapas corresponden a las secuencias de la Figura 5.3. (B) Fragmentos generados experimentalmente. Se digirieron los productos de PCR con *HaeIII* durante 6 horas a 37 C. C, pNL4-3; carriles 1-7, PCRs de muestras sucesivas del paciente P11 tomadas a lo largo de 32 meses de seguimiento

5.6 Variabilidad del LTR de la posición -200 a la -120.

En algunas variantes mexicanas del LTR, se observaron varias mutaciones puntuales a lo largo de los sitios de unión a los factores USF-1, Ets-1, LEF-1, RBF-1, RBF-2 (Figura 5.3(A)). Sin embargo, todas estas mutaciones se han reportado con anterioridad [90] y se ha demostrado que no alteran significativamente la función del LTR *in vitro* [44].

El polimorfismo MFNLP (*Most Frequent Naturally-occurring Length Polymorphism*) es una inserción de 15 a 34 pb que contiene una duplicación del sitio RBF-2 (Figura 5.3(A)). La frecuencia de este polimorfismo fue de un 38% en las variantes mexicanas del LTR. Esta frecuencia coincide exactamente con la reportada en la Cohorte de Linfadenopatía de Vancouver (42 pacientes) [36]. El MFNLP no se observó en las variantes de los pacientes con bajos niveles de linfocitos T CD4⁺ (P4, P11).

En el caso de las secuencias del paciente P14, cuatro de cinco variantes tenían el MFNLP; sin embargo, los polimorfismos no eran idénticos (Figura 5.3(A)), ya que uno medía 16 pb y los otros tres 21 pb. Esta observación discrepa con reportes anteriores, ya que no se había observado ninguna heterogeneidad del MFNLP en pacientes no progresores [88].

5.7 Variabilidad del LTR de la posición -120 a la +80.

Se observó que el 100% de las variantes mexicanas del LTR mantenían conservados los sitios de unión al factor NF- κ B (Fig.5.3(B)). Los sitios de unión al factor Sp-1 se mantenían intactos en las secuencias del paciente P14, con excepción de una mutación puntual G→A en la secuencia P14.2-PBMC-clone6. El resto de las variantes mexicanas sí manifestaron varias mutaciones puntuales en el sitio Sp-1. Sin embargo, estas mutaciones ya se han reportado con anterioridad [90] y se ha demostrado que tampoco alteran la función del LTR *in vitro*. La caja TATA se mantuvo conservada al 100% en las variantes mexicanas.

5.8 Mutaciones puntuales en la secuencia TAR y predicción de estructuras secundarias.

Se observaron distintas mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia TAR de las variantes mexicanas del LTR (Figura 5.3(B)).

En el caso del paciente P15, se observó una sustitución (C→T) en el centro de la protuberancia (*bulge*) que interacciona con Tat. Sin embargo, se sabe que esta mutación no afecta ni la unión con Tat ni la transcripción viral en modelos de mutagénesis dirigida [105]. Asimismo, se observaron mutaciones puntuales en la posición +25 (T → A) de las secuencias correspondientes a los pacientes P2 y P10. Esta misma sustitución se ha reportado con anterioridad en el aislado primario HIV-1SF₁₆₂ [90] y en un aislado de un paciente canadiense con un bajo nivel de linfocitos T CD4⁺ [36]. Al igual que en la mutación anterior, la sustitución no afecta la transcripción de genes reporteros *in vitro*.

En el caso del paciente P14, las secuencias de TAR correspondientes a la protuberancia (*bulge*) y al asa (*loop*) se mantuvieron conservadas. Sin embargo, se observaron dos sustituciones en las posiciones +11 (G→A) y +13 (T→G), correspondientes al tallo de TAR (Figura 5 3(B)). Estas mutaciones solo se han reportado en otros tres aislados distintos a nivel mundial: HIV-1_{C-92BR025} (Brasil), HIV-1_{C-Etk2220} (Etiopía) y HIV-1_{B-WR27} (Estados Unidos) [90]. Utilizando la opción *squiggles* del programa *mfold* del GCG, se calculó que las mutaciones alteraban las interacciones Watson-Crick en el tallo de TAR y afectaban la energía libre de Gibbs a un pH de 7.0, generando dos posibles estructuras secundarias alternas de TAR (Figura 5 6). En teoría, la formación de ambas estructuras secundarias es bioquímicamente espontánea (ΔG negativa en ambos casos). De formarse, ambas mantendrían la protuberancia y el asa intactas, pero la estructura alterna tendría un asa adicional cuya importancia se desconoce.

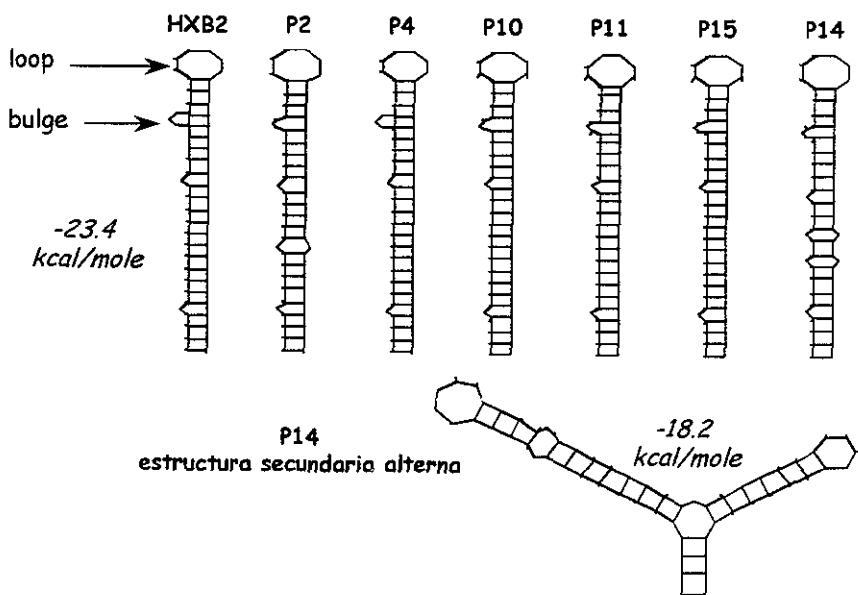


Figura 5.6. Predicción de estructuras secundarias de TAR-RNA. Se incluye la estructura del virus prototipo HXB2 como referencia. Utilizando la opción *Squiggles* de los programas *mfold* y *plotfold* de *GCG*, se generaron dos estructuras alternas en el caso de los LTRs del paciente P14.

5.9 Selección de variantes del LTR para ensayos de actividad transcripcional.

Para los ensayos de actividad transcripcional, se seleccionaron variantes mexicanas del LTR que contuvieran mutaciones significativas aún no descritas o no caracterizadas en la literatura. En el Cuadro 5.2 se describen las características de las secuencias que se clonaron en el vector pGL2-Basic, tal y como se describe en la Sección 4.11 de Material y Métodos. Se clonó la secuencia LTR del virus prototipo pNL4-3 como control positivo y el vector pGL2-Basic por sí solo como control negativo. Así, se utilizaron un total de ocho plásmidos recombinantes de luciferasa para los ensayos posteriores.

Cuadro 5.2
Secuencias del LTR clonadas en pGL2-Basic

Paciente	Secuencia	Características e importancia.
Control positivo	pNL4-3-LTR	<ul style="list-style-type: none"> • LTR prototipo. Contiene los sitios y elementos necesarios para dirigir la transcripción basal y dependiente de Tat [106] • Secuencia TAR intacta. • No contiene polimorfismos.
P11	P11.2PBMCClone1	<ul style="list-style-type: none"> • Deleción de 18 pb en NFAT-1 (no descrita). • Mutación A→G en TAR (posición +57; descrita y presuntamente intrascendente) [90].
	P11 2PBMCClone2	<ul style="list-style-type: none"> • Idéntica a la secuencia anterior, excepto por el nucleótido +57. • Secuencia TAR intacta.
P14	P14.2PBMCClone2	<ul style="list-style-type: none"> • Mutaciones en el tallo de TAR (posiciones +11, +13) posiblemente generen dos estructuras secundarias alternas • Descritas en otros tres aislados [90] pero función aún desconocida. • Contiene el polimorfismo MFNLP (16 pb)
	P14 2PBMCClone4	<ul style="list-style-type: none"> • Mutaciones en el tallo de TAR (posiciones +11, +13) • Contiene el polimorfismo MFNLP (21 pb). • Difiere de la secuencia anterior en el número de nucleótidos del MFNLP.
P15	P15.1PBMCClone3	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación en la protuberancia de TAR (<i>bulge</i>, posición +24, descrita y presuntamente intrascendente) [90]. • Contiene el MFNLP (16 pb). • Útil para comparar con la secuencia del paciente P14
	P15 1PBMCClone4	<ul style="list-style-type: none"> • Idéntica a la secuencia anterior, excepto por un nucleótido en Sp-1(3) (posición -66).
Control negativo	ninguna	<ul style="list-style-type: none"> • Se incluye en los ensayos para restar el fondo de transcripción de pGL2-Basic.

5.10 Actividad transcripcional del LTR en células Jurkat.

Los ocho plásmidos descritos se emplearon para transfectar células Jurkat en la ausencia o presencia del transactivador Tat, utilizando los materiales y métodos detallados en la Sección 4.11. Las células se incubaron 48 horas y los extractos celulares se emplearon para realizar los ensayos de luciferasa como se describe en la Sección 4.12. La Figura 5.7 muestra la actividad transcripcional de las variantes mexicanas del LTR. Los resultados se ajustaron con el control de transfección de beta-galactosidasa (ver Sección 4.13).

A niveles basales de transcripción, las variantes mexicanas manifestaron una actividad transcripcional similar a la del LTR prototipo ($p > 0.05$). Sin embargo, bajo los efectos de Tat, cinco de las seis variantes mexicanas manifestaron una actividad significativamente mayor a la del LTR control ($p < 0.05$). Aún las variantes con la delección de 18 pb en el sitio NFAT-1 (correspondientes a P11), así como aquellas con las mutaciones que presuntamente afectan la estructura de TAR (correspondientes a P14), mostraron una actividad superior a la del LTR del virus prototipo.

Los niveles de transcripción no se vieron reprimidos en ninguna de las variantes con el polimorfismo MFNLP (P14 ó P15), lo cual discrepa con estudios previos que sugieren que el MFNLP es un elemento represor [40]

Cabe señalar que se observó una diferencia significativa entre la actividad transcripcional de las dos variantes del LTR del paciente P15 (P15.1PBMCclone3 > P15.1PBMCclone4, $p < 0.01$), aún cuando la única diferencia entre estas secuencias corresponde a un nucleótido en el sitio Sp-1(3), posición -66 (Figura 5.3(B)).

En síntesis, estos resultados indican que ninguna de las mutaciones observadas en las variantes mexicanas del LTR reprime la actividad transcripcional *in vitro*.

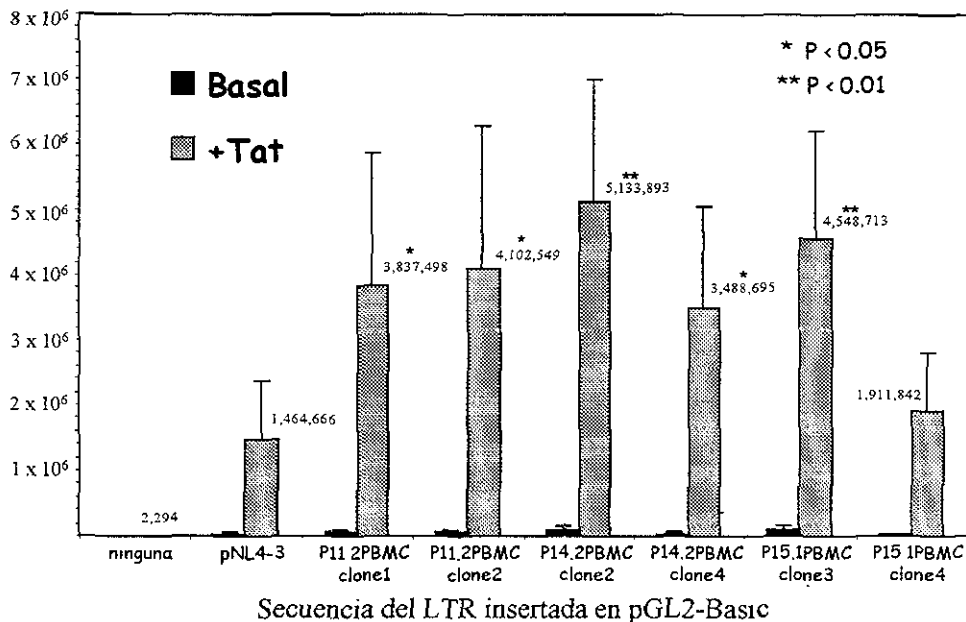


Figura 5.7. Actividad transcripcional del LTR en células Jurkat. Se indican los promedios de actividad de luciferasa bajo los efectos del transactivador (+Tat). Se reportan los valores en unidades relativas de luz (RLUs), mostrándose la desviación estándar de la muestra (barras de error). Los resultados han sido ajustados con un control interno de transfección (pRSV- β -gal).

6.1 Variabilidad y función del LTR.

En este estudio, se caracterizaron variantes mexicanas de la secuencia LTR del HIV-1. Para ello, en lugar de recurrir a muestras sanguíneas aleatorias o a bancos de material biológico poco caracterizados, se organizó e integró la primera cohorte de pacientes HIV-1 seropositivos de larga sobrevida en México. El seguimiento de la Cohorte permitió clasificar a los pacientes y obtener información clínica, virológica e inmunológica que pudiera ser útil en la interpretación de las secuencias que se obtuvieran posteriormente. A más de cinco años de seguimiento, la Cohorte de la Ciudad de México se suma a otras cohortes que se han organizado internacionalmente [73, 77, 80, 88, 89, 95, 107].

El seguimiento de la Cohorte también permitió distinguir al paciente P14 como un presunto no-progresor (LTNP) mexicano. Debido a que se han encontrado deleciones significativas en los LTRs de no-progresores en otras regiones del mundo [85, 86], se procedió a amplificar, clonar y secuenciar el LTR del paciente P14. Estos experimentos se hicieron en el contexto de otras variantes mexicanas del LTR, incluyendo a otros pacientes como fondo local de comparación. Sin embargo, no se encontraron deleciones grandes en el LTR del paciente P14 (Figura 5.1). Mediante un análisis más detallado, se observaron dos mutaciones puntuales en las posiciones +11 y +13 dentro de la secuencia correspondiente a TAR (Figura 5 3(B)). Utilizando programas de cómputo del GCG, se predijo que estas sustituciones podrían generar dos estructuras secundarias alternas de TAR (Figura 5 6). No obstante, no se realizaron experimentos que comprobaran la formación de tales estructuras *in vitro* o *in vivo*.

Con el fin de examinar la función promotora del LTR del paciente P14, se clonaron dos variantes de sus LTR en un vector transcripcional que expresa luciferasa bajo el promotor que se le inserte. Así, se realizaron ensayos de actividad transcripcional en células Jurkat, demostrándose que los LTRs de este paciente eran funcionales y lograban dirigir la expresión de luciferasa en células linfocíticas (Figura 5 7). Las mutaciones en las posiciones +11 y +13, aquellas que presuntamente generan dos estructuras secundarias de TAR, no resultaron en algún fenotipo negativo, ni disminuyeron la actividad transcripcional dependiente de Tat. De hecho, esta actividad es significativamente mayor a la observada en el control positivo (pNL4-3). No obstante, tampoco

podemos afirmar con certeza que estas mutaciones aumentan la actividad transcripcional, ya que el LTR de este paciente contiene otras mutaciones puntuales y polimorfismos

Por otro lado, en las variantes del LTR del paciente P11, un miembro de la Cohorte con diagnóstico de SIDA, se observó una deleción de 18 pb (Figura 5.3(A)). Esta deleción elimina más de la mitad del primer sitio de unión al factor NFAT-1. En la Cohorte de Linfadenopatía de Vancouver, ya se habían encontrado variantes del LTR con una deleción similar de 18 pb (a siete nucleótidos de distancia de la deleción de P11) en un paciente que también presentaba síntomas de inmunodeficiencia [36]. Asimismo, los aislados virales HIV-1_{HAN} (Alemania) y HIV-1_{P89 6} (Estados Unidos), ambos provenientes de pacientes con SIDA, también presentan una deleción de 18pb en el sitio NFAT-1 (a tres nucleótidos de distancia de la deleción mexicana) [90]. Llama la atención que, siendo tan poco frecuentes, las deleciones en el sitio NFAT-1 coincidan en ser de 18 pb (6 aa) en cuatro reportes independientes.

El hecho de que estas deleciones ocurran *in vivo*, en sangre periférica y en aislados del HIV-1 que se replican eficientemente en cultivo (HIV-1_{HAN} y HIV-1_{P89 6}), sugiere que la ausencia de estos 18 pb no afecta alguna función esencial del virus. En efecto, al realizar ensayos de actividad transcripcional con los LTRs del paciente P11, se observó que la deleción de 18 pb no impedía la función promotora del LTR *in vitro*. Al igual que en el caso anterior, la actividad transcripcional dependiente de Tat fue significativamente superior a la actividad del control, lo cual indica que los nucleótidos deletados son dispensables en el proceso de trans-activación en linfocitos T (Figura 5 7)

Cabe destacar que la deleción de 18 pb cae dentro de la porción del LTR que traslapa con el gen *nef*, eliminando así, seis amino ácidos de la proteína viral correspondiente (Fig 5 4(A)). Normalmente, estos seis amino ácidos (DKVEEA) estarían ubicados cerca del extremo carboxil terminal de Nef, dentro de un asa flexible e hidrofóbica que participa en la formación de dímeros de la proteína [13] y que además interacciona con una serie de ligandos peptídicos aún en proceso de caracterización [108]. En este sentido, la proteína Nef del paciente P11 puede emplearse como una mutante natural del virus para complementar los estudios relacionados a la cristalización de la proteína y a la función del asa flexible

Como se muestra en la Figura 5.4(B), la delección de 18 pb no se encontró en una de las muestras del paciente P11. Fenómenos similares de variabilidad temporal del LTR se han observado en otros estudios, en donde las delecciones son genéticamente inestables y se recuperan *in vitro* e *in vivo* mediante mecanismos aún desconocidos [109, 110]. Sin embargo, también es posible que el paciente P11 esté infectado con dos cuasi-especies del virus que sean distintas en la región LTR y que estén predominando a distintas etapas en sangre periférica. En humanos, la coinfección con dos cepas, subtipos y tipos del HIV es posible y se ha documentado en varios reportes [111, 112]

6.2 Utilidad y validez de los ensayos de actividad transcripcional.

La variabilidad del LTR *in vivo* se ha estudiado en cuatro cohortes distintas: (i) la Cohorte de Linfadenopatía de la Ciudad de Vancouver [36], (ii) la Cohorte pediátrica del Hospital de Harlem [95], (iii) la Cohorte de LTNP de Sydney [85] y (iv) la Cohorte de LTNP en Nueva York [88]. A diferencia de lo realizado en estas cohortes, en el presente estudio se investigó la función de los LTRs mediante un ensayo de actividad transcripcional que emplea luciferasa como proteína reportera y lípidos (FuGene-6) que facilitan la transfección en células linfocíticas. Este ensayo no se ha reportado en la literatura y ofrece las ventajas de ser sencillo, no citotóxico y reproducible. La sensibilidad de este ensayo es considerable, ya que se detectaron diferencias en la actividad transcripcional de dos clonas que variaron únicamente en un par de bases (clonas de P15; Figura 5.7). Además, la actividad ajustada de luciferasa varió de 1×10^2 a 7×10^6 RLU, superior al rango de detección reportado previamente (1×10^3 a 2×10^5 RLU) en ensayos de actividad transcripcional del LTR [88].

Utilizando este ensayo, se demostró que las variantes mexicanas del LTR, aún con mutaciones y deleciones significativas, tenían una actividad transcripcional equiparable o superior a la del LTR prototipo (Figura 5.7). Debido a que las transfecciones se realizaron en células Jurkat, estos resultados solo pueden interpretarse en el contexto de linfocitos T, la principal estirpe celular infectada *in vivo*. Existe todo un espectro adicional de células susceptibles a infectarse con el HIV-1 [76] y, en principio, tales células expresan factores celulares de transcripción distintos que activan o reprimen el LTR diferencialmente. Se ha observado, por ejemplo, que la actividad transcripcional dependiente de Tat puede modularse de forma distinta en células linfocíticas y en células monocíticas [113].

Los ensayos de actividad transcripcional tienen otra limitante: la transfección no es estable sino transitoria, lo cual implica que el plásmido reportero no está integrado en el genoma cromosomal sino que se encuentra de forma episomal en el núcleo de la célula transfectada. Aquí, es indispensable señalar que, dentro del ciclo de replicación del HIV-1, el DNA viral puede encontrarse integrado o de forma circular no integrada en el núcleo de la célula infectada (Sección 1.3.1). Por lo tanto, este modelo de estudio es útil para examinar la actividad transcripcional del LTR en un contexto extracromosomal y no necesariamente para extrapolarla a un contexto de provirus integrado. Rossi y

cois han demostrado que la actividad del LTR puede ser distinta en células transfectadas estable versus transitoriamente [114].

Por último, es importante subrayar que los ensayos de actividad transcripcional solo examinan un aspecto de la función del LTR. Como se ha mencionado anteriormente, esta región del genoma viral está involucrada en otros procesos tales como la poliadenilación y el encapuchamiento (*capping*) de transcritos virales [1]. Recientemente, se ha demostrado que la estructura secundaria intacta de TAR es imprescindible en los eventos de retrotranscripción [54] y empaquetamiento viral [54-56]. En estos procesos, las mutaciones +11 y +13 en los LTRs del paciente P14 podrían ser importantes

6.3 Relevancia en el estudio de vacunas en contra del HIV-1.

Ante el impacto epidemiológico global del HIV-1 [96] y ante la falta de una vacuna eficiente en contra de la infección, ha surgido la propuesta de producir una vacuna atenuada introduciendo mutaciones y deleciones en la región *nef*/LTR del genoma viral [85, 86, 115]. Las repercusiones bioéticas que esta idea conlleva han generado un sinnúmero de críticas y contrapropuestas [116-119].

Por un lado, utilizando el modelo del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), se había demostrado que la cepa SIV_{macΔ239nef}, atenuada por una deleción en *nef*/LTR, no producía SIDA al inocularse en monos Rhesus adultos [87]. La inmunización con esta cepa inducía una respuesta inmune humoral [120] y celular [121] tan favorable que protegía a los monos adultos en contra de retos posteriores con cepas silvestres del SIV [120]. Sin embargo, posteriormente se demostró que estas cepas atenuadas sí producían SIDA al inocularlas en las mucosas de monos recién nacidos [122]. Aunado a esta observación, también se señaló que las deleciones cortas en el genoma del SIV podían repararse *in vivo* [109], revirtiendo a la secuencia silvestre.

Asimismo, en humanos, el antecedente de los LTNP de la Cohorte de Sydney había generado un entusiasmo considerable. Debido a que estos individuos portaban cepas con deleciones múltiples en *nef*/LTR [85], se pensó que tales cepas no podrían producirles daño alguno. Sin embargo, con el paso del tiempo, se ha demostrado que algunos de estos pacientes empiezan a deteriorarse inmunológicamente y que su carga viral ha aumentado [77]. Al examinar el genoma de sus virus, se han manifestado cambios temporales en la secuencia *nef*/LTR, mostrándose algunas inserciones que no estaban en los aislados originales. Del mismo modo, Berkhout y cols. han demostrado que la cepa HIV-1_{Δ3}, un candidato de vacuna con deleciones en *nef*, *vpr* y el LTR, manifiesta cambios genotípicos y fenotípicos después de dos meses en cultivo. duplica sus sitios Sp-1, compensando y así revirtiendo a un virus de replicación rápida y transcripción más eficiente [110].

La variabilidad temporal de la deleción de 18 pb que se observa en las variantes mexicanas P11 (Figuras 5.4 y 5.5) sugiere que el paciente está infectado con dos variantes que predominan a distintos tiempos en sangre periférica. Sin embargo, esta variabilidad también puede ser el resultado de la inestabilidad genética del LTR *in vivo*. De ser el caso, estas observaciones independientes, en conjunto, sugieren que el HIV es capaz de restituir sus deleciones *in vitro* e *in vivo*. Esta evidencia de

inestabilidad genética representa un grave potencial de reversión a formas silvestres y por lo tanto argumenta en contra del uso de vacunas atenuadas por medio de deleciones en el genoma del HIV-1

5.4 Conclusiones

En síntesis, se investigaron cuatro aspectos originales acerca de la secuencia terminal larga repetida del HIV-1. (i) las características del LTR de un no-progresor mexicano en el contexto de un fondo local de variabilidad, (ii) la variabilidad temporal de una delección de 18 pb en el sitio NFAT-1, (iii) las secuencias correspondientes a TAR y las posibles estructuras secundarias que éstas generan y (iv) la función promotora del LTR mediante un nuevo ensayo de actividad transcripcional en células linfocíticas.

Se concluye que las variantes mexicanas del LTR contienen polimorfismos, mutaciones y delecciones diversas que **no** disminuyen la actividad transcripcional basal ni la actividad transcripcional dependiente de Tat en células linfocíticas.

Este estudio demuestra que las delecciones y mutaciones que ocurren *in vivo* en el LTR no le son forzosamente perjudiciales al virus y pueden ser genéticamente inestables, argumentando así, en contra de la producción de vacunas del HIV-1 atenuadas por delecciones en *nef*/LTR.

7. Bibliografia

- 1 Luciw PA Human Immunodeficiency Viruses and their replication. En *Virology* (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds) 3a ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, p. 1881-952
- 2 Coffin JM Structure and classification of retroviruses. En *The Retroviridae* (Levy JA, ed) Vol 1 Plenum Press, New York, 1992 p 19-50
- 3 Haase AT Pathogenesis of lentivirus infections *Nature* (London) 1986, 322.130-136
- 4 Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin HT, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R Human Immunodeficiency Viruses. *Science* 1986, 232 697.
- 5 Levy JA. Heterogeneity of HIV and Its Relation to Pathogenesis En: *HIV and the pathogenesis of AIDS* (Levy JA, ed) 2a ed American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, p. 137-174
- 6 Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS *Science* 1986: 233-343-346.
- 7 Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* (London) 1987; 326 662-669
- 8 Mann J, Tarantola D. AIDS in the World II Oxford University Press, New York. 1996.
- 9 Whittle H, Egboga A, Todd J, Corrah T, Wilkins A, Demba E, Morgan G, Rolfe M, Berry N, Tedder R Clinical and laboratory predictors of survival in Gambian patients with symptomatic HIV-1 and HIV-2 infection. *AIDS* 1992; 6 685-689
- 10 Whittle H, Morris J, Todd J, Corrah T, Sabally S, Bangali J, Ngom PT, Rolfe M, Wilkins A HIV-2 infected patients survive longer than HIV-1 infected patients. *AIDS* 1994, 8:1617-1620
- 11 Castro BA, Barnett SW, Evans LA, Moreau J, Odehoun K, Levy JA. Biologic heterogeneity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) *Virology* 1990, 178 527-534
- 12 Athur LO, Bess JW, Sowder RCI, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE Cellular proteins bound to immunodeficiency virus implications for pathogenesis and vaccines *Science* 1992; 258:1935-1938.
- 13 Turner BG, Summers MF. Structural Biology of HIV *JMB* 1999, 285:1-32
- 14 Levy JA Discovery and Origin of HIV En. *HIV and the pathogenesis of AIDS* (Levy JA, ed). 2a ed American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, p. 1-14.
- 15 Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997, 89:263-273
- 16 Caffrey M, Cai M, Kaufman J, Stahl SJ, Wingfield PT, Covell DG, Gronenborn AM, Clore GM. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J* 1998, 17:4572-4584
- 17 Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration. progress and problems *Annu Rev Cell Biol* 1992. 8:275-306
- 18 Negroni M, Buc H Recombination During Reverse Transcription: An Evaluation of the Role of the Nucleocapsid Protein *IMB* 1999, 286 15-31
- 19 Miller MD, Farnet CM, Bushman FD. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition *J Virol* 1997, 71:5382-5390
- 20 Popov S, Rexach M, Zybarth G, Reihing N, Lee MA, Ratner L, Lane CM, Moore MS, Biobel G, Bukransky M Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex *EMBO J* 1998, 17 909-917
- 21 Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamouca CA HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration *EMBO J* 1990, 9 1551-1560

- 22 Sakai H, Kawamura M, Sakuragi JI, Sakuragi S, Shubata R, Ishimoto A, Ono N, Ueda S, Adachi A. Integration is essential for efficient gene expression human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67:1169-1174.
23. Levy JA. Intracellular Control of HIV Replication. En: *HIV and the pathogenesis of AIDS* (Levy JA, ed). 2a ed. American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, p 97-120.
- 24 Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 1998; 92:451-462.
- 25 McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 1988; 53:55-67.
- 26 Schubert U, Antón LC, Bacik J, Cox JH, Bour S, Bennick JR, Orlowski M, Strebel K, Yewdell JW. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* 1998, 72: 2280-2288
27. Figuet V, Chen YL, Mangasarian A, Foti M, Carpentier JL, Trono D. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO J* 1998; 17:2472-2481.
28. Ohno M, Fornerod M, Mattaj JW. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 1998; 92:327-336.
29. Freed EO, Martin AM. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* 1996; 70:341-351
- 30 Debouck C, Gorniak JG, Strickler JE, Meek TD, Metcalf BW, Rosenberg M. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:8903-8906
31. Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1998; 72:2846-2854
32. Kranke KE, En Hui, Yuan H, Luban J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature (London)* 1994, 24:359-362.
33. Camarú D, Trono D. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* 1996; 70:6106-6111.
34. Ou SH, Gaynor RB. Intracellular factors involved in gene expression of human retroviruses. En: *The Retroviridae* (Levy JA, ed.) Vol 4. Plenum Press, New York, 1995. p 97-187
35. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A Compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Research* 2000; 28:663-668
36. Estable MC, Bell B, Merzouki A, Montaner JSG, O'Shaughnessy MV, Sadowski IJ. Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat variants from 42 patients representing all stages of infection display a wide range of sequence polymorphism and transcription activity. *J Virol* 1996; 70:4053-4062
37. Lu YC, Touzjan N, Stenzel M, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990, 64:5526-5529
38. Lu YC, Hey A, Touzjan N, Stenzel M, Haseltine WA. Cellular transcription factors which regulate HIV-1 replication. En: *Genetic Structure and Regulation of HIV* (Haseltine WA, Wong-Staal F, eds) Raven Press, New York, 1991 p 415-435
39. Bell B, Sadowski IJ. Ras-responsiveness of the HIV-1 LTR requires RBF-1 and RBF-2 binding sites. *Oncogene* 1996, 13:2687-2697
40. Estable MC, Bell B, Hirst M, Sadowski IJ. Naturally occurring human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeats have a frequently observed duplication that binds RBF-2 and represses transcription. *J Virol* 1998; 72:6465-6474
41. Seth A, Hodge DR, Thompson DM, Robinson L, Panyiotakis A, Watson DK. ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993, 9:1017-1023

- 42 Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosshield R, Wright PE Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature (London)* 1995, 376 791-795.
- 43 Sheridan PL, Sheline CT, Cannon K, Voz ML, Pazin MJ, Kadonaga JT Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro *Genes Dev* 1995; 9:2090-2104
- 44 Zeichner S, Kim JY, Alwine JC Linker-scanning mutational analysis of the transcriptional activity of the Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 1991;65 2436-2444.
- 45 Naghavi MH, Schwartz S, Sonnerborg A, Vahine A. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1 *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999, 15:1293-1303
- 46 Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, Berkhout B Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G *J Virol* 2000, 74 3740-3751.
- 47 Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine WA. Location of the trans-activating region of the genome of the human T-cell lymphotropic virus type III *Science* 1985, 229 74-77.
- 48 Goh WC, Rosen CA, Sodroski JG, Ho DD, Haseltine WA Identification of a protein encoded by the transactivator gene, tat_{III}, of a huma T-cell lymphotropic retrovirus type III. *J Virol* 1986, 59:181-184.
- 49 Rosen CR, Sodroski JG, Haseltine WA. The location of cis-acting regulatory sequences in human T lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 1985, 41 813-823.
- 50 Selby MJ, Bam ES, Luciw PA, Peterlin BM. Structure, sequence, and position of the stem-loop in TAR determine transcriptional elongation by Tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev* 1989; 3:347-358.
- 51 Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, Lowe AD, Singh M, Skinner MA, Valerio R Human immunodeficiency virus 1 Tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:6925-6929
- 52 Zhang J, Tamilarasu N, Hwang S, Garber ME, Hug I, Jones KA, Rana TM HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J Biol Chem* 2000, 275 34314-34319
- 53 Garcia JA, Harrich D, Pearson L, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Functional domains required for Tat-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J* 1988, 7 3143-3147
- 54 Harrich D, Hooker CW, Parry E. The Human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA upper stem-loop plays distinct roles in reverse transcription and RNA packaging. *J Virol* 2000, 74 5639-5646
- 55 Helga-Maria C, Hammarskjöld ML, Rekosh D An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA *J Virol* 1999, 73 4127-4135.
- 56 Clever JL, Eckstein DA, Parslow TG Genetic dissociation of the encapsidation and reverse transcription functions in the 5' R region of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1999, 73:101-109
- 57 Das AT, Klaver B, Berkhout B The 5' and 3' TAR elements of human immunodeficiency virus exert effects at several points in the virus life cycle. *J Virol* 1998, 72:9217-9223
- 58 Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983, 220.868-871
- 59 Poli G, Fauci AS. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992, 8 191-197
- 60 Krumar S, Orsana MJ, Lee JC, McDonnell PC, Debouck C, Young PR. Activation of the HIV-1 Long Terminal Repeat by cytokines and environmental stress requires an active CSB/p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 1996; 271:30864-30869.
- 61 Kruppa G, Thomas B, Machleidt T, Wiegmann K, Kronke M Inhibition of tumor necrosis factor (TNF) - mediated NF-kB activation by selective blockade of the human 55-kDa TNF receptor *J Immunol* 1992, 148 3152-3157

- 62 Pomerantz RJ, Feinberg MB, Trono D, Baltimore D Lipopolysaccharide is a potent monocyte/macrophage-specific stimulator of the human immunodeficiency virus type 1 expression. *J Exp Med* 1990, 172: 253-261
- 63 Mackewicz CE, Blackburn DJ, Levy J CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 2308-13
- 64 Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 1996, 17 217-221.
- 65 Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL Suppression of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is dependent on the NFAT-1 element. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996, 12 143-148.
- 66 Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270:1811-1814
- 67 Mackewicz CE, Barker E, Greco G, Reyes-Terán G, Levy JA. Do chemokines have a clinical relevance in HIV infection? *J Clin Invest* 1997; 100:921-30
68. Levy JA. The mysteries of HIV challenges for therapy and prevention. *Nature (London)* 1988; 333:519-522
- 69 Lang W, Perkins H, Anderson RE, Royce R, Jewell N, Wilkenstein W Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J AIDS* 1989; 2:63-69.
70. Rutherford GW, Lifson AR, Hessel NA. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men. An 11-year follow-up study. *Br Med J* 1990, 301 1183-1188.
- 71 Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allan JP. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J AIDS* 1991, 4:704-712.
72. Cao Y, Qin L, Zhang L, Sapiro J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995, 332 201-208.
73. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Scharger LK, Margolick JB, Buchbinder S, Giorgi JV, Fauci AS Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995, 332:209-216
- 74 Homsy J, Meyer M, Levy JA. Serum enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) correlates with disease in HIV infected individuals. *J Virol* 1990;64:1437-1440
- 75 Westby M, Manca F, Dalglish AG The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996, 17:120-126
- 76 Levy JA Overall Features of HIV Pathogenesis: Prognosis for Long-Term Survival. En *HIV and the pathogenesis of AIDS* (Levy JA, ed) 2a ed. American Society for Microbiology Press, Washington, 1998, p 311-338
- 77 Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Sullivan JS Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. *N Engl J Med* 1999; 340:1715-1722
- 78 Gómez-Román VR, Vázquez JA, Basualdo M-C, Estrada FJ, Ramos-Kuri M, Soler C *Nef*/Long Terminal Repeat quasispecies from HIV type 1-infected Mexican patients with different progression patterns and their pathogenesis in hu-PBL-SCID mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, 16 441-452.
- 79 Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Ying Zhou J, Tao Zhou J, Bolognesi DP, Fauci AS, Montefiori DC. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* 1997, 176 924-932
- 80 Lubaki NM, Ray SC, Dhruva B, Quinn TC, Siliciano RF, Bollinger RC Characterization of a polyclonal cytolytic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus in persons without clinical progression. *J Infect Dis* 1997, 175 1360-1367
- 81 Blackburn DJ, Mackewicz CE, Barker E, Hunt TK, Herndier B, Haase AT, Levy JA Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93 13125-13130

- 2 Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skunhoj P, Svejsgaard A, Nielsen JO, Hoffman B Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4+ T cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 1997, 11 305-310
- 3 O'Brien SJ, Moore JP The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 2000; 177 99-111
- 4 Clegg AO, Ashton LJ, Biti RA, Badhwar P, Williamson P, Kaldor JM, Stewart GJ. CCR5 promoter polymorphisms, CCR5 59029A and CCR5 59353C, are under represented in HIV-1-infected long-term non-progressors. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* 2000; 14:103-108
- 5 Deacon NJ, Tyskin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellet A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmon J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995, 270 988-991
- 6 Kirchhoff F, Greenough TC, Brettlter DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief Report: Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332:228-232
- 7 Kestler HW, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991, 65 651-662.
- 8 Zhang L, Yaoming H, Yuan H, Chen BJ, Ip J, Ho DD Genotypic and phenotypic characterization of long terminal repeat sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1997, 71:5608-5613
- 9 Mounch DV, Lee S, Reyes-Terán G, Mackewicz CE, Levy JA Lack of differences in nef alleles among HIV-infected asymptomatic long-term survivors and those who progressed to disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15 1573-1575.
- 10 Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Pavlakis GN. *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1993.
- 11 Pazzagli M, Devine JH, Peterson DO, Baldwin TO Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. *Anal Biochem* 1992;204 315-323.
- 12 Zeiphath O, Nguyen C, Ferran M, Felgner J, Tsai Y, Felgner PL Stable and monodisperse lipoplex formulations for gene delivery. *Gene Ther* 1998; 5:1272-1282.
- 13 Remy JS, Sirlin C, Vierling P, Behr JP Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjug Chem* 1994, 5 647-654
- 14 Haensler J, Szoka FC Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* 1993; 4:372-379
- 15 Rosseau C, Abrams E, Lee M, Urbano R, King MC Long terminal repeat and nef gene variants of human immunodeficiency virus type 1 in perinatally infected long-term survivors and rapid progressors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13 1611-1623
- 16 Epidemiological Fact Sheet on HIV/AIDS and sexually transmitted infections- Mexico. 2000 Update. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS.
- 17 Gudiño JC, Martínez F, Alcántara P, Soler C Genotyping of Mexican HIV-1 isolates. En *XIth International Conference on AIDS* Vancouver, Canada. July 7-12, 1996. Vol 1 Transcontinental Printing Inc, Canada, 1996, p277 [Abstract A2071]
- 18 Soler C, Gudiño JC A 11 años del descubrimiento del virus de inmunodeficiencia humana. *Salud Pública de México* 1995, 37 499-509
- 19 Soler C, Gudiño JC Subtyping of HIV-1 in Mexico by envHMA and gagPCR-FLP. En *12th World AIDS Conference*. Geneva, Switzerland, June 1998. Marathon Multimedia, USA [Abstract 11198]
- 20 Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories. Publication NIH-97-3828 U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C. 1997

101. Ait-Khaled M, Emery VC. Phylogenetic relationship between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat natural variants present in the lymph node and peripheral blood of three HIV-1 infected individuals. *J Gen Virol* 1994; 75:1615-1621.
102. Weiss AL, Wiskocil RL, Stobo JD. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 1984; 133:123-128.
103. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988; 55:1189-1193.
104. Dowdy S, Wearden S. Student's t Distribution. *En. Statistics for Research*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1993.
105. Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steiz TA, Crothers DA. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* 1990; 249:1281-1286.
106. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Wiley R, Rabson A, Martin MA. Production of Acquired immunodeficiency Syndrome-Associated Retrovirus in Human and Nonhuman Cells Transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986; 59:284-291.
107. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994; 8:1123-1128.
108. Stephan Grzesiek, University of Basel (comunicación personal).
109. Whatmore AM, Cook N, Hall GA, Sharpe S, Rud EW, Cranage MP. Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J Virol* 1995; 69:5117-5123.
110. Berkhout B, Verhoeve K, Van Wamel JLP, Back NKT. Genetic instability of live, attenuated human immunodeficiency virus type 1 vaccine strains. *J Virol* 1999; 73:1133-1145.
111. Nkengasong JN, Kestens L, Ghys PD, Koblavi-Deme S, Otten RA, Bile C, Maurice C, Kalou M, Laga M, Wiktor SZ, Greenberg AE. Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 and type 2: impact on HIV type 1 viral load and immune activation markers in HIV-seropositive female sex workers in Abidjan, Ivory Coast. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:1371-1378.
112. Becker-Pergola G, Mellquist JL, Guay L, Muro F, Nduwagwa C, Kazaaha P, Jackson JB, Eshleman SH. Identification of diverse HIV type 1 subtypes and dual HIV type 1 infection in pregnant Ugandan women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:1099-1104.
113. Copeland KF, Leith JG, McKay PJ, Rosenthal KL. CD8+ T cell supernatants of HIV type 1-infected individuals have opposite effects on long terminal repeat-mediated transcription in T cells and monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:71-77.
114. Rossi C, Gibellini D, Barbanti-Brodano G, Betti M, Boarini C, Pengue G, Lania L, Caputo A. Transiently transfected and stably integrated HIV-1 LTR responds differentially to the silencing activity of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repressor domain. *J Med Virol* 1999; 58:264-272.
115. Bangham CRM, Phillips RE. What is required of an HIV vaccine? *Lancet* 1997; 350:1617-1621.
116. Ruprecht RM, Baba TW, Liska V. Attenuated HIV vaccine: caveats. *Science* 1996; 271:1790-1792.
117. Ruprecht RM. Live attenuated AIDS viruses as vaccines: promise or peril? *Immunol Rev* 1999; 170:135-149.
118. Collins KL, Nabel GJ. Naturally attenuated HIV--lessons for AIDS vaccines and treatment. *N Engl J Med* 1999; 340:1756-1757.
119. Desrosiers RC. Safety issues facing development of a live-attenuated, multiply deleted HIV-1 vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:331-332.
120. Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak PK, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 1992; 258:1938-1941.
121. Johnson RP, Glickman RL, Yang JQ, Kaur A, Dion JT, Mulligan MJ, Desrosiers RC. Induction of vigorous cytotoxic T-lymphocyte responses by live attenuated simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1997; 71:7711-7718.

- 122 Balba TW, Jeong YS, Pennick D, Bronson R, Greene MF, Rupprecht RM Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaque *Science* 1995, 267 1820-1825

nef/Long Terminal Repeat Quasispecies from HIV Type 1-Infected Mexican Patients with Different Progression Patterns and Their Pathogenesis in hu-PBL-SCID Mice

VICTOR RAUL GÓMEZ-ROMÁN,¹ JOEL A. VÁZQUEZ,¹ MARÍA DEL CARMEN BASUALDO,¹
FRANCISCO J. ESTRADA,² MANUEL RAMOS-KURI,² and CARMEN SOLER¹

ABSTRACT

To examine the genetic features of the long terminal repeat (LTR) derived from six HIV-1-infected individuals enrolled in the Mexico City Cohort, we cloned and sequenced a 505-bp fragment of the proviral LTR from their peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). All patients harbored HIV-1 LTR quasispecies corresponding to the B subtype. Three patients with high CD4⁺ T cell counts (>500/mm³) presented LTR sequences with point mutations in the TAR bulge. The LTR sequence from a patient classified as a long-term nonprogressor (LTNP) presented the most frequent naturally occurring length polymorphism (MFNLP) and two substitutions in the TAR region that were predicted to result in two alternative secondary RNA structures. A novel 18-bp deletion, which eliminates part of the putative binding site for the nuclear factor of activated T cells (NFAT-1), was identified in the overlapping *nef*/LTR sequence derived from a patient progressing to AIDS. This deletion coincides with the ability of this virus to consistently replicate at low levels *in vivo* (viral load <500 RNA copies/ml) and *in vitro* (unsuccessful virus isolation). On one occasion, when virus isolation was successful, the 18-bp deletion was no longer evident and LTR sequences with intact NFAT-1-binding sites were observed. Inoculation of hu-PBL-SCID mice with viruses from several Mexican patients resulted in differential CD4⁺ T cell depletion patterns 15 days postinfection, which agree with the *in vivo* CD4⁺ T cell count data from each patient.

INTRODUCTION

ALTHOUGH THE MEDIAN TIME from HIV-1 seroconversion to AIDS is approximately 10 years in the absence of antiretroviral treatment,¹ there are numerous reports of long-term nonprogressors (LTNPs) worldwide.²⁻⁵ LTNPs represent only a minority of the HIV-1-infected population and they can be defined as people who have been infected for at least 10 years and who remain asymptomatic with a normal CD4⁺ T cell count and a low viral load despite no antiretroviral treatment.² Close observation and follow-up of LTNPs in several cohort studies have revealed that these patients may in fact be slow progressors as opposed to nonprogressors of HIV disease,⁶ as shown by small but steady decreases in their CD4⁺ T cell counts through time. In any case, the study of LTNPs continues to be a key element in the understanding of HIV pathogenesis and in

the development of novel strategies for the treatment and prevention of AIDS.

To date, no single host or viral phenotype has been consistently linked to long-term nonprogression and it is widely believed that its causes are multifactorial. In some studies, high-titer neutralizing antibodies⁷ and effective cellular immune responses have been described in LTNPs. These cellular responses include potent antiviral factors secreted by CD8⁺ T cells⁸ and strong CD8⁺ T cell cytotoxicity against HIV antigen-pulsed cells.⁹ There are also strong associations suggesting that genetic background and HLA may be involved in a slower progression to AIDS, as evidenced by a higher frequency of certain alleles found in nonprogressors.¹⁰ Other large cohort studies have reported that heterozygosity for the 32-base pair deletion of the β -chemokine receptor gene CXCR-5 is strongly associated with a delayed progression of AIDS-related symp-

¹Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, México

²Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, México

toms¹¹ Such a delay, however, is most notably observed during the first 7 years of infection; thereafter, progression to AIDS in the heterozygous CCR5/ΔCCR5 population is similar to that observed in the wild-type CCR5/CCR5 carriers

Alternatively, many other cohort studies have focused their efforts in searching for peculiarities in the genome of the HIV-1 variants harbored by LTNP. The strongest association between viral genotype and nonprogression is that of the Sydney Blood Bank Cohort Study, where major deletions in the *nef* gene and in the long terminal repeat (LTR) were consistently found in the donor and in the seven recipients of a contaminated blood unit. All eight affected patients were initially reported as LTNPs who had remained asymptomatic throughout at least 13 years of HIV-1 infection.⁴ Similarly, presumably attenuated HIV-1 proviruses have been reported in a North American⁵ and in an Italian LTNP,¹² suggesting that *nef*/LTR-deleted HIV-1 quaspecies may be circulating globally, although not necessarily in all persons identified as nonprogressors.⁵ *Nef* has been shown to downregulate CD4 molecules from the surface of T cells and to decrease interleukin 2 (IL-2) production,¹³ but also has been shown to have a positive effect on HIV-1 replication.¹⁴

The U3 region of the LTR, which overlaps with the *Nef*-coding region, has several sites that bind cellular transcription factors.¹⁵ Previous studies indicate that some of these *cis*-binding sites within the LTR are variable and this variability affects viral replication.¹⁶ There are reports that HIV-1 variants with deletions in the NFAT sites replicate faster and are more cytopathic *in vitro* than parental strains.¹⁷

In this article, we present data from a 4-year follow-up study of several HIV-1-infected patients in the Mexico City Cohort. Only one of these patients has consistently satisfied the more stringent criteria for long-term nonprogression² prior to receiving any antiretroviral drugs. We therefore chose to examine the LTR sequence derived from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of this patient, and to compare it with the LTR of HIV-1 proviruses derived from several patients with differ-

ent progression patterns and with high and low CD4⁺ T cell counts. We also examined the *in vivo* temporal variation of the HIV-1 LTR sequence from several patients as well as the *in vitro* sequence variation in cocultured cells and in virus grown in MT-2 cells. In addition, in order to measure the *in vivo* impact of the mutations found in the LTR, we inoculated hu-PBL-SCID mice with Mexican isolates and determined CD4⁺ T cell depletion and HIV-1 antigen production at 15 and 30 days postinfection. Inoculation of three different patient-derived isolates into hu-PBL-SCID mice permitted us to evaluate the effect of these different viruses on CD4⁺ T cell depletion in this model.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

Twelve HIV-1-infected subjects were studied (Table 1). All patients are males infected through the sexual route. All study subjects gave informed consent for the study prior to sampling. Four of them have more than 13 years of infection, four have more than 12 years, three more than 11 years, and one has had 6 years of infection. Time of infection is considered as their first formally documented HIV-1-positive antibody test. Most of the patients were sampled every 4 months starting between 1995 and 1997. Viral load (Hybrid Capture II assay, Digene, Beltsville, MD), CD4⁺ T cells counts (FACScount; Becton Dickinson, San Jose, CA), plasma antigen (HIVAG-1 monoclonal antibody to human immunodeficiency virus type 1, Abbott Diagnostics, North Chicago, IL), and virus isolation by coculture were performed each time. Virus isolation was performed according to guidelines from the Division of AIDS (DAIDS) *Virology Manual for HIV Laboratories*.¹⁸ Briefly, 2×10^6 patient PBMCs were mixed with $8-10 \times 10^6$ phytohemagglutinin (PHA)-preactivated PBMCs from two (1) HIV-1, hepatitis B virus (HBV)-negative donors. Cultures were

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF HIV-1 INFECTED PATIENTS IN THE MEXICO CITY COHORT

Patient	Duration of infection (years)	Years of ARV treatment	CDC stage ^a	CD4 ⁺ T cell count (No./mm ³)	HIV-1 isolation (PBMCs) ^b	Plasma viral load ^c
P4	≥13	2	C	107-212	5/7	3.1-5.3
P10	≥13	5	A	555-779	7/8	≤2.7-4.4
P11	≥13	4	C	169-311	1/7	≤2.7-3.7
P14	≥13	2	A	462-1151	8/9	2.9-4.6
P8	≥12	3	A	375-799	4/6	3.8-5.1
P17	≥12	3	B	430-884	0/5	≤2.7-3.5
P19	≥12	3	A	412-554	0/5	≤2.7-4.0
P22	≥12	2	C	105-250	0/4	3.6-4.7
P2	≥11	4	A	533-801	3/5	3.5-4.3
P23	≥11	2	A	227-635	1/5	4.0-5.9
P21	≥11	2	C	86-191	5/5	5.1-6.0
P15	≥6	4	A	527-1045	0/5	3.0-3.6

Abbreviation: ARV, Antiretroviral.

^aA, asymptomatic, B, symptomatic, C, AIDS.

^bNumber of successful virus isolations per number of attempts.

^cLog RNA copies per milliliter of plasma.

kept in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% antibiotic-antimycotic solution, and recombinant IL-2 (rIL-2, 20 U/ml) (all from GIBCO, Grand Island, NY). Fresh donor cells were added every 10 days. Cultures were monitored by supernatant HIV-1 antigen determination every week for at least 4 weeks. Two consecutive positive antigen determinations (>50 pg) were considered as successful isolation.

LTR sequences

DNA was extracted directly from uncultured PBMCs. Approximately $1 \mu\text{g}$ was used as template in a nested polymerase chain reaction (PCR) in order to amplify a 505-base pair fragment (from position -380 to +125, HXB2 sequence) of the proviral LTR. This fragment overlaps with the 3' end of the *nef* gene and is inclusive of the U3, R, and U5 regions of the LTR. LTR1 (5'-CAC ACA AGG CTA CTT CCC TGA-3') and LTR2 (5'-GAT CTC TAG TTA CCA GAG TCA-3') were used as outer primers as described previously¹⁹ to increase the sensitivity of the PCR, we designed LTR3 (5'-CCC TGA TTA GCA GAA CTA CAC-3') and LTR4 (5'-GTC ACA CAA CAG ACG

GGC ACA C-3') as inner primers. A low-error *Taq* polymerase (Accuzyme, Bioline, U.K.) was used in both PCR rounds to minimize the introduction of mutations. In most cases, the LTR amplicons were subcloned into *Sma*I-digested pUC18. Several clones from the same patient were sequenced. In some cases the second round of PCR was directly run with fluorescent dideoxynucleotides (ABI Big dye terminator mix, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) in order to sequence the total PCR product. Sequencing of recombinant plasmids was conducted with universal forward and reverse primers, using a 373A Applied Biosystems (Foster City, CA) automated sequencer.

Sequence analysis

Sequences were visualized in electropherograms (Chromas, version 1.43) and entered into the Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI) sequence management programs (courtesy of the "alpha" server at the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México) using Chopup, Reformat, and Seqed. Gelassemble was used to merge the sense and antisense sequences. Multiple sequence alignment files were generated using LineUp and PileUp. Pretty was used to

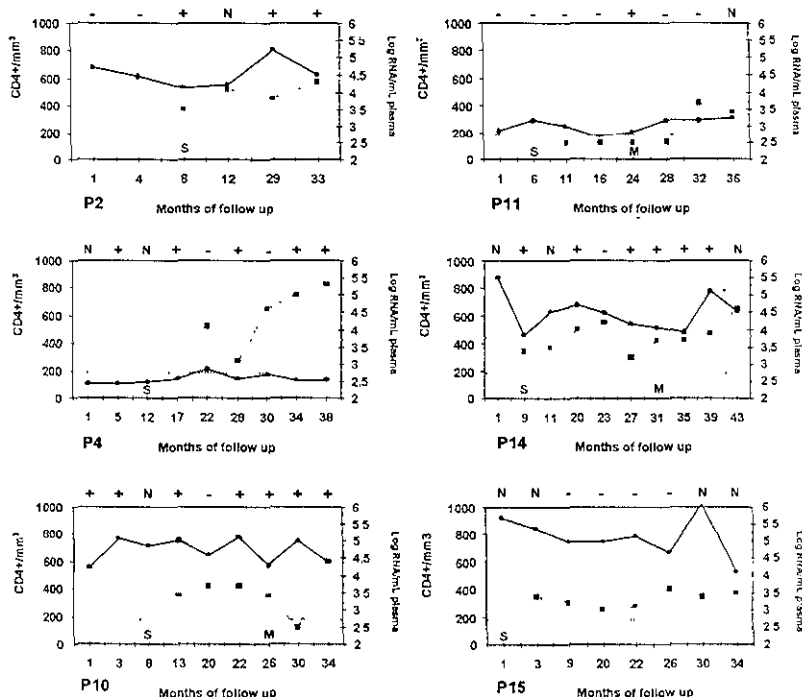


FIG. 1. Follow-up data of six patients from the Mexico City Cohort. The solid lines represent the absolute number of CD4⁺ T cells and the broken lines represent the plasma viral load. The dotted horizontal line indicates the detection level for the viral load assay (500 RNA copies/ml plasma). Along the top of each graph the results of virus isolation by coculture of patient and normal PBMCs are indicated: +, positive; -, negative; N, not performed. Samples labeled S were used for cloning and sequencing of the *nef* LTR region. Samples labeled M (P10, P11, and P14) were used for inoculation of hu-PBL-SCID mice.

RESULTS

Mexico City Cohort

A Mexico City cohort of HIV-1-infected people was established in 1995 with the objective of studying progression factors in our population and possibly detecting long-term non-progressor individuals. Table 1 shows data from 12 patients, 11 with more than 11 years of infection and 1 with at least 6 years of infection. Virus isolation attempts were successful in half the samples. Two patient groups were distinguished: those from whom virus was rarely recovered—2 positive samples over 26 attempts (patients 11, 15, 17, 19, 22, and 23), and those with a high rate of isolation—32 positive cultures over 47 attempts (patients 4, 10, 14, 8, 2, and 21). Successful virus isolation was not related to either lower CD4⁺ T cell counts, or to higher plasma viral load. Antiretroviral treatment was not related, since patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) at the time of virus isolation were found in both isolation groups.

If long-term nonprogressors (LTNPs) are defined as clinically healthy individuals (CDC stage A) who have maintained normal and stable CD4⁺ T cell counts (>450 cells/mm³) after at least 10 years of HIV-1 infection without antiretroviral treatment,² then P14 is the only patient who satisfies these LTNP criteria, because he has had more than 11 years of asymptomatic HIV-1 infection prior to receiving any antiretroviral drugs (Table 1). All other cohort members with stable CD4⁺ T cell counts (P2, P10, P15, and P17) started antiretroviral treatment prior to their tenth year of HIV-1 infection. To date, despite recent fluctuation in his viral load, P14 remains fully asymptomatic. Although his CD4⁺ T cell count once dropped to 462 cells/mm³, that value is still within the normal values for CD4⁺

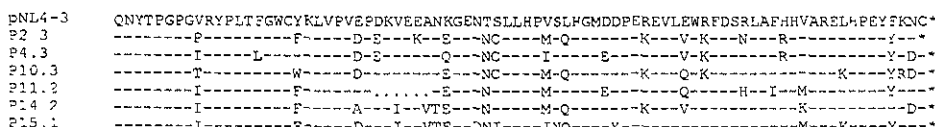
T cell counts in the healthy HIV-1-negative Mexican male population ($n = 130$; mean CD4⁺ T cell count, 796/mm³, range at 90% confidence interval, 421–1140/mm³, O. Diaz, unpublished data, 1999). Virus has been repeatedly isolated from the PBMCs of this patient by conventional isolation procedures, and on several occasions we have observed syncytium formation in less than 10 days of primary culture. This syncytium-inducing phenotype (SI) is preserved even after two subsequent passages in PBMCs as well as in MT-2 cells, and the virus is able to replicate, at least transiently, in several cell lines, including SupT1, CemX, and U937. Although the presence of SI isolates was initially associated with disease progression,²² our observation agrees with previous reports of SI viruses found in LTNPs.⁵

LTR region

DNA was extracted from PBMCs derived from all the patients included in Table 1, and the region spanning the LTR was amplified by nested PCR. The *nef*/LTR amplicons were visualized by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. All patient samples yielded an expected PCR product of approximately 505 base pairs similar to that of the pNL4-3 control, indicating that no gross *nef*/LTR deletions were present in the population under study. In addition, no intrasample length variations were observed in any of the patients under study.

To examine the genetic features of the LTR region, amplicons from the 6 patients included in Fig 1 were cloned and a total of 21 full-length LTR sequences was obtained. P2, P10, P14, and P15 had high CD4⁺ T cell counts, whereas P4 and P11 were patients progressing to AIDS. Cloned samples were collected between March and July 1996, when patients P4 and

A



B

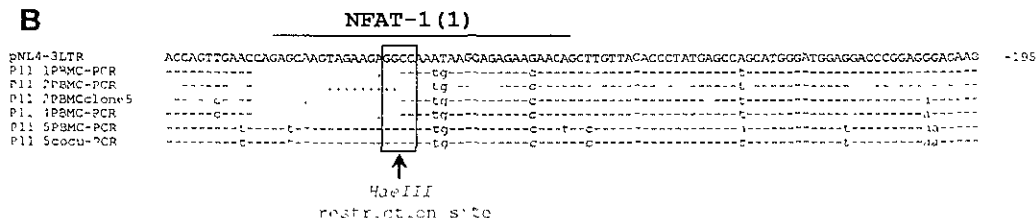


FIG. 3. (A) Partial Net amino acid sequences of six patients from the Mexico City Cohort, aligned in relationship to pNL4-3, which is listed at the top. The sequences are labeled by patient number followed by the sequential sample number. A dash indicates identity to the reference sequence. A dot indicates a gap introduced to preserve the alignment. IUPAC standardized codes for amino acids were used in this alignment. (B) LTR nucleotide sequences derived from sequential samples taken from P11. Sequences are aligned with reference to pNL4-3, which is listed at the top. PBMC-PCR indicates a sequence obtained directly from the PCR product. PBMC-clone 5 indicates that the sequence was obtained from a PCR product cloned into pUC18, co-cu-PCR indicates that the sequence was obtained from the cocultured cells of that sample. The *Hae*III restriction site is boxed.

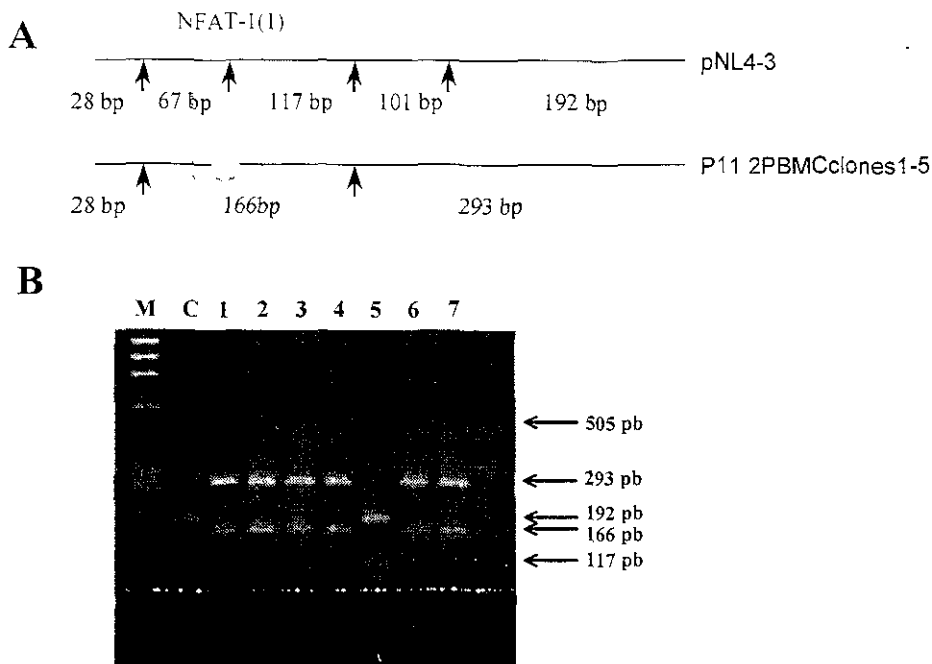


FIG. 4. (A) Expected *Hae*III restriction patterns for pNL4-3 and for P11 2 clones 1-5, according to the sequences obtained for the 505-bp *nef*/LTR amplified fragment as shown in Fig. 2A. (B) *Hae*III restriction patterns of the 505-bp fragment (-380 to -125 of the *HXB2* sequence) obtained as a PCR product with primers LTR3 and LTR4 and electrophoresed on a 2% agarose gel. M, Molecular weight marker. C, pNL4-3 digestion products, lanes 1 to 7, digestion products of sequential samples up to 32 months of follow-up of P11 as indicated in Fig. 1. Digestion products from the *nef*/LTR 505-bp fragment obtained from samples 1 through 4 and from samples 6 and 7 show a pattern that corresponds to the loss of a restriction site at position -68 [Sp-1(3) site], as well as the restriction site at the NFAT-1(1) site, where the 18-bp deletion was observed. Lane 5 shows the restriction pattern of P11 5, which is similar to that observed for pNL4-3 and corresponds to the obtained nucleotide sequence of that sample, as can be observed in Fig. 6. Sample 5 is the only sample from P11 from which virus was recovered by coculture (Fig. 1).

P14 had not started antiretroviral treatment. Figure 2 shows a multiple sequence alignment profile of the LTR sequences derived from these patients.

As expected, the Mexican LTR consensus sequence was closest to the Los Alamos National Laboratory (LANL) consensus B sequence.²³ This finding, together with previous observations of V3 sequences derived from other Mexican patients,^{24,25} as well as the results obtained through *env* heteroduplex mobility assay (HMA) genotyping²⁶ (data not shown), provide genetic evidence that HIV-1 subtype B circulates in Mexico. More extensive molecular epidemiology studies will be needed to demonstrate whether this is the only subtype circulating in the country.

Sequence nucleotides -295 to -121 (Fig. 2A) share an 84.74% of identity in all LTRs, whereas nucleotides -120 to

-80 (Fig. 2B) are 97.65% identical. This greater variability in the *NeF*-coding sequences overlapping the LTR is consistent with several previous reports that suggest that the *NeF*-coding and noncoding sequences of the LTR have evolved independently as two uncoupled loci.²⁷

NFAT-1 deletion in P11

The LTRs from most of the patients bear a perfectly conserved putative binding site for the nuclear factor of activated T cells (NFAT-1), except for the four clones sequenced from P11: a patient with a low CD4⁺ T cell count and a consistently low viral load. The 18-bp deletion found in this patient's LTR (boxed in Fig. 2A) has not been reported previously and is predicted to truncate six amino acids in frame from *NeF* (Fig. 3A). Nucleotide sequence analysis of this patient's LTR through time (Fig. 3B) indicates that this 18-bp NFAT-1 deletion predominates in proviral sequences at several time points but was not present in one sample. A restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay using *Hae*III as the digesting enzyme on the 505-bp amplified fragment (Fig. 4A) permitted us to distinguish between wild-type and deleted samples. As shown in Fig. 4B, the 18-bp deletion was present in four sequential samples (from February 1996 to March 1997) but in December 1997 (P11 5), when virus isolation was successful, the wild-type-like virus was predominant. Later samples taken in 1998 show the

deleted virus as prevalent. None of the seven samples with deleted NFAT-1 sites were culture positive.

LTR-binding site variability from nucleotides -200 to -120

Patient 10 (four of four clones) and P2 (two of three clones) had a perfectly conserved upstream stimulatory factor (USF-1) site palindrome 5'-CACGTG-3' (Fig. 2A), which has been implicated in downregulation of viral transcription.³⁰ The non-conserved USF-1 site identified in P14 (five of five clones) and in one clone from P2, has been reported either in the LANL database²³ or in a larger longitudinal analysis of LTR sequences derived from 42 HIV-1-infected patients.²⁹ The erythroblastoma 26 (Ets-1) motif core, 5'-GGA-3' (nucleotides -144 to -146 on the negative strand), was 90% conserved, with the only variant being 5'-GGG-3', which has been observed previously as well. The high-affinity binding site for the lymphoid enhancer-binding factor (LEF-1), often called the T-cell factor-1 α -binding site (TCF-1 α), 5'-CTNTG-3' (nucleotides -130 to -134 on the negative strand), was 80% conserved in P14 and only 19% conserved in all LTR variants, although all variations, again, have been reported elsewhere. The binding sites for the Ras-responsive binding factors RBF-1, 5'-ATCCG-3' (nucleotides -147 to -143), and RBF-2, 5'-ACYGCTGA-3' (nucleotides -121 to -129), implicated in LTR transcriptional responsiveness to protein-tyrosine kinases and v-Ras,^{31,32} were found to be nearly perfectly conserved.

The HIV-1 most frequent naturally occurring length polymorphism (MFNLP), which has often been termed the TCF1- α duplication site, has been previously described as a 15- to 34-bp-long insertion containing a duplicated RBF-2 site (Fig. 2A). The MFNLP has been previously found in up to 38% of HIV-1 LTR sequences from patients at all stages of disease progression in the Vancouver Lymphadenopathy-AIDS study.²⁹ This is exactly the same frequency at which we observed the

MFNLP in the clones that we sequenced from Mexican patients. However, in this case, the MFNLP was not found in either of the two patients with low CD4⁺ T cell counts (Fig. 2).

Four of five LTR sequences derived from P14 bear the MFNLP; however, not all four MFNLPs were identical (Fig. 2A). This heterogeneity observed in the MFNLP from P14 contrasts with previous observations that indicate either the absence or presence but no inpatient variability in the TCF-1 α duplication sites derived from long-term nonprogressors.^{5,12}

LTR sequences from nucleotides -120 to +80

The NF- κ B enhancer sequences (Fig. 2B) were perfectly conserved in all patients under study. Aside from a single G \rightarrow A substitution found in the first SP-1-binding site of the P14 2-PBMC-clone6 sequence, all core promoter sequences derived from this patient were perfectly conserved, compared with the more frequent mutations observed in Sp-1 sites from P4, P10, and P11. The TATA box was also perfectly conserved in all cases.

Point mutations along the TAR regulatory sequence

It is well established that the Tat protein binds to the tripyrimidine bulge of the TAR RNA sequence and that, except for the central cytosine of the bulge, such as the one observed in P15, modifications to any one of the 10 base pairs centered on the bulge prevent the binding of Tat.³³ In this regard, we found an important T \rightarrow A substitution at position +25 in the LTR sequences from P2 and P10. This substitution has been reported previously in HIV-1_{SF162}²³ and in the LTR sequences from a patient with low CD4⁺ T cell counts.²⁹ In the latter case, the substitution did not affect Tat-mediated transcription in the Jurkat-Tat cell line. Its relevance *in vivo* remains unknown.

The TAR region of the LTRs derived from P14 was well conserved, maintaining intact bulge and loop regions as well as the six principal base nucleotides involved in supporting the

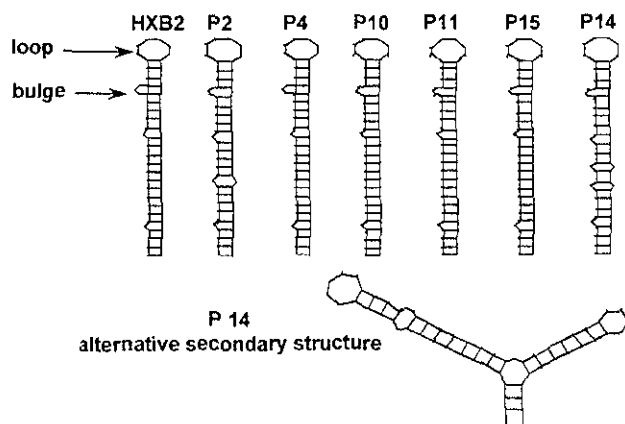


FIG. 5. Secondary structure of TAR RNA for the six patients from the Mexico City Cohort, showing a predicted alternative structure for P14. These structures were obtained through the Squiggles option of the mfold and plotold programs in GCG. The HXB2 structure is given as a reference.

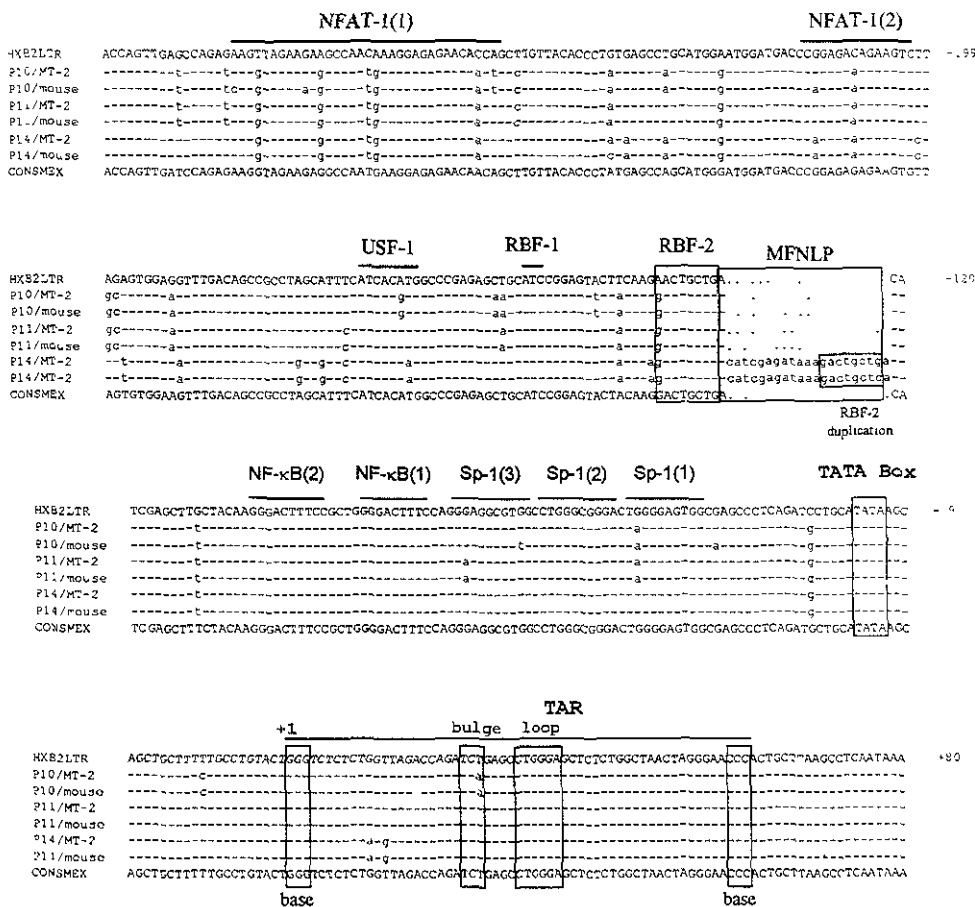


FIG. 6. LTR nucleotide sequences from nucleotide -295 to +80, aligned with reference to HXB2. The sequences are labeled by patient number. The first sequence for each patient corresponds to the provirus present in cells of the coculture of patient PBMCs and MT-2 cells. The second sequence for each patient corresponds to provirus present in spleen cells of mice inoculated with the corresponding strain. The consensus for Mexican LTRs (CONSMEX) is listed at the bottom. Regulatory sites are indicated.

bent rod TAR RNA secondary structure (nucleotides +1 to +3 and +57 to +59). However, the G → A and T → G substitutions found at positions +11 and +13 (Fig. 2B) were also observed. These substitutions have been reported previously in LTR sequences from several isolates: HIV-1_{C-92BR025.8} (Brazil), HIV-1_{C-En220} (Ethiopia), and HIV-1_{B-WR27} (United States).²³ By running the Squiggles option of the mfold program in GCG, we predicted that these two substitutions resulted in all these isolates, in the formation of two alternative TAR RNA secondary structures (Fig. 5). Both of these structures preserve the bulge and loop regions, but one of them generates a second loop of unknown importance *in vivo*. Although the formation of such a rare alternative secondary structure is questionable, it is note-

worthy that an identical substitution at position +11 was found by Zhang *et al.* in a nonfunctional hypermutated LTR sequence derived from a North American nonprogressor.⁵

Infectiousness and pathogenicity of P10, P11, and P14 in hu-PBL-SCID mice

Previous studies have demonstrated that molecularly cloned, *nef*-mutated isolates of HIV-1 do not prevent CD4⁺ T cell depletion in hu-PBL-SCID mice.¹⁴ Few studies, however have specifically addressed whether patient-derived HIV-1 *nef*/LTR mutants are infectious or pathogenic in the same mouse model. With this in mind, we tested whether Mexican HIV-1 isolates

with known mutations in the LTR (Fig. 6) resulted in different CD4⁺ T cell depletion patterns in hu-PBL-SCID mice. We chose to test an isolate from P14, containing the heterogeneous MFNLP at the end of *nef* and the two seemingly important substitutions in the TAR region (+11/+13) of the LTR, an isolate from P10 with a presumably important T → A substitution at the bulge position +25, and the single isolate obtained from P11 in 4 years of follow-up.

We included five groups of mice. Each experimental group consisted of four or six mice, with one hu-PBMC donor used in half of the mice in each group. On days 15 and 30 postinfection three mice from each group were killed and the percentage of CD4⁺ human T cells from the total spleen/peritoneal cells was determined by flow cytometry (Table 2). On day 15 postinfection, a significant ($p < 0.01$) decrease in the percentage of CD4⁺ T cells was observed in mice inoculated with the pathogenic control strain UIRH5 and with isolates from P11 and P14. In contrast, mice inoculated with an isolate from P10 had CD4⁺ T cell values similar to those of the mock-infected mice. At 30 days postinfection, all isolates produced a significant ($p < 0.01$) CD4⁺ T cell decrease with respect to the mock control.

Virus was recovered by coculture of PHA-activated human PBMCs with suspended mouse spleen cells and cells obtained through peritoneal washing from all but one mouse inoculated with isolate from P11, suggesting that all three isolates tested were fully infectious, at least in this model. Antigen production in the cocultures was different among the isolates tested. Cultures derived from mice infected with P14 isolate produced the least amount of antigen at 15 and 30 days postinfection. Cultures from P10-infected mice produced an intermediate amount of antigen, with the antigen values at 15 days postinfection being slightly higher than those observed at 30 days. In the case of P11, although no virus was recovered from one of the mice sacrificed 15 days postinfection, the cultures derived from the other five mice had the highest antigen production of the three isolates tested.

Finally, to determine whether the *in vivo* mutations in the LTR from these patients were preserved in the PBMC/MT-2 cultures and in the hu-PBL-SCID mice, we PCR amplified and directly sequenced the LTRs from the MT-2 isolates, as well as from the spleen/peritoneal cell cocultures (recovered virus).

Figure 6 shows that none of the isolates tested suffered any modifications during coculture in MT-2 cells or after *in vivo* passage in the hu-PBL-SCID mice.

DISCUSSION

In this study, we specifically addressed whether a Mexican long-term nonprogressor (P14) harbored distinctive *nef*/LTR variants in the context of several other cases of HIV-1 infection in Mexico. Consistent with previous reports, we found no gross deletions in the proviral LTR derived from P14 (Fig. 2). A more detailed analysis of the *nef*/LTR sequences obtained from this patient revealed no significant peculiarities other than two substitutions at positions +11 and +13, which were predicted to result in an alternative form of TAR RNA secondary structure (Fig. 5). Whether the formation of such an alternative structure really occurs *in vivo* remains unknown. Since several LTR sequences have been reported with both of these substitutions, it would be worthwhile to generate the +11 and +13 mutations by site-directed mutagenesis of molecular clones of HIV in order to examine their possible impact in viral transcription. In general, however, the LTRs from P14 were 87 and 97% identical (Nef-coding and noncoding loci) to the sequences from the rest of the patients under study, suggesting that the current well-being of P14 is a result of host rather than viral factors. Indeed, of the patients involved in this study, P14 is the sole patient heterozygous for the 32-bp CCR-5 deletion implicated in long-term survival (data not shown).

We found a novel deletion in sequences derived from several samples of P11, an AIDS patient with a low CD4⁺ T cell count, a low viral load, and who has had an episode of *Pneumocystis carinii* pneumonia. The 18-bp deletion eliminates nearly half of the first NFAT-1-binding site (Fig. 2A) and is seven nucleotides upstream of a similar, previously reported 18-bp deletion found in the LTR of a progressor enrolled in the Vancouver Lymphadenopathy Study.²⁹ In that same cohort, shorter deletions (9 to 11 bp) along the first NFAT-1-binding site were identified in two other patients progressing to AIDS (stage IV), but not in any of the patients at stages I and II of HIV-1 infection. Similarly, the B-subtype HIV-1 molecular clones HAN (Germany)³⁵ and P89.6 (United States),³⁶ both de-

TABLE 2. INFECTION OF hu-PBL-SCID MICE WITH PATIENT-DERIVED HIV-1 ISOLATES^a

HIV-1 isolate	Percentage of CD4 ⁺ T human cells in spleen/peritoneal cavity ^b		Mice from which HIV was recovered ^c
	T ₁₅	T ₃₀	
P10	21.3 ± 2.1	11.7 ± 3.5	6/6
P11	6.0 ± 2.0	7.3 ± 4.5	5/6
P14	15.0 ± 1.0	14.0 ± 2.6	6/6
Mock infected	21.5 ± 3.5	24.5 ± 0.7	0/4
UIRH5	4.0 ± 1.0	4.5 ± 0.5	4/4

^aPercentage of CD4⁺ human T cells from the total of spleen/peritoneal cells recovered from HIV-1-inoculated mice was determined by flow cytometry, using anti-human CD4-RPE-conjugated MAb

^bT₁₅ and T₃₀, days 15 and 30 postinfection, respectively

^cNumber of mice from which HIV-1 was recovered by coculture over total number of attempts.

rived from AIDS patients, have been reported to present an 18-bp deletion along the NFAT-1 site, which is 3 base pairs upstream from the 18-bp deletion reported here. Altogether, the LTR sequence data available from these four independent studies indicate that deletions along the NFAT-1 site can occur in peripheral blood virus of persons progressing to AIDS but not in LTNP.

As shown in Fig. 4, we observed temporal variation at the NFAT-1 site *in vivo*. We do not know whether this variation is a result of the well-known genetic and temporal instability of the LTR,^{3,4,12,37} or whether P11 was originally infected with two distinct populations of HIV-1 variants that predominated at different time points. The restoration of an intact NFAT-1 site coincided with the single successful event of virus isolation, suggesting that the 18-bp deletion reported here impedes virus replication in PBMCs via an unknown mechanism. Our findings would seem to contradict earlier studies in which removal of the entire NFAT-1-binding site from HIV-1_{HXB2} results in higher replication and increased reverse transcriptase activity in Jurkat cells.³⁰ Similarly, the 18-bp deletion found in the NFAT-1 sequence from HIV-1_{P89.6} has not been reported to affect its replication in culture; in fact, HIV-1_{P89.6} replicates quite well in monocyte-derived macrophages, in PBMCs, and in CemX174,³⁶ indicating that its particular 18-bp deletion is dispensable for LTR function. Further studies employing mutagenesis of this region will have to define whether the 18-bp deletion we found in P11 has any real relevance to virus replication in PBMCs and in other cell lines. On the other hand, since the 18-bp deletion falls into the overlapping *nef*/LTR sequence, thereby eliminating six amino acids from the Nef protein (Fig. 3A), it could well result in an alternative form of Nef protein whose function would be worthwhile studying in more detail.

A second objective of this study was to address specifically whether HIV-1 *nef*/LTR variants derived from three of our patients were infectious and/or pathogenic in a hu-PBL-SCID mouse model. Previous studies exploring the function of the *nef* gene in this murine model have involved only artificially fabricated *nef*-deleted variants of HIV-1, which were shown to delay but not to prevent CD4⁺ T cell depletion.³⁴ Naturally occurring, patient-derived *nef*/LTR mutants derived from nonprogressors have seldom been tested. In this particular case, at 15 days postinfection, we observed a depletion of CD4⁺ T cells in mice that was in some way related to our *in vivo* follow-up data on these patients. Mice infected with HIV-1_{P14} presented a significant but intermediate depletion of CD4⁺ T cells with respect to mock-infected control mice. P10 is also an asymptomatic patient, infected more than 13 years ago, but whose well-being seems to be more dependent on his antiretroviral treatment. Virus derived from this patient induced a time-dependent CD4⁺ T cell depletion in mice, reaching a significantly lower value only after 30 days of infection. Finally, HIV-1_{P11} isolate is the one that induced a more drastic depletion of CD4⁺ T cells, a phenomenon that is also reflected in the low CD4⁺ T cell counts observed in this patient during 3 years of follow-up. By 30 days postinfection, all isolates resulted in lower levels of CD4⁺ T cells, suggesting that the *nef*/LTR mutations observed in P10 and P14 may delay but not prevent CD4⁺ T cell depletion.

Interestingly, the MFNLP, which has been implicated in

downregulation of viral replication *in vitro*,³² was found in the predominant HIV-1 population recovered from mice infected with HIV-1_{P14}, indicating that the MFNLP confers no detectable phenotype in hu-PBL-SCID mice and that its presence neither prevents nor delays CD4⁺ T cell depletion.

This model using the hu-PBL-SCID mice would provide a relatively simple method to measure the *in vivo* pathogenic potential of patient-derived *nef*-truncated strains of HIV-1, as would be the case for the viruses identified in Australian, Italian, and North American nonprogressors.

In conclusion, our data further emphasize the notion that long-term nonprogression is a multifactorial process not necessarily involving *nef*/LTR-truncated HIV-1 strains. In addition, deletions in the *nef*/LTR gene sequence are not exclusive of nonprogressors and do not prevent the emergence of full-length LTR variants, as such deletions can be found in persons progressing to AIDS. Together with cumulative evidence describing the instability of mutant LTR strains, our results further argue against the safety of *nef*-truncated strains as suitable HIV-1 vaccine candidates.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank in particular all patients who participated in this study. We are grateful to O. Diaz for providing background data on CD4⁺ T cell counts, and to J.C. Gudino and C. Wong for performing the HMA assays. We also thank all the base personnel from the Retrovirus Research Unit for their continued support. Funding for this research was provided by the Mexican Ministry of Health. V.R.G.R. (94078) and J.A.V. (138542) are recipients of CONACYT fellowships.

REFERENCES

- Rutherford GW, Lifson AR, Hessel NA. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: An 11-year follow-up study. *Br Med J* 1990;301:1183-1188.
- Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, and Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994;8:1123-1128.
- Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, and Desrosiers RC. Brief Report: Absence of intact *nef* sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:228-232.
- Deacon NJ, Tyskun A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Elliott A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, and Mills J. Genomic structure of an attenuated quasi-species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995;270:988-991.
- Zhang L, Yaoxing H, Yuan H, Chen BJ, Ip J, and Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of long terminal repeat sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1997;71:5608-5613.
- Learmont J, Gezey AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsta RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DL, Deacon NJ, and Sullivan JS. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. *N Engl J Med* 1999;340:1715-1722.

- 7 Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Ying Zhou J, Tao Zhou J, Bolognesi DP, Fauci AS, and Montefiori DC. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* 1997;176:924-932.
- 8 Blackburn DJ, Mackewicz CE, Barker E, Hunt TK, Herndier B, Haase AT, and Levy JA. Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13125-13130.
- 9 Lubaki NM, Ray SC, Dhruva B, Quinn TC, Sliciano RF, and Boillinger RC. Characterization of a polyclonal cytolytic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus in persons without clinical progression. *J Infect Dis* 1997;175:1360-1367.
- 10 Westby MF, Manca F, and Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996;17:120-126.
- 11 Eugen-Olsen J, Iversen AKN, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skinhøj P, Svejgaard A, Nielsen JO, and Hofmann B. Heterozygosity for a deletion in the *CCR-5* gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS* 1997;11:305-310.
- 12 Salvi R, Garbuglia AR, DiCaro A, Pulciani SA, Montella F, and Benedetto A. Grossly defective *nef* gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol* 1998;72:3646-3657.
- 13 Goldsmith MA, Wernherdam MT, Acheson RE, Miller MD, and Greene WC. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol* 1995;69:4112-4121.
- 14 Kessler HW III, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, and Desrosiers RC. Importance of the *nef* gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991;65:651-662.
- 15 Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* 1992;6:347-363.
- 16 Golub EI, Lu GG, and Volsky DJ. Differences in the basal activity of the long terminal repeat determine different replicative capacities of two closely related human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 1990;64:3654-3660.
- 17 Lu YC, Touzjan N, Stenzel M, Dorfman T, Sodroski JG, and Haseltine WA. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990;64:5526-5529.
- 18 Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *DAIDS Virology Manual for HIV Laboratories*. Publication NIH-97-3828. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C., 1997.
- 19 Att-Khaled M and Emery VC. Phylogenetic relationship between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat natural variants present in the lymph node and peripheral blood of three HIV-1 infected individuals. *J Gen Virol* 1994;75:1615-1621.
- 20 Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, and Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature (London)* 1988;335:256-259.
- 21 Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB, Spector DH, and Spector SA. Human immunodeficiency virus infection of human-PBL-SCID mice. *Science* 1991;251:791-794.
- 22 Koop M, Vos AHV, Keet RPM de Goede REY, Derksen AMW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, and Fetsinette M. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an M12 cocultivation assay. *AIDS* 1992;6:49-54.
- 23 Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, and Pavlakis GN. *Human Retroviruses and AIDS*. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1993.
- 24 Gudiño JC, Martínez F, Alcántara P, and Soler C. Genotyping of Mexican HIV-1 isolates. In *XIII International Conference on AIDS Vancouver, Canada*, July 7-12, 1996. Vol 1. Transcontinental Printing Inc., Canada, 1996, p 277 [Abstract A2071].
- 25 Soler C and Gudiño JC. A 11 años del descubrimiento del virus de inmunodeficiencia humana. *Salud Pública México* 1995;37(6):499-509.
- 26 Soler C and Gudiño JC. Subtyping of HIV-1 in Mexico by envHMA and gagPCR-FLP. In *12th World AIDS Conference*, Geneva, Switzerland, June 1998. Marathon Multimedia, USA [Abstract 11198].
- 27 McNearney T, Hornickova Z, Templeton A, Birdwell A, Arens M, Markham R, Saah A, and Ratner L. Nef and LTR sequence variation from sequentially derived human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Virology* 1995;208:388-398.
- 28 Rousseau C, Abrams E, Lee M, Urbano R, and King MC. Long terminal repeat and *nef* gene variants of human immunodeficiency virus type 1 in perinatally infected long-term survivors and rapid progressors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:1611-1623.
- 29 Estable MC, Bell B, Merzouki A, Montaner JSG, O'Shaughnessy MV, and Sadowski IJ. Human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat variants from 42 patients representing all stages of infection display a wide range of sequence polymorphism and transcription activity. *J Virol* 1996;70:4053-4062.
- 30 Lu Y, Hey A, Touzjan N, Stenzel M, and Haseltine W. Cellular transcription factors which regulate HIV-1 replication. In *Genetic Structure and Regulation of HIV* (Haseltine WA and Wong-Staal F, eds.) Raven Press, New York, 1991, pp 415-435.
- 31 Bell B and Sadowski I. Ras-responsiveness of the HIV-1 LTR requires RBF-1 and RBF-2 binding sites. *Oncogene* 1996;13:2687-2697.
- 32 Estable MC, Bell B, Hirst M, and Sadowski IJ. Naturally occurring human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeats have a frequently observed duplication that binds RBF-2 and represses transcription. *J Virol* 1998;72:6465-6474.
- 33 Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steiz TA, and Crothers DA. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* 1990;249:1281-1286.
- 34 Gulizia RJ, Collman RG, Levy JA, Trono D, and Mosier DE. Deletion of *nef* slows but does not prevent CD4-positive depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected human-PBL-SCID mice. *J Virol* 1997;71:4161-4164.
- 35 Sauerbarm U, Schneider J, Mous J, Bruckhorst U, Schudel I, Jentsch KD, and Hunsmann G. Molecular cloning and characterization of a German HIV-1 isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6:813-823.
- 36 Collman R, Ballet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N, and Srinivasan A. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1992;66:7517-7521.
- 37 Berkhout B, Verhoeft K, Van Wanmel JLP, and Baek NKT. Genetic instability of live, attenuated human immunodeficiency virus type 1 vaccine strains. *J Virol* 1999;73:1138-1145.

Address reprint requests to

Carmen Soler

Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos

Universidad Nacional Autónoma de México

Cajón 470

Col. Santo Tomás

México DF 06740, México

E-mail: csoler@servidor.unam.mx