

1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

296789

"Patrones de Restricción de las Regiones LTR y RT del Provirus del VIH-1 en un paciente Seronegativo Persistente y en un Virus Prototipo"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
SERGIO AGUILAR MATEOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR PAUL GOMEZ ROMAN



FACULTAD DE CIENCIAS CIUDAD UNIVERSITARIA UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Patrones de Restricción de las Regiones LTR y RT del Provirus del VIH-1
en un paciente Seronegativo Persistente y en un Virus Prototipo"

realizado por **Aguilar Mateos Sergio**

con número de cuenta **8752537-1**, pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Victor Raúl Gómez Román

V. Raúl Gómez Román
Carmen Soler

Propietario

M. en C. Carmen Soler Claudín

Propietario

Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Suplente

Biol. Adriana García Alarcón

Adriana García Alarcón

Suplente

Biol. Alejandro Huerta Saquero

Alejandro Huerta Saquero

**FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.**

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos Morales



Dra. Patricia Ramos Morales

**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA**

DEDICATORIA

A mi madre y a mi padre por todo su apoyo y ayuda para que esta tesis se pudiera terminar. Gracias.

A mi hija Montserrat Aguilar Valenzuela por todos la felicidad que me ha dado desde que nació. Te amo mi amor.

A Mariana R. F. por todos los años de amistad que me ha permitido disfrutar a su lado. Te quiero.

*A Aldo, Alina, Alonso y Almira.
Los quiero mucho.*

*A Lourdes Flores por su cariño y compañía.
Gracias, tú cariño me ha ayudado mucho*

A las siguientes personas que me han dado desinteresadamente su amistad:

*Guadalupe L., Elena D., Javier D., Ruth C., Jorge M., Carolina G.
Virginia H., Susana N., Beatriz C. Alejandro ., Elsa E., Adriana G.,*

Pero sobre todo a Susana Valenzuela Alanís por todas las cosas que compartió conmigo durante mucho tiempo y por darme una hija. Gracias.

A mis hermanas y hermanos.

A todas las personas que viven con el VIH.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes personas que revisaron y corrigieron esta tesis:

*Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal
Biol. Adriana García Alarcón.
Biol. Alejandro Huerta Saquero*

A la Jefa de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos la Dra. Carmen Soler Claudin por las facilidades dadas para la realización de esta tesis.

Al M. en C. Joel Vazquéz Pérez por toda la ayuda otorgada durante el desarrollo de esta tesis.

A todas (os) las (os) integrantes de la Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos por la ayuda brindada.

Pero especialmente al Dr. Raúl Gómez Román por los consejos, facilidades y el tiempo concedido para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. por brindarme la oportunidad de estudiar Biología.

A todas y todos las profesoras y profesores de la carrera de Biología

Patrones de Restricción de las Regiones LTR y RT del Provirus del VIH-1 en un Paciente Seronegativo Persistente y en un Virus Prototipo.

RESUMEN.

EN LOS ULTIMOS AÑOS SE HAN REALIZADO UNA SERIE DE OBSERVACIONES EN GRUPOS DE PACIENTES QUE NO SIGUEN EL MODO HABITUAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1. DENTRO DE ESTOS GRUPOS SE ENCUENTRAN LOS SERONEGATIVOS PERSISTENTES, QUE SON PERSONAS QUE HAN SIDO EXPUESTAS AL VIH-1 , PERO QUE NO SEROCONVIERTEN. SIN EMBARGO EN ALGUNOS CASOS SE HA LOGRADO DEMOSTRAR LA INFECCIÓN EN ESTOS INDIVIDUOS MEDIANTE EL CULTIVO VIRAL O MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA. EN ESTE ESTUDIO SE OBTUVIERON PATRONES DE RESTRICCIÓN DE LAS REGIONES LTR Y RT DEL GENOMA VIRAL Y SE COMPARARON CON UN VIRUS PROTOTIPO PARA PODER DETERMINAR LA POSIBLE PARTICIPACIÓN DE UN VIRUS DEFECTUOSO. LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN OBTENIDOS MUESTRAN DIFERENCIAS PARA EL SEGMENTO LTR EN LA DIGESTIÓN REALIZADA CON LA ENZIMA Bgl II Y PARA EL SEGMENTO RT CON LA ENZIMA BSTX I, LO QUE SUGIERE QUE EL SITIO DE CORTE SE ENCUENTRA ALTERADO POSIBLEMENTE DEBIDO A INSERCIONES O DELECCIONES, ALTERANDO POSIBLEMENTE LAS FUNCIONES.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

1.- INTRODUCCIÓN.....1

1.1 ANTECEDENTES.....2

 1.1.1 HISTORIA.....2

1.2 HISTORIA NATURAL.....5

 1.2.1 INFECCION.....5

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....7

 1.3.1 CLASIFICACION.....7

 1.3.2 BIOLOGIA DEL VIH.....8

 1.3.3 CICLO DE REPLICACIÓN.....11

1.4 METODOS DE DETECCION DEL VIH.....13

 1.4.1 DEFINICION DE LA INFECCION POR VIH.....13

 1.4.1.1 SEROCONVERSION.....13

 1.4.2. METODOS INDIRECTOS.....14

 1.4.2.1 PRUEBAS DE TAMIZAJE.....14

 1.4.2.1.1 AGLUTINACION.....14

 1.4.2.1.2 ENSAYO INMUNO ENZIMATICO (ELISA).....15

 1.4.2.2 PRUEBAS CONFIRMATORIAS.....15

 1.4.2.2.1 WESTERN BLOT.....15

 1.4.3 METODOS DIRECTOS.....16

 1.4.3.1 CULTIVO VIRAL.....17

1.4.3.2 DETECCION DE ANTIGÉNO VIRALES.....	17
1.4.3.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	17
1.4.3.3.1 APLICACIONES DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	20
1.5 SERONEGATIVOS PERSISTENTES.....	22
1.5.1 ANTECEDENTES	23
1.5.2 ALTERNATIVAS PARA EL DIAGNOSTICO DE SERONEGATIVOS PERSISTENTES.....	24
1.5.3 IMPORTANCIA DE LOS SERONEGATIVOS PERSISTENTES.....	25
1.5.4 FACTORES INMUNOLÓGICOS Y VIRALES QUE INDUCEN RESISTENCIA FRENTE AL VIH.....	25
1.5.4.1 FACTORES INMUNOLÓGICOS.....	26
1.5.4.2 FACTORES VIRALES.....	27
1.6 JUSTIFICACION.....	29
2.- OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
3.- METODOS.....	32
3.1 SUJETO DE ESTUDIO Y VIRUS PROTOTIPO.....	33
3.2 AMPLIFICACION DE LOS FRAGMENTOS RT Y LTR.....	34
3.3 DIGESTION DE LOS AMPLIFICADOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	36
3.4 PATRONES DE RESTRICCIÓN.....	37
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.- CONCLUSIONES.....	46
6.- REFERENCIAS.....	48

1.- INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES.

1.1.1. HISTORIA .

Los retrovirus y el daño que éstos producen no representan un nuevo descubrimiento. Se sabía que estos virus producían cáncer en otros mamíferos, sobre todo leucemias que son tumores originados en los glóbulos blancos. Resultaba lógico, por tanto, buscar un virus que ejerciera un efecto similar en el humano (1). Sin embargo, no fué sino hasta 1978, casi una década después de descubrirse la transcriptasa reversa, que se aisló el primer retrovirus humano, el Virus Linfotrópico de las células T, (HTLV. por sus siglas en inglés) llamado así por su afección por dicho tipo de linfocitos. En 1982 se halló un segundo retrovirus humano que también producía leucemia. Desde entonces, el primer virus linfotrópico de células T pasó a llamarse HTLV-I y, el segundo HTLV-II.(1)

A principios del verano de 1981, cinco casos de neumonía causada por *Pneumocystis carinii* fueron reportados al Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC). Los cinco casos se presentaron en varones homosexuales jóvenes, sexualmente activos y previamente saludables originarios de la ciudad de Los Angeles, California. Este reporte fue bastante fuera de lo común debido a que la neumonía por *Pneumocystis carinii*, una neumonía causada por un parásito, se llega a observar casi exclusivamente en individuos inmunodeprimidos. Estos cinco hombres no presentaban ningún antecedente de inmunodepresión, ni existía motivo por el cual se sospechara que estuvieran inmunodeprimidos. Sin embargo, los análisis de laboratorio que se practicaron en tres de ellos revelaron un funcionamiento anormal del sistema inmune.

En esa misma época, se reportaron al CDC 26 casos de sarcoma de Kaposi, un tipo raro de cáncer de piel. Al igual que los casos de neumonía, el cáncer se presentó en hombres homosexuales de las ciudades de Los Angeles y Nueva York.

Previo a esto, el sarcoma de Kaposi únicamente se había observado en varones ancianos de ascendencia judía o mediterránea o en receptores de transplantes de riñón. El que se encontrara este cáncer en hombres homosexuales jóvenes fue raro en extremo. Pronto se corroboró que estos casos epidemiológicos estaban relacionados a una nueva enfermedad, denominada Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Este Síndrome no se limitaba a la población de hombres homosexuales o bisexuales, ya que también se observó en dos grupos singulares: heterosexuales que utilizaban drogas intravenosas y varones heterosexuales que padecían hemofilia A.

A pesar de que los primeros intentos de aislar e identificar un agente causal del SIDA fueron en vano, la historia clínica de los pacientes sugería que habían dos factores principales involucrados: el ser expuesto a sangre o el contacto sexual. El que se presentara tal enfermedad en aquellos que empleaban drogas intravenosas, en hemofílicos quienes utilizan factores de coagulación concentrados y en receptores de transfusiones sanguíneas, indicaba que el agente causal podía ser transmitido a través de la sangre. El que se presentara también en hombres homosexuales activos, y en compañeras sexuales de hombres portadores, indicó que este agente también era sexualmente transmisible de un hombre a otro o a una mujer. Además, se observó que la enfermedad podría ser transmitida verticalmente a los hijos de las mujeres que tenían SIDA durante la gestación. Debido a que se reconoció que el síndrome aparentemente era transmitido en forma muy parecida a la de la hepatitis B, se consideró la posibilidad de que fuera una variante de Citomegalovirus o de un Virus Epstein Barr.

No fue sino hasta principios de 1983 cuando se sospechó que algún tipo de HTLV, pudiese ser el agente causal (2).

En 1984, tres instituciones diferentes reportaron el descubrimiento de un virus asociado al SIDA, este virus fué denominado Virus Asociado con Linfadenopatía (LAV) por el Dr. Luc Montagnier y cols. en el Instituto Pasteur en Francia en mayo de 1983; Virus Linfotrópico tipo III de las células T humanas (HTLV-III) en mayo de 1984 por el Dr. Robert Gallo y cols. en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos; y Virus Relacionado al SIDA (ARV) por el Dr. Jay Levy y cols. en la Escuela de Medicina de la Universidad de California de San Francisco en agosto de 1984. El nombre definitivo del virus fue establecido por el Comité Internacional de Taxónomos como "Virus de la Inmunodeficiencia Humana" (VIH). Este nombre sustituye a las siglas o a los nombres que representan las siglas HTLV-III, LAV o ARV, siglas de los nombres de mayor uso hasta antes de la aparición de esta denominación.

La pandemia de SIDA parece haberse originado en África (2). En febrero de 1982 se reportó el caso más antiguo de infección por el VIH. En un estudio serológico de 1,213 muestras de plasma obtenidas de África entre 1959 y 1982, se obtuvo un resultado positivo del plasma fechado en 1959, de un adulto. La muestra fué confirmada por inmunofluorescencia, Western blot y radioinmunoprecipitación.(3)

1.2. HISTORIA NATURAL.

1.2.1. INFECCION.

El virus suele transmitirse de una persona a otra mediante la exposición directa a la sangre contaminada o por transmisión de la madre al feto o al lactante y por las relaciones sexuales no protegidas, donde hay intercambio de semen o secreciones vaginales. Una vez en el humano, el VIH-1 invade varios tipos de células del sistema inmune (entre ellas, los linfocitos TCD4, o auxiliares), se replica en su interior y se propaga a otras células. La historia natural de la infección por el VIH-1 se ilustra en la Fig. 1.

Al principio de la infección, una gran replicación del virus y la muerte de las células TCD4 se ponen de manifiesto por los grandes niveles de VIH-1 presentes en la sangre y por una disminución notable de la concentración de células TCD4, cuyo número normal es de 500 por milímetro cúbico de sangre como mínimo. A las tres o cuatro semanas de esta fase aguda, muchas personas muestran síntomas que semejan a la mononucleosis: fiebre, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, exantema, dolores musculares y cefaleas. Estas dolencias se resuelven en un período de una a tres semanas, a medida que el sistema inmune empieza a ejercer control sobre el virus. La población de células TCD4 responde estimulando a otras células, los linfocitos TCD8, o citotóxicos, para que intensifiquen la destrucción de las células infectadas. Se producen también anticuerpos en un esfuerzo por contener al virus; éstos ayudan a eliminar partículas libres del VIH-1 y células infectadas que expresan antígenos virales en la superficie.

Pese a toda esta actividad, es raro que el sistema inmune elimine por completo al virus. La tasa de replicación viral disminuye en un promedio de seis meses, manteniéndose relativamente estable y alcanzando un "punto de equilibrio". Este punto varía considerablemente de un paciente a otro y se asocia con la progresión de la enfermedad.

En promedio pasan de 8 a 10 años antes de que se desarrolle una complicación importante relacionada con el VIH-1.

Este estadio prolongado se define como el período asintomático. El período asintomático se debe a que los niveles de células TCD4 siguen siendo lo suficientemente estables como para conservar las respuestas defensivas en contra de agentes infecciosos. Con el tiempo, las concentraciones de células TCD4 van disminuyendo de manera gradual. Cuando el nivel cae por debajo de 200 células por milímetro cúbico de sangre se define al paciente como enfermo de SIDA.

En esta etapa, el sistema inmune se encuentra sobrepasado. La concentración del VIH-1 se incrementa y empiezan a proliferar los patógenos que en condiciones normales serían mantenidos bajo control, dando lugar a las infecciones oportunistas. Una vez que aparecen estas enfermedades, el SIDA suele resultar mortal en un año o dos. En ocasiones, estas infecciones aparecen antes de que el nivel de células TCD4 caiga por debajo de 200, lo que hace que se diagnostique el SIDA clínicamente sin considerar el número absoluto de linfocitos TCD4.

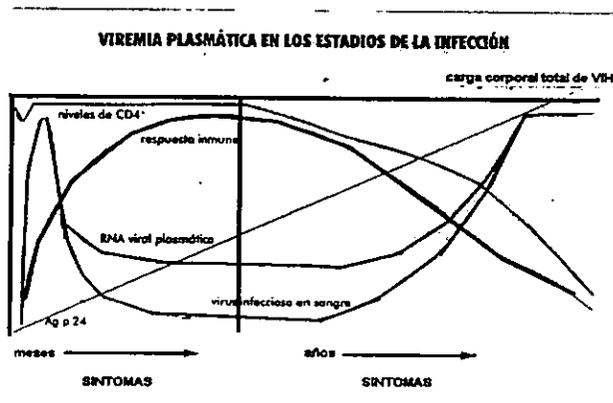


Figura 1. Historia Natural de la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1.3. AGENTE ETIOLOGICO.

1.3.1. CLASIFICACION.

El VIH-1 es un miembro de la familia Lentivirinae, de los retrovirus que afectan a los humanos. Los lentivirus característicamente causan infecciones que involucran largos periodos de latencia clínica y una débil respuesta inmune humoral. También presentan asociación con enfermedades con largos periodos de incubación, supresión inmune y autoinmunidad. Son especie-especificos, no son oncogénicos, hay acumulación de formas circular y lineal de ADN viral no integrado en células infectadas. Tienen un genoma grande (9 Kb) (4)

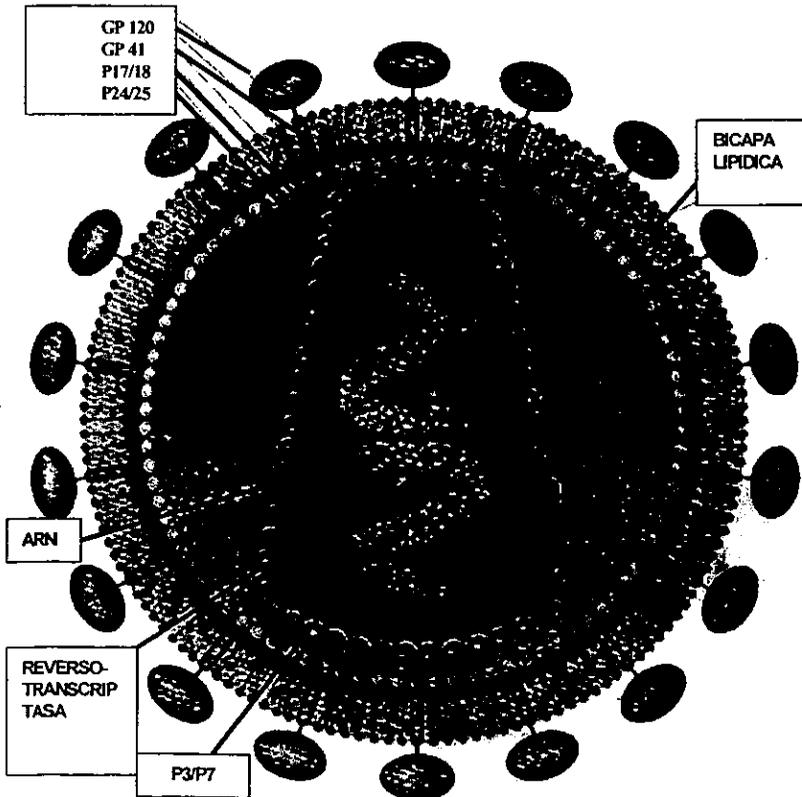


Fig. 2 Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1.3.2. BIOLOGIA DEL V.I.H.

Actualmente se conocen dos grupos de retrovirus humanos: los virus de leucemia de células T (HTLV-I Y HTLV-II) de la subfamilia de los oncovirus y los virus de la inmunodeficiencia humana. Se conocen dos tipos del VIH: VIH-1, aislado en 1983 y que se encuentra distribuido en todo el mundo, por lo cual es responsable de la mayoría de los casos de SIDA. El otro tipo, el VIH-2, produce el síndrome con mayor parsimonia y está restringido a determinadas zonas de África (5).

El VIH tiene una estructura icosaédrica, cuyo diámetro es de aproximadamente una diezmilésima de milímetro, conteniendo 72 picos externos (Fig. 2). Estos picos son formados por dos de las principales proteínas del virus, gp120 y gp41, las cuales se pueden encontrar en trímeros o tetrámeros y se encuentran en la membrana. Su envoltura es una doble capa lipídica proveniente de las membranas celulares y por lo tanto tiene insertadas otras proteínas incluyendo antígenos de histocompatibilidad clase I y clase II. Debajo de la envoltura, se encuentra una capa de proteína llamada matriz (MA) que rodea a la nucleocápside (NC), ésta última tiene forma de cono truncado y hueco que está formada por otra proteína, la p24. La nucleocápside se encarga de albergar el material genético del virus, que por ser un retrovirus está en forma de ácido ribonucleico o ARN, en vez del más habitual ADN. Dos hebras de ARN con una longitud de 9800 nucleótidos, se asocian físicamente a la nucleocápside. También están la enzima reverso transcriptasa (RT) que transcribe el ARN vírico en ADN una vez que el virus ha entrado en la célula. Junto con el ARN hay también una integrasa y una proteasa. Además hay otras dos proteínas, la p6 y la p7.

Una característica que distingue a los Lentivirus de otros retrovirus es la excepcional complejidad de su genoma viral. La mayoría de los retrovirus son capaces de replicarse conteniendo sólo 3 genes: *gag*, *pol* y *env*.

Los genes estructurales codifican para proteínas que forman la partícula viral o que tienen actividades enzimáticas, indispensables para la replicación de los virus: *gag* codifica para la proteína p55 que es el precursor de las proteínas de la nucleocápside del virus (p24, p17 y p9); *pol* tiene la información para las enzimas transcriptasa reversa (p55 y p60), integrasa (p31) y proteasa; *env* codifica para un precursor glicosilado, gp160, que es procesado dando origen a la glicoproteína de superficie de la envoltura (gp120) y la glicoproteína transmembranal (gp41). Además de estos 3 genes esenciales el VIH-1 contiene en su genoma pequeños genes accesorios: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*. (Ver Fig. 3). Tres de estos genes: *tat*, *rev* y *nef*, juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión viral. El gen *tat* es un "transactivador", lo cual quiere decir que la proteína correspondiente ejerce su regulación en un lugar distante del genoma, a la cual se le llama región responsiva. Las proteínas de *tat* y *rev* regulan la transcripción y los fenómenos postranscripcionales, y ambos son esenciales para que se lleve a cabo la replicación viral. El gen *nef* codifica para una proteína que ejerce una función de regulador negativo, de modo que cuando se modifica por algunas mutaciones, el virus se replica mucho más.

La proteína producida por el gen *vif* se encuentra en las partículas virales maduras, es muy conservada entre distintas cepas. Se ha comprobado que la proteína codificada por *vif* controla la infectividad de partículas virales libres, las cuales disminuyen considerablemente su capacidad infectiva si el gen que la codifica sufre mutaciones.

El producto de *vpu* no interfiere en la expresión de las proteínas del virus, pero parece estar involucrado en el fenómeno de liberación de partículas virales de células infectadas. Con respecto al producto de *vpr*, se sabe que éste induce la formación de anticuerpos en individuos infectados y participa en el proceso pre-integración.

El provirus tiene en sus extremos unas secuencias llamadas repetidos terminales largos (LTR, por sus siglas en ingles), que contienen elementos reguladores de la expresión viral como el promotor y secuencias aumentadoras de la transcripción.

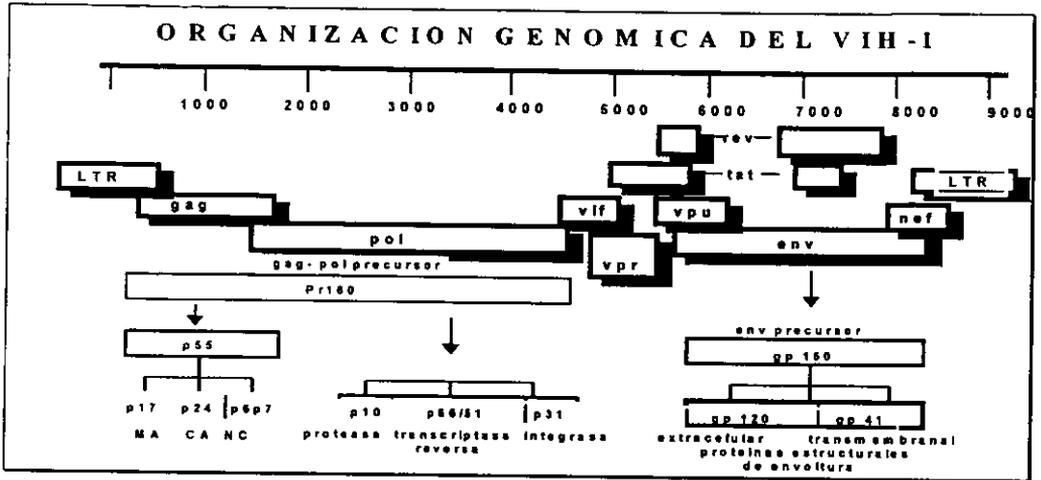


Figura 3. Genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1.3.3. CICLO DE REPLICACION.

El ciclo comienza con la unión de la proteína gp120 de la envoltura viral con la molécula CD4, una proteína que se encuentra en las membranas de varios tipos de células del sistema inmune. Ciertas células portadoras de CD4, las dendríticas, se encuentran distribuidas en las mucosas; pudieran ser éstas las primeras células infectadas por el VIH en la transmisión sexual. Macrófagos y monocitos, células del sistema inmune, portan también la molécula CD4 al igual que algunas células del cerebro como las neuronas y la microglia. Pero los principales blancos del VIH son los linfocitos T ayudadores o células T4, que expresan CD4.

A mediados de los noventas, el grupo encabezado por Edward A. Berger (6), del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas de EUA, aisló un correceptor indispensable para las variantes de VIH que preferentemente infectan a los linfocitos T (T-trópicas). Resultó ser un receptor de quimiocinas, denominado CXCR4. Casi simultáneamente, Michael Samson y Marc-Parmentier, de la Universidad Libre de Bruselas aislaron el gen correspondiente a un receptor similar de quimiocinas que reconoce RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β . En dos meses, cinco grupos demostraron independientemente que la proteína codificada por dicho gen, la CCR5, era también un correceptor para las estirpes M-trópicas del VIH, aunque el VIH generalmente utiliza CCR5 como un segundo receptor (7).

El mecanismo por el cual se da la unión del VIH y la célula blanco se ilustra en la Fig. 4. La proteína gp120 del VIH reconoce al receptor CD4. Esta interacción lleva a un cambio conformacional en la gp120, ligándose entonces al correceptor CCR5/CXCR4. A continuación, la gp41 expone un dominio fusogénico en la membrana celular de la célula blanco, dándose de esta manera la fusión del virus con la membrana celular de la célula huésped.

Esta unión le permite fusionarse con la membrana celular y liberar su contenido en el citoplasma. Dicho contenido lo forman las tres enzimas virales y dos hebras de ARN portadoras, cada una, del genoma entero del VIH, es decir, el material genético para fabricar nuevas partículas del virus (8).

Una de las enzimas, la transcriptasa reversa, copia el ARN del virus en un ADN de doble hebra. Posteriormente una segunda enzima llamada integrasa, ayuda a empalmar covalentemente el ADN del VIH a los cromosomas de la célula hésped. Cuando una célula T en cuyo interior se encuentra este ADN integrado (o provirus) entra en actividad para atacar al VIH o a cualquier otro microorganismo, se activa la replicación viral, se producen copias del genoma y de las proteínas del virus y se generan nuevas partículas virales. Estas partículas salen por gemación de la célula e infectan a otras células.



Figura 4. Mecanismo de Unión del VIH y la Célula Blanco

1.4. METODOS DE DETECCION DEL VIH-1

1.4.1. DEFINICION DE LA INFECCION POR VIH.

El individuo VIH seropositivo es aquel sujeto que ha demostrado ser repetidamente positivo en pruebas serológicas presuntivas de detección de anticuerpos contra el VIH (ELISA. Aglutinación) y adicionalmente en pruebas confirmatorias (Western Blot). El individuo infectado es aquel en quien se ha demostrado la presencia del virus por métodos directos (PCR, Cultivo, Detección de antígeno).

1.4.1.1. SEROCONVERSION.

Cuando ocurre la exposición al virus transcurre un período de duración variable y que en la mayoría de los casos es de 3 a 8 semanas después del cual el individuo desarrolla anticuerpos (Ver Fig. 1). Durante este lapso el título de anticuerpos específicos contra el virus resulta negativo aunque la persona se haya infectado y pueda transmitir el virus. Posteriormente el individuo permanecerá con altos títulos de anticuerpos durante un tiempo considerable. El tiempo que transcurre desde la exposición al virus hasta que se pueda detectar la presencia de anticuerpos es comúnmente llamado el período de ventana o de seroconversión y pueden transcurrir de 3 a 8 semanas antes de que se logren detectar los anticuerpos.

1.4.2. METODOS INDIRECTOS.

Estos métodos utilizan el suero del paciente para detectar anticuerpos específicos dirigidos hacia antígenos virales de la envoltura, de la cápside, matriz o de alguna otra estructura viral.

1.4.2.1. PRUEBAS DE TAMIZAJE.

Actualmente las pruebas de tamizaje que se utilizan en México para detectar la presencia de anticuerpos anti-VIH son las pruebas de aglutinación y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Cuando una prueba de ELISA o Aglutinación resulta positiva, debe repetirse la prueba. Si por segunda ocasión se obtiene un resultado positivo, podemos considerar esa muestra como presuntamente positiva. Si esta segunda prueba resulta positiva, se realizará una prueba confirmatoria.

1.4.2.1.1. AGLUTINACION.

Esta prueba utiliza antígeno del VIH obtenido por cultivo de virus en células linfoides. El virus es inactivado y desintegrado y con él se cubren partículas inertes de látex o gelatina. La prueba se basa en la aglutinación producida por la reacción antígeno-anticuerpo que se presenta cuando el suero que se está probando contiene anticuerpos específicos dirigidos a los antígenos virales que recubren a la partícula. La reacción es evaluada visualmente en una placa en la que se colocan las partículas recubiertas de antígeno viral y el suero problema. Se observa la diferencia entre la reacción negativa que produce un botón compacto y la positiva en la que el asentamiento de las partículas es difuso y grande.

1.4.2.1.2. ENSAYO INMUNO ENZIMATICO (ELISA).

Esta prueba se basa también en la reacción inmunológica que se presenta entre un antígeno y su anticuerpo específico. Para evaluar esta reacción antígeno-anticuerpo se diseñaron los análisis inmunoenzimáticos, que consisten en fijar a una superficie (fase sólida) alguno de los dos reactivos y hacerlo reaccionar con el complementario. Posteriormente se lleva a cabo una segunda reacción antígeno-anticuerpo que utiliza generalmente un anticuerpo policlonal que reacciona específicamente con el complejo formado inicialmente. Para visualizar el resultado, el segundo anticuerpo monoclonal empleado se encuentra conjugado con una enzima que al reaccionar con un sustrato da un producto final coloreado.

1.4.2.2. PRUEBAS CONFIRMATORIAS.

Actualmente se encuentran disponibles varias pruebas confirmatorias. Una de las más difundidas es el Inmunoblot o Western Blot (WB). El Western Blot no es una prueba tamiz, sino una prueba confirmatoria.

1.4.2.2.1 WESTERN BLOT

En este ensayo los antígenos virales son separados por medio de electroforesis (en un gel de poliacrilamida con SDS), luego transferidos de un gel a un soporte sólido (usualmente un filtro de nitrocelulosa) y posteriormente analizados con reactivos que son específicos para secuencias particulares de aminoácidos. Para su empleo en diagnóstico serológico se utiliza el suero problema, que de tener anticuerpos estos reaccionan específicamente contra antígenos que se encuentran en el soporte sólido. Esta técnica es extremadamente útil para la identificación de anticuerpos contra proteínas específicas del virus.

Resultado Positivo. Será el suero con anticuerpos dirigidos a los antígenos virales:

"env" + "gag" + "pol" o

"env" + "gag" o

"env" + "pol" o

"env" solamente (con un mínimo de antígenos "env" reconocidos)

1) Resultado Indeterminado. Será el suero con anticuerpos dirigidos a los antígenos virales:

"gag" + "pol" o

"gag" solamente o

"pol" solamente

El resultado indeterminado suele corresponder a estadios muy tempranos de la infección por VIH-1 (infección reciente), puede resultar de la reacción cruzada con VIH-2, (o bien deberá someterse a una tercera prueba). La repetición de la prueba después de tres meses puede proporcionar mayor información, ya que en este lapso se definirán algunos casos de seroconversión temprana.

3) Resultado Negativo. Será el suero en el que no se demuestre la existencia de anticuerpos contra ninguno de las tres clases de antígenos virales mencionados.

1.4.3. METODOS DIRECTOS.

Existen otras técnicas para el diagnóstico de la infección por el VIH, estas técnicas no detectan anticuerpos sino la presencia del virus, o las proteínas o ADN del mismo. Entre estas pruebas se encuentran: cultivo viral, detección de antígeno virales y la reacción en cadena de la polimerasa.

1.4.3.1 CULTIVO VIRAL.

Un diagnóstico definitivo de la infección por VIH puede ser realizado por el uso de cultivo celular para aislamiento del virus a partir de células, tejidos o fluidos corporales de individuos infectados. Muy comúnmente se emplea un sistema de cocultivo en el cual células mononucleares periféricas (PBMC por sus siglas en inglés de Peripheral Blood Mononuclear Cells) de donadores seronegativos al VIH, preestimuladas con fitohemaglutinina son mezcladas con PBMC's provenientes de un individuo presuntamente infectado del cual se quiere llevar a cabo el aislamiento. El cocultivo se mantiene en medio con interleucina 2 (IL-2) para promover la proliferación de linfocitos T. La presencia del virus se confirma por detección de actividad de reverso transcriptasa o de antígenos virales en el sobrenadante del cultivo o por inmunofluorescencia de las células.

1.4.3.2. DETECCIÓN DE ANTIGENOS VIRALES.

La detección de antígenos (Ag) virales se puede realizar en muestras de cocultivo para confirmar la infección, pero también se puede hacer directamente en muestras de plasma o suero de pacientes posiblemente infectados. La técnica de detección de Ag viral ofrece algunas ventajas: se ha encontrado que el Ag del VIH-1 puede ser detectado antes que los anticuerpos anti-VIH-1 en la mayoría de las infecciones agudas, además la determinación de Ag puede ser relacionada con el desarrollo de complicaciones clínicas.

1.4.3.3. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

El término reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso.(Fig.5)

Desarrollada a mediados de los ochentas, la aparición de esta técnica permite obtener en un breve lapso de tiempo, una gran cantidad de copias de la porción de ADN que se desea estudiar. La sensibilidad que aporta este método es tal que actualmente es posible analizar un gen aunque sólo se disponga del ADN de una célula (9).

El principio de la PCR es sencillo: consiste en copiar hasta mil millones de veces, en un tubo de ensayo, un fragmento del genoma que se desea estudiar. Los fragmentos de ADN contienen 2 hebras enlazadas en doble hélice. Cada hebra está constituida por el encadenamiento de un gran número de componentes elementales, los nucleótidos (Adenina, Timina, Guanina, Citosina), las secuencias de ambas hebras son complementarias y se hibridizan por enlaces energéticamente débiles, puentes de hidrogeno. Esta complementaridad tiene una gran importancia: cuando los puentes de hidrogeno se rompen, por ejemplo a causa del calor, las dos hebras son capaces de reasociarse simplemente por enfriamiento, reproduciendo la doble hélice inicial. Tal propiedad de hibridación específica de las secuencias complementarias ha sido utilizada por la PCR.

Esta técnica se basa en la acción de una enzima termo resistente, la Taq polimerasa, capaz de sintetizar, tomando como modelo una de las hebras, una nueva hebra formada por nucleótidos complementarios. La estrategia consiste en hacer funcionar la Taq polimerasa a partir de un pequeño oligonucleótido complementario del extremo de la región a amplificar, que queda fijado y sirve de cebador. El otro extremo del fragmento esta delimitado por un segundo oligonucleótido en la otra hebra.

Como se ilustra en la figura 5, cada ciclo de amplificación pasa por tres etapas: primero, la doble hélice de ADN se calienta a 94°C, lo que permite romper los puentes de hidrógeno entre las dos hebras y desnaturalizar el ADN. Luego la temperatura se baja hasta aproximadamente 50°C en presencia de los oligonucleótidos.

Entonces estos se hibridan específicamente en los extremos complementarios de la región a amplificar, cada uno en su hebra. Seguidamente cuando la temperatura se eleva a 72°C la polimerasa sintetiza las nuevas hebras de ADN a partir de los cebadores, uniendo nucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Estas operaciones constituyen un ciclo de amplificación, se dispone entonces de dos nuevas copias del fragmento. En el ciclo de amplificación siguiente, que pasa por las mismas 3 etapas (separación de las hebras, hibridación de los cebadores y elongación), estas nuevas hebras servirán, a su vez, de moldes para la polimerasa. De este modo se obtienen 2^n fragmentos después de n ciclos (10).

Los primeros ensayos de la PCR se realizaron en forma manual, utilizando para la amplificación al fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de la bacteria *Escherichia coli*, así como varios baños de agua para las diferentes temperaturas. Después del paso de desnaturalización, en cada ciclo se requería agregar una cantidad de enzima para reemplazar a la incluida inicialmente, dado que esta se inactivaba por la alta temperatura requerida durante el paso de desnaturalización del ADN. Sin embargo, al hacer esto también se incrementaba la concentración de glicerol (contenido en la preparación comercial de la enzima) y éste terminaba por inhibir la actividad de la enzima y limitar así la eficiencia de la reacción.

Afortunadamente el descubrimiento de una enzima resistente al calor, la *Taq* polimerasa, aislada a partir de la bacteria *Thermophilus aquaticus* que vive en manantiales térmicos, evita añadir enzimas en cada ciclo y permite la automatización de la PCR.(11)

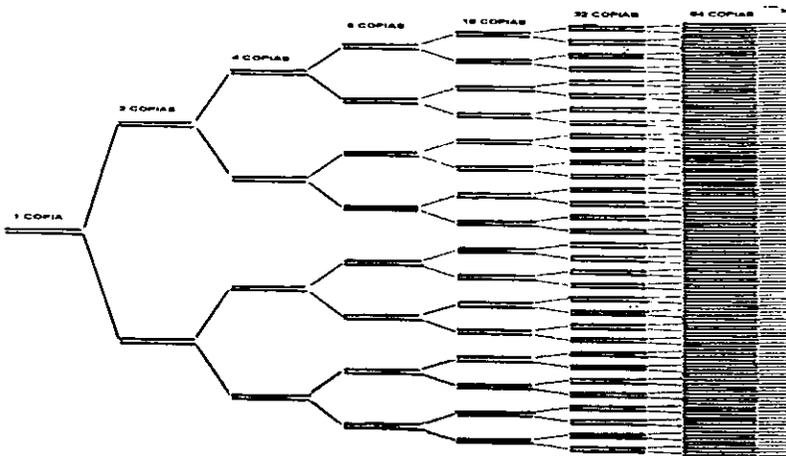


Fig. 5 Ciclos de amplificación por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

1.4.3.3.1. APLICACIONES DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica con aplicaciones en diversos campos como la biología molecular, diagnóstico clínico, en genética de poblaciones y análisis forense (12).

En el diagnóstico clínico esta metodología es utilizada en la genética médica para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y de algunas cromosomopatías comunes. En el campo de la inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (13). En el campo de la oncología, se emplea para probar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de anti-oncogenes, para detectar arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos, y para la detección de virus y secuencias oncogénicas.

En la microbiología la PCR se ha utilizado en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus; particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo de cultivo, como es el caso de las micobacterias. En la medicina legal, la PCR ha enriquecido enormemente el análisis de las pruebas de paternidad y la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de ADN altamente variables o polimórficas (14).

1.5. SERONEGATIVOS PERSISTENTES

En la historia natural de la infección por VIH encontramos que el tiempo medio desde el momento de la infección hasta el desarrollo de la enfermedad que se conoce como SIDA es de alrededor de 10 años. Así, unos pocos individuos van a progresar a SIDA en 18 meses, mientras que otros permanecen libres de la enfermedad más de 18 años (15).

En general se ha venido aceptando que los receptores de transfusiones progresaban más rápidamente que los que se infectaban por contacto sexual o los hemofílicos.

En los últimos años se han realizado una serie de observaciones en pacientes que no seguían el modo habitual de progresión de la infección, distinguiéndose 3 grupos:

- 1) Pacientes de larga supervivencia. Personas infectadas, con disminución de linfocitos T CD4 (<200 células / mm^3), pero sin presentar síntomas
- 2) No progresores. Personas infectadas, asintomáticas y con niveles normales de linfocitos T CD4 (>500 células / mm^3).
- 3) Seronegativos Persistentes. (HEPS, Highly Exposed Persistently Seronegatives). Personas que no seroconvierten a pesar de exposiciones múltiples al VIH.

Los HEPS, son personas asintomáticas quienes han sido expuestos al VIH pero no seroconvierten e incluyen: trabajadoras sexuales y otros individuos que han tenido relaciones sexuales múltiples sin protección con individuos seropositivos al VIH, usuarios de drogas por vía intravenosa que compartían agujas o jeringuillas con seropositivos, receptores de sangre o derivados de la misma contaminados

con VIH, trabajadores sanitarios que han sufrido exposición a sangre o fluidos orgánicos VIH+, recién nacidos de madres infectadas y en parejas en las cuales uno es seronegativo al VIH y el otro es seropositivo al VIH (parejas discordantes).

A pesar de una exposición continua al VIH, los seronegativos persistentes no producen anticuerpos de tipo IgG contra el virus, según pruebas de tamizaje (ELISA) o confirmatorias (Western Blot) utilizando su suero. Sin embargo, en algunos casos, se ha logrado demostrar la infección en estos individuos mediante el cultivo viral o mediante la PCR (16).

El seguimiento y estudio de los HEPS, aporta nuevas vías para el mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad, abriendo nuevas aproximaciones terapéuticas e hipótesis para el desarrollo de vacunas.

1.5.1. ANTECEDENTES.

Las observaciones hechas por Clerici y colaboradores indican la existencia en algunas enfermeras que habían estado expuestas al VIH con riesgo de infectarse que aparentemente no habían contraído la enfermedad ya que no presentaban anticuerpos contra el virus ni se pudo detectar la presencia del virus o de sus ácidos nucleicos en la sangre (17).

En estos casos estudiados, las células mononucleares periféricas de estas personas presentaban una fuerte producción de interleucina-2 (IL-2) indicativo de una buena respuesta celular cuando eran estimuladas con péptidos de la envoltura viral. Los autores han realizado estas mismas observaciones en homosexuales seronegativos que han sido expuestos al virus en múltiples ocasiones por prácticas de alto riesgo con parejas seropositivas.

Estudios de Plummer llevados a cabo en una cohorte de 262 trabajadoras sexuales seronegativas de Kenia han demostrado que 29 de ellas permanecían sin infectarse a pesar de haber tenido varios contactos sexuales diarios sin protección durante un periodo de actividad de 9 años. Este fenómeno de resistencia podría estar relacionado con el hecho de poseer alelos AW28 y Bw705 de histocompatibilidad (MHC-1) que están relacionados con la disminución en el riesgo de transmisión del VIH en contraposición con el alelo aW19 que está relacionado con el aumento de riesgo de seroconversión (18).

1.5.2. ALTERNATIVAS PARA EL DIAGNOSTICO DE SERONEGATIVOS PERSISTENTES.

De modo tradicional se considera que un individuo que dé resultados negativos en pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH-1 no se encuentra infectado con el VIH-1. Para el caso de los HEPS las pruebas inmunológicas no permiten el diagnóstico.

Por esta razón se hace necesario demostrar la presencia del virus, la cual se puede evidenciar realizándose aislamiento viral o demostrando la presencia de sus componentes, que pueden ser sus proteínas (determinación de antígenos virales) o su material genómico (ADN proviral integrado en las células infectadas o ARN viral presente en el plasma).

El aislamiento viral, considerado hasta el momento como el estándar de oro de la infección por VIH, alcanza una efectividad cercana al 100%. No obstante, un gran inconveniente de este método es que pocos laboratorios en el mundo lo llevan a cabo y, en general, son laboratorios especializados dedicados a la investigación con instalaciones de alta seguridad biológica; además, por su costo elevado no es una metodología aplicable en un alto número de muestras.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa promete ser uno de los métodos de elección para este tipo de diagnóstico, así como también la hibridación de DNA viral amplificado. Contrariamente a la determinación de antígeno la PCR permite la detección de DNA viral en cualquier etapa de la infección siempre y cuando la estandarización y el control de calidad de su aplicación asegure la validez de los resultados obtenidos (19).

1.5.3. IMPORTANCIA DE LOS SERONEGATIVOS PERSISTENTES

Históricamente, las estrategias para diseñar una vacuna en contra del VIH se han enfocado en la neutralización del virus mediante anticuerpos dirigidos a la envoltura viral. Sin embargo, la envoltura es justamente una de las regiones más variables del genoma viral, lo cual sugiere que deben explorarse métodos alternos a los anticuerpos neutralizantes (20).

En la búsqueda de una vacuna contra el VIH, es necesario preguntarse si algunos humanos son capaces de montar una respuesta inmune lo suficientemente exitosa como para eliminar al virus después de la exposición al mismo. Si esto es lo que ocurre en los HEPS, deben estudiarse los factores inmunológicos y virales que conducen a la presunta eliminación del virus. (21).

1.5.4. FACTORES INMUNOLOGICOS Y VIRALES QUE INDUCEN RESISTENCIA FRENTE AL VIH.

La resistencia y la no progresión hacia SIDA es un concepto heterogéneo. Existen factores inmunes propios del hospedero implicados en producir una respuesta inmune poderosa capaz de eliminar al virus. En otros casos son los factores internos del virus o sus deficiencias genéticas los que contribuyen al desarrollo de cepas virales más o menos susceptibles.

1.5.4.1. FACTORES INMUNOLOGICOS

Diversos factores inductores de una respuesta citotóxica y supresora fuerte se asocian con la resistencia al VIH-1 y con una atenuación de síntomas clínicos desde la primoinfección. A los HEPS no se les detectan anticuerpos en su sangre contra el VIH-1, pero los estudios realizados en ellos reportan que presentan diversas respuestas inmunológicas principalmente a nivel celular.

Dentro del grupo de los HEPS, las trabajadoras sexuales son un grupo interesante para estudiar las consecuencias inmunológicas a la exposición al VIH-1 dada la variedad de prácticas de alto riesgo a una multitud de variantes al VIH-1 sobre un periodo prolongado de tiempo. También porque su riesgo de infección al VIH-1 se puede incrementar por su alta incidencia y por la prevalencia de enfermedades de transmisión sexual.

En las trabajadoras sexuales, los recién nacidos de madres VIH+ y en parejas discordantes se han encontrado actividad citotóxica (CTL's) dirigida a epítomos virales de las proteínas *env*, *gag*, *pol*, *nef* y *tat*, principalmente. Los clones CTL's reconocen al VIH y lisan las células infectadas, siendo así un factor de ataque al virus durante la primoinfección y que tiene implicaciones importantes en el desarrollo posterior de la infección (22).

También dentro de las trabajadoras sexuales, la inmunidad de la mucosa es probablemente una barrera efectiva contra la infección viral. En contraste con trabajadoras sexuales VIH+, una significativa concentración de IgA mucosal contra gp160 fue detectada en secreciones cervicales y vaginales, sugiriéndose un rol importante en la asociación de la inmunidad a través de la mucosa vaginal y cervical y la inmunidad celular específica en contra del VIH, quizás confiriéndosele resistencia al VIH-1 (23,24).

También dentro de los HEPS se han encontrado activación de células auxiliares tipo 1 (Th1) las cuales secretan interferon γ (IFN- γ), que es un antivirico natural y multisupresor, e interleucina-2 (IL-2) ambas asociadas a la resistencia a la infección por el VIH-1, contribuyendo de esa manera a la respuesta celular para eliminar al virus y proveer una protección subsecuente. Esta activación de células Th1 responde a antígenos de la envoltura. Un decremento en la respuesta Th1 daría por resultado la activación de células auxiliares tipo 2 (Th2) las cuales producen interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10) que ayudan a las células B para generar una respuesta vía anticuerpos.

También se ha observado una fuerte producción de IL-2 por la presencia de antígenos de la envoltura en enfermeras que han tenido contacto con sangre o fluidos del paciente VIH+.

Cada uno de estos estudios ha documentado resultados que sugieren una relación entre ciertas respuestas inmunológicas del hospedero y una inmunidad protectora.

(25-28).

1.5.4.2. FACTORES VIRALES

No hay un estudio en los HEPS donde se examine detalladamente el genoma del VIH. En Sydney, Australia, se ha estudiado, una cohorte que presenta resistencia al desarrollo de la enfermedad. Esta formada por un seropositivo que se infectó por transfusión a lo largo de una intervención cardiaca en abril de 1981 y de otros 6 individuos infectados por el mismo inóculo de sangre contaminada. Trece años después todos ellos permanecen seropositivos, pero sin síntomas ni patologías. Los estudios de amplificación por PCR y de secuenciación del gen *nef* procedente de esta cohorte indican que éste es defectuoso y asocian las deleciones de este gen regulador con la falta de patología.

En otro estudio realizado en la Ciudad de México, Gómez et al monitoreó el progreso de la infección en una cohorte formada por 12 varones adultos, encontrándose patrones muy diferentes; entre ellos un individuo de los denominados no progresores a largo plazo. Se estudió en este grupo la región LTR realizándose las secuencias nucleotídicas, encontrándose en el paciente no progresor dos mutaciones puntuales no reportadas con anterioridad, las cuales podrían modificar la estructura terciaria del RNA del virus, lo que podría a su vez interferir en la transcripción. En HEPS no hay un estudio donde se examine detalladamente el genoma del VIH (29).

1.6 JUSTIFICACIÓN

La no progresión clínica en los seronegativos persistentes representan en la actualidad, dentro de la investigación, una de las opciones para la elaboración de una vacuna protectora contra el VIH. Esta condición de resistencia al VIH quizás dependa tanto de características del virus como del hospedero. Sin embargo, su estudio se ha enfocado principalmente en analizar cómo la respuesta inmunológica que presentan los hospederos ha logrado contener la replicación viral o eliminar al virus.

Las características del virus, dentro del grupo de los seronegativos persistentes, no han sido estudiadas para poder determinar la posible participación de un virus defectuoso. La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa está reportada en el área de investigación como un método para poder evidenciar la integración del provirus del VIH a las células de los HEPS, dada la no detección de anticuerpos contra el virus. En este sentido el análisis mediante enzimas de restricción, así como su comparación contra un virus prototipo podría evidenciar algunas deleciones o mutaciones puntuales en el genoma viral que pudieran indicarnos defectos en el VIH-1. Estos defectos podrían repercutir en la seronegatividad persistente del sujeto de estudio. En este estudio se amplificaron las regiones RT y LTR del VIH-1 integrado en células de un paciente seronegativo persistente, para su análisis de restricción comparativo, utilizando un virus prototipo.

2.- OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar los patrones de restricción que se generan al cortar segmentos de un provirus del VIH-1 en un paciente seronegativo persistente y de un provirus prototipo.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Amplificar las regiones LTR y RT del provirus del VIH-1 tanto en células de un paciente seronegativo persistente, así como en células infectadas con el virus prototipo VIH-1 IIIb.
- 2.- Cortar las regiones amplificadas con enzimas de restricción.
- 3.- Comparar los patrones de restricción generados e identificar similitudes y diferencias entre los provirus.

3.- METODOS

3.1 SUJETO DE ESTUDIO

El sujeto de estudio, seronegativo persistente, con clave de paciente **LIGW** es un hombre homosexual con pareja seropositiva al VIH.

A dicho paciente en estudios anteriores y que no forman parte de este proyecto se le tomaron muestras de sangre. Se separaron las células mononucleares periféricas, a las cuales se les practicó extracción de ADN por medio de fenol/cloroformo y precipitándolo con isopropanol/etanol. El ADN extraído fue utilizado para estudios de detección del genoma viral por PCR. El suero proveniente de la sangre fue utilizado para estudios de detección de anticuerpos contra el VIH. Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 3.1.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	RESULTADO
ELISA Genelavia Mix	Negativo
Western Blot	Indeterminado
DETECCIÓN DEL GENOMA VIRAL POR PCR	RESULTADO
Iniciadores SK 462/431 (gag)	Positivo
Iniciadores Gag 3' y 5' (gag, anidado)	Positivo
Iniciadores RT (Pol, anidado)	Positivo

Tabla 3.1 Estudios practicados al paciente LIGW

VIRUS PROTOTIPO

El virus prototipo IIIIB, es el primer Virus de la Inmunodeficiencia Humana aislado y cultivado y posteriormente secuenciado. En este estudio se toma como referencia ingresando la secuencia BHX2.

3.2 AMPLIFICACION DE LOS FRAGMENTOS RT Y LTR.

Se utilizó la técnica de PCR anidado para amplificar los fragmentos RT y LTR a partir del ADN proviral del VIH. Para RT en la primera vuelta se utilizaron los oligonucleótidos RT1 (5' GTTGACTCAGATTGGTTGCAC 3') y RT2 (5' GTATGTCATTGACAGTCCAGC 3') correspondientes a las posiciones 2,519 y 3,321. En la tabla 3.2 se muestra el protocolo que se utilizó para amplificar los fragmentos RT1-RT2.

reactivo	Volumen por cada reacción
Mezcla de dNTP'S	8 µl
Buffer 10X	5 µl
Taq DNA polimerasa	0.3 µl
DNA	4 µl
RT1	1 µl
RT2	1 µl
H ₂ O	30.7 µl
TOTAL	

Tabla 3.2 Protocolo del PCR anidado para amplificar RT

Para la segunda vuelta del PCR, se utilizaron los oligonucleótidos internos RT3 (5' GGATGGCCCAAAGTAAAC 3') y RT4 (5' TATCAGGATGGAGTTCATAAC 3') correspondientes a las posiciones 2,597 y 3,261. EL protocolo de la reacción de PCR de segunda vuelta fue idéntico al de la primera vuelta. La tabla 3.3 muestra en detalle las condiciones de PCR que se programaron con el termociclador automatizado (Perkin-Elmer 2400). Los amplificados, tanto del segmento RT como del segmento LTR, se sometieron a electroforesis, a 100V, en un gel de agarosa al 2%. Posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos:segundos)	Ciclos
1.1	94	2:00	1
2.1	94	0:10	3
2.2	55	0:10	
2.3	72	0:30	
3.1	94	0:10	32
3.2	60	0:10	
3.3	72	0:30	

Tabla 3.3 Condiciones del PCR anidado para amplificar el fragmento RT.

Para la amplificación del fragmento LTR se utilizó la misma técnica de PCR anidado.

Se utilizaron en la primera vuelta los oligonucleótidos LTR1 (5' CACACAAGGCTACTTCCCTGA 3') Y LTR2 (5' GATCTCTAGTTACCAGAGTCA 3') correspondientes a las posiciones 9142 y 9661. Para la segunda vuelta fueron empleados los oligonucleótidos LTR3 (5' CCCTGATTAGCAGAACTACAC 3') y LTR4 (5' GTCACAACAGACGGGCACAC 3') correspondientes a las posiciones 9159 y 9643. El protocolo que se utilizó para amplificar el fragmento LTR es el mismo que se muestra en la tabla 3.2 a excepción de la Taq DNA Polimerasa que se utilizó que fue de 0.2 µl por reacción. Las condiciones de PCR que se programaron se muestran en la tabla 3.4

Etapa	Temperatura (°c)	Tiempo (minutos:segundos)	Ciclos
1.1	94	5:00	1
2.1	94	0:10	35
2.2	55	0:10	
2.3	72	0:30	
3.1	72	5:00	1

Tabla 3.4 Condiciones del PCR anidado para el fragmento LTR

3.3 DIGESTION DE LOS AMPLIFICADOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Al término de las reacciones de PCR se tomaron 10µl de cada amplificado y se sometieron a una reacción con las enzimas de restricción Bstx I, Sca I, Bgl II y Hind III. Cada amplificado, por separado, fue sometido a 2 enzimas de restricción. Se utilizaron 2µl de cada enzima y la reacción se dejó incubando 16 horas en una estufa a 37°C. La tabla 3.5 muestra en detalle las condiciones que se utilizaron para las reacciones con enzimas de restricción.

RT		
Reactivo	Volúmen por reacción Bstx I	Volúmen por reacción SCA I
DNA	10µl	10µl
H ₂ Odd	12µl	12µl
BSA 10x	3µl	3µl
Buffer 10x	3µl	3µl
Enzima	2µl	2µl
	30µl Total	30µl Total
LTR		
Reactivo	Volúmen por reacción BGL II	Volúmen por reacción HIND III
DNA	10µl	10µl
H ₂ Odd	12µl	12µl
BSA 10x	3µl	3µl
Buffer 10x	3µl	3µl
Enzima	2µl	2µl
	30µl Total	30µl Total

TABLA 3.5 CONDICIONES PARA LAS REACCIONES CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Posteriormente los amplificadores digeridos se sometieron a electroforesis (100 V), en un gel de agarosa al 2%. Fueron teñidos con Bromuro de Etidio por 5 minutos y visualizados con luz UV.

3.4 PATRONES DE RESTRICCIÓN

Utilizando el programa DNAMAN (Lynnon Biosoft 1994-1997) e ingresando la secuencia prototipo HXB2 se analizó el sitio en el cual se pegarían los oligonucleótidos correspondientes a los segmentos RT y LTR, se determinó también el tamaño de los amplificadores. Utilizando el mismo programa se generaron patrones de restricción teóricos para las enzimas BgIII, Hind III, Bstx I y Sca I, prediciendo los sitios de corte en la secuencia prototipo HXB2, para así también poder determinar el tamaño de los fragmentos que se obtendrían por las digestiones con las enzimas de restricción.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS

En este análisis se amplificaron por medio de PCR las regiones RT y LTR del VIH integrado en células de un paciente seronegativo persistente y como referencia un virus prototipo integrado en células de cultivo. Los amplificados se sometieron a digestión con enzimas de restricción para determinar similitudes y diferencias en los patrones de restricción, tal y como se describe en la metodología.

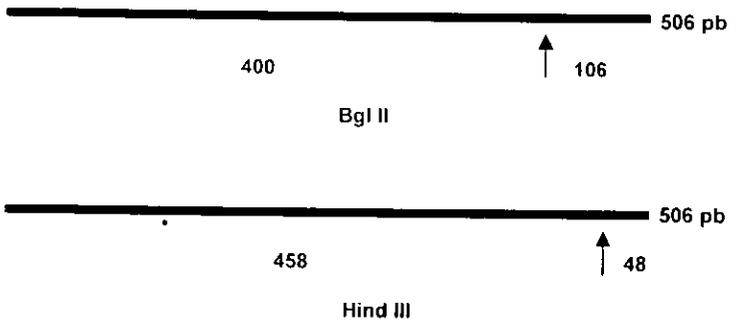
Los patrones de restricción obtenidos experimentalmente para el caso del virus prototipo concuerdan con los patrones esperados teóricamente. Para el caso del paciente seronegativo persistente los patrones esperados y obtenidos difieren en algunos casos.

Los productos obtenidos experimentalmente difieren para el segmento LTR con la enzima Bgl II y para el segmento RT con la enzima BSTX I, indicándonos que el sitio de corte se encuentra posiblemente alterado debido a deleciones o inserciones puntuales. La tabla 3.5 muestra los patrones de restricción generados en el paciente seronegativo persistente y en el virus prototipo IIb.

ENZIMA	SERONEGATIVO PERSISTENTE		VIRUS PROTOTIPO	
	LTR	RT	LTR	RT
Bgl II	<400/>106		400/106	
Hind III	458/48		458/48	
BSTX I		408/>246		408/228
Sca I		157/119/39		157/119/391

Tabla 3.5 productos obtenidos en el paciente seronegativos persistente y en el virus prototipo IIb

A)



B)

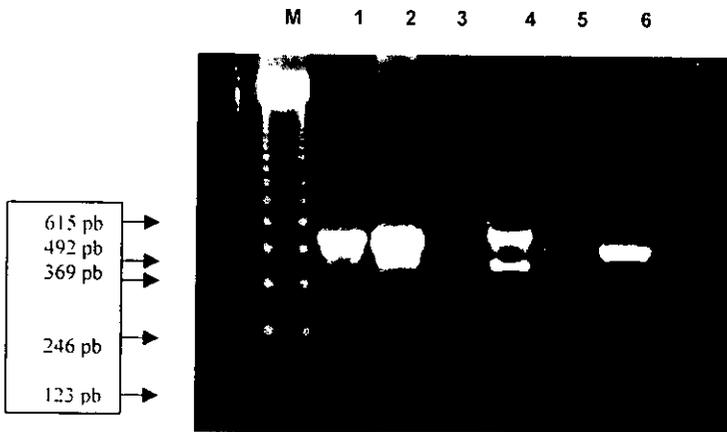
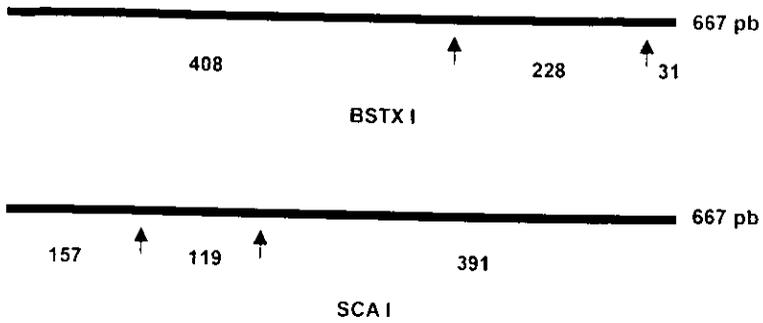


Fig. 5. A) Patrón de restricción esperado para el segmento LTR del virus prototipo III b. B) Patrón obtenido experimentalmente. M (Marcador de Peso Molecular). Carriles 1 y 2 amplificados sin digerir. Carriles 1,3 y 5 Virus prototipo. Carriles 2,4 y 6 Seronegativo Persistente. 3 y 4 productos de digestión con Bgl II. 5 y 6 productos de digestión con Hind III. En el carril 4 se observa la banda correspondiente al amplificado original debido a digestión imparcial.

A)



B)

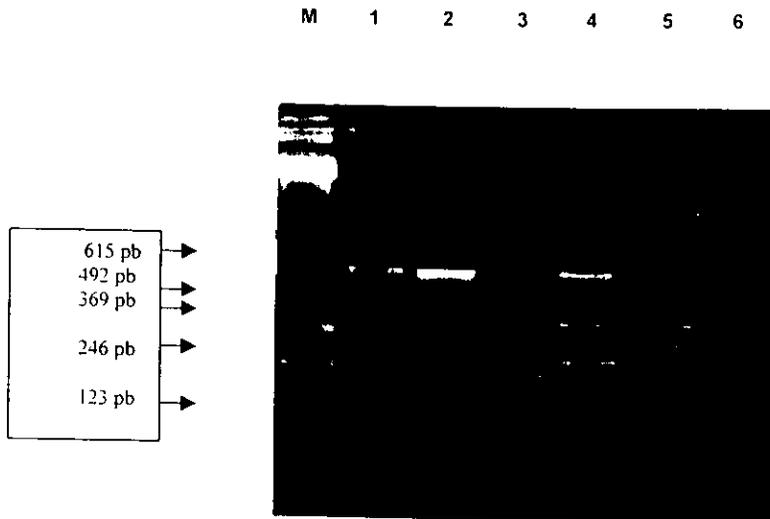


Fig. 6. A) patrón de restricción esperado para el segmento RT. B) Patrón obtenido experimentalmente M (Marcador de Peso molécula). Carriles 1 y 2 amplificados sin digerir. Carriles 1, 3 y 5 Virus Prototipo Carriles 2, 4 y 6 Seronegativo Persistente. 3 y 4 productos de digestión con BSTX I. 5 y 6 productos de digestión con SCA I. En el carril 4 se observa la banda correspondiente al amplificado original debido a digestión imparcial

DISCUSION

Para los amplificadores correspondientes al segmento LTR (fig. 5b carriles 1 y 2) se observa una similitud entre el amplificado del paciente seronegativo persistente y el virus prototipo, por lo que se puede inferir que no hay deleciones o inserciones grandes en el genoma proviral del paciente seronegativo persistente. El corte con la enzima Bgl II (carriles 3 y 4, fig. 5b) muestra resultados diferentes entre el virus prototipo (carril 3) que presenta el patrón esperado y el patrón del seronegativo persistente (carril 4) que indica una alteración en el sitio de corte debido quizás a inserciones o mutaciones puntuales. Además se observó una digestión incompleta (fig. 5b carril 4) así como dos fragmentos, uno por debajo de los 400 pb y otro por arriba de los 106 pb. Para el caso del virus prototipo los resultados esperados y los obtenidos son similares. Para la reacción con la enzima Hind III, esta tendría un sitio de corte esperando encontrar dos fragmentos: uno de 458 pb y otro de 48 pb (Fig.5a). En los resultados obtenidos(carriles 5 y 6, fig. 5b) se observa en el gel el fragmento de 458 pb, tanto en el paciente como en el virus prototipo. El fragmento de 48 no se observa debido al bajo peso molecular. Es probable que las funciones correspondientes a este segmento (LTR) que son la transcripción reversa, la integración y la transcripción del ADN viral se conservan y no se ven alteradas.

Para el segmento RT/POL los amplificadores del virus prototipo y del paciente seronegativo persistente no muestran deleciones significativas dada la similitud que presentan (carriles 1 y 2 fig. 6b). El patrón de digestión con BSTXI (Fig.6a) nos muestra dos sitios de corte (408 pb y 636 pb) obteniéndose tres fragmentos: 408 pb, 228 pb y 31 pb. Para el caso del virus prototipo (fig. 6b carril 3,) se observan los fragmentos de 408 pb y el de 228 pb, y no se visualiza el de 31 pb.

Sin embargo en los cortes obtenidos en el paciente seronegativo persistente (carril 4, fig. 6b) se observa el amplificado sin cortar y dos fragmentos, el de 408 pb y otro que está arriba de la marca de 246 pb.

La reacción con la enzima Sca I (Fig 6b) nos muestra dos sitios de corte (Fig. 6a) obteniéndose 3 fragmentos: 157, 119 y 391. En los cortes obtenidos experimentalmente, se observa similitud tanto para el virus prototipo como para el paciente seronegativo persistente.

Este trabajo aborda las características del patógeno y no del hospedero. Los patrones de restricción obtenidos experimentalmente muestran, de manera no concluyente, alteraciones en los sitios de corte para el caso del paciente seronegativo persistente en la región LTR en la digestión con las enzimas Bgl II y en la región RT de POL con la enzima BSTX I.

Existen limitaciones inherentes al diseño de este estudio, el cual se realizó a un sólo paciente lo cual no es representativo como lo pudiera ser una cohorte con más sujetos. Por lo que los resultados aquí mostrados no son generalizables. Sin embargo, este estudio concuerda con reportes previos que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa como una prueba para identificar al seronegativo persistente. Así también, el estatus inmunológico del paciente estudiado es similar a los casos reportados en la literatura.

Existen individuos que han sido expuestos al VIH-1, algunos en múltiples ocasiones, pero no seroconvierten o no muestran signos de infección, respondiendo su sistema inmune de una manera poco convencional tanto a nivel celular como a nivel humoral.

Entre los estudios sobre seronegativos persistentes se incluyen respuestas celulares específicas: proliferación de células T, producción de interleucina-2 (IL-2) inducida por péptidos del VIH-1 y la generación de una respuesta citotóxica mediada por células T. Se reporta también, en algunos casos, la presencia de auto anticuerpos anti-CD4, los cuales inhiben la formación de sincicios (30).

Los seronegativos persistentes se han reportado en los siguientes grupos de personas: recién nacidos de madres infectadas, usuarios de drogas intravenosas que comparten jeringas, homosexuales, trabajadoras de la salud que han estado expuestas al VIH-1, trabajadoras sexuales y en parejas discordantes, en las cuales una persona está infectada y la otra no. El periodo en el cual permanecen seronegativos es muy variable, reportándose periodos prolongados hasta por 36 meses en hombres homosexuales con PCR positivo. El mismo tiempo se reporta para las trabajadoras sexuales, quienes presentan resultados de PCR negativos para el VIH-1, pero presentan una respuesta específica en la mucosa vaginal a través de anticuerpos IgA contra la gp160 del VIH-1.

Los estudios en seronegativos persistentes se han enfocado en el rol que juega la inmunidad natural en la resistencia al VIH-1; algunos utilizan la reacción en cadena de la polimerasa para identificar al provirus del VIH-1 y definir así al seronegativo persistente. También utilizan la PCR para poder determinar el tiempo que se da antes de la seroconversión. Pero no se ha reportado un estudio a detalle, por lo que los análisis sobre aspectos moleculares para determinar la posible participación de virus defectuosos no se han realizado (31-34).

En la actualidad el diagnóstico para la infección por el VIH-1 está basado en la presencia de anticuerpos contra las proteínas virales por medio de un prueba de ELISA y confirmada posteriormente por Western Blot. El empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar la presencia del VIH-1 en los HEPS es importante, ya que hay que resaltar que un resultado negativo empleando únicamente las pruebas de serología no es suficiente para descartar el que una persona pueda estar infectada por el VIH. Esto es importante, ya que un resultado equivocado evitaría una intervención terapéutica oportuna.

La importancia que representan los seronegativos persistentes radica en descifrar cómo su inmunidad natural ha logrado contener al virus, lo cual ayudaría al diseño de una vacuna. También es importante determinar si estos pacientes fueron expuestos a virus defectuosos o a dosis no infecciosas, resultando en la activación de células T sensibles al VIH (35,36).

5.- CONCLUSIONES

Se lograron amplificar las regiones LTR y RT del provirus del VIH-1 en células de un paciente seronegativo persistente y en un virus prototipo integrado en células de cultivo.

Se generaron digestiones parciales en algunos amplificadores del Paciente Seronegativo Persistente..

Se lograron establecer similitudes y diferencias en los patrones de restricción. Aún cuando indirectamente, para el caso de las diferencias, se puede inferir qué funciones se afectan, un análisis de secuenciación podría proporcionar mayor información sobre mutaciones puntuales.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, puede ser utilizada como una prueba directa para la detección de la infección del VIH-1, dentro del área de investigación, independientemente de las pruebas serológicas

6.- REFERENCIAS

- 1.- Gallo, R. El primer retrovirus humano. *Investigación y ciencia*. 1987, 125: 44-55
- 2.- Gao, F: Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. 1999. *Nature*, 391: 436-441.
- 3.- Zhu, t. An African HIV-1 Sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. 1998. *Nature* 391: 594-597.
- 4.- Levy, J. HIV Patogénesis. 1992
- 5.- Valadez, N. Soler, C. Comparación inmunológica y molecular entre los virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2. *BEB* 14: (2):25-32.
- 6.- Feng, Y. HIV-1 Entry Cofactor: Funtional cDNA Cloning of Seven-Transmembrane G protein-Coupled Receptor. 1996. *Science* 272: 872-877.
- 7.- O'Brien, J. Genes que oponen resistencia al SIDA.. *Investigación y Ciencia*. 1997. 255: 6-15
- 8.- One in One meets two. *Nature* 1996,. 384: 117-118.
- 9.- Mullis, K. B: Specific Synthesis of DNA In Vitro via A Polymerase Catalyzed Chain Reacción. 1987. *Methods in Enzymology*. 155: 335-350.
- 10.- Saiki, R.H. and Mullis, K.B. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. 1988. *Science* 239: 487-491.
- 11.- Erlich, H.A. Specific DNA amplification. 1988. *Nature*. 331: 461-462.
- 12.- Erlich, H.A. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. 1991. *Science* 252: 1643-1651.
- 13.- Saiki, R.H. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. 1985. *Science* 230: 1350-1354.
- 14.- Li, H. Amplification and analysis of DNA Sequences in single sperm and diploid cells. 1988 *Nature* 335: 414-417.

- 15.- Haseltine, W.A. Silent of infections. 1989, The New England Journal of Medicine 320(22):1487-1489.
- 16.- Zuche, M. Identificación of HIV-Infected Seronegative individuals by a direct diagnostic test based in hibridisatin to amplified viral DNA. 1988, Lancet 418-421. Agosto 20.
- 17.- Clerice, M. HIV-Specific T-Helpe Activity in Seronegative Health Care Worker Exposed to Contaminated Blood. 1994, JAMA. Vol 271 # 1 42-46
- 18.- Fowke, K. And Plumer, F. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. 1996 Lancet; 348: 1347-1351.
- 19.- Soler, C y Basualdo, S.M.C. Un problema de diagnóstico perinatal: pacientes serológicamente negativos pero infectados por el VIH. 1995. Salud Pública de México. 37 (6): 515-519.
- 20.- Soler, C.C. Vacunas Para el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
- 21.- Rowland-Jones, S. Immune responses in HIV-1exposed seronegatives: Have they repelled the virus?. 1995 Current Opinion in Immunology; 7: 448-455.
- 22.- Beyrer, C. Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 Higly Exposed Persistently Seronegative Female Sex Workers in Northern Thailand .1999. J. of Infectious Diseases. 179:59-67.
- 23.- Mazzoli et al. HIV-specific mucosal an cellular immunity in HIV-seronegative individuals. 1997. Nature Medicine. 3(11):11250-1257.
- 24.- Mascola, R.J. HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. AIDS, 2000, 14 (suppl. 3):5167-5174.

- 25.- Langlade-Demogen, P. Human Immunodeficiency Virus (HIV) nef-specific Cytotoxic Lymphocytes in Noninfected Heterosexual Contact of HIV-infected Patients. 1994, *J.Clin. Invest.*; 93: 1293-1297.
- 26.- Herr W. Quantificación of CD8+ T Lymphocytes Responsive to Human Immunodeficiency Virus (HIV) Peptide Antigens in HIV-infected Patients and Seronegative Persons at High Risk For Recent HIV Exposure. 1998. *J. Of Infectious Diseases*; 178:260-265.
- 27.- Bernard, N. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific Cytotoxic T lymphocyte Activity in HIV-Exposed Seronegative Persons. 1999 *J. Of Infectious Diseases*; 179:538-547.
- 28.- Clerice, M: Cell-Mediated Immune Response to Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 in Seronegative Homosexual Men with recent Sexual Exposure to HIV-1. 1992, *J. Of Infectious Diseases*; 165: 1012-1019.
- 29.- Gómez-Román, V. R. et al. Nef/Long Terminal Repeat Quasispecies from HIV Type 1-Infected Mexican Patients with Different Progression Patterns and Their Pathogenesis in hu-PBL-SCID mice. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2000, 16(5): 441-452.
- 30.- Burastero, S.E. Autoantibodies to CD4 in HIV Type 1- Exposed Seronegative Individuals.. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1996. 12(4): 273-280.
- 31.- Ranki, A. Long Latency Precedes Overt Seroconversion in sexually Transmitted Human-Immunodeficiency Virus Infection. *Lancet*. 1987, 12:589-593.
- 32.- Imagawa, T.D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Homosexual Men Who Remain Seronegative for Prolonged Periods. *Science*. 1989, 320(22): 1458-1462.
- 33.- Clerice, M. T-Cell Proliferation to Subinfectious SIV Correlates With Lack of Infection After Challenge of Macaques. *AIDS*, 1994, 8: 1391-1395.

- 34.- Haseltine, W.A. Silent of Infections. The New England Journal of Medicine. 1989, 320(22): 1487-1489.
- 35.- Salk,k. Clerice,M. A Strategy for Prophylactic Vaccination Against HIV. 1993. 260: 1270-1272.
- 36.- Kaul, R. CD8 Lymphocytes Respond to Different HIV Epitopes in Seronegative and Infected Subjec. Journal of Clinical Investigation. 2001. 107(10): 1303-1310.