

28  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LOS VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA ADQUIRIDA TIPO 1 (VIH-1) Y TIPO 2 (VIH-2) EN LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I (MHC I), EN CELULAS MONONUCLEARES PERIFERICAS DE LA SANGRE (PBMC)”

T E S I S

DUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

GABRIELA CARAVEO PISO

DIRECTOR DE TESIS  
M. en C. CARMEN SOLER CLAUDE

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

1 9 9 8

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE SOLAR

TESIS CON  
FALTA DE CONTEN

26 2933



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. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto de los virus de inmunodeficiencia humana adquirida tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2) en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MIC I), en las células mononucleares periféricas de la sangre (PMNC).  
realizado por Gabriela Caraveo Pizo

con número de cuenta 9350448-3, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

M. en C. Carmen Soler Claudín

*Carmen Soler*

Propietario

Dr. Rafael Saavedra Durán

*Rafael Saavedra*

Propietario

Dr. Carlos Rosales Ledezma

*Carlos Rosales Ledezma*

Suplente

Dr. Beatriz Gómez García

*Beatriz Gómez-García*

Suplente

Dr. Enrique Ortega Soto

*Enrique Ortega Soto*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

*Edna Maria Suarez Diaz*

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

Como bien dijo alguna vez John Lennon : " life is what happens to you while you  
are busy making other plans "

Son tres las personas a las que les dedico esta tesis; a mi madre por su incondicional apoyo tanto en las risas como en las lágrimas, y sobre todo, por la dura tarea de lidiar conmigo todos los días, te quiero mucho. A mi padre, por sus grandes consejos, entre ellos el transmitirme la necesidad de comerme al mundo y finalmente a Pablo, porque con él descubrí que puedo transformar las semillitas de una papaya en estrellas fugaces.

Quiero expresar mi mas profundo agradecimiento y cariño a Carmen Soler, por haber confiado en mí y por brindarme todo el apoyo necesario para la realización de esta tesis, sin el cual no hubiera sido posible, gracias otra vez.

A la Dra. Phyllis Kanki en Boston también le estoy muy agradecida, entre otras cosas, por haberme dado la oportunidad de probar mis "tochuras" en su laboratorio.

De la gente de Boston que técnicamente me apoyaron mucho, a quienes agradezco infinitamente su ayuda está Efi, Mohammed, Yourgen Walter, Jean Louis Sankalé y por supuesto mis amigos entrañables Catarina y Stephen con quienes compartí tantas chocoaventuras.

A toda la gente que de alguna u otra forma hicieron posible mi estancia en Boston, entre ellos por supuesto al Prof. Emerito Herman Eisen, la Fundación UNAM, Dr. Alfonso Torre Blanco, Victor Valdés, Alicia Negrón, Manuel Jesús León Cazares y Ruben Barocio.

A todos mis cuates de corazón (ustedes saben quienes son, así que sientanse dedicados), pero en especial a Isabel, por sus porras que son siempre un aliciente; y a Gabichi, quien además de su apoyo, me ayudó a descubrir a la estadística. Y bueno, no podía faltar Fidel, que si bien no tuvo nada que ver con el desarrollo de esta tesis, si le debo mis lágrimas y sonrisas de toda la carrera y como consecuencia, la gran telenovela que espero algún día patrocinemos, nos haríamos millonarios.

A mi amiga Paty del laboratorio por su gran paciencia conmigo y sus porras.

Por último y no por ello menos importante, a mi guerito Chris "el dutch", quien además de darme su apoyo en lo académico, me hizo descubrir todo un mundo.

## INDICE

<i>INTRODUCCION</i> .....	1
a) Vamos adentrándonos.....	1
b) Inmunidad celular.....	1
c) ¿Qué son las moléculas MHC clase I ?.....	6
d) Citometria de flujo.....	9
e) ¿Qué es el VIH ?.....	12
f) Diferencias entre VIH-1 y VIH-2 .....	16
g) Respuesta inmune celular en individuos infectados con VIH-1.....	20
h) VIH y MHC.....	21
<i>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</i> .....	22
<i>METODOLOGIA</i> .....	23
<i>RESULTADOS</i> .....	26
<i>DISCUSION</i> .....	60
<i>CONCLUSIONES</i> .....	67
<i>REFERENCIAS</i> .....	68

## INTRODUCCION

### a) Vamos adentrándonos

Una de las características más distintivas del sistema inmune de los vertebrados es su habilidad para reconocer una enorme cantidad de moléculas orgánicas llamadas antígenos, y así poder distinguir entre lo no propio al animal en cuestión y lo propio. Esta propiedad se debe a la presencia de receptores para esos antígenos en células llamadas linfocitos, los cuales constituyen alrededor del 5% del total de las células corporales. Los receptores presentes en las dos clases mayores de linfocitos, células B y T, son similares en cuanto a su estructura, sin embargo difieren enormemente en cuanto al tipo de antígeno que reconocen, repercutiendo de manera importante en su función. Los antígenos que son reconocidos por los anticuerpos, moléculas proteicas producidos por las células B, abarcan desde proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos hasta algunos fragmentos pequeños de moléculas orgánicas. En cambio, el TCR, receptor de las células T, normalmente reconoce y por lo tanto sólo responde, a complejos formados por péptidos pequeños y un grupo de proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (moléculas MHC) (1).

### b) Inmunidad celular

La respuesta inmune generada por las células B ante la presencia de un antígeno se conoce como respuesta humoral, ya que involucra la producción de anticuerpos, los cuales se encuentran en la circulación. En cambio la respuesta inmune dependiente de las células T antígeno-específicas y de otros tipos de

células no específicas del sistema inmune como los macrófagos, se conoce como respuesta inmune celular, ya que involucra la destrucción del patógeno por medio de la interacción directa con éstas células, las cuales posteriormente producen otro tipo de proteínas, entre ellas las proteínas solubles llamadas citocinas (2).

Es precisamente la inmunidad celular la que nos interesa en este estudio y de la que hablaré en seguida.

El proceso de maduración de las células T se lleva a cabo en un órgano linfóide conocido como timo. Ahí, las células T indiferenciadas terminan su desarrollo para formar dos grupos celulares de acuerdo a la presencia de los receptores CD4 y CD8: células T CD4+ CD8- y células T CD8+ CD4-. Una vez que las células T se han desarrollado en el timo, entran en una constante recirculación entre la sangre y los órganos linfáticos periféricos hasta el momento en el que se "topan" con un antígeno. Para que éstas células todavía "vírgenes" puedan tener una respuesta inmune adaptativa, tienen que ser estimuladas por el antígeno para que así proliferen y se diferencien en células efectoras capaces de remover a los patógenos.

Existen dos señales principales que activan a una célula T para que adquiera su actividad efectora (3). Una de ellas es la proporcionada por la interacción del complejo péptido antigénico-molécula MHC que se encuentra en la célula presentadora, con el receptor de las células T (complejo TCR-CD3) y la proteína membranar CD4 o CD8 según sea el caso en el linfocito T; y la segunda señal, considerada como coestimuladora, es la proporcionada por la interacción de la glicoproteína B7 que se encuentra en la célula presentadora y la proteína CD28 de las células T. Existen otras moléculas involucradas que ayudan a que se establezcan estos complejos, como es el caso de las moléculas de adhesión. Estas moléculas son principalmente de la familia de las integrinas y de la superfamilia de las inmunoglobulinas: LFA-1, CD2 e ICAM-3 en la célula T e ICAM-1, ICAM-2, LFA-1 y LFA-3 en la célula presentadora (Fig.1). Las células presentadoras, es decir las células capaces de expresar las moléculas B7 y los complejos MHC-

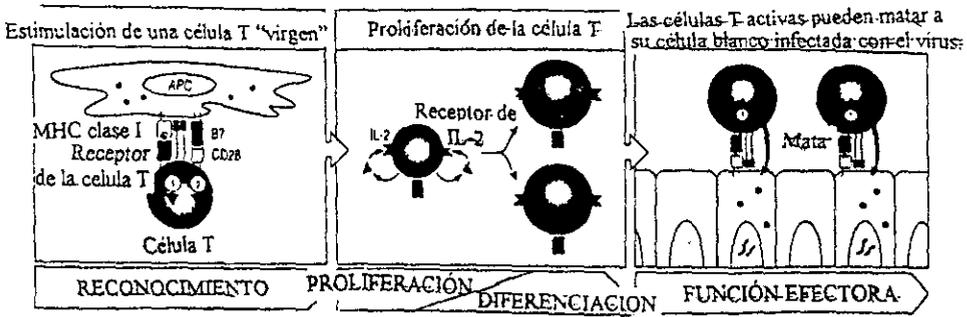


Fig. 1. Esquema que muestra el proceso de expansión clonal de una célula T desde su activación hasta la función efectora.

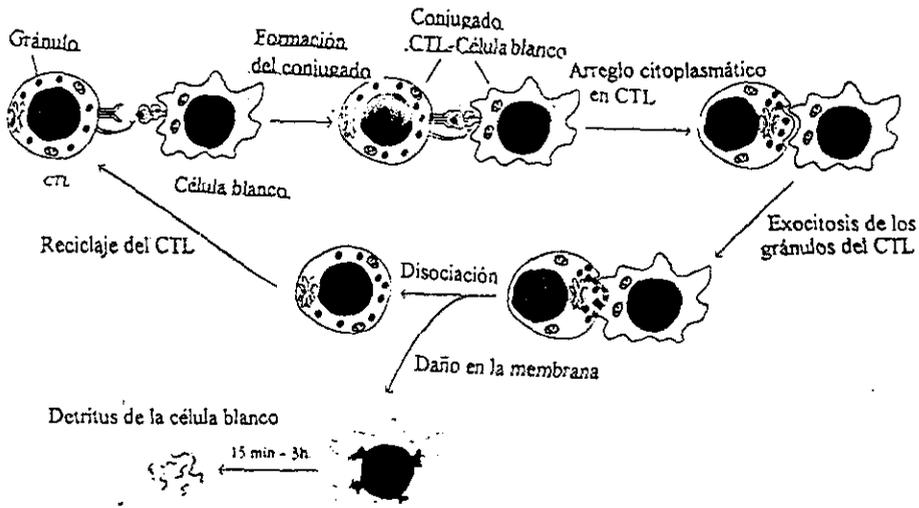


Fig.2 Esquema que muestra las etapas de citotoxicidad mediada por CTL en las células blanco.

péptido para presentar los péptidos antigénicos son las células dendríticas, macrófagos y células B.

La importancia de las moléculas involucradas en el proceso de señalización es tal, que la ausencia de alguna de ellas además de impedir la activación de las células T como ya se había mencionado, puede llevar incluso, a un estado anérgico de las células T (lo que ocurre cuando el receptor de una célula T entra en contacto con el complejo péptido-MHC sin tener la segunda señal proporcionada por las moléculas coestimuladoras) (4).

Se sabe que uno de los mecanismos de acción inducido por este tipo de señales es la regulación de la expresión de factores como la interleucina 2 (IL-2), la cual fomenta la proliferación, así como la diferenciación de las células T hacia efectoras (5). Así, cuando se dan ambos tipos de señales, se producen una serie de factores de transcripción entre los cuales están NF-AT, AP-1 y NF- $\kappa$ b. NF-AT se une a la región del promotor del gen de IL-2 para que se active la transcripción del mismo. Por efecto de la señal co-estimuladora se estabilizan los mRNA de esta citocina que por lo general tienden a ser muy inestables en su región 3' (6). Esto genera un incremento en la producción de IL-2 de hasta 100 veces. Por otro lado, la señal co-estimuladora promueve la síntesis de la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-2, lo cual incrementa de manera considerable su afinidad hacia IL-2 (7).

Por su funcionalidad, las células efectoras se dividen en dos categorías principales: **Células cooperadoras y Células T citotóxicas**. La inducción hacia una u otra categoría está determinada por el tipo de péptidos generados en la célula presentadora (lo cual es un reflejo directo del tipo de patógeno). Aquellos péptidos antigénicos derivados de patógenos que se multiplican en vesículas intracelulares, o aquellos péptidos derivados de la ingestión de bacterias extracelulares y toxinas se unen a moléculas MHC Clase II y son detectados por células cooperadoras o lo que es lo mismo, células T CD4 + (2). A su vez, las células cooperadoras se clasifican en dos grupos: Th1 y Th2. Esta clasificación

esta basada en el tipo de citocinas que estas producen y consecuentemente en el tipo de respuesta inmune que generan.

Las células Th1 producen citocinas como : IL-2, IF  $\gamma$  y TNF- $\beta$ , las cuales promueven la activación de los macrófagos, elementos primordiales dentro de la respuesta inmune celular. La activación de las propiedades microbicidas de los macrófagos son las que inducen a las células B a secretar anticuerpos IgG efectivos en la opsonización de patógenos extracelulares.

Las células cooperadoras Th2 en cambio, secretan interleucinas tales como IL-4 e IL-5 que actúan directamente en las células B promoviendo la secreción de anticuerpos tales como IgM, los cuales sirven de estímulo para la producción de diferentes isotipos de Ig como IgA , IgE, así como anticuerpos neutralizantes o subtipos de IgG capaces de opsonizar (8,9).

**Las células T citotóxicas**, correspondientes a la segunda categoría de células efectoras, son generalmente células T CD8+ (aunque se ha visto que ciertas células T CD4+ pueden presentar actividad citotóxica también) (11), que como lo indica su nombre, son capaces de matar células. Esto lo hacen gracias al reconocimiento de los complejos formados por los péptidos derivados de los patógenos que se multiplican en el citoplasma de la célula y las moléculas MHC clase I de la célula infectada (2).

Una vez que el linfocito T CD8+ ha reconocido a la célula infectada, el principal mecanismo que usa para matar a su blanco es mediante la liberación, dependiente de calcio, del contenido de los gránulos líticos . Estos gránulos son lisosomas que contienen al menos dos clases de citotoxinas que se encuentran en su forma inactiva cuando son almacenadas. Una de ellas es la perforina, proteína que se polimeriza formando poros en la membrana de la célula blanco; y la otra clase, comprende al menos tres clases de proteasas llamadas granzimas. Una vez formado el poro por la perforina, las granzimas penetran a la célula blanco, activando una cascada de enzimas involucradas en eventos de apoptosis; también puede ocurrir que se active la vía apoptótica desde la

superficie celular mediante el ligando de Fas (2). Posteriormente, las células que llevan a cabo una muerte celular programada, son fagocitadas rápidamente por células fagocíticas que se encuentren alrededor (Fig.2).

Algunos linfocitos T CD8 +, además de la capacidad para matar a su célula blanco, pueden liberar citocinas tales como IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  y TNF  $\beta$ . El IFN  $\gamma$  por ejemplo, actúa directamente de las siguientes formas: inhibiendo la replicación viral, induciendo a la expresión de moléculas MHC clase I, reduciendo la concentración de triptofano intracelular, "matando de hambre " a parásitos intracelulares, y activando macrófagos ya sea para que estos actúen como células presentadoras o bien como células efectoras (12).

Una vez que el antígeno ha sido presentado a las células T vírgenes por las correspondientes células presentadoras, se produce una respuesta inmune primaria, así como también se genera una respuesta inmunológica de memoria que provee protección para infecciones subsecuentes con el mismo patógeno (2).

c) ¿Qué son las moléculas MHC clase I ?

Las llamadas moléculas MHC son glicoproteínas integrales de membrana, cuya función es presentar péptidos a los linfocitos T para que éstos puedan detectar la presencia de un antígeno en el cuerpo y así eliminarlo (2).

Existen dos tipos de moléculas MHC, las moléculas MHC clase I y las MHC clase II. En cuanto a su estructura, ambas moléculas son similares ya que tienen dominios extracelulares que forman un surco, el cual presenta a los fragmentos peptídicos durante la síntesis y ensamble de las moléculas MHC dentro de la célula; sin embargo, las diferencias más importantes entre ambas, radican en la fuente de la cual provienen los péptidos. El origen de los péptidos de unión a las moléculas MHC clase I es citosólico (provenientes de la vía endógena), mientras que el origen de los péptidos de unión a las moléculas MHC clase II son extracelulares y de proteínas de membrana (provenientes de la vía exógena) (1).

Las moléculas MHC clase I se encuentran presentes en todas las células nucleadas. Están formadas por dos cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente: una cadena grande (45 KDa)  $\alpha$ , formada por tres dominios ( $\alpha$  1,  $\alpha$  2 y  $\alpha$  3, éste último contiene la parte transmembranal que la ancla a la membrana) y una cadena pequeña  $\beta$ 2m formada por un solo dominio (Fig.3). La cadena  $\alpha$  está codificada por los genes A, B y C del complejo mayor de histocompatibilidad localizados en el cromosoma 6; sin embargo,  $\beta$ 2m, la cadena ligera (12KDa), está codificada por otros genes localizados en un cromosoma diferente. La asociación de ambas cadenas junto con el péptido, es indispensable para la expresión de moléculas MHC clase I en la superficie celular (2).

Los péptidos que presentan las moléculas MHC Clase I son aquellos provenientes de virus y algunas bacterias e incluso protozoarios como *Plasmodium*. A grandes rasgos, una vez en el citoplasma, las proteínas antigénicas son conducidas hacia un complejo multicatalítico llamado proteosoma. Debido a su actividad de proteasa, el proteosoma degrada a las proteínas para que así los péptidos generados sean translocados mediante una proteína llamada TAP (heterodímero formado por las cadenas TAP 1 y TAP 2) hacia el retículo endoplasmático. Cuando el péptido se une a la molécula MHC clase I, existe un cambio de conformación tal en ésta última, que todas las chaperoninas previamente asociadas a éstas así como la misma proteína TAP, liberan al complejo MHC clase I-péptido, para que éste sea exportado hacia la superficie celular. Esta vía citosólica es conocida como vía endógena (2) (Fig.4).

La longitud de los péptidos que presentan es generalmente de 8-9 aminoácidos, cuyos extremos amino y carboxilo quedan "ocultos" en el surco de la molécula MHC clase I. Existen puntos críticos de unión entre el péptido y la molécula MHC clase I. En el péptido estos puntos críticos reciben el nombre de aminoácidos de anclaje, los cuales generalmente están constituidos por aminoácidos aromáticos como fenilalanina localizados en la posición 2, y

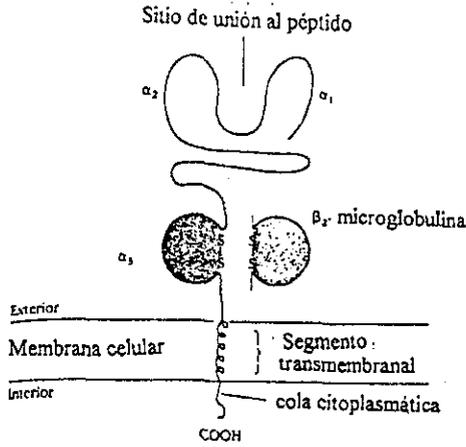


Fig. 3. Estructura de la molécula MHC clase I.

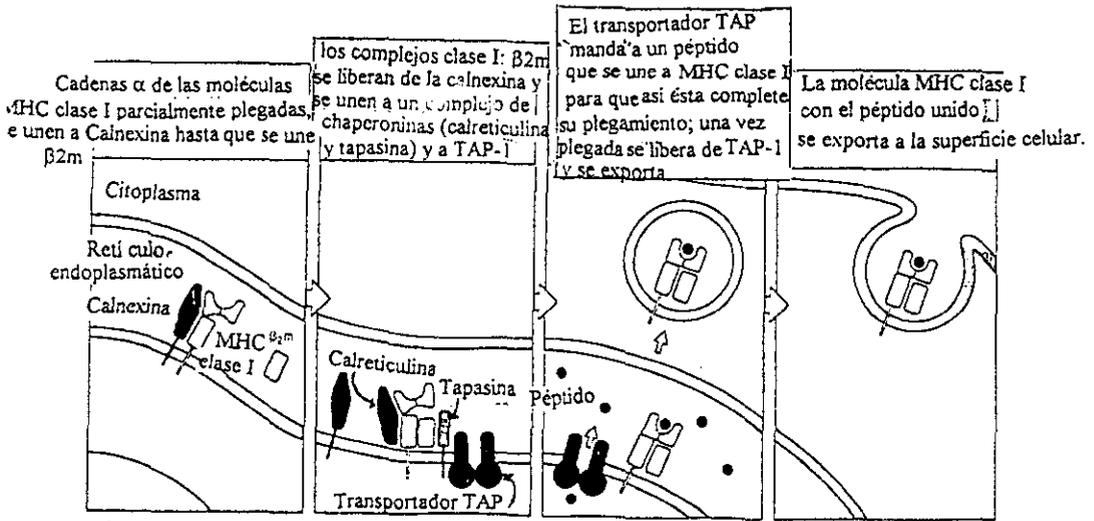


Fig. 4. Procesamiento de péptidos por la ruta de las moléculas MHC clase I.

aminoácidos hidrofóbicos tales como valina, leucina o isoleucina localizados en la posición 9.

En la molécula MHC clase I los puntos críticos son conocidos como "motivos" (2). Esto es importante en el sentido de que la presencia de estos "motivos" determinará la afinidad de un péptido por el otro, para así ayudar a la estabilización de estos complejos, y por lo tanto a una eficiente respuesta por parte del linfocito T (1).

Ahora bien, la abundancia de complejos MHC clase I-péptido, así como la estabilidad de éstos complejos (definida en gran parte por la secuencia peptídica), son determinantes en la intensidad de la respuesta de la célula T madura (1).

Es importante señalar que la abundancia de los complejos MHC clase I-péptido depende de la cantidad de moléculas MHC clase I expresadas, las cuales a su vez dependen tanto del tipo celular como de la producción de ciertas citocinas. Así por ejemplo, las células B del sistema inmune, generalmente expresan una mayor cantidad de éstas moléculas en comparación con las células del hígado. Por otro lado, en cuanto a las citocinas, se sabe que interferón  $\gamma$  y así como TNF  $\alpha$  estimulan la expresión de estas moléculas (2).

#### d) Citometría de flujo

El citómetro de flujo o FACS (del inglés "Fluorescence activated cell sorter") es un instrumento comúnmente utilizado en inmunología ya que ayuda a analizar con base a la intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo marcado, subpoblaciones de células las cuales generalmente son linfocitos. A grandes rasgos, una población compuesta de varios tipos celulares es marcada con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo y específico para la población de células que deseamos separar. Una vez marcadas las células, se colocan dentro de la

cámara del citómetro. Las células son succionadas, gracias a un vibrador a base de laser que genera microgotas, cada una de ellas conteniendo una sola célula. Las gotas pasan a través de un rayo laser que excita al fluorocromo. La intensidad de la fluorescencia emitida por cada gota es registrada en un detector el cual envía la señal a un osciloscopio. Aquellas gotas que emiten luz fluorescente adquieren una carga eléctrica, la cual es directamente proporcional a su fluorescencia. Finalmente, las gotas cargadas se separan con base a la carga que adquirieron, gracias a unas placas de detección. (Fig. 5).

*Para poder analizar una muestra con base a algún parámetro, independientemente del que este sea, se tienen que correr ciertos controles cada vez que se lee en el citómetro.*

El primer control que se analiza es el negativo, es decir, la muestra que no se le adiciona anticuerpo. Este control sirve para dos cosas muy importantes: por un lado, para darnos cuenta de la autofluorescencia que presentan las células y consecuentemente ajustarla de tal manera que esta sea la menor posible con el fin de que no interfiera con la fluorescencia de cada uno de los anticuerpos en cuestión. Según el tipo de fluorocromos que estén conjugados al anticuerpo, son los canales de fluorescencia en los que se va a detectar la fluorescencia emitida. El canal FL-1 detecta la fluorescencia emitida por la excitación de fluorocromos tales como la fluoresceína que emiten a 515nm (su rango comprende de 500-550nm). El canal FL-2 en cambio, detecta la fluorescencia emitida cuando fluorocromos tales como la ficoeritrina se excitan y emiten a 565nm (su rango comprende de 500-550). Finalmente, el canal FL-3 detecta fluorescencia entre 640 y 680 nm aproximadamente, de fluorocromos tales como *Trycplor (TC)*.

Por el otro lado, el control negativo sirve para analizar a las células con base a su tamaño y granularidad; esto nos permite identificar subpoblaciones celulares, así como también la presencia de detritus celulares dentro del mismo cultivo. Este análisis es importante ya que con la formación de una ventana ("region" en el

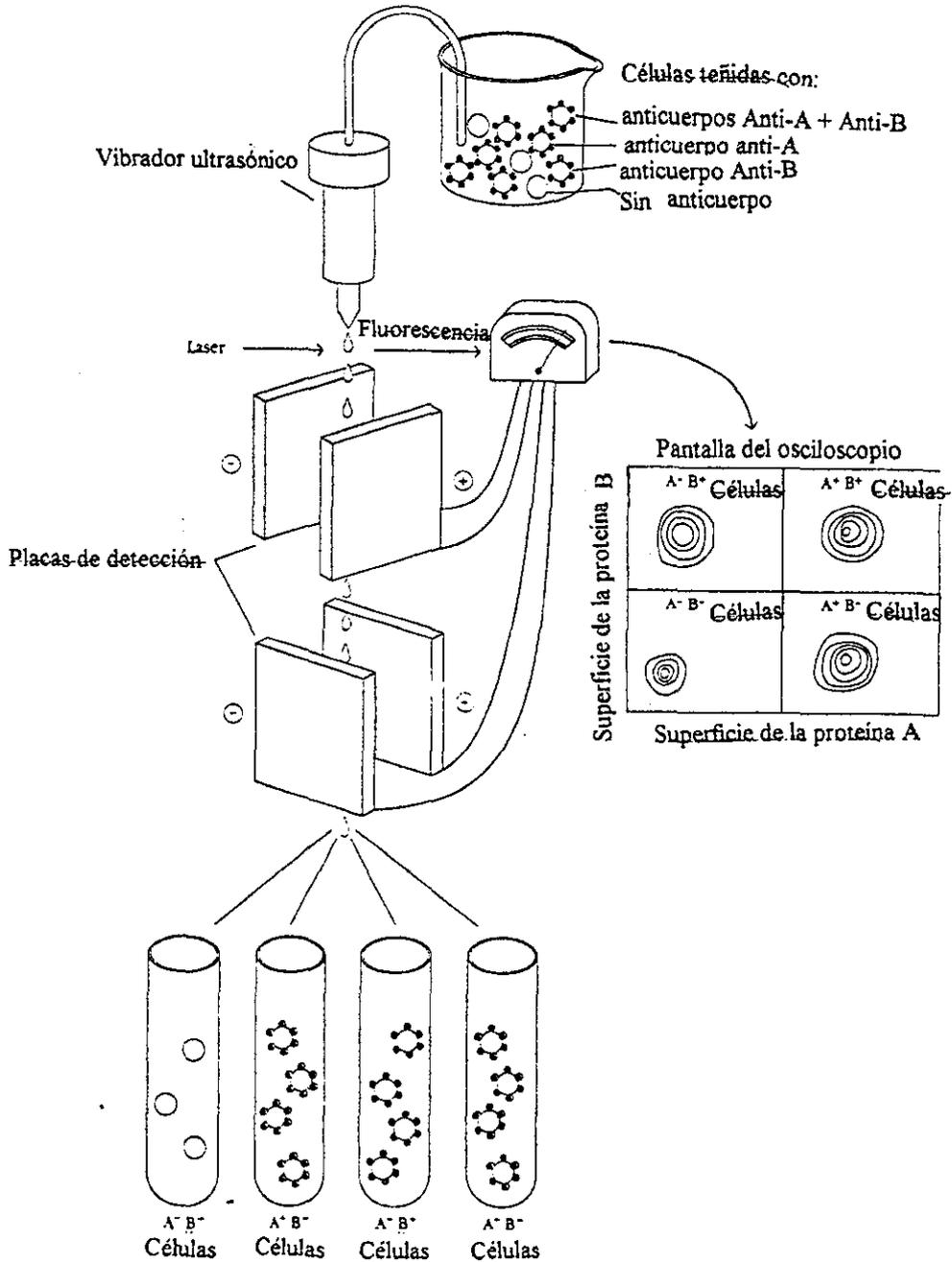


Fig.5. Esquema que muestra el funcionamiento de manera general, de un citómetro de flujo.

FACS) se puede establecer la población celular de interés para analizar a lo largo del estudio desde un principio.

Ahora bien, el tipo de fluorocromos empleados no solamente determina los canales de fluorescencia en los cuales se va a leer, sino que además determina los controles necesarios para la compensación.

La compensación, la cual se tiene que llevar a cabo cada vez que se lee en el citómetro, consiste en incorporar controles positivos para cada uno de los anticuerpos conjugados que se emplean en el experimento y de manera independiente. El objetivo de ésta consiste en calibrar al citómetro con base a los fluorocromos empleados, para evitar que la fluorescencia emitida por cualquiera de estos interfiera con alguno de los otros fluorocromos, evitando de esta manera, cualquier posible artefacto al momento de correr las muestras con los tres fluorocromos juntos.

Una vez realizada la compensación, se procede a analizar cada una de las muestras problema.

#### e) ¿ Qué es el VIH ?

El virus de inmunodeficiencia humana o VIH es un retrovirus que pertenece a la subfamilia de los lentivirus. Esto quiere decir que es un virus diploide de RNA que tiene la habilidad de integrar su material genético en la célula del huésped y de presentar un largo período de latencia.

El genoma de VIH contiene alrededor de 9,000 pares de bases que codifican 9 genes. Los extremos 5' y 3' de éste los delimitan unas secuencias conocidas como LTR ( "long terminal repeats " ), las cuales son necesarias tanto para la integración del virus al genoma de la célula, así como también para la unión de proteínas regulatorias que controlan la expresión viral.

El VIH comparte con otros retrovirus tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica proteínas estructurales de la cápside, *pol* codifica para las enzimas involucradas en la replicación y en la integración viral, y finalmente *env*, codifica para las proteínas de la envoltura. El resto de los genes característicos de VIH tienen propiedades reguladoras y se pueden resumir en la siguiente tabla :

GEN	FUNCIÓN
<i>tat</i> (transactivador)	Regulador positivo de la transcripción
<i>rev</i> (regulador de la expresión viral )	Permite la exportación del núcleo de los RNAm sin procesar.
<i>vif</i> ( infección viral )	Afecta la infectividad de las partículas; ayuda a que se ensamblen los viriones.
<i>vpr</i> (proteína viral R)	Regulador positivo de la transcripción; aumenta la producción de viriones.
<i>vpu</i> ( proteína viral U)	Solamente lo posee el VIH-1; controla la expresión de CD4.
<i>nef</i> (factor de regulación negativa )	Aumenta la replicación viral tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> ; controla la expresión de CD4.

El VIH entra a las células gracias a un complejo no covalente de glicoproteínas que posee en su envoltura denominadas gp 120 y gp 41 codificadas por el gen *env*, las cuales reciben ese nombre debido a su peso molecular. gp 120 se une con gran afinidad a CD4 en la superficie de células tales como linfocitos T CD4+ y macrófagos; además gp 120 contiene un dominio en la región V3 que determina el tropismo del virus hacia determinados tipos celulares.

En cambio, la gp 41, regula la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula, permitiendo la entrada del genoma así como de las proteínas virales al citoplasma.

Además de CD4, existen otras moléculas que funcionan como co-receptores en la célula y que de igual manera determinan la fusión así como la entrada del virus hacia la misma. El tipo de co-receptor empleado por el VIH depende del tropismo del mismo. Así por ejemplo, los virus que son linfotrópicos utilizan como co-receptor a la fusina (receptor acoplado al complejo de proteína G) presente en los linfocitos T CD4 +, mientras que los virus macrófago-trópicos utilizan al receptor CCR5 presente en macrófagos, que une a quimiocinas CC como RANTES, MIP 1  $\alpha$  y MIP 1  $\beta$  (13).

Existen varias evidencias que indican que los aislados de VIH macrófago-trópicos se transmiten preferentemente por contacto sexual, siendo este fenotipo viral dominante en individuos recién infectados. El virus es diseminado a partir de un reservorio inicial de macrófagos infectados en mucosas de tejido linfático. Mas tarde en la infección, el fenotipo viral cambia hacia VIH linfotrópicos formadores de sincicios, el cual es seguido por una rápida disminución de células T CD4 + y una progresión hacia SIDA (14).

La infección inicial por VIH ocurre debido a la transferencia de fluidos corporales de una persona infectada a una no infectada. Lo mas común es contagio por relaciones sexuales, agujas contaminadas por uso de drogas intravenosas, por uso terapéutico de sangre infectada en el caso de hemofílicos y por madres infectadas que transmiten el virus, ya sea al momento del nacimiento, mediante leche materna o bien vía placenta durante el embarazo.

La infección primaria por VIH es asintomática en la mayoría de los casos, aunque existen algunos pacientes que desarrollan síntomas muy parecidos a aquellos experimentados por efecto del virus de la influenza. En esta etapa, la cual dura entre 2 y 6 semanas, existen grandes cantidades de virus libre en la sangre periférica, así como un pequeño decremento en células T CD4 + circulantes. El control de ésta viremia está asociado con la activación de células T

CD8 +, que gracias a su respuesta eliminan a las células infectadas con VIH. Esto reestablece los niveles de células T CD4 + y por lo tanto desencadena una producción de anticuerpos, llevando así a la seroconversión. En seguida viene un período conocido como fase asintomática que puede durar entre 2 y 15 años. Aun cuando no se desarrolla ningún síntoma durante esta fase, el virus se encuentra en constante replicación en órganos linfáticos; es por esto que las células T CD4 +, las cuales están constantemente combatiendo al virus, comienzan de manera gradual a declinar hasta que eventualmente desaparecen. De hecho uno de los parámetros que ayudan a diagnosticar el SIDA en pacientes VIH infectados es el número de células T CD4 +, las cuales se encuentran por debajo de las 500 células / $\mu$ l en sangre periférica cuando se manifiesta la enfermedad. Debido a que el sistema inmune está completamente abatido durante este periodo (de hecho todavía no está claro si la destrucción de las células del sistema inmune se deba a un efecto directo del virus o bien a un efecto indirecto del mismo ocasionado por el propio sistema inmune), el paciente muere debido a infecciones oportunistas como aquellas ocasionadas más comúnmente por *Candida spp*, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc.

Actualmente se estima que hay 30 millones de personas infectadas con VIH en todo el mundo, de las cuales 6 millones ya han muerto de SIDA en los últimos 15 años.

#### f) Diferencias entre VIH-1 y VIH-2

La diferencia quizás mas importante entre el VIH-1 y VIH-2 es su origen filogenético (15). Los VIH-2 son prácticamente indistinguibles de los virus de inmunodeficiencia que infectan a los simios (SIV) tales como macacos y "mangabey"; de hecho VIH-2 tiene la capacidad de crecer en monos, mientras que VIH-1 no se replica muy bien en éstos (VIH-1 en cambio, puede infectar a otro tipo de simios tales como chimpancés y monos gibón). En ese sentido es interesante mencionar la manera en la que se descubrió VIH-2; sueros provenientes de una cohorte de prostitutas de Senegal reaccionaron muy fuerte con proteínas de membrana así como de la cápside de antígenos de SIV y no de igual manera con proteínas de VIH-1, en donde aun cuando reaccionaban muy fuerte con proteínas de la cápside no reaccionaban con aquellas de membrana.

A nivel de secuencias nucleotídicas, el genoma de VIH-2 comparte con VIH-1 entre 40-45 % de similitud, estimándose que VIH-1 y VIH-2/SIV pudieron haber divergido hace 50-60 años. Existe un mayor grado de variabilidad entre VIH-1 encontrados en comparación con VIH-2; de hecho existen 10 subtipos de VIH-1 (denominados desde la A hasta la J), mientras que de VIH-2 existen 5 (A-E, siendo los más comunes A y B) (15).

La zona geográfica en donde se han registrado un mayor número de casos de gente infectada VIH-2/SIV, considerada por lo mismo como endémica, es la costa occidental de Africa, es decir en países como: Senegal, Mali, Guinea Bissau, Costa de Marfil y Gambia (es importante mencionar que actualmente ha habido un brote importante en India). En cambio, casos de gente infectada con VIH-1 se localizan en todo el mundo, incluyendo aquellos países en los que el VIH-2 es endémico (15).

Otra diferencia importante radica en la eficiencia de transmisión. Modelos matemáticos estiman que la eficacia de transmisión heterosexual de VIH-2 es de

5-9 veces menor que VIH-1 (14). En cuanto a la transmisión perinatal, esta diferencia es aún más dramática, ya que el riesgo de que una madre infectada le trasmite el virus a su hijo es de 10- 20 veces más alta en VIH-1 en comparación con VIH-2 (incluso casos de transmisión por leche materna de VIH-2 son extremadamente raros).

Con relación al contenido proteico, existe una diferencia importante, la cual es la presencia de la proteína vpx en VIH-2 y de vpu en el caso de VIH-1 (14) (Fig 6). La proteína vpx se localiza justo abajo de la envoltura viral; su función todavía no está muy clara, sin embargo en el sistema SIV se ha visto que es necesaria y suficiente para el importe nuclear del complejo de transcripción reversa. La proteína vpu en cambio, está involucrada en el control de la expresión de CD4 como ya había mencionado anteriormente, la cual, a diferencia de vpx, no tiene una localización específica dentro del virion.

En cuanto a la unión celular, parece ser que gp110 de VIH-2 tiene una menor afinidad por el receptor CD4, en comparación con gp120 de VIH-1 (14); quizás en parte esto ayude a explicar los bajos niveles de virus encontrados en gente infectada con VIH-2 en comparación con aquellos encontrados en gente infectada con VIH-1.

Los elementos y mecanismos de transcriptasa reversa así como de integración son prácticamente los mismos en ambos tipos de virus, a excepción de un par de detalles: la especificidad de la actividad RNAsa de VIH-2 que parece ser 10 veces más lenta comparada con la de VIH-1, además de que el gen de transactivación *tat* es ligeramente más complejo en VIH-2, ya que consta de dos asas TAR, mientras que VIH-1 tiene solamente una.

Las proteínas de membrana son ligeramente más pequeñas en el caso de VIH-2, además de no presentar la secuencia de aminoácidos GPGR conservada en la punta del asa del dominio V3 (14).

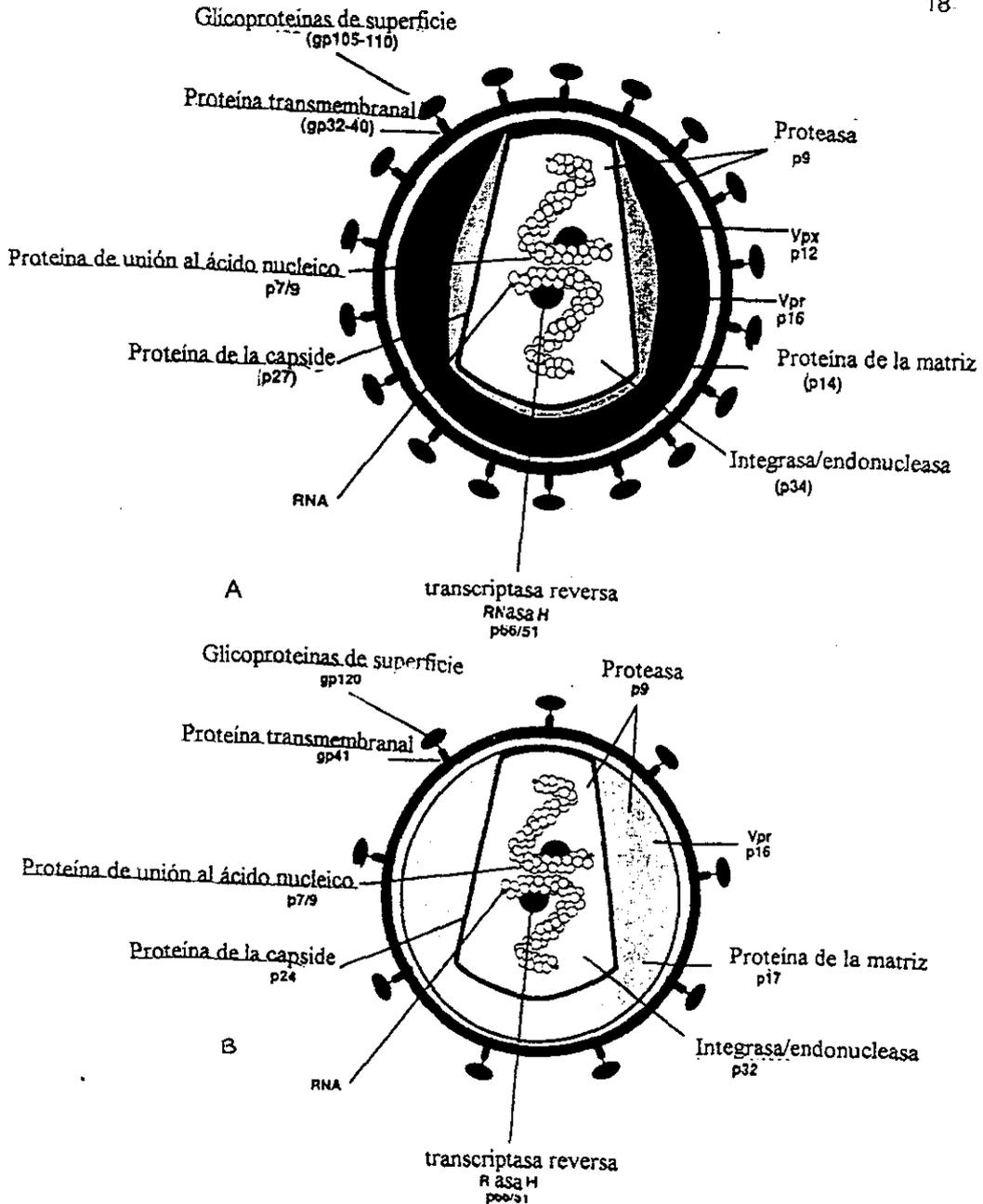


Fig. 6. Ilustración esquemática de viriones VIH-2 (a) y VIH-1 (b).

Finalmente, otra de las diferencias importantes es la patogénesis provocada por ambos virus (16). Durante el período asintomático, los individuos infectados por VIH-2 presentan cargas virales muy bajas en comparación con los individuos infectados con VIH-1, además de que los pocos viriones VIH-2 que se logran aislar no llegan a formar sincicios en líneas celulares linfocíticas, como los viriones VIH-1. Al parecer, la relación TCD4+:TCD8+ no se invierte de manera tan drástica en individuos VIH-2 infectados a diferencia de los individuos infectados con VIH-1. En general, individuos infectados con VIH-2 tienen una menor inmunosupresión, niveles de neopterinina y  $\beta$ 2microbulina no tan elevados, así como una menor anergia en la piel en comparación con los individuos infectados con VIH-1.

Por otro lado, aún cuando los individuos infectados con VIH-2 si desarrollan la enfermedad, el período de incubación previo a la misma es por lo general muy largo (15-20 años) comparado con VIH-1 (8-10 años) (16). Algo importante de señalar es que una vez presentado el SIDA, la progresión es igual de rápida en individuos infectados con VIH-2 que en aquellos infectados con VIH-1; quizás con la única observación de que los individuos con SIDA infectados con VIH-2, son generalmente mujeres de edad avanzada, además de que se detectan un menor número de casos de tuberculosis en pacientes terminales.

g) Respuesta inmune celular en individuos infectados con VIH-1

Como ya mencioné anteriormente, los CTLs son los elementos más importantes dentro de la respuesta inmune celular encargados de eliminar agentes virales (2). Varios modelos animales, en los cuales se lleva a cabo una transferencia de CTLs de memoria a recipientes "vírgenes", han mostrado que los CTLs son capaces de controlar la replicación del VIH (17). De hecho se ha observado que la infección por retrovirus provoca una respuesta muy fuerte por parte de los CTLs en humanos (18), en primates diferentes a humanos (19), en caballos (20) e incluso en borregos (21). Por esto mismo, resulta de gran importancia el papel que juegan los CTLs dentro de la infección por VIH.

Dentro de las respuestas de los CTLs contra antígenos de VIH-1, se encuentran aquéllas dirigidas principalmente a epitopos de las proteínas producidas por los genes : *gag*, *nef*, *env* y *pol*. (22).

Desde etapas tempranas de la infección, existe una respuesta citotóxica, misma que se mantiene durante el periodo asintomático. Esta respuesta citotóxica específica cesa una vez que el individuo ha desarrollado el SIDA, que es cuando aumenta considerablemente la carga viral, así como el número de células T CD 4+ infectadas (23).

Algo muy interesante es el hecho de que pacientes infectados con VIH-1 de larga sobrevivida (con más de 8 años de infección), presentan por lo general una respuesta vigorosa de CTLs cuando éstos son sometidos a la presencia del antígeno *in vitro* (23). En sí, estados clínicos favorables están asociados con respuestas permanentes y específicas de CTLs (24).

#### h) VIH-1 y MHC

En 1989 se hicieron los primeros estudios encaminados a establecer la posible relación entre la infección por VIH-1 y la expresión de moléculas MHC Clase I (25,26). Infectando con VIH-1 (HTLV-IIIB) líneas celulares tanto linfocíticas (HeLa CD4+, CEM E5, HT y H9) como monocíticas (U 937), así como PBMC CD8-, ambos estudios demostraron de manera independiente, que la infección por VIH-1 controlaba la expresión de moléculas MHC clase I.

Dos años más tarde, se propuso que VIH-1 pudiera estar interfiriendo con algún mecanismo involucrado en la generación y/o transporte de péptidos que consecuentemente controlara la expresión de moléculas MHC clase I (27).

En 1996, se demostró mediante la manipulación de cepas de VIH-1 deletadas en *nef*, que tanto el control en la expresión de moléculas MHC clase I, así como del receptor CD4 está mediada por la proteína *nef*, la cual estimula la endocitosis de éstas moléculas de la superficie celular hacia vesículas citoplasmáticas para posteriormente ser ahí degradadas (28, 29, 30, 31, 32).

Para el caso de la infección por VIH-2, existe un reporte (el cual de hecho salió justo cuando nosotros empezábamos con el experimento), que evaluó la relación entre la infección por este virus y la expresión de moléculas MHC Clase I e incluso no como tema central del artículo (32). Sin embargo, además de que no especifican la cepa de VIH-2 con la que trabajaron, los análisis por citometría de flujo que presentan son muy ambiguos, razones por las que decidimos continuar con el estudio.

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Se ha propuesto que el control en la expresión de moléculas MHC Clase I en la superficie celular pudiera ser una estrategia para evadir la respuesta inmune celular. Varios agentes infecciosos como el VIH-1, así como otros virus tales como el herpes virus, adenovirus, etc (33), afectan la expresión de las moléculas MHC Clase I.

Si hacemos una comparación entre el periodo de incubación previo al desarrollo de la enfermedad o SIDA de VIH-1, el cual oscila entre los 8 y 10 años, y VIH-2, el cual oscila entre los 15 y 20 años después de la infección, se observa que en los individuos infectados con VIH-2 el período de incubación es considerablemente más prolongado. Si una respuesta citotóxica efectiva es en parte responsable del largo período asintomático observado en individuos infectados con VIH-2, esperaríamos una expresión igual o más alta de moléculas MHC clase I en la superficie de células VIH-2 infectadas comparadas con las células VIH-1 infectadas. Esto favorecería una buena respuesta de los CTLs contra el virus y posiblemente alargaría el período de incubación antes del desarrollo de la enfermedad o SIDA.

A raíz de la propuesta anterior, se planteó como objetivo de este trabajo, confirmar que VIH-1 controla la expresión de moléculas MHC clase I en PBMCs infectados con el mismo y someter a prueba la hipótesis de que VIH-2, en contraste, no controla la expresión de éstas moléculas.

## METODOLOGIA

### ***Cultivo celular e infección***

Se aislaron las PBMCs mediante la técnica de Ficoll-Hypaque (como lo especifican las instrucciones del reactivo) a partir de 10 mL de sangre heparinizada de cuatro diferentes donadores sanos. De cada donador se obtuvieron  $\sim 9 \pm 1 \times 10^6$  PBMC/10mL. Las células de cada donador fueron estimuladas de manera independiente durante tres días con fitohemaglutinina (PHA) 5  $\mu$ l/mL en 10 mL de medio completo de cultivo (RPMI 1640 + 1% antibiótico/antimicótico (Gibco BRL) + SFB 20%) suplementado con interleucina 2 (IL-2) recombinante 100 unidades/mL (Becton Dickinson) a 37 °C en cajas F75. Después de este período, el número total de células obtenido fue de  $\sim 18 \pm 2 \times 10^6$  PBMC/10mL en cada uno de los donadores; las células se dividieron en placas de 24 pozos a una cuenta de  $1 \times 10^6$  células por pozo en 1mL de medio completo + 100 unidades /mL de IL-2 recombinante (Becton Dickinson). Una vez transferidas las PBMC a la placa de 24 pozos, con la ayuda de una micropipeta se llevó a cabo la infección (lo que empezamos a contar como día 0), formando de ésta manera cuatro diferentes grupos: 1) PBMC sin infectar; 2) PBMC infectados con VIH-1 JRFL # 3, 3) PBMC infectados con VIH-2 p1629 y 4) PBMC infectados con VIH-2 MS.

Los virus VIH-1 # 3 JRFL y VIH-2 p1629 son aislados primarios, macrófago trópicos. Las infecciones con ambos tipos de virus se realizaron a 600 dosis infectivas medias (DIM), lo que correspondió a un volumen de 100  $\mu$ l/pozo de solución de VIH-1 + medio de cultivo y 200  $\mu$ l/pozo de solución de VIH-2 p1629 + medio de cultivo.

La cepa viral VIH-2 MS en cambio, crece en líneas celulares monociticas (U937), y en cuanto a las DIM, no se lograron establecer; el único dato en cuanto a

cantidad de virus infeccioso fue el obtenido mediante ensayos de transcripción inversa (RT), los cuales estaban dentro de los valores máximos. El volúmen de solución formada a base de VIH-2-MS + medio de cultivo que se añadió fue de 300  $\mu$ l/pozo.

Las células fueron alimentadas en una relación de 1:1 a partir de medio de cultivo preexistente y medio de cultivo nuevo suplementado con IL-2 recombinante los días de experimentación, es decir, en los días 1, 4, 7 y 11 después de haber llevado a cabo la infección.

### *Imunofluorescencia y citofluorometría*

En los días 1, 4, 7 y 11 después de la infección,  $1 \times 10^6$  células fueron tomadas de los cultivos control así como de aquellos infectados con VIH-1 y VIH-2, para llevar a cabo una tinción en dos magnitudes: tanto extracelular como intracelular. A continuación se describe el protocolo experimental:

- 1.-  $1 \times 10^6$  células se lavan con 3mL de PBS separando por centrifugación a 1200 rpm durante 5 min a 20 ° C.
- 2.- Las células se fijan con 300  $\mu$ L de PFA 3% (paraformaldehído 3%) durante 15 min a una temperatura de 20 °C.
- 3.- Las células se lavan con 3mL de PBS-SFB 3% (buffer de fosfatos salino con suero fetal bovino) separando por centrifugación a 1200 rpm durante 5 min a 20 ° C.
- 4.- Con el fin de llevar a cabo una tinción extracelular, las células se incuban durante 30 min en un volúmen de 50  $\mu$ L con una dilución 1:50 de los siguientes anticuerpos: anticuerpo murino monoclonal contra HLA humano A, B y C marcado con ficoeritrina (CALTAG Laboratories) y anticuerpo murino monoclonal contra CD4 humano marcado con Trycolor (CALTAG Laboratories)

5.- Las células se lavan en 5mL de PBS-SFB 3% separando por centrifugación a 1200 rpm durante 5 min a una temperatura de 20 ° C.

6.- Posteriormente, las células se permeabilizan con 200 µL de PBS-Tween 0.2% a 37 °C, durante 15 min.

7.- Las células se incuban durante 30 min en hielo en un volúmen de 50 µL, con una dilución de 1: 50 del anticuerpo murino monoclonal contra p24 marcado con fluoresceína en el caso de VIH-1 (COULTER), y con el anticuerpo murino monoclonal contra p26 marcado también con fluoresceína en el caso de VIH-2 (American Bioproducts).

8.- Las células se lavan con 5mL de PBS-SFB 3% a 1200 rpm durante 5 min a una temperatura de 20 °C.

v

Finalmente, las células se resuspendieron en 300 µL de PBS y fueron analizadas en el citómetro de flujo (FACScan) mediante el programa Lysis II (Becton and Dickinson, del instituto Dana Farber, Boston, MA).

El diseño experimental considera que el anticuerpo contra VIH (tanto para tipo 1 como para tipo 2, según el caso), nos permite captar las células que estén infectadas por el virus. El anticuerpo contra las moléculas MHC clase I (anticuerpo murino monoclonal vs HLA A, B y C), se uso para medir la expresión de éstas moléculas en células que estuviesen tanto infectadas como no infectadas. Finalmente, el anticuerpo contra CD4 permite comparar la población de PBMC no infectados positiva a CD4, con la población infectada con VIH. Esto se pensó, ya que en la literatura se reportaba una expresión variable de moléculas MHC clase I según el tipo celular; dentro de las PBMC, las células B por ejemplo, expresan una mayor cantidad de moléculas MHC Clase I que los macrófagos; de tal manera que si hubiésemos comparado toda la población de PBMC contra las células VIH-1 infectadas, podría haber generado un artefacto en los resultados obtenidos.

Como control del experimento, el anticuerpo contra CD4 se adicionó también a las PBMC control, lo cual dió origen a resultados inesperados muy interesantes como se verá más adelante

## RESULTADOS

### **VIH-1 afecta negativamente la expresión de las moléculas MHC clase I en las células que infecta**

Lo primero que se hizo fue analizar a la población del cultivo no infectado con base al tamaño y granularidad (Fig.7 a). Para nuestro estudio decidimos trabajar con toda la población celular, es decir, tanto las células de mayor tamaño y granularidad (en donde estarían contemplados los macrófagos) como las de menor (en donde entre otros tipos celulares se encontrarían los linfocitos). Este mismo criterio se aplicó a los cultivos infectados, ya que morfológicamente fueron muy similares al cultivo no infectado (datos que no se muestran).

Posteriormente, también del cultivo no infectado, se analizó la autofluorescencia de las PBMC en cada uno de los canales de fluorescencia (Fig. 7 b y c). Como se observa, la fluorescencia que emiten las PBMC sin la presencia de anticuerpo conjugado a un fluorocromo está dentro de los rangos basales. El control negativo del cultivo infectado con VIH-1 mostró un patrón de fluorescencia muy similar al del cultivo no infectado (datos que no se muestran).

Para probar el funcionamiento de cada uno de los anticuerpos de manera independiente (mismos que sirvieron como controles para la compensación del citómetro), se hizo un análisis mediante "Dott Blotts" como se muestra en la figura 8.

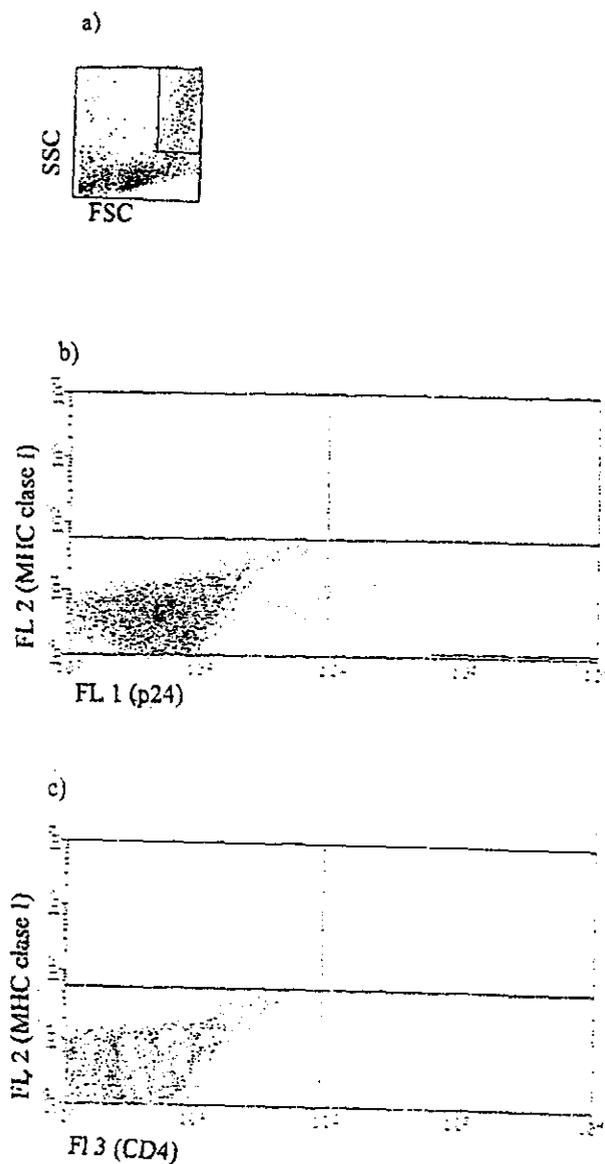


Fig. 7. Gráfica en "Dot Blotts" que muestra el tamaño (FSC) y granularidad (SSC) de las PBMC del cultivo no infectado (a), la autofluorescencia emitida por el cultivo no infectado también, con relación a las Moléculas MHC clase I y VIH-1 p24 (b), y Moléculas MHC clase I y CD4 (c).

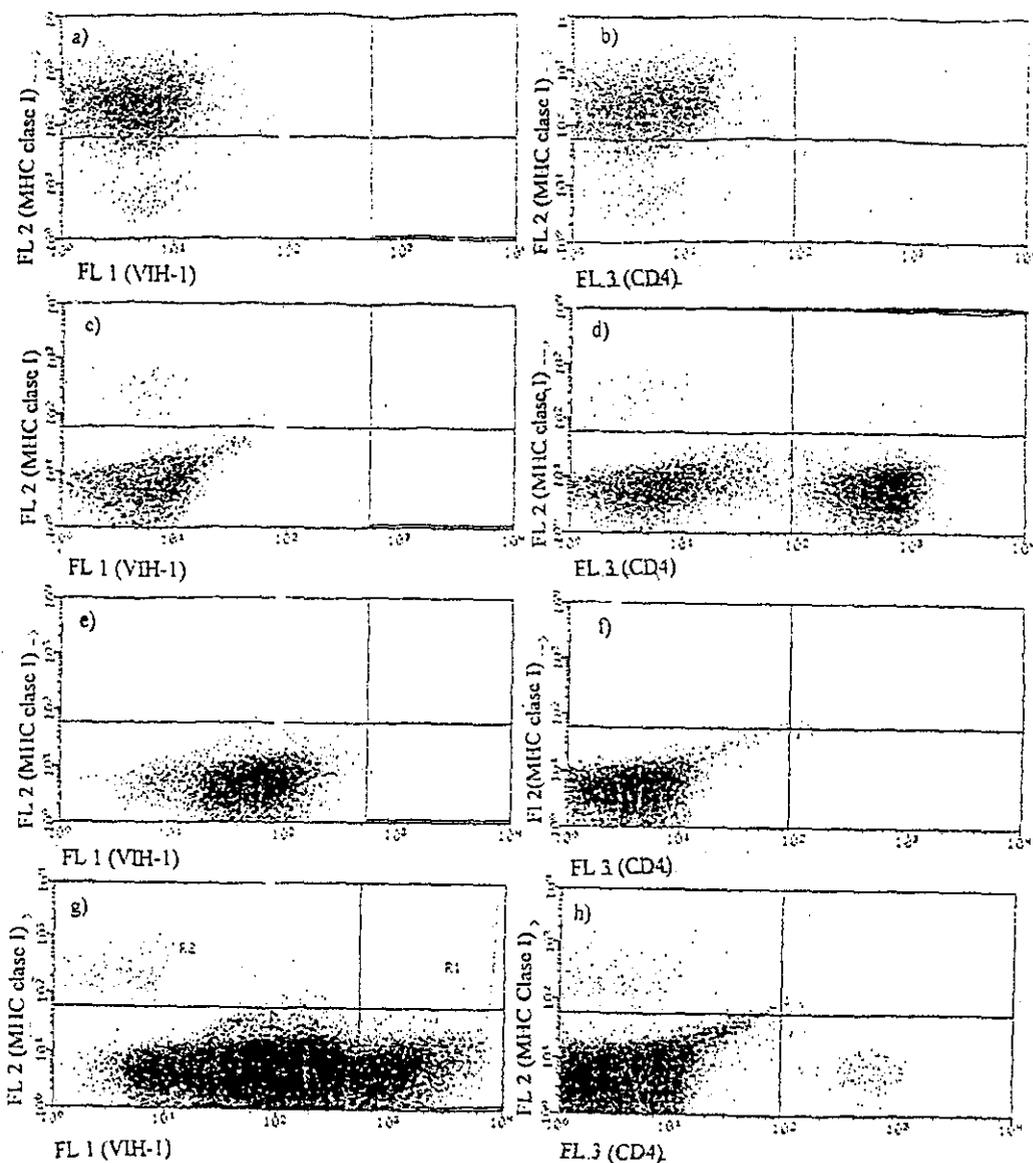


Fig. 8. Gráficas en "Dot Plots" que muestran las células no infectadas e incubadas con el anticuerpo contra las moléculas MHC clase I (a y b), contra CD4 (c y d) y contra p24 de VIH-1 (e y f); células infectadas con VIH-1 e incubadas con el anticuerpo contra p24 (g y h). En todos los casos se analizó la fluorescencia emitida en los 3 canales.\* en g y h se colectaron 300,000 eventos.

Es importante mencionar que en no se corrieron controles de isotipo ya que los anticuerpos nunca llegaron a tiempo (sobre todo nos referimos al isotipo control para la detección de VIH-1).

Una vez que se corrieron los controles en el citómetro procedimos a analizar cada uno de los cultivos tratados. El primero de ellos fue el cultivo no infectado. La figura 9a muestra el resultado de este análisis mediante "dot blots". Debido a que este cultivo no se infectó, el hecho de que la media de fluorescencia para VIH-1 p24 no sea cero o cercana a cero, sugiere de antemano una unión inespecífica del anticuerpo (aunque esto tendría que confirmarse con el isotipo control). Posteriormente se analizó a la población con relación al tercer anticuerpo que en nuestro caso estaba dirigido contra el receptor de superficie CD4. En la figura 9b se puede observar como con relación a CD4 existen dos poblaciones: CD4+ MHC clase I+ y CD4- MHC clase I+.

Algo interesante que también se observa en la figura 9b es que los niveles de expresión de moléculas MHC clase I es prácticamente igual tanto en la subpoblación CD4+ como en la subpoblación CD4-.

El siguiente cultivo que se analizó fue el cultivo infectado con VIH-1. Lo primero que se hizo fue estudiar a toda la población bajo los parámetros de CD4 y moléculas MHC clase I (Fig. 10 a). Posteriormente procedimos a analizar a toda la población celular en términos de la expresión de moléculas MHC clase I y antígeno p24 (Fig. 10 b). En esta figura se observa como aún cuando existe un pegado inespecífico del anticuerpo, el cual ya se había detectado en el cultivo no infectado, se distingue una subpoblación con una mayor intensidad de fluorescencia en dicho eje, la cual corresponde a la subpoblación de PBMC positivas a p24 o VIH-1 infectadas.

Debido a que nuestro interés radicaba en la expresión de moléculas MHC clase I en PBMC VIH-1 infectadas, separamos a las células p24 positivas de las p24

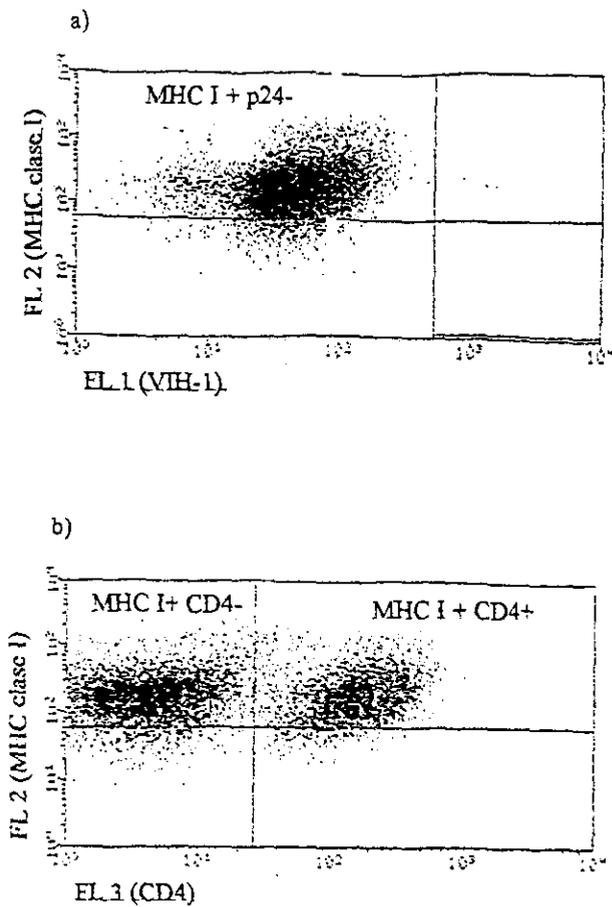


Fig. 9. Fluorescencia de células del cultivo no infectado incubadas con el anticuerpo contra MHC clase I y p24 de VIH-1 (a), y anticuerpo contra CD4 (b) simultaneamente.

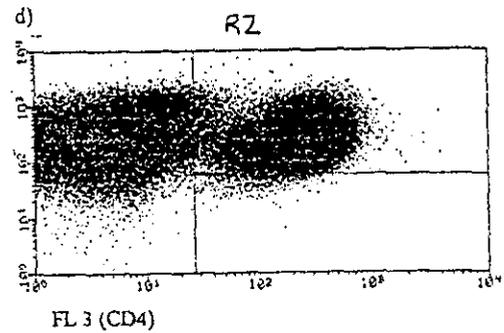
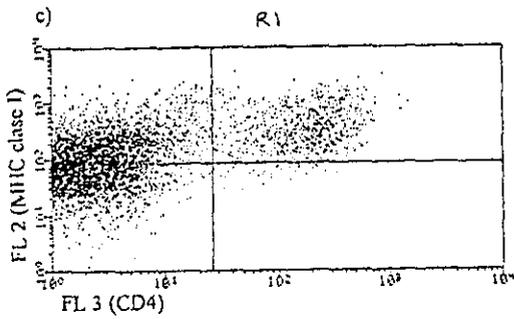
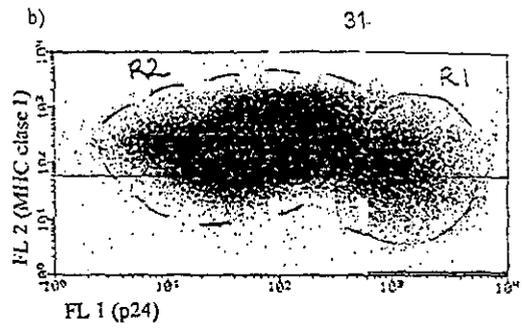
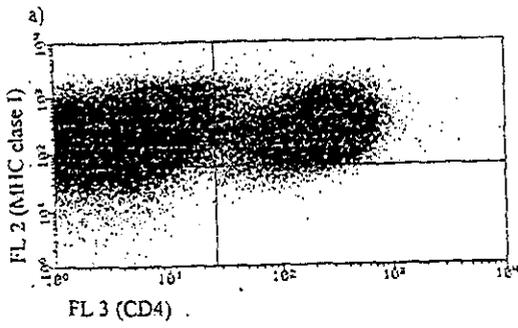


Fig 10. Fluorescencia de células infectadas *in vitro* con VIH-1, analizadas en función de la expresión de CD4, MHC I y p24. A) Células totales analizadas por MHC I y p24. B) Células totales analizadas por MHC I y p24; la region R1 corresponde a las células infectadas con VIH-1, mientras que la region R2 corresponde a las células p24 negativas del mismo cultivo. C) La region R1 de la fig b) analizada en función de la expresión de CD4 y MHC I. D) La region R2 de la fig b) analizada en función de CD4 y MHC I. Los controles de este experimento corresponden a las figuras 7 y 8.

negativas mediante la creación de una compuerta o "gate". El haber creado esta compuerta en el programa del citómetro, nos permitió analizar tanto la población de PBMC p24 negativas como la población p24 positivas del mismo cultivo pero de manera independiente. La figura 10c muestra el análisis de las PBMC colectadas en la compuerta R1, es decir las PBMC positivas a p24 y por lo tanto infectadas con VIH-1, con relación a la expresión de CD4 y moléculas MHC clase I. Todas aquellas células que no entraron dentro de la compuerta R1, es decir las células p24 negativas del mismo cultivo que suponemos como no infectadas, se colectaron en otra compuerta llamada R2 y fueron analizadas bajo los mismos parámetros que las células infectadas (Fig. 10d).

Con base al programa estadístico que contiene el citómetro, pudimos conocer el porcentaje de PBMC infectadas con el virus a partir del número de eventos p24 positivos registrados en relación al número total de PBMC de cada cultivo infectado con VIH-1 en todos los donadores (TABLA 1).

**Tabla 1. Porcentajes de infección obtenidos en los cultivos VIH-1 infectados durante los días de experimentación en los 4 distintos donadores probados.**

DIA	DONADOR			
	A	B	C	D
1	—*	—*	0	0
4	2.71	2.11	1.53	3.06
7	1.14	1.82	2.09	2.29
11	0.98	1.43	0.56	0.57

\* no se registró el día 1 después de la infección para estos donadores

Esta tabla nos dice dos cosas importantes. La primera, es que el pico de la infección por VIH-1 se logra, en la mayoría de los casos, en el día 4 después de realizada la infección, aunque incluso se podría argumentar que esto depende del donador, ya que existe una persona (muestra C) en la que se detectó el pico de infección 7 días después de haber llevado a cabo ésta.

El segundo punto que llama la atención de esta tabla son los bajos porcentajes de infección obtenidos con todas los donadores (donde el más alto porcentaje es de 3.06%).

Debido a que la tabla 1 refleja que existe un gran número de PBMC sin infectar o al menos p24 negativas dentro del mismo cultivo, la pregunta inmediata que surgió fue encaminada a establecer si las células p24 negativas de éstos cultivos

se comportaban de igual manera que las PBMC del cultivo no infectado en cuanto a expresión de moléculas MHC clase I así como de CD4. La figura 11 muestra los resultados obtenidos con base a los datos estadísticos tomados a partir de las gráficas de "Dot Blot". En el donador A se puede observar como las PBMC del cultivo no infectado tienden a aumentar los niveles de expresión de moléculas MHC clase I al día 7 (lo que llama la atención, ya que este cultivo no estuvo sometido a ningún estímulo), sin embargo éstos tienden a decaer al día 11 después de la infección. Las PBMC negativas a p24 del cultivo infectado con VIH-1 en cambio, presentan un comportamiento más homogéneo en los días 4 y 7, sin embargo la expresión de las moléculas MHC clase I decae ligeramente al cabo del día 11. Las PBMC positivas a p24 tienden a expresar niveles muy semejantes de moléculas MHC clase I durante el tiempo de experimentación, sin embargo, los niveles de expresión de estas moléculas están **por debajo** de aquellos que se expresan en las PBMC del cultivo no infectado, así como de las PBMC negativas a p24 del cultivo infectado con VIH-1 en los días 4 y 7 después de la infección; en el día 11 las diferencias entre los cultivos no parecen ser significativas.

En el donador B, el cultivo no infectado presenta un comportamiento similar al del cultivo no infectado del donador A. La expresión de éstas moléculas aumenta en el día 7 y después cae drásticamente al día 11. Las PBMC negativas a p24 del cultivo infectado con VIH-1 presentan el mismo comportamiento, e incluso parecería que las PBMC positivas a p24 también siguen este patrón (desgraciadamente, debido a que el citómetro tuvo un problema y se perdió la muestra, carecemos del dato del día 11 para afirmar esto). Es importante hacer notar que aunque las PBMC positivas a p24 parecieran seguir un comportamiento similar al de las otras poblaciones, los niveles de expresión de moléculas MHC clase I están **por debajo** de los expresados por ellas, sobretodo en el día 4; en el día 7 ésta diferencia solo se observa cuando se hace la comparación con las PBMC antígeno p24 negativas del mismo cultivo y no cuando se les compara con el cultivo no infectado.

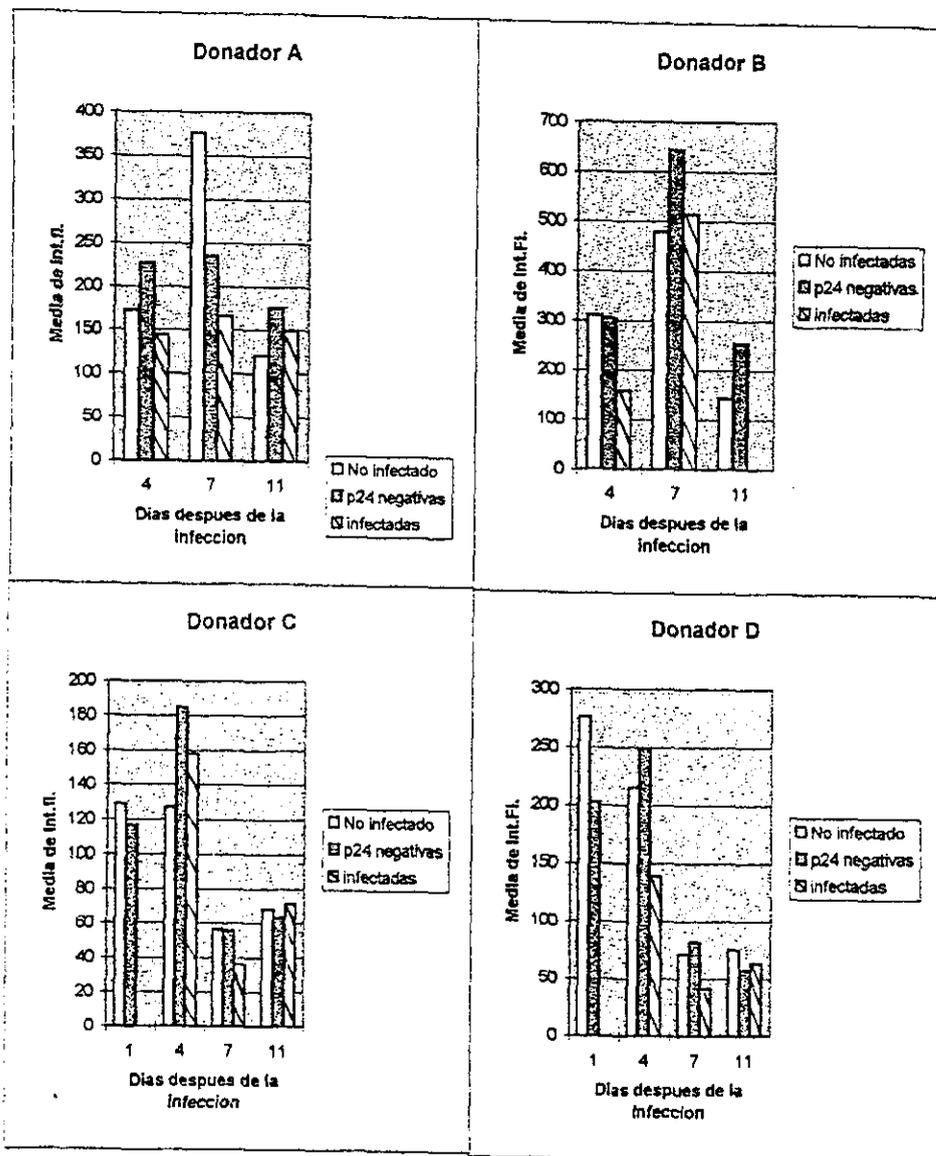


Fig. 11. Expresión de moléculas MHC clase I mediante las medias de intensidad de fluorescencia del cultivo no infectado y de las PBMC p24 positivas y negativas del cultivo infectado con VIH-1, durante el tiempo de experimentación en los diferentes donadores.

En los donadores C y D vemos un patrón de comportamiento muy similar en todas las poblaciones analizadas, es decir en las PBMC del cultivo no infectado, en las PBMC antígeno p24 negativas así como positivas del cultivo infectado con VIH-1: la expresión de moléculas MHC clase I tiende a ser constante durante los días 1 y 4, sin embargo ésta tiende a decaer drásticamente a partir del día 7 después de la infección. A pesar de este comportamiento similar entre las poblaciones, es interesante hacer notar otra vez, que las PBMC antígeno p24 positivas tienden a expresar los **menores niveles** de estas moléculas seguidas de las PBMC del cultivo no infectado y finalmente de las PBMC antígeno p24 negativas del cultivo infectado con VIH-1.

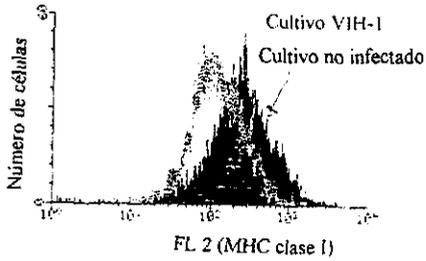
Todo este análisis sirvió para darnos cuenta de dos cosas: 1) que hay un control aparentemente inespecífico en la expresión de las moléculas MHC clase I a partir del día 7 y 11 después de la infección en todos los donadores. Probablemente esto se deba al tiempo en cultivo en el que permanecieron estas células, ya que mientras las células han sido recién activadas (los primeros días de experimentación) mantienen una expresión de moléculas MHC clase I relativamente alta y estable; sin embargo, conforme transcurren los días en cultivo, deja de haber estímulos que mantengan activadas a estas células, comenzando a reducir su gasto energético, el cual se podría ver reflejado en la disminución en la expresión de moléculas, entre ellas las MHC clase I; y 2) que las diferencias observadas que existen entre los cultivos control y las PBMC antígeno p24 negativas del cultivo infectado con VIH-1, probablemente se deban a las condiciones microambientales de cada uno de ellos. El hecho de que en la población de PBMC antígeno p24 negativas del cultivo infectado con VIH-1 presente mayores niveles de expresión de moléculas MHC clase I a diferencia de las PBMC del cultivo no infectado, podría sugerir la liberación de algún factor soluble como consecuencia de la infección (por ejemplo alguna citocina), que estuviera actuando de manera indirecta en las células no infectadas promoviendo su activación. Por esto mismo es que se pensó que mientras hubiesen PBMC

antígeno p24 negativas en el cultivo infectado con VIH-1, éstas iban a compararse con las PBMC antígeno p24 positivas del mismo cultivo, ya que de esta manera nos aseguraríamos de que las condiciones microambientales a las que las PBMC estuvieron sometidas eran exactamente las mismas, y de esta manera evitar el "ruido" que pudiese generar la variación natural entre los pozos.

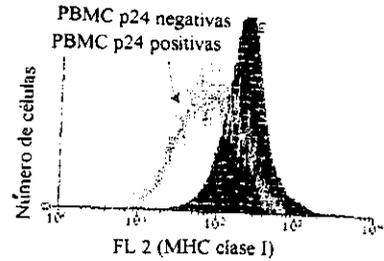
### **Efecto en la expresión de moléculas MHC clase I y CD4 debido a la infección por VIH-1.**

A partir del análisis anterior, procedimos a hacer la comparación entre las PBMC antígeno p24 positivas y las PBMC antígeno p24 negativas del cultivo infectado con VIH-1 mediante histogramas durante los días de experimentación, como se observa en la figura 12. Antes que nada, es importante aclarar que debido al bajo número de células positivas para VIH-1 y al alto número de células antígeno p24 negativas del mismo cultivo, ésta escala se modificó con ayuda de un programa del FACS, con el fin de que se pudiesen observar las diferencias más claras entre las PBMC positivas a p24 y las negativas a p24. La figura 12a corresponde al primer día después de la infección, y muestra el cultivo no infectado vs la población total del cultivo infectado con VIH-1. La razón por la que decidimos utilizar el cultivo no infectado como punto de comparación en el día 1 después de la infección, fue debido a que no se detectaron células positivas a p24 en el cultivo infectado con VIH-1. El cultivo VIH-1 presenta una menor expresión de moléculas MHC clase I (MF=202.65) en relación al cultivo no infectado (MF=276.2), sin embargo, pensamos que debido a que no logramos detectar células infectadas en ese día, la diferencia observada se deba a variaciones interpozo, mas que a una falta de sensibilidad del anticuerpo para detectar bajas cantidades de antígeno p24, como se probó más adelante. A los 4 días después de la infección (Fig. 12b), que para este donador corresponde al pico de la

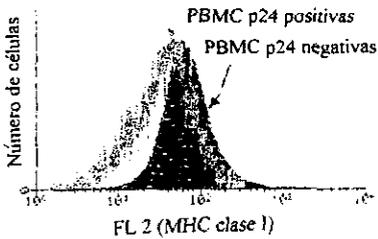
a) DIA 1 DESPUES DE LA INFECCION  
(0% de PBMC VIH-1 infectados)



b) DIA 4 DESPUES DE LA INFECCION  
(pico de infección, 3% de PBMC VIH-1 infectados)



c) DIA 7 DESPUES DE LA INFECCION  
(1.32% de PBMC VIH-1 infectados)



d) DIA 11 DESPUES DE LA INFECCION  
(0.56% de PBMC VIH-1 infectados)

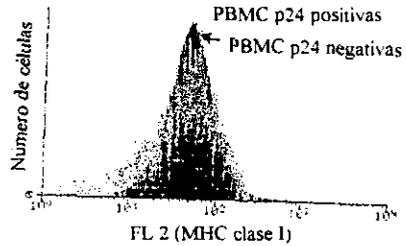


Fig 12. Modulación en la expresión de las moléculas MHC clase I en PBMC infectados con VIH-1 a través del tiempo de experimentación (aunque estos datos corresponden al donador D, cualitativamente son representativos del resto de los donadores).

infección (3.06% de PBMC infectadas, Tabla 1), se observa que las PBMC p24 positivas, presentan una menor expresión de moléculas MHC clase I (MF=138.8) con relación a las PBMC p24 negativas del mismo cultivo (MF=249.18). En el día 7 después de la infección (Fig. 12c), se puede observar como todavía se ve afectada la expresión de moléculas MHC clase I en PBMC positivas a p24 (MF=41.35), sin embargo, el efecto por la infección en la expresión de moléculas MHC clase I no es muy claro, ya que las PBMC p24 negativas también controlan la expresión de éstas moléculas (MF=82.19), lo cual se ve reflejado en una menor intensidad de fluorescencia para éstas moléculas si lo comparamos con la figura 12b. Finalmente a los 11 días, vemos que las PBMC p24 positivas expresan prácticamente los mismos niveles de moléculas MHC-I (MF=63.1) que las PBMC p24 negativas (MF=57.52) (fig 12d).

Para probar que las diferencias observadas en el día 1 después de la infección entre el cultivo no infectado y VIH-1 se debía a variaciones inter - pozo como ya habíamos mencionado anteriormente, y no a una falta de sensibilidad de nuestro anticuerpo que pudieran sugerir el aparente control en la expresión de las moléculas MHC clase I desde el inicio del experimento, procedimos a comparar a toda la población del cultivo infectado con VIH-1 (PBMC positivas a p24 + PBMC negativas a p24) con el cultivo no infectado en cada uno de los días de experimentación. Si la disminución en la expresión de moléculas MHC clase I por efecto de la infección por VIH-1 se viera reflejado en el balance final de la población al momento de tomar en cuenta las PBMC negativas a p24, entonces, en los días en los que logramos detectar PBMC positivas a p24, esperaríamos un efecto similar al observado en el día 1 después de la infección, ya que cuando se detectan PBMC positivas a p24 existe una disminución en la expresión de moléculas MHC clase I en éstas células.

La figura 13 muestra las gráficas obtenidas tras haber comparado el cultivo no infectado con toda la población del cultivo infectado con VIH-1. Como se puede observar, a excepción del donador B en el día 7 después de la infección, en los días 4, 7 y 11 en la mayoría de los donadores, la expresión de moléculas MHC

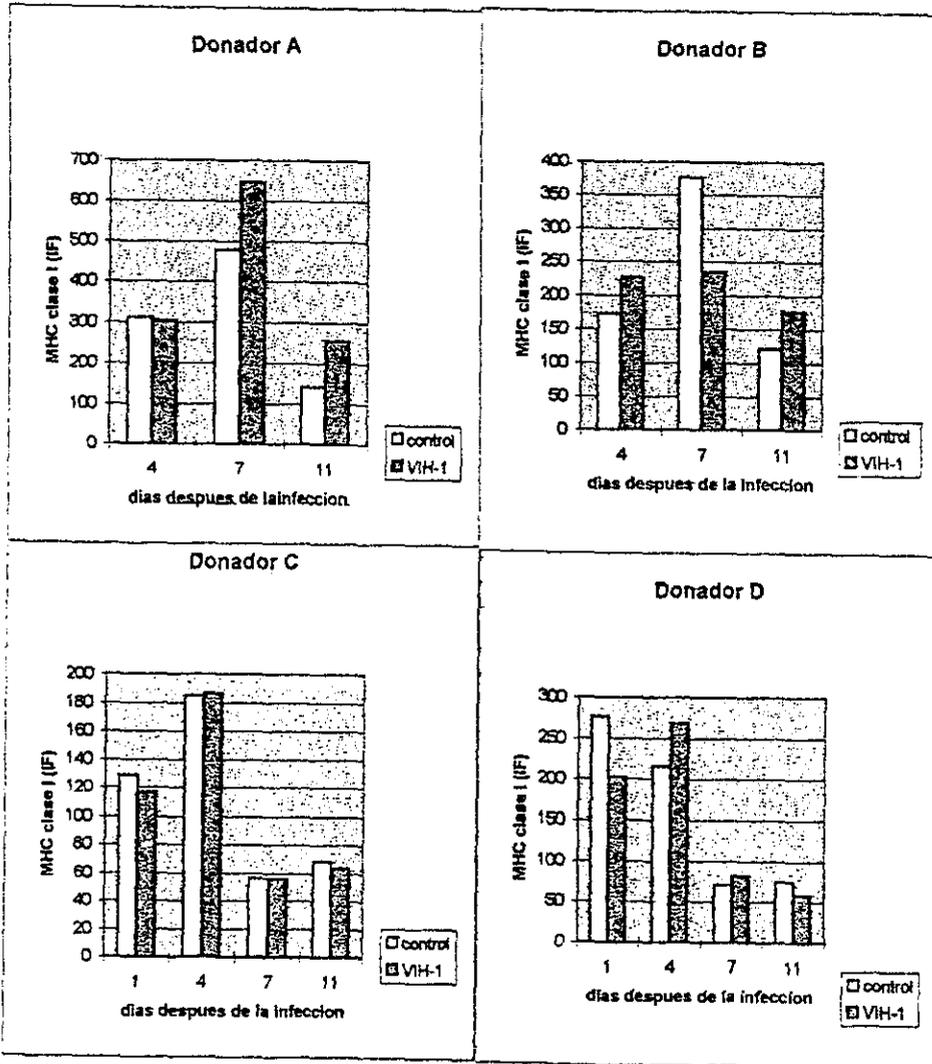


Fig. 13. Expresión de moléculas MHC clase I en el cultivo no infectado (control en la gráfica) vs toda la población del cultivo infectado con VIH-1 (células p24 positivas + células p24 negativas) durante el tiempo de experimentación (los donadores A y B no presentan datos en el día 1 después de la infección debido a que no se tomó muestra ese día).

clase I es por lo general más alta o similar en el cultivo infectado con VIH-1 comparada con el cultivo control. En otras palabras, el porcentaje de infección obtenido en los cultivos infectados con VIH-1 es tan pequeño, que cualquier cambio en el patrón de expresión de moléculas MHC clase I en células positivas a p24 no afecta en términos globales en el balance final al momento de tomar en cuenta a la población de PBMC p24 negativas del mismo cultivo; lo que indica que las diferencias observadas entre el cultivo no infectado y el cultivo infectado con VIH-1 en el día 1 después de la infección no tienen que ver con la sensibilidad del método, sino probablemente a la variación inter-pozos de la cual se había hablado anteriormente.

No toda la población positiva a p24 afectó de la misma manera la expresión de las moléculas MHC Clase I (tabla 2). En esta tabla podemos ver como en todos los días de experimentación en los que se detectan PBMC antígeno p24 positivas, existen dos subpoblaciones distinguidas entre sí por la media de intensidad de fluorescencia del anticuerpo contra p24 de VIH-1: una población con mayor intensidad de fluorescencia y una con menor. Existe una correlación aún más interesante, a mayor intensidad de fluorescencia para el antígeno p24 de VIH-1, menor la expresión de moléculas MHC Clase I, así como ausencia del receptor CD4; no así en la población con menor intensidad de fluorescencia para el antígeno p24 de VIH-1, en la que la expresión de moléculas MHC Clase I es ligeramente mayor, además de presentar todavía el receptor CD4. Es importante aclarar que aún cuando dentro de la población positiva a VIH-1, existe una subpoblación caracterizada por una mayor intensidad en la media de fluorescencia para moléculas MHC Clase I, el nivel de expresión de éstas moléculas siempre es menor con relación a las PBMC antígeno p24 negativas del cultivo infectado con VIH-1 (Fig. 12) así como con las PBMC del cultivo no infectado.

**TABLA 2.** Medias de intensidad de fluorescencia de moléculas MHC clase I y VIH-1 en PBMCs CD4- y CD4+ dentro de la población antígeno p24\*.

Días después de la infección	Población CD4	Moléculas MHC clase I (Media de Fluorescencia)	VIH-1 (Media de Fluorescencia)
1	-	-	-
	+	-	-
4	-	100.88	1106.29
	+	177.32	825.94
7	-	35.28	397.05
	+	47.42	288.92
11	-	55.37	819.56
	+	70.9	522.88

\* aunque los datos corresponden al donador D, son representativos de lo que ocurrió con el resto de los donadores.

Algo importante de aclarar es que el hecho de que haya dos subpoblaciones dentro de la población positiva a VIH-1, distinguidas entre sí por la media de intensidad de fluorescencia del anticuerpo unido al antígeno viral; ya que esta distinción no está relacionada forzosamente con el hecho de que exista una población que esté más infectada que la otra, ya que los niveles elevados de la media de fluorescencia para p24 detectados, podrían concentrarse en una sola célula o bien en un grupo de células distribuidos de manera homogénea.

Ahora bien, debido a que los resultados anteriores sugieren un efecto colateral en la expresión del receptor CD4 a altas intensidades de fluorescencia para p24, decidimos corroborar si lo observado se debía a un efecto en las células por la infección de VIH-1, o bien se trataban de poblaciones celulares distintas a las que

el VIH-1 estaba infectando. Para esto, decidimos con base al criterio de morfología mediante citometría de flujo ("forward scatter " y "side scatter"), analizar las células antígeno p24 positivas. Si ambas subpoblaciones resultaran ser las mismas bajo el criterio de morfología (tamaño y granularidad), querría decir que se trata de una misma población a la que VIH-1 está infectando, que a altas intensidades de fluorescencia para p24 disminuye la expresión del receptor CD4. Si por el contrario, se tratara de poblaciones celulares morfológicamente distintas, querría decir que VIH-1 está infectando poblaciones diferentes (una que "naturalmente" es positiva a CD4 y otra que es negativa), lo que probablemente estaría determinando la facilidad para establecer la infección.

Los resultados obtenidos a raíz de este análisis no fueron tan claros como hubiéramos esperado, ya que en la población CD4+ (Fig.14b) parece haber más de una población celular morfológicamente hablando: una pequeña y bien distinguida en donde probablemente estarían los linfocitos, y otra subpoblación ligeramente más grande, menos definida en donde se encuentran células en un rango más amplio de tamaño y granularidad. Este mismo resultado se observa en la fig.14c, es decir en la población CD4-. Si bien es cierto que la población CD4+ y la población CD4- no están integradas por una sola población celular bien definida, el hecho de que ambas poblaciones (CD4+ y CD4-) tengan las mismas subpoblaciones en términos morfológicos podría sugerir un efecto de la infección por VIH-1 en la expresión de CD4.

### **VIH-2 estimula la expresión de moléculas MHC Clase I**

Una de las razones fundamentales por las que muy poca gente en el mundo trabaja con VIH-2 es porque el número de gentes infectadas es muy reducido comparadas con los individuos VIH-1 infectados; esto es básicamente debido a

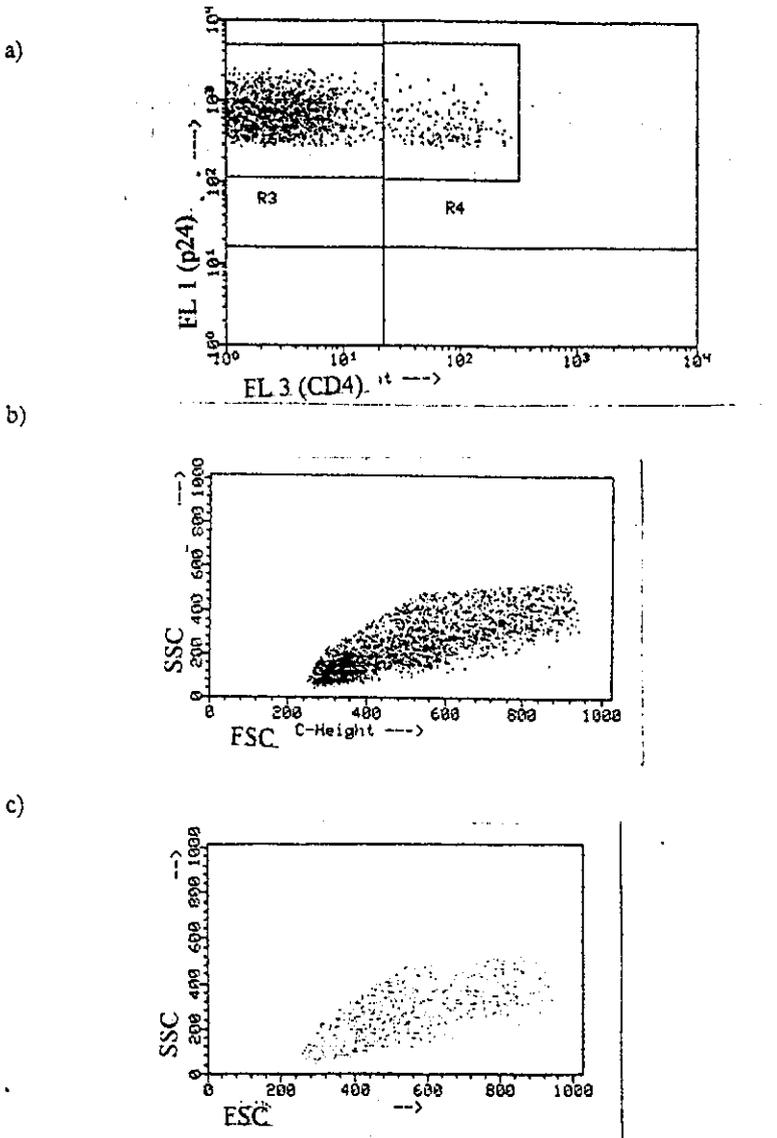


Fig. 14. PBMC p24 positivas analizadas bajo el criterio de morfología por citometría de flujo (datos del donador D, pero representativos del resto de los donadores). A) Población total de PBMC p24 positivas; R4 contiene a la población CD4<sup>+</sup> y R3 a la población CD4<sup>-</sup>. B) Población CD4<sup>+</sup> (colectadas de la compuerta R4) y C) Población CD4<sup>-</sup> (colectadas de la compuerta R3).

que su distribución está restringida a un área muy pequeña a nivel mundial. Esto lo menciono, porque encontrar anticuerpos que detecten infección por VIH-2 y que además sirvan para citometría de flujo es muy difícil, ya que son muy pocas (por no decir que dos) las compañías que los producen. Sin embargo, logramos encontrar un anticuerpo que medianamente funcionó (mas adelante explicaré porqué medianamente).

Lo primero que se hizo fue corroborar que el anticuerpo contra p26 de VIH-2 funcionaba. Para esto procedimos a analizar como único parámetro, la media en la intensidad de fluorescencia del anticuerpo en cuestión en cada una de las cepas de VIH-2 probadas (MS y p1629) con relación a las PBMC control en cada uno de los días de experimentación.

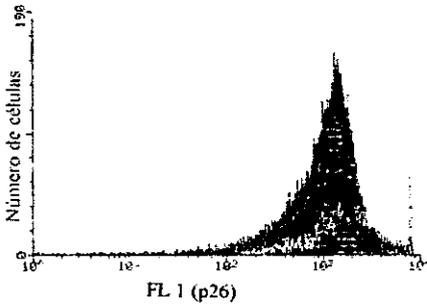
Los datos obtenidos con VIH-2 que se presentan a continuación, corresponden únicamente a dos de los donadores probados (C y D) ya que debido a razones de temporales, no se pudieron probar a los otros donadores.

La figura 15 (a-e) muestra los resultados obtenidos (la escala en el eje de las Y fue modificada de la misma manera que en el caso de VIH-1 y no representa el número de células detectadas originalmente en el citómetro, ya que tuvo que ser modificada con el fin de que los histogramas obtenidos fueran equiparables).

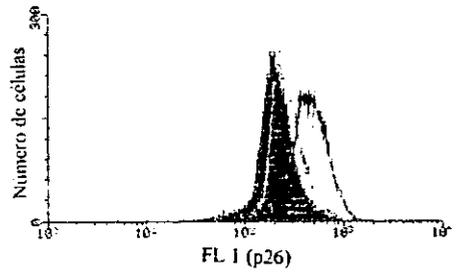
Como se puede observar, en el día 1 después de la infección (Fig.15a), no se detectan PBMC VIH-2 infectados en ninguna de las dos cepas probadas con relación al cultivo no infectado.

En el día 4 después de la infección (Fig.15b), hay un ligero desplazamiento en el histograma correspondiente a las PBMC infectadas con la cepa VIH-2 MS hacia una zona de mayor intensidad de fluorescencia con respecto al histograma del cultivo control, sin embargo, las PBMC infectadas con VIH-2 p1629, aún cuando presentan un ligero desplazamiento, éste es hacia una menor intensidad de fluorescencia con relación al no infectado.

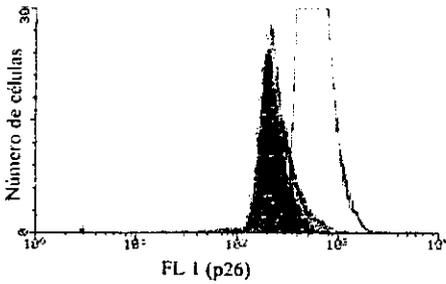
a) 1 día después de la infección



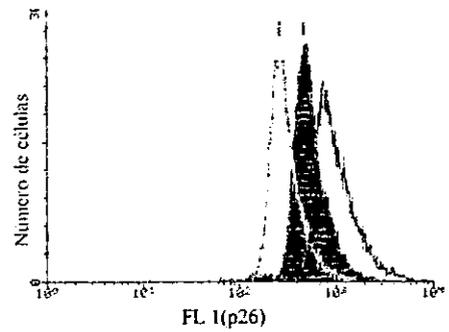
b) 4 días después de la infección



c) 7 días después de la infección



d) 11 días después de la infección



e)

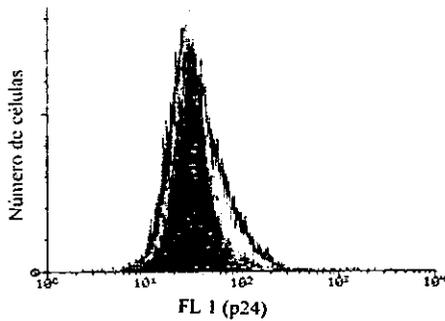


Fig 15. Detección de VIH-2 en los cultivos: no infectados (histograma gris), VIH-2 p1629 (histograma rojo) y VIH-2 MS (histograma verde) durante el tiempo de experimentación (a-d). Tinción con isotipo control en los cultivos descritos anteriormente en el día 11 después de la infección (e) (donador D).

En el día 7 después de la infección, no se detecta infección alguna en la cepa VIH-p1629 ya que su histograma ocupa la misma posición que las PBMC del cultivo no infectado, sin embargo, en las PBMC infectadas con VIH-2 MS podemos observar un alta intensidad de fluorescencia hacia p26 de VIH-2, misma que podría ser un indicativo de un alto grado de infección, ya que su histograma se encuentra desplazado prácticamente en su totalidad con una mayor intensidad de fluorescencia con relación al histograma obtenido para las PBMC del cultivo control (Fig15c).

Finalmente, en el día 11 después de la infección (fig.15d), se observa un desplazamiento de mayor intensidad de fluorescencia del histograma correspondiente a las PBMC infectadas con VIH-2 p1629, así como también en las PBMC infectadas con VIH-2 MS. Con respecto a las PBMC infectadas con la cepa VIH-2 MS, se observa que el desplazamiento observado de su histograma es muy similar a aquel registrado en el día 7 después de la infección.

Estos resultados indican, por un lado, que la infección por VIH-2 MS en las PBMC parece progresa durante los días de experimentación, hasta llegar a un máximo en el día 11 después de la infección; sin embargo por el otro lado, en el caso de la infección por VIH-2 p1629, el anticuerpo no parece detectar infección en el cultivo infectado con VIH-2 p1629 debido a las fluctuaciones discordantes en la posición con respecto a su histograma y al cultivo no infectado.

Para corroborar que los desplazamientos obtenidos en los histogramas de las PBMC infectadas con VIH-2 MS eran debido a la infección detectada y no a desplazamientos aleatorios, se introdujo un anticuerpo control. El anticuerpo elegido fue un anticuerpo monoclonal murino vs VIH-1 p24 IGg1; que aunque no sería el mejor candidato debido a que también detecta infección por VIH, aunque en este caso VIH-1 (normalmente se utilizan anticuerpos que no están relacionados con el experimento), lo utilizamos ya que sabíamos de antemano que no tenía reacción cruzada con VIH-2 (datos que no se muestran en ésta tesis), además de que carecíamos de otro isotipo control a nuestra disposición en

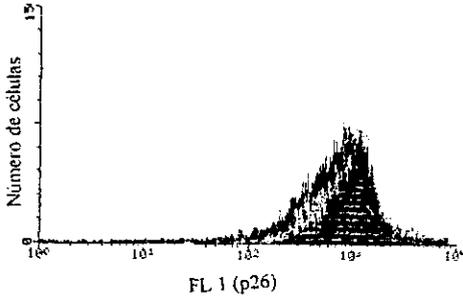
ese momento. Es importante señalar que lo ideal hubiese sido introducir el anticuerpo control en cada uno de los días de experimentación, sin embargo, por razones diversas no pudo ser posible sino hasta el día 11 después de la infección.

Los resultados obtenidos tras haber aplicado el anticuerpo control se muestran en la figura 15e. Como se observa, no existe ningún desplazamiento entre los histogramas obtenidos para cada uno de los diferentes cultivos tratados, lo que indica, si los comparamos con los resultados obtenidos del mismo día de infección (día 11) con el anticuerpo murino contra VIH-2 p26 (Fig15d), que los desplazamientos observados en las PBMC infectadas con VIH-2 MS muy probablemente sean ocasionados por efecto de la infección y no debido a eventos aleatorios; es decir, que la unión del anticuerpo a p26 de VIH-2 MS es específica.

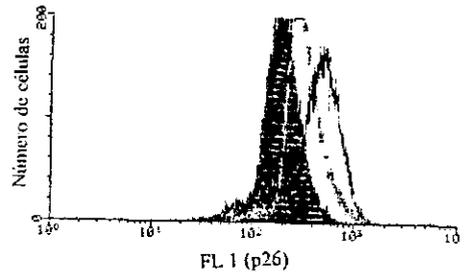
Es importante mencionar que resultados muy semejantes se obtuvieron con el donador C (fig. 16 a-e). La única diferencia importante radica en el día 11 después de la infección (fig.15d), en la que a diferencia del donador D en el que el pico de la infección permanece, en el donador C no se detectan PBMC infectadas con VIH-2 MS. Pensamos que éstas diferencias se pueden explicar a través del número inicial de PBMC con el que comenzamos el experimento (ya que contábamos con menos células en éste donador), e incluso podría explicarse a través de las características genéticas de cada donador.

La tabla 3 resume los porcentajes de infección por VIH-2 MS para cada uno de los donadores a lo largo de los días de experimentación.

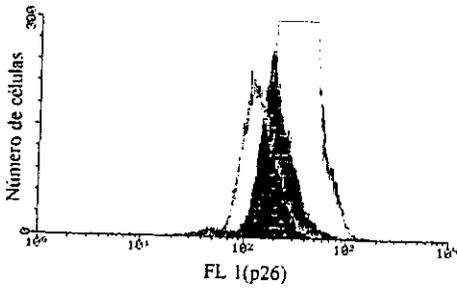
a) 1 día después de la infección



b) 4 días después de la infección



c) 7 días después de la infección



d) 11 días después de la infección

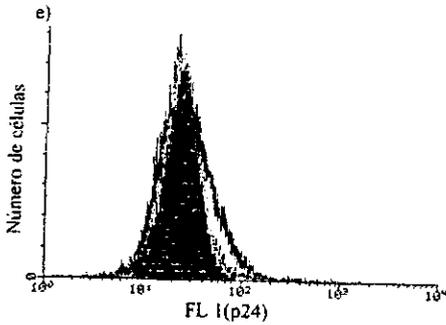
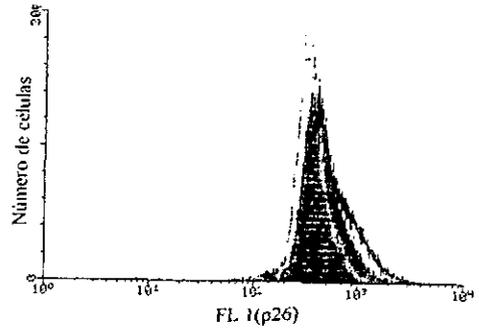


Fig 16. Detección de VIH-2 en los cultivos: no infectados (histograma gris), VIH-2 p1629 (histograma rojo) y VIH-2 MS (histograma verde) durante el tiempo de experimentación (a-d). Tinción con isotipo control en los cultivos descritos anteriormente en el día 11 después de la infección (e) (donador C).

**TABLA 3.** Porcentajes de Infección en los cultivos infectados con VIH-2 MS durante los días de experimentación en ambos donadores.

Días después de la infección	Porcentaje de la infección (%)	
	Donador D	Donador C
1	0	0
4	40	20
7	90	50
11	90	0

El hecho de que no se haya podido detectar de manera eficiente la infección por VIH-2 p1629, probablemente es debido a una baja infectividad de esta cepa viral. Como sabemos, VIH-2 p1629 y VIH-1 JRFL #3 fueron inoculados a las mismas dosis infectivas; si los porcentajes de infección detectados en PBMC infectados con VIH-1 fueron extremadamente bajos, esperaríamos que también lo fueran para VIH-2 p1629. Quizás entonces, el anticuerpo contra VIH-2 no es lo suficientemente sensible para detectar bajas dosis de infección. No así en las PBMC infectadas con VIH-2 MS, en donde a pesar de que no pudimos establecer las dosis infectivas, sabíamos de antemano, tanto por el volumen adicionado, como por los ensayos de transcripción inversa (RT), que el porcentaje de infección era mucho mayor, lo que ayudó a que el anticuerpo pudiera detectar la infección. Otra posibilidad que contemplamos es que el epítipo contra el cual estuviera dirigido el anticuerpo fuera diferente en VIH-2 p1629, ya que VIH-2 MS es un virus bien caracterizado adaptado a líneas celulares contra el cual probablemente se originó el anticuerpo, mientras que VIH-2 p1629 es un aislado primario (proveniente de una trabajadora del sexo de Senegal), apenas estudiado.

Una vez probado el anticuerpo para la detección de VIH-2, procedimos a analizar la expresión de moléculas MHC clase I durante el tiempo de experimentación en ambos donadores (Fig. 17).

En ambos donadores se observa como en las PBMC del cultivo no infectado, las PBMC p26 negativas y positivas del cultivo infectado con VIH-2 MS, la expresión de moléculas MHC clase I tiende a ser relativamente constante hasta el día 4 después de la infección, sin embargo a partir del día 7 esta expresión decae (un fenómeno muy similar al observado en los cultivos infectados con VIH-1); sin embargo, se ve muy claramente como aún cuando todas las poblaciones celulares siguen la misma cinética a través del tiempo de la infección, las PBMC positivas a p26 presentan una mayor expresión de moléculas MHC clase I (siempre y cuando se detecten células positivas a p26) en comparación con las PBMC negativas a p26 y a las PBMC del cultivo no infectado. Algo interesante que se observa es que al igual que en la infección por VIH-1, las PBMC negativas a p26 del cultivo infectado con VIH-2 MS expresan por lo general mayores cantidades de moléculas MHC clase I en comparación con las PBMC del cultivo no infectado, lo que podría sostener la hipótesis previamente planteada en la que la infección por VIH estuviera causando la liberación de alguna citocina que repercutiera indirectamente en las células de la periferia p26 negativas.

Una vez probado el anticuerpo para la detección de VIH-2, procedimos a hacer la comparación entre las PBMC infectadas con VIH-2 MS y las PBMC que no se lograron infectar del mismo cultivo en cuanto a la expresión de moléculas MHC Clase I.

En el día 1 después de la infección (Fig.18 a), debido a que no se detectaron PBMC positivas a p26 o infectadas por VIH-2 MS, se hizo un análisis similar al de la infección por VIH-1, en donde se tomó en cuenta a toda la población de PBMC

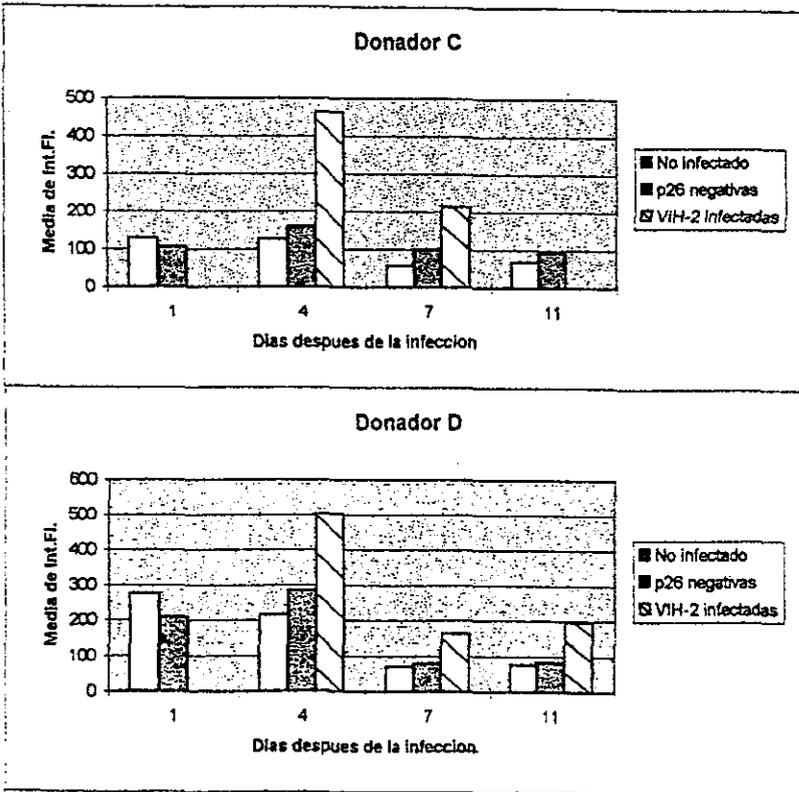
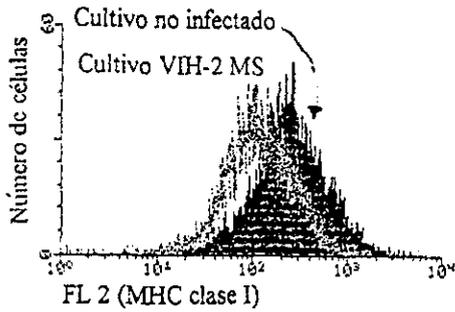
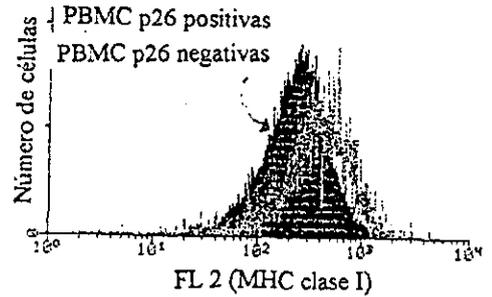


Fig. 17. Medias de fluorescencia relacionadas con la expresión de moléculas MHC clase I en el cultivo no infectado, y las PBMC p26 negativas y positivas del cultivo infectado con VIH-2 en ambos donadores, durante el tiempo de experimentación.

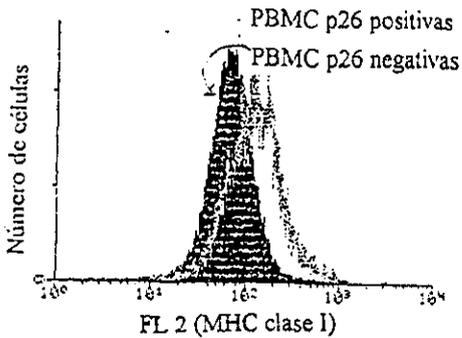
a) 1 DIA DESPUES DE LA INFECCION  
(0% de infección)



b) 4 DIAS DESPUES DE LA INFECCION  
(20% de infección)



c) 7 DIAS DESPUES DE LA INFECCION  
(40 % de infección)



d) 11 DIAS DESPUES DE LA INFECCION  
(80 % de infección)

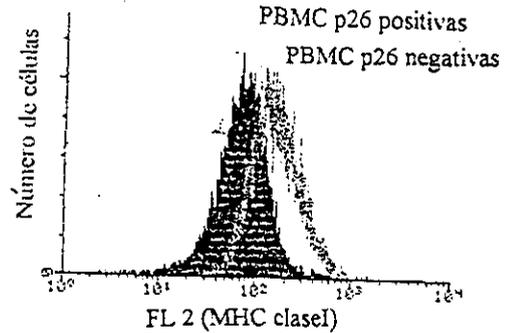


Fig 18. Expresión de las moléculas MHC clase I en las PBMC VIH-2 MS infectadas durante el tiempo de experimentación (donador D).

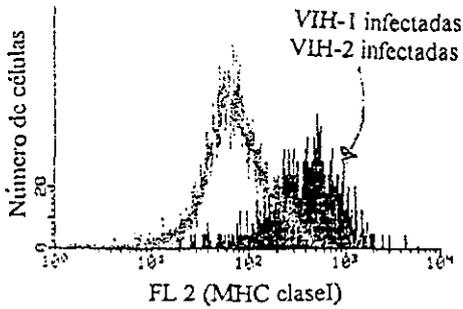
del cultivo infectado con VIH-2 MS para compararlas con las PBMC del cultivo no infectado.

Al igual que en los cultivos infectados con VIH-1, el cultivo no infectado muestra una mayor expresión de moléculas MHC clase I (MF=276.2), a diferencia del cultivo infectado con VIH-2 MS, el cual presenta una menor expresión de moléculas MHC clase I (MF=209.2).

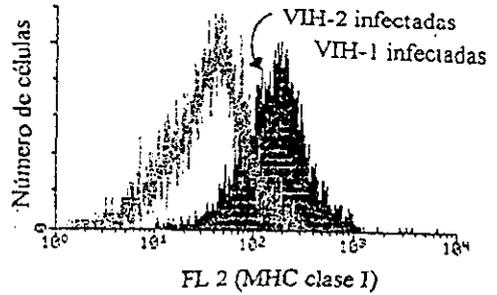
Debido a que al cabo de 4 días de realizada la infección detectamos alrededor de 40% de células infectadas (tabla 3), pudimos comparar en cuanto a la expresión de moléculas MHC clase I, a las PBMC p26 positivas contra las PBMC antígeno p26 negativas del cultivo infectado con VIH-2 MS (fig.18b). En esta figura, se observa como las PBMC p26 positivas presentan una mayor expresión de moléculas MHC clase I (MF=502.75) con relación a las PBMC p26 negativas del mismo cultivo (MF=284.04). Este fenómeno persiste conforme aumenta el porcentaje de infección, es decir, hasta el 90% de infección detectado tanto a los 7 (PBMC p26 positivas MF=163.52 y PBMC p26 negativas MF=78.92), como a los 11 días después de llevada a cabo la infección (PBMC p 26 positivas MF=196.9 y PBMC p26 negativas MF=83.61).

Ahora bien, si comparamos las células VIH-2 MS infectadas con las células VIH-1 JRFL #3 infectadas (Fig. 19), vemos que desde el momento en que se detecta infección, es decir a partir del día 4 después de haber llevado a cabo la misma, las PBMC positivas a p26 o infectadas con VIH-2 MS tienen una mayor expresión de moléculas MHC Clase I comparadas con las PBMC positivas a p24 o infectadas con VIH-1 JRFL #3 (Fig 19 a,b y c).

a) 4 DIAS DESPUES DE LA INFECCION



b) 7 DIAS DESPUES DE LA INFECCION



c) 11 DIAS DESPUES DE LA INFECCION

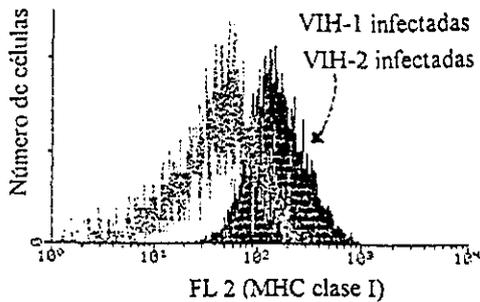


Fig 19. Modulación en la expresión de las moléculas MHC clase I en las PBMC p26 positivas para VIH-2 MS vs las PBMC positivas para p24 de VIH-1 JRFL # 3 durante el tiempo de experimentación, (datos del donador D, pero representativos del condaor C).

## **VIH-2 MS así como VIH-1 controlan la expresión de CD4 por un mecanismo indirecto**

La figura 20 muestra el impacto de la infección tanto por VIH-2 MS, VIH-2 p1629, así como VIH-1 JRFL #3 en la expresión del receptor CD4 en toda la población (es decir, tanto en las células infectadas y células no infectadas del mismo cultivo).

Como se puede observar, un patrón general en todos los cultivos es al aumento en el porcentaje de células negativas a CD4, es decir, un aumento en la pérdida del receptor CD4. Las diferencias más significativas entre los cultivos se observan a partir del día 7 después de la infección, en donde se observa claramente que el cultivo VIH-1 infectado así como el cultivo VIH-2 p1629 tienden a perder de manera más pronunciada el receptor CD4, mientras que el cultivo VIH-2 MS y el cultivo control, aunque lo pierden, lo hacen de manera menos drástica.

Debido a que además de la población infectada estamos tomando en cuenta la población antígeno viral negativa, que en el caso de los cultivos infectados con VIH-1 y VIH-2 p1629 era la mayor parte de la población debido a los bajos porcentajes de infección, nos llevó a sugerir que la infección por éstos virus indirectamente estuviera provocando la liberación de algún factor soluble (por ejemplo alguna citocina), que esté regulando la expresión de CD4 en la población antígeno viral negativa.

El hecho de que VIH-2 MS se comportara prácticamente igual que el cultivo no infectado, es decir, con muy poco efecto en la expresión de CD4, y el hecho de que supiéramos que la mayoría de las células estuvieran infectadas por VIH-2 MS, nos dice que no existe un control en la expresión de CD4 por efecto de la infección por VIH-2 MS, ya que lo observado parece deberse a un control más bien inespecífico en la expresión de este receptor como ocurre en el cultivo control. Estos resultados nos llevaron a analizar la expresión de CD4

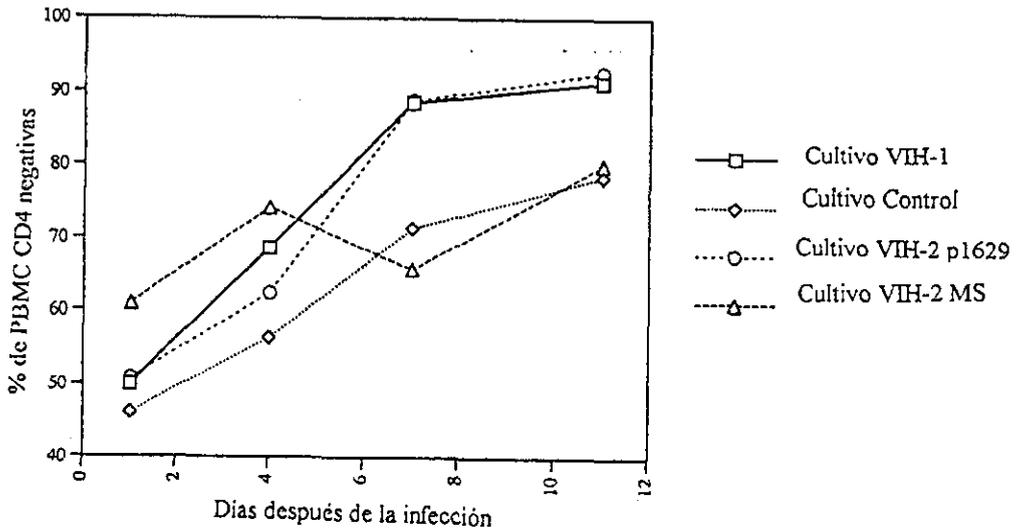


Fig.20. Porcentaje de células negativas al receptor CD4 en la población total del mismo cultivo (PBMC antígeno viral positivas + PBMC antígeno viral negativas) en los cultivos VIH-1, VIH-2 y No infectado durante el tiempo de experimentación (datos correspondientes al donador D, aunque representativos del donador C).

exclusivamente en las células infectadas o lo que es lo mismo, en las células antígeno viral positivas.

Con relación al porcentaje de células CD4+ (Fig.21), vemos que las diferencias aparentemente mas significativas se presentan en los días 4 y 11 después de la infección entre las PBMC infectadas con las distintas cepas virales. Las células infectadas con VIH-1 son las que presentan un menor porcentaje de células positivas a CD4, seguidas de las PBMC infectadas con VIH-2 y finalmente las PBMC del cultivo no infectado; e incluso es interesante observar que el porcentaje de PBMC CD4+ disminuye en las células infectadas drásticamente en el día 11 en comparación con el día 4, sin embargo conservando la misma relación en cuanto a magnitud de porcentaje de células CD4+ entre las infectadas con las diferentes cepas virales.

La figura 22 muestra el análisis del porcentaje de PBMC CD4- en los distintos cultivos durante el tiempo de experimentación. Como se observa, las diferencias aparentemente mas importantes entre las PBMC infectadas se dan en el día 4 después de la infección. En este día, en orden decreciente en cuanto a porcentaje de PBMC CD4-, lo ocupa en primer lugar las PBMC infectadas con VIH-1, después las PBMC infectadas con VIH-2 MS y finalmente las PBMC del cultivo no infectado. De modo que las PBMC infectadas con VIH-1 son las que tienden a perder de manera mas pronunciada CD4 seguidas de las PBMC infectadas con VIH-2 MS y finalmente las PBMC del cultivo no infectado.

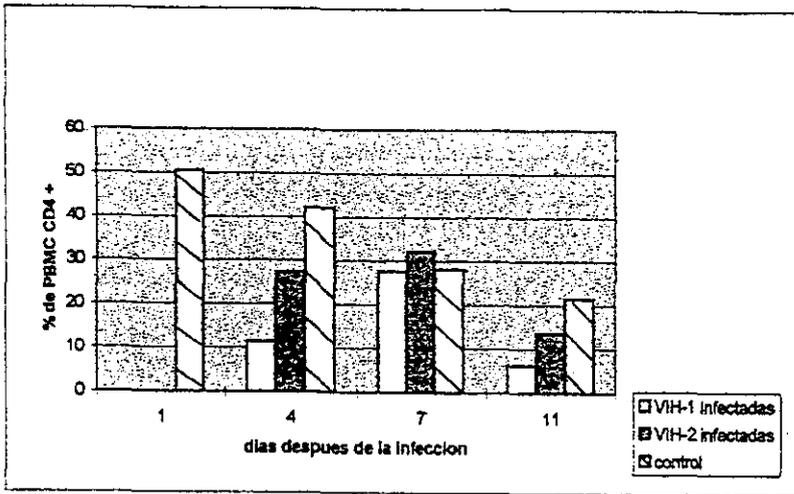


Fig.21. Porcentaje de células positivas a CD4 en la población de PBMC positivas a p24 de VIH-1, p26 de VIH-2 MS, así como en el cultivo no infectado (control en la gráfica). Datos correspondientes al donador D, pero representativos también del donador C.

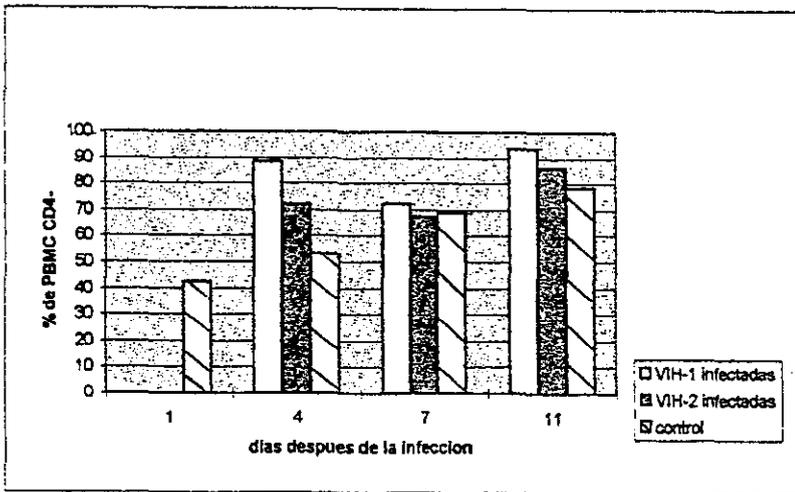


Fig.22. Porcentajes de células negativas a CD4 en la población de PBMC positivas a p24 de VIH-1, p26 de VIH-2 MS, así como en el cultivo no infectado (control en la gráfica). Datos correspondientes al donador D, pero representativos también del donador C.

## DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, la infección por VIH-1 controla la expresión de moléculas MHC Clase I, en cambio, VIH-2-MS no controla la expresión de las moléculas MHC Clase I, sino por el contrario, estimula su expresión.

Es importante resaltar que aunque nosotros usamos un aislado primario macrófago-trópico (VIH-2 p1629) y un aislado secundario (VIH-2 MS) que ordinariamente crece en líneas celulares monocíticas, no pudimos obtener ningún resultado del cultivo infectado con VIH-2 p1629 debido, nosotros creemos, a la poca sensibilidad del anticuerpo en cuestión, incapaz de detectar bajas cantidades de infección. De modo que los resultados que obtuvimos con relación a VIH-2, en realidad corresponden únicamente a la cepa VIH-2 MS. En este sentido, habría que reconsiderar el experimento, tratando con dosis infectivas altas e iguales para las distintas cepas de VIH-2 (tanto para VIH-2 MS como VIH-2 p1629), para rectificar que el hecho de que no hayamos obtenido resultados para las PBMC infectadas con VIH-2 p1629 era debido a la poca sensibilidad del anticuerpo, y por el otro lado, para observar de esta manera si se repite el mismo efecto de estimulación en la expresión de moléculas MHC clase I previamente registrado. Inclusive sería interesante trabajar con cepas virales distintas a las empleadas en éste experimento, las cuales pudieran ser de un aislado primario linfotrópico y de un aislado secundario que creciera en líneas celulares T, para poder afirmar contundentemente que VIH-2 no controla la expresión de las moléculas MHC Clase I.

No tendría relevancia alguna los resultados obtenidos si no los ubicáramos dentro del contexto inmunológico, es decir, si no tratáramos de establecer las posibles repercusiones *in vivo* de tales modulaciones en la expresión de moléculas MHC Clase I por ambos tipos de virus. En este sentido, es importante mencionar que la gran mayoría de los estudios que han demostrado el papel tan

preponderante que juegan los CTLs en el control de la infección por VIH-1, han sido realizados en células blanco construídas artificialmente (17-24,35). Esto es, células B que han sido inmortalizadas con el virus Epstein-Barr, son dotadas de péptidos específicos de VIH-1, para que estas células únicamente se encarguen de presentarlos a los CTLs. En otras palabras, el enfoque de estos estudios va encaminado a determinar el grado de funcionalidad y especificidad de los CTLs de personas infectadas; sin embargo, ninguno de ellos enfoca su atención al papel que podrían jugar las células que se infectan directamente con el virus como células presentadoras ante la presencia de los CTLs.

Actualmente existen muy pocos estudios que han analizado la actividad de los CTLs ante células infectadas con el virus. Sin embargo, existe uno de ellos relativamente reciente (36), que sostiene que la infección por VIH-1, aún cuando genera un control en la expresión de las moléculas MHC Clase I en las células que infecta (aunque cabe mencionar que la modulación en la expresión de las proteínas MHC Clase I que se detecta es apenas perceptible), el reconocimiento y por lo tanto la eficiencia de la lisis ocasionada por los CTLs no se ve afectada. Sin embargo, me parece que hay que tomar en cuenta un par de factores de este estudio que a mi modo de ver podrían alejarse de lo que pudiera estar ocurriendo *in vivo*. Uno de ellos es el hecho de que hayan trabajado con virus de aislados secundarios, es decir, virus que crecen exclusivamente en líneas celulares (ellos en particular utilizaron VIH-1 IIIIB), y el otro factor es precisamente el hecho de que hayan infectado líneas celulares. Esto podría ser lejano a lo que ocurre *in vivo*, ya que en primer lugar, los virus adaptados a líneas celulares están seleccionados. Quizás éste proceso de selección conservó a los virus que tuvieran alguna mutación en *nef* que impidiera un control en la expresión de las moléculas MHC Clase I, ya que como se sabe, Nef parece estar involucrada en el control de la expresión de moléculas MHC clase I (28-30).

Además, el hecho de trabajar con líneas celulares en las que las células están constantemente activadas, pudiera provocar una expresión constitutiva de toda clase de moléculas, entre las que pudieran estar las MHC Clase I que, aunado a

la rapidez en la replicación viral, no da oportunidad para una modulación de éstas moléculas conspicua.

Por todo lo anteriormente mencionado es que presento cierto escepticismo ante la interpretación de los trabajos realizados, por lo que pienso que un estudio más apegado a lo que pudiera estar ocurriendo *in vivo* sería con base a estudios como el nuestro, en donde se probara la actividad de los CTLs ante PBMCs infectadas con el virus completo, preferentemente de aislados primarios, a manera de simular lo que ocurre en un contagio por vía intravenosa. En el mejor de los casos, sería muy interesante establecer un cultivo de células de Langerhans (dejando que se diferencien hacia células dendríticas), posteriormente infectarlas con el virus completo proveniente de aislados primarios, y finalmente someter a prueba la actividad de los CTLs ante éstas, con la idea de simular lo que ocurre a nivel de las mucosas en el momento de la presentación del antígeno, cuando hay contagio por acto sexual, una de las rutas más comunes de transmisión del VIH.

Ahora bien, es importante mencionar que la realización de un experimento que someta a prueba la funcionalidad de los CTLs ante un protocolo como el de este proyecto resulta bastante complicando, ya que hay que tomar en cuenta los siguientes factores: 1) que las células blanco tengan el mismo haplotipo que los CTLs ; 2) que las células permanezcan viables por un tiempo razonable después de haber sido infectadas y 3) que la infección en las células blanco se mantenga, de modo que se garantice una constante expresión de péptidos virales.

Si para VIH-1 existen pocos estudios que hayan evaluado la funcionalidad de los CTLs ante células infectadas con el virus completo, en VIH-2 no existe estudio alguno. Sin embargo, un punto muy importante a considerar al respecto, es que para que la estimulación en la expresión de moléculas MHC Clase I por efecto de la infección por VIH-2 pudiera ser relevante dentro del contexto inmunológico y consecuentemente en la patogénesis observada, ya que como sabemos existe un

*largo período asintomático en individuos infectados con VIH-2 (entre 15-20 años). Antes que nada, habría que probar, bajo el modelo experimental que seguimos, que efectivamente la eficiencia en la respuesta citotóxica de los CTLs se ve disminuida cuando existe infección por VIH-1 debido al control en la expresión de moléculas MHC clase I, y entonces sí, someter a prueba la capacidad efectora de los CTLs ante PBMC infectados con VIH-2. Sin esta clase de experimentos, las diferencias encontradas entre ambos virus en cuanto a la modulación de las moléculas Clase I no serían importantes en términos de las posibles repercusiones que pudieran tener *in vivo* en cuanto a la capacidad del sistema inmune para posteriormente eliminar al virus.*

En el estudio que realizamos para VIH-1 trabajamos con un aislado primario *macrófago-trópico* (aislado de un paciente de San Francisco). Sería interesante trabajar el mismo modelo de infección en PBMC, sólo que con VIH-1 *linfotrópicos*, como una posible representación del efecto que pudiera tener este tipo de virus en etapas terminales de la infección, ya que como sabemos, la *progresión hacia SIDA* está íntimamente ligada al cambio de fenotipo viral de *macrófago-trópicos* a *linfotrópicos* (13). Esto quizás podría ayudar a elucidar, por un lado, si el cambio en el fenotipo viral *exacerba el efecto observado en el control de la expresión de moléculas MHC Clase I* y consecuentemente, por el otro lado, si este efecto tiene alguna repercusión más evidente en el reconocimiento y por lo tanto lisis por parte de los CTLs de células infectadas por el virus.

El otro tema que resulta interesante para discutir, y que sin ser parte del objetivo inicial de este trabajo brindó resultados muy interesantes, es el papel del receptor CD4 en la infección por VIH.

Como se observó, la magnitud de fluorescencia para p24 de VIH-1 es inversamente proporcional a la expresión del receptor CD4 (tabla 2). Además, el control en la expresión de CD4 no sólo se observa en la población antígeno p24 positiva, sino en la población de PBMC negativas a p24 de VIH-1 (Fig.12). Este hecho podría hablar de la liberación de alguna citocina como *IL-4*, que estuviera

actuando como consecuencia de un cierto umbral de infección causado por VIH-1, y modulando de esta manera la expresión de CD4 en las células no infectadas. Hablo de IL-4 por dos razones fundamentalmente; la primera es porque ya se ha probado, al menos en timocitos fetales y postnatales, que la infección por VIH-1 en cultivos ricos en IL-2 +IL-4 disminuyen los números absolutos de células CD4 positivas (37) ; y segunda, porque estudios *in vitro* han demostrado que la infección primaria por VIH-1 en PBMC se caracteriza tempranamente por la secreción de citocinas generadas en una respuesta típicamente Th2, es decir IL-4 e IL-10, semejando lo que ocurre en las etapas tardías de la infección (38). Al parecer estas alteraciones inmunológicas están limitadas temporalmente por el gradual retorno hacia una respuesta Th1.

Pienso que el papel que puede jugar el control en la expresión de CD4, está directamente relacionado con la patogénesis. Si nos damos cuenta, existe una regulación en la expresión de CD4 cuando la célula presenta una alta replicación viral y quizá como consecuencia de ésto, la liberación de IL-4 afectando de ésta manera a las células no infectadas de la periferia. IL-4 es justamente una de las dos interleucinas que predominan en etapas terminales de la infección, cuando comienza el desarrollo de la enfermedad o SIDA. De modo que la pérdida no temporal de CD4 (remarco no temporal, ya que se podría confundir con la fase primaria de la infección, en donde quizás éste fenómeno no ocurre precisamente debido a la baja cantidad de virus infeccioso con el que se infectan los individuos que recién entran en contacto con el virus) podría significar el inicio de la pérdida de linfocitos T CD4+ definitiva que determina el progreso hacia SIDA.

Por otro lado, con respecto a la modulación de CD4 en la infección por VIH-2, tenemos dos casos: el de la cepa VIH-2p1629 que en términos de la población total moduló CD4 como VIH-1, y el caso de la cepa VIH-2 MS que moduló, aunque de manera menos drástica, la expresión del receptor CD4.

Si bien no podemos decir lo que ocurrió en las células infectadas con VIH-2 p1629, podemos decir que el mecanismo indirecto de control de CD4 es diferente

en cada una de las cepas de VIH-2, ya que en términos de la población total de células, la infección por VIH-2 MS aparentemente no controla la expresión de CD4 en comparación con VIH-2 p1629. Probablemente esto tenga una explicación en relación al origen de la cepa viral. Pudiera ser que las cepas de origen primario como es el caso de VIH-2 p1629 y VIH-1 JRFL # 3, controlen de manera más evidente la expresión de CD4 y no así en las cepas de origen secundario, como es el caso de VIH-2 MS. Con relación a esto, existen reportes que sostienen que VIH-2, así como también VIH-1, presentan una gran heterogeneidad biológica en las diferentes cepas, que posiblemente podría influenciar la patogénesis observada en el huésped (39).

Existen dos razones posibles para explicar el hecho de que VIH-2 MS no modulara tan drásticamente CD4 en la población de PBMC infectada. La primera de ellas pudiera tener que ver con la cantidad de virus por célula, que aunque no la medimos, podría ser que ésta sea diferente en células infectadas por VIH-1 y por VIH-2. El hecho de que haya un número elevado de células positivas a p26 en el cultivo infectado con VIH-2, la replicación viral en cada una de ellas pudiera estar controlada y no afectar de manera tan marcada la expresión de CD4; un caso similar a lo que ocurre con una de las subpoblaciones VIH-1 infectadas, en donde en el día 4 la población con menor intensidad de fluorescencia para p24 (MF= 825.9) CD4+, expresa más moléculas MHC clase I (MF=177.32) que la población con mayor intensidad de fluorescencia para p24 (MF=1106.29), CD4- que expresa menos moléculas MHC clase I (MF=100.88) (TABLA 2).

La segunda razón tiene que ver con las características *per se* del VIH-2 MS, ya sea debido a la constante manipulación *in vitro* que ocasiona el fenómeno de selección del que ya había hablado anteriormente, o bien que "naturalmente" el virus tuviera alguna modificación en *nef* que le impidiera modular CD4 de una manera menos eficiente que VIH-1 (40).

Biológicamente, el hecho de que VIH-2 MS no controle la expresión de CD4 tiene ventajas y desventajas. La ventaja es que al conservar CD4 permite que células del sistema inmune como las células B y/o los macrófagos, se mantengan activas

y consecuentemente puedan eliminar al virus. La desventaja es que al conservar CD4 las vuelve un blanco perfecto para co-infecciones con VIH-1, ya que como sabemos, CD4 es uno de los receptores más importantes que permiten la entrada del virus a la célula. Menciono esto, ya que se ha probado que VIH-2 a diferencia de VIH-1, tiene menor afinidad por CD4 (41,42).

Para finalizar, me gustaría mencionar que si bien este estudio brindo resultados interesantes, existen partes del protocolo que habría que cambiar y rehacer como ya se discutió anteriormente; por eso es importante ubicar a este trabajo como un estudio piloto, a partir del cual se abre un camino muy interesante para explorar, pero ya con bases mas sólidas.

## CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado, se puede concluir que :

- 1) La infección por VIH-1 JRFL #3 provoca una disminución en la expresión de moléculas MHC clase I en PBMC 4 y 7 días después de la infección.
- 2) La infección por VIH-1 JRFL #3, así como por VIH-2 p1629, provoca una disminución en la expresión del receptor CD4, tanto en células infectadas así como no infectadas, postulándose un mecanismo indirecto en las células no infectadas. Sin embargo, la infección por VIH-2 MS no parece tener el mismo efecto ya que se comporta más cercano al cultivo control.
- 3) La infección por VIH-2 MS provoca un aumento en la expresión de moléculas MHC clase I en PBMC 4, 7 y 11 días después de la infección.

## REFERENCIAS

- 1.- Eisen H, Sykulev Y y Tsomides T. Antigen-specific T-cell receptors and their reactions with complexes formed by peptides with major histocompatibility complex proteins. *Advances in protein chemistry* 1996; 49: 1-56.
- 2.- Janeway CA y Travers P. 1997. Immunobiology. Current Biology- Garland, London- New York. pag.13:38
- 3.- Liu, Y y Janeway, C.A. Cells that present both specific ligand and co-stimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1992, 89: 3845-3949.
- 4.- Mueller, D.L. y Jenkins, M.K. Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness. *Curr.Opin.Immunol.* 1995, 7: 375-381.
- 5.- Fraser, J.D. et.al. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T-cell accessory molecule CD28. *Science.* 1991, 251: 313-316.
- 6.- Lindsten, T. et.al. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T-cell activation pathway. *Science* 1989, 244: 339-342.
- 7.- Minami, Y. et.al. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Ann.Rev.Immunol.* 1993, 11: 245-267.
- 8.- Paul, W.E y Seder, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 1994, 76: 241-251.
- 9.- Scott, P. Selective differentiation of CD4+ T-helper cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 1993, 5: 391-397.
- 10.- Yoshimoto, T. et.al. Role of NK1.1+ T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production. *Science.* 1995, 270: 1845-1848.
- 11.- Wantanbe, F.R. et.al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992, 356: 314-317.
- 12.- Ramshaw, I. et.al. Expression of cytokines by recombinant vaccinia viruses: a model for studying cytokines in virus infections *in vivo*. *Immunol.Rev.* 1992, 127: 157-182.

- 13.- D'Souza P y Harden V. Chemokines and HIV-1 second receptors. *Nature Medicine* 1996, 2 (12) : 1293-1299.
- 14.- Kanki P et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *The Lancet* 1994, 343: 943-946.
- 15.- Essex M y Kanki P. Human Immunodeficiency virus type 2 (HIV-2). En : *Textbook of Aids Medicine*. USA: Williams and Wilkins.
- 16.- Marlink R et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994, 265: 1587-1590.
- 17.- Ferbas J et al. Virus burden in long -term survivors of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *Journal of Infectious Diseases* 1995, 172 : 329-339.
- 18.- Walker B et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987, 328: 345-348.
- 19.- Yasutomi Y et al. Simian immunodeficiency virus-specific CD8+ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *Journal of Virology* 1993, 67 : 1707-1711.
- 20.- McGuire TC et al. Major histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize env and gag/PR proteins. *Journal of Virology* 1994, 68: 1459-1467.
- 21.- Blacklaws BA et al. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus-infected sheep. *Journal of General Virology* 1994, 75: 1589-1596.
- 22.- Levy JA, Mackewicz CE y Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8 + cells. *Immunology Today* 1996, 17 (15) :217-224.
- 23.- Klein MR et al. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection : a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *Journal of Experimental Medicine* 1995, 181: 1365-1372.
- 24.- Miedema F y Klein MR. Aids pathogenesis : a finite immune response to blame ?. *Science* 1996, 272 : 505-506.
- 25.- Scheppeler JA et al. Downmodulation of MHC-I in a CD4+T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection. *The Journal of Immunology* 1989,143 (9) : 2858-2866.
- 26.- Kerkau T et al. Downregulation of HLA Class I antigens in HIV-1 infected cells. *Aids Research and Human Retroviruses* 1989, 5(6) : 613-620.

- 27.- Kerkau T et al. Mechanism of MHC Class I downregulation in HIV infected cells. *Immunobiology* 1992, 184 (45): 402-409.
- 28.- Gall S et al. Human Immunodeficiency virus type I Nef independently affects virion incorporation of major histocompatibility complex Class I molecules and Virus Infectivity. *Virology* 1997, 229: 295-301.
- 29.- Schwartz O et al. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* 1996, 2(3): 338-342.
- 30.- Mangasarian A et al. The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and the plasma membrane. *Immunity* 1994, : 67-77.
- 31.-Robertson MN et al. Efficient antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes by cells transduced with a retroviral vector expressing the HIV-1 Nef protein. :*AIDS research and human retroviruses* 1993, 9 (12):1217-1223.
- 32.-Kerkau T et al. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the Biosynthesis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Molecules. *The Journal of Experimental Medicine* 1997, 185 (7): 1295-1305.
- 33.- Rinaldo CR. Modulation of Major histocompatibility complex antigen expression by viral infection. *American Journal of Pathology* 1994, 144(4): 637-650.
- 34.- Kuby, J. *Immunology*. W.H.Freeman and Company, New york. Pag 660.
- 35.- Koup RA et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Syndrome. *Journal of Virology* 1994, 68(7) : 4650-4655.
- 36.- Otto YO et al. Efficient lysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology* 1996, 70(9) : 5799-5806.
- 37.- Uittenbogaart CH et al. Effects of cytokines on HIV-1 production by thymocytes. *Thymus* 1994, 23 (3-4): 155-175.
- 38.- Meroni L et al. Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV-1 infection. *AIDS* 1996, 10: 23-30.
- 39.- Castro BA et al. Biologic heterogeneity of Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) strains. *Virology* 1990, 178 (2): 527-534.

- 40.- Garcia JV y Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell surface CD4 by nef. *Nature* 1991, 350: 508-511.
- 41.- Kanki P. Virologic and Biologic features of HIV-2. En : *AIDS and other manifestations of HIV infection.*. New York, Raven Press.
- 42.- Moore JP. Simple methods for monitoring HIV-1 and HIV-2 gp120 binding to soluble CD4 by enzyme-linked immunosorbent assay: HIV-2 has a 25-fold lower affinity than HIV-1 for soluble CD4. *AIDS* 1990, 4: 297-305.