

12.3.05

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología



* 5 3 0 9 5 6 2 2 6 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

VARIABILIDAD DEL VIH-1 GENERADA POR PASES SERIADOS EN CULTIVOS

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por
la licenciada:

Sonsoles Sánchez Palomino

Director de la Tesis:

Dr. Cecilio López Galíndez

Jefe del Servicio de Virología Molecular
Centro Nacional de Biología Celular y
Retrovirus (I.S. Carlos III)

13305

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología



* 5 3 0 9 5 6 2 2 6 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

VARIABILIDAD DEL VIH-1 GENERADA POR PASES SERIADOS EN CULTIVOS

Memoria presentada para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por
la licenciada:

Sonsoles Sánchez Palomino

Director de la Tesis:

Dr. Cecilio López Galíndez

Jefe del Servicio de Virología Molecular
Centro Nacional de Biología Celular y
Retrovirus (I.S. Carlos III)

Alguien me dijo:

"Hay cosas que sólo se debieran olvidar en la noche.

Hay cosas, muchas cosas, que siempre serán noche"

A mis padres,
a Belén y a M^a José.

Quiero expresar mis más profundos agradecimientos y mi reconocimiento al Instituto de Salud Carlos III y a las personas que en él han permitido la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Cecilio López Galíndez la dirección del trabajo realizado, así como la formación y ayuda que de él he recibido.

Así mismo agradezco a la Dra. Josefina Rodríguez de Lecea su intervención como ponente de esta tesis.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Esteban Domingo por su ayuda en la realización y discusión de este trabajo, así como por su interés.

Quiero agradecer a los Drs. Miguel Angel Martínez y Eva María Fenyö por su colaboración, gracias a la cual importantes aspectos de este proyecto pudieron ser completados.

Así mismo quiero agradecer por su apoyo y colaboración técnica a Concha Casado, Lourdes Muñoz, Alicia Rodríguez, Blanca González, Isabel Nájera y José María Varela y a los Drs. Alfredo García Saíz, Lucía Pérez Alvarez e Inmaculada Herrera. Y a Angel del Pozo y Gabriel Jiménez por el trabajo fotográfico.

A los "becarios" y "asociados": Carmen, Susana, Clara, Angel, Juan y Florencio, por sus continuos ánimos, su ayuda con la estadística y los dibujos de los plásmidos.

Al Dr. Jorge Alvar que fue el culpable del inicio de esta historia.

A Gabriel Sánchez por sus correcciones y ayuda desde el comienzo de esta tesis.

Y por último a los Drs. Nieves Villanueva, M^a Eugenia González, Isabel Olivares y José M^a Rojas, por su ejemplo, ayuda y paciencia. Y por mostrarme la otra cara de LA REALIDAD.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral del Instituto de Salud Carlos III.

1.- <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1.- <u>VARIABILIDAD EN VIRUS RNA</u>	2
1.2.- <u>RETROVIRUS</u>	4
1.2.1.- VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1	6
1.3.- <u>CARACTERISTICAS GENERALES DEL VIH-1</u>	6
1.3.1.- ESTRUCTURA DEL VIRION	7
1.3.2.- ESTRUCTURA DEL GENOMA	10
1.3.2.1.- Genes estructurales	11
1.3.2.2.- Genes no estructurales: genes reguladores	12
1.3.2.3.- Genes no estructurales: genes accesorios	16
1.3.3.- CICLO REPLICATIVO	17
1.3.4.- VARIABILIDAD DEL VIH-1	20
1.3.4.1.- Variabilidad genética	20
1.3.4.2.- Variabilidad fenotípica	24
1.4.- <u>OBJETIVOS</u>	26
2.- <u>MATERIALES</u>	27
2.1.- <u>MATERIALES BIOLÓGICOS</u>	28
2.2.- <u>MEDIOS DE CULTIVO</u>	30
2.2.1.- PARA CELULAS EUCARIOTICAS	30
2.2.2.- PARA CELULAS PROCARIOTICAS	30
2.3.- <u>PLASMIDOS</u>	30
2.4.- <u>ENZIMAS</u>	31
2.5.- <u>ISOTOPOS Y AUTORADIOGRAFIA</u>	31
2.6.- <u>MATERIAL PARA ELECTROFORESIS</u>	34

2.6.1.- GELES DE POLIACRILAMIDA	34
2.6.2.- GELES DE AGAROSA	34
2.7.- <u>SECUENCIACION</u>	34
2.8.- <u>SOLUCIONES</u>	35
2.9.- <u>OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS</u>	36
2.10.- <u>MICROSCOPIOS</u>	37
3.- <u>METODOS</u>	38
3.1.- <u>CULTIVO CELULARES</u>	39
3.1.1.- SUBCULTIVOS CELULARES	39
3.1.2.- CRECIMIENTO Y CLONAJE DE VIRUS	39
3.1.2.1.- Co-cultivo con linfocitos de sangre periferia	39
3.1.2.2. Producción de inóculo viral inicial	40
3.1.2.3.- Infección viral en líneas celulares	40
3.1.2.4. Plaqueo	41
3.1.3.- VALORACION DE LA INFECCION	41
3.1.3.1.- Titulación	41
- Por unidades formadoras de placa en MT-4/ml	41
- Por dosis infectivas 50 (DI ₅₀)/ml	41
3.1.3.2.- Detección de antígeno soluble	42
3.1.3.3.- Inmunofluorescencia indirecta	43
3.1.3.4.- Detección de actividad transcriptasa inversa	43
3.1.4.- CARACTERIZACION BIOLOGICA	44

3.2.- <u>OBTENCION DE ACIDOS NUCLEICOS</u>	45
3.2.1. OBTENCION DE DNA	45
3.2.2. OBTENCION DE RNA	45
3.2.3. OBTENCION DE DNA DE PLASMIDOS A GRAN ESCALA: "MAXI-PREP"	46
3.3.- <u>TECNICA DE DETECCION DE DESAPAREAMIENTOS POR DIGESTION CON RNasa A</u>	47
3.3.1.- SINTESIS DE RIBOSONDAS RADIATIVAS	49
3.3.1.1.- Preparación de plásmidos	49
3.3.1.2. Transcripción "in vitro"	51
3.3.2.- HIBRIDACION	53
3.3.3.- TRATAMIENTO CON RNasa A	53
3.4.- <u>MARCAJE DEL DNA DE ϕX174</u>	54
3.5.- <u>SECUENCIACION</u>	54
3.5.1.- SECUENCIACION A PARTIR DEL DNA	54
3.5.1.1.- Reacción de amplificación de DNA (PCR)	55
3.5.1.2.- Reacción de secuenciación por PCR	55
3.5.2.- SECUENCIACION A PARTIR DEL RNA	56
3.5.2.1.- Obtención de cDNA a partir de RNA	56
3.5.2.2.- Secuenciación del dsDNA lineal (PCR) con oligonucleótidos 5'- γ -P ³² -ATP marcado	57
3.6.- <u>ESTUDIO DE PROTEINAS</u>	58
3.7.- <u>NOMENCLATURA</u>	60
3.8.- <u>CALCULOS ESTADISTICOS</u>	60

4.- <u>RESULTADOS</u>	61
4.1.- <u>OBTENCION DEL S61</u>	62
4.2.- <u>OBTENCION DE CLONES BIOLÓGICOS</u>	62
4.2.1.- DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE PLAQUEO PARA VIH-1	62
4.2.2. CLONAJE DEL VIRUS S61	70
4.2.3.- CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS CLONES	70
4.2.3.1.- Caracterización genotípica	7
4.2.3.1.1. Análisis de los clones por la técnica de "mismatches"	70
4.2.3.1.2.- Secuenciación de mutaciones observadas por "mismatches"	78
4.2.3.2.- Caracterización fenotípica	81
- Efecto citopático en células MT-4	81
- Tamaño de las placas	83
- Título de cada clon	85
- Actividad transcriptasa inversa	85
4.3.- <u>PASES SERIADOS DE LOS CLONES</u>	87
4.3.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES	87
4.3.2.- REALIZACIÓN DE LOS PASES SERIADOS	91
4.3.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CLONES DESPUÉS DE LOS PASES	93
4.3.3.1.- Caracterización genotípica	93
4.3.3.1.1.- Análisis del patrón de bandas obtenido por la aplicación de	

la técnica de "mismatches"	93
- Cuantificación de la variabilidad	94
4.3.3.1.2. Secuenciación	100
- Cuantificación de la variabilidad	103
4.3.3.2.- Caracterización fenotípica	106
- Efecto citopático	106
- Cinética de replicación	108
- Tropismo	108
- Estudio de proteínas	111
4.3.3.3.- Cambios genotípicos y fenotípicos obseados en poblaciones virales clanadas a baja m.d.i.	112
4.4.- <u>EVOLUCION "IN VIVO" DEL S61</u>	112
5.- <u>DISCUSION</u>	115
6.- <u>CONCLUSIONES</u>	131
7.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	134

ABREVIATURAS

A	: Adenosina o desoxiadenosina
aa	: Aminoácidos
ARV	: Virus relacionado con SIDA
C	: Citidina o desoxicitidina
°C	: Grado Celsius
Ci	: Curio
cpm	: Cuentas por minuto
CTP	: Citosina-5'-trifosfato
Da	: Daltons
dATP	: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DI ₅₀	: 50% de dosis infectivas
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DNA	: Acido desorribonucleico
DNasa I	: Desoxirribonucleasa I
dNTP	: Desoxirribonucleótido trifosfato
D.O.	: Densidad óptica
dTTP	: Ditiotreitól
dTTP	: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
ECP	: Efecto citopático
EDTA	: Etilendiamino tetracetato disódico
ELISA	: Ensayo inmunoenzimático
FMDV	: Virus de la fiebre aftosa
G	: Guanidina o desoxiguanidina
h	: Horas
HIV-1	: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
HIV-2	: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
HTLV-I	: Virus de la leucemia de las células T tipo 1
IFI	: Inmunofluorescencia indirecta
IL-2	: Interleuquina 2
Kd	: Kilodaltons
Kpb	: Kilopares de bases
LAV	: Virus asociado a linfadenopatias
LB	: Medio de Luria y Bertani
M	: Molar
m.d.i	: Multiplicidad de infección
min.	: minuto

VII

ml	: Mililitro
mM	: Milmolar
mRNA	: Acido ribonucleico mensajero
n	: nucleótido
ng	: nanogramo
nm	: nanometros
NP40	: Nonidet P-40
NSI	: No sincitial
³² P	: Isótopo fósforo 32
pb	: Pares de bases
PBL	: Linfocitos de sangre periférica
PBS	: <i>Tampón salino de fosfato</i>
PEG	: Polietilenglicol
PHA P	: Fitohemaglutinina
pg	: picogramo
PLL	: Poli L-Lisina
RNA	: Acido ribonucleico
RNasa A	: Ribonucleasa pancreática bovina A
r.p.m.	: Revoluciones por minuto
RT	: Transcriptasa inversa
SBF	: Suero bovino fetal
SDS	: Dodecil sulfato sódico
seg	: segundo
SI	: Sincitial
SIDA	: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSC	: Solución salina de citrato
T	: Desoxitimidina
TBE	: Tampón de Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'- tetrametilendiamina
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	: Acido ribonucleico de transferencia
u	: unidades
ufp	: Unidades formadoras de placas
UV	: Ultravioleta
V	: Voltios
vs	: Versus
VSV	: Virus de la estomatitis vesicular
μCi	: Microcurio
μg	: Microgramo
μl	: Microlitro

1.- INTRODUCCION

1.1.- VARIABILIDAD EN VIRUS RNA

La variabilidad genética es una de las propiedades más características de todos los seres vivos y constituye la base de su evolución. La aplicación de nuevas técnicas de biología molecular a los estudios de genética evolutiva ha demostrado, en el terreno molecular, la gran variabilidad genética existente en poblaciones naturales (Ayala, 1980).

Los virus, y sobre todo los virus RNA, no escapan a esta situación, presentando una elevada frecuencia de mutación y, en consecuencia, una rápida evolución. El virus de la gripe constituyó un prototipo en los estudios de la variabilidad existente en estos sistemas. Desde los primeros trabajos, se planteó la necesidad de explicar la gran heterogeneidad observada en los virus con genoma RNA y los cambios genéticos y fenotípicos que se producían. En el plano teórico, se trató de entender el mecanismo que subyacía en esta variabilidad observada, definir la frecuencia de mutación y la distribución de diferentes genotipos (Domingo y Holland, 1988).

Las primeras evidencias de la alta variabilidad genética en virus RNA se obtuvieron con bacteriofagos, a finales de la década de los setenta. En experimentos con el bacteriofago Q β , se pudo cuantificar la variabilidad de los fagos RNA. Se observó que el virus estaba constituido por una mezcla compleja de variantes genómicas, existiendo como media 1-2 mutaciones entre cualquier genoma viable del fago y la secuencia promedio de la población. El estudio también mostró que pases seriados de virus Q β clonados daban lugar a la generación de variantes, mientras que el genoma "promedio" del virus no variaba durante las infecciones (Domingo y cols., 1978). De acuerdo a los conceptos teóricos, y según la terminología de Manfred

Eigen, a esta población de genomas virales relacionados se la denomina como "cuasi-especies" (Eigen, 1971). El modelo propone la existencia de una población viral que incluye una o varias secuencias "master" y un "espectro mutante", reflejo de todos los variantes virales que difiere de la(s) secuencia(s) "master" (Domingo y Holland, 1988). La secuencia "master" es la secuencia genómica más apta replicando en un entorno definido, dentro de la población global, esta secuencias pueden representar una proporción minoritaria de las moléculas genómica. Este concepto teórico se comprobó que explicaba la gran heterogeneidad genética y fenotípica observaba en virus RNA. Esto junto con el gran tamaño de las poblaciones permiten a los virus de genoma RNA adaptarse a determinados entornos (Domingo y cols., 1985).

Dentro de los virus RNA se han descrito poblaciones virales con estructura de "cuasi-especies" en virus que infectan tanto animales como al hombre. Por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular (VSV; Steinhauer y Holland, 1987); el virus de la fiebre aftosa (FMDV; Domingo y cols., 1985); poliovirus (Kinnunen y cols., 1990); el virus de la gripe (Smith y Palese, 1988); el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH 1; Myerhans y cols., 1989; Groenink y cols., 1991). En general se consideró que todos los virus con genoma RNA presentan un modelo de distribución en "cuasi-especies" (Domingo y Holland, 1988; Eigen y Biebricher, 1988). Este modelo puede aplicarse no sólo a aislados naturales sino también a cualquier población viral, así como a poblaciones clonadas de virus RNA. Debido a su extrema frecuencia de mutación y a la rápida selección de mutantes mejor adaptados al entorno como son presencia de anticuerpos, de antivirales, cambios de tipos celulares donde se replican y otros factores.

Por termino medio, la tasa de mutación de los virus RNA se considera que es de 10^{-4} - 10^{-5} sustituciones/nucleótido y ciclo de replicación, mientras que en genomas DNA los valores oscilan de 10^{-7} a 10^{-8} (Domingo y Holland, 1988; Eigen y Biebricher,

1988; Temin, 1989; Myerhans y cols., 1989; Coffin, 1990).

La diversidad en las poblaciones de virus de genoma RNA y el tamaño de la población viral posibilitan una rápida adaptación a nuevos entornos mediante cambios antigénicos para evadir la respuesta del sistema inmune o el desarrollo de resistencias eficaces contra antivirales (Domingo y cols., 1990).

Las fluctuaciones y cambios en las poblaciones virales dentro de un individuo infectado dificulta el estudio de la infección producida por dichos virus (Holland y cols., 1992).

Dentro de la evolución de poblaciones de virus RNA se pueden encontrar períodos de baja evolución o períodos de éxtasis, a pesar de la elevada frecuencia de mutación y su rápida replicación. La observación se ha hecho tanto en la naturaleza como en ensayos de laboratorio. Por ejemplo, se ha observado en la evolución de algunos genes del virus de la gripe (Gorman y cols., 1990), o en clones de VSV, donde se han encontrado períodos de éxtasis en la evolución de la población frente a períodos de rápida evolución, dependiendo de las condiciones de los pases en cultivo del virus (Steinhauer y cols., 1989).

La rápida evolución de las poblaciones virales está promovida por cambios en las condiciones del entorno, las cuales originan la pérdida del equilibrio de las poblaciones, pérdida ejemplo de la dominancia de secuencias "master", más óptimas, y aparición de nuevas secuencias "master". Obviamente, cambios del contexto promueven este desequilibrio, tales como cambios externos (infecciones a nuevos huéspedes o a nuevas líneas celulares), o internos, presencia de partículas defectivas interferentes (Holland y cols., 1982; Domingo y cols., 1985; Domingo y Holland, 1988; Steinhauer y cols., 1989).

1.2.- RETROVIRUS

Los retrovirus son un grupo muy heterogéneo de virus que presentan un genoma RNA con polaridad positiva, capaces de replicar a través de un DNA intermediario, DNA de doble banda, que puede integrarse en el DNA genómico de la célula huésped (Temin y cols., 1970; Baltimore, 1970). Este paso de RNA a DNA es catalizado por una DNA polimerasa dependiente de RNA o transcriptasa inversa (RT), que dio origen a la palabra retrovirus (Temin y Mizutani, 1970).

Los retrovirus son muy frecuentes en los seres vivos y presentan diferentes grados de infectividad y patogenicidad. Son clasificados según su morfología, patogenicidad y por su mecanismo de transmisión, encontrando retrovirus endógenos y exógenos. Los retrovirus endógenos se encuentran dentro de la línea germinal y muchos de ellos son defectivos y en general no patógenos (Doolittle y cols., 1989)

La familia de los retrovirus podemos agruparla en diferentes géneros (tabla I).

1.2.1.- VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), agente responsable del *síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA)*, es un virus perteneciente al género de los lentivirus. Presenta una serie de características comunes tales como un largo período de incubación (por ello el término lentivirus), tropismo por el sistema nervioso y por el tejido hematopoyético, así como estar asociado con supresión inmunológica (Coffin, 1990).

CLASIFICACION Y NOMENCLATURA DE LA FAMILIA RETROVIRIDAE

GENEROS

- Oncovirus tipo B de mamiferos	MMTV
- Oncovirus tipo C	MLV FeLV
- Retrovirus tipo D	Virus del mono Mason-Pfizer
- Retrovirus tipo C aviares	ALV
- HTLV-BLV	HTLV-I HTLV-II STLV BLV
- <i>Virus espumosos</i>	SFV FeSV BSV
Lentivirus	VIH VIH-1 VIH-2 SIV VISNA EIAV FIV BIV

TABLA I.- Clasificación de Retrovirus

(Clasificación según Collin, 1991)

MMTV: virus del tumor mamario del ratón; MLV: virus de la leucemia murina; FeLV: virus de la leucemia felina; ALV: virus de la leucosis aviar; HTLV-I: virus linfotrópico de las células T humano tipo I; HTLV-II: virus linfotrópico de las células T humano tipo II; STLV: virus linfotrópico de las células T de simio; BLV: virus de la leucemia bovina; SFV virus foamy simio; FeSV virus sincitial felino; BSV virus sincitial bovino; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; SIV: virus de la inmunodeficiencia simia; EIAV: virus de la anemia infecciosa equina; FIV: virus de la inmunodeficiencia felina; BIV: virus de la inmunodeficiencia bovina.

El primer caso de síndrome de inmunodeficiencia humana fue descrito en un homosexual masculino en Estados Unidos, en 1981 (NMWR. 1981; Gottlieb y cols., 1981; Masur y cols., 1981; Siegal y cols., 1981); después se descubrieron casos en hemofílicos (MMWR. 1982), en pacientes transfundidos (MMWR. 1982), posteriormente en drogadictos por vía intravenosa (MMWR, 1982), y en hijos de madres infectadas (MMWR. 1982). El agente causal del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) fue identificado en 1983 por el grupo de Montagnier (Barré-Sinoussi y cols., 1983), como un retrovirus aislado de un paciente con linfadenopatías, por lo que se denominó LAV (virus asociado a linfadenopatías). Más tarde fue aislado por el grupo de Gallo, denominándole HTLV-III (Gallo y cols., 1984; Popovic y cols., 1984), por considerarse semejante a los virus HTLV-I y HTLV-II que habían sido descubiertos anteriormente (Poiesz y cols., 1981; Kalnaraman y cols., 1982). Con posterioridad, se realizó otro nuevo aislamiento por el grupo de Levy, denominándose ARV (virus relacionado con SIDA; Levy y cols., 1984) y en la actualidad se le identifica como SF2. A todos ellos se les designa actualmente como VIH 1 (Coffin y cols., 1986).

También ha sido aislado un virus en simios, asociado a inmunodeficiencia, denominado SIV, perteneciente al mismo género (Daniel y cols., 1985; Kanki y cols., 1985).

En 1986, Clavel y colaboradores aislaron un retrovirus relacionado con el VIH, de un individuo de África Occidental con inmunodeficiencia (Clavel y cols., 1986). Este virus se caracterizaba por que sus proteínas Gag y Pol podían inmunoprecipitar con anticuerpos contra VIH-1 pero no los productos del gen env; el nuevo virus se denominó primeramente LAV-2 y ahora se denomina VIH-2 (virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2).

Las primeras secuencias de VIH-1 (Ratner y cols., 1985; Wain-Hobson y cols., 1985), HIV-2 (Guyader y cols., 1987) y de SIV-mac (Chakraborti y cols., 1987), permitieron realizar un análisis de secuencias mostrando un 42% de homología de nucleótidos entre el VIH-1 y el VIH-2, (Guyader y cols., 1987), en contraste con la alta semejanza encontrada entre el VIH-2 y el SIV-mac (Chakarbatir y cols., 1987).

Partiendo de secuencias de diferentes aislados tanto de lentivirus humanos como de simios, Eigen y Nieselt-Struwe calcularon el tiempo de evolución de diferentes secuencias (Eigen y Nieselt-Struwe, 1990). El método utilizado tenía en *consideración las tres posiciones del codon y distinguía transiciones de transversiones*, pero también asignaba probabilidades individuales de sustituciones de todas las posiciones de los nucleótidos. El resultado de este análisis permitió considerar que el punto de divergencia entre estos virus se encontraba hace 900 ± 300 años.

1.3.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIH-1

1.3.1.- ESTRUCTURA DEL VIRION

El VIH 1 presenta un virión con una estructura esférica de 110 nm de diámetro, con espículas exteriores (formadas por la gp120 y la gp41) ancladas en la bicapa lipídica que constituyen la envuelta. Por debajo, se encuentra una capa proteica (p17), y en su interior un nucleoide en forma de cono truncado, formado por una cápside denominada core (constituida por la proteína p24), que a su vez contiene el material genómico (dos moléculas de RNA idénticas) y enzimas virales (transcriptasa inversa, integrasa y proteasa) (figuras 1 y 2).

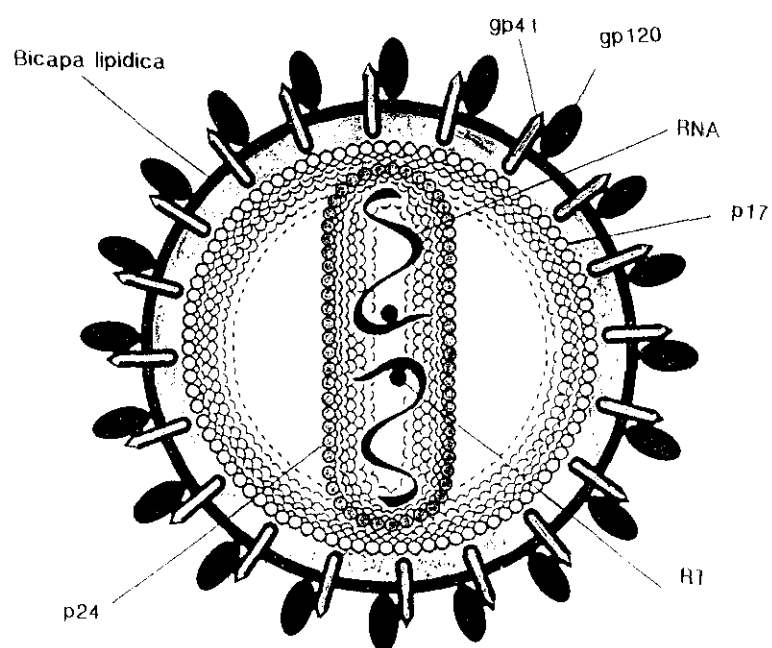


FIGURA 1.- Representación esquemática de la morfología y estructura del virion del VIH-1.



FIGURA 2 Cultivo de células MT-4 infectadas con un aislado de VIH-1

1 y 2: células MT-4 infectadas con el VIH-1 IIIIB

3 y 4: células MT-4 infectadas con el VIH-1 (Aislado 61/89)

Las barras localizadas en la parte superior de cada fotografía indican 100 nm

Micrografías electrónicas realizadas en el Servicio de Microscopías Electrónica CNBCR

1.3.2.- ESTRUCTURA DEL GENOMA

El VIH 1 es un virus de genoma RNA, de polaridad positiva y 9200 nucleótidos. Su genoma está constituido por tres genes estructurales, al igual que todos los retrovirus (*gag*, *pol* y *env*) (Varmur 1988) y otros genes no estructurales, que se pueden agrupar en genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*), y genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *tnt/tnv*).

El DNA proviral se encuentra limitado, a ambos extremos del genoma, por secuencias repetidas terminales largas (LTRs) formadas por unas unidades funcionales designadas U3, R, y U5 (figura 3). Estas unidades funcionales son importantes para la replicación e integración del virus en el genoma de la célula huésped, contienen promotor y activadores, con secuencias de reconocimiento para factores de transcripción viral, celulares y virales.

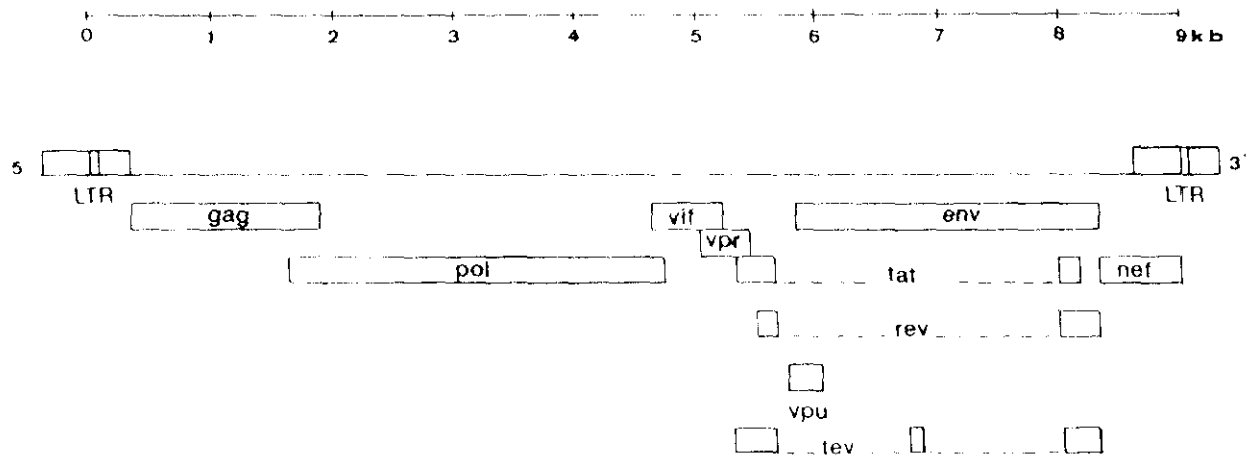


FIGURA 3. Esquema genético del provirus de VIH-1

1.3.2.1.- Genes estructurales

El gen gag codifica las proteínas del core, origina una poliproteína precursora de 55 Kd que es procesada proteolíticamente durante la maduración, dando lugar a las proteínas p24, p17, p9 y p7 (NH₂-p17-p24-p9-p7-COOH; Muesing y cols., 1985; Mervis y cols., 1988).

El gen pol codifica los enzimas virales: transcriptasa inversa (RT), proteasa e integrasa. La poliproteína precursora es procesada por la proteasa viral para dar lugar a p10 (proteasa), p66/51 (RT) y p32 (integrasa).

La RT en su forma activa es un heterodímero de p66 y p51. Se ha encontrado que presenta dos actividades: DNA polimerasa RNA dependiente y RNasa H (Hansen y cols., 1987; Larder y cols., 1987). En forma p51 carece de actividad RNasa H. La actividad RNasa H juega un importante papel en la síntesis del DNA proviral, encargada de digerir el RNA molde en el híbrido RNA:DNA formado en la síntesis de la 1ª banda del cDNA.

El gen env codifica una glicoproteína de 160 Kd, que es procesada en gp120 (glicoproteína externa, localizada en el extremo amino-terminal) y en gp41 (glicoproteína transmembranal, localizada en el extremo carboxi-terminal), (Veronese y cols., 1985; Robey y cols., 1985). Este procesamiento es fundamental para la infectividad del virus y probablemente es realizado por proteasas celulares intracelularmente, en un compartimento no lisosomal (Willey y cols., 1988; Kozarsky y cols., 1989). Ambos productos están altamente glicosilados (presenta 31 sitio de glicosilación; Allan y cols., 1985; Myers y cols., 1990). Después de ser procesadas las dos moléculas continúan estando unidas por enlaces no covalentes, en el extremo amino terminal de ambas proteínas (Kowalski y cols., 1987; figura 4).

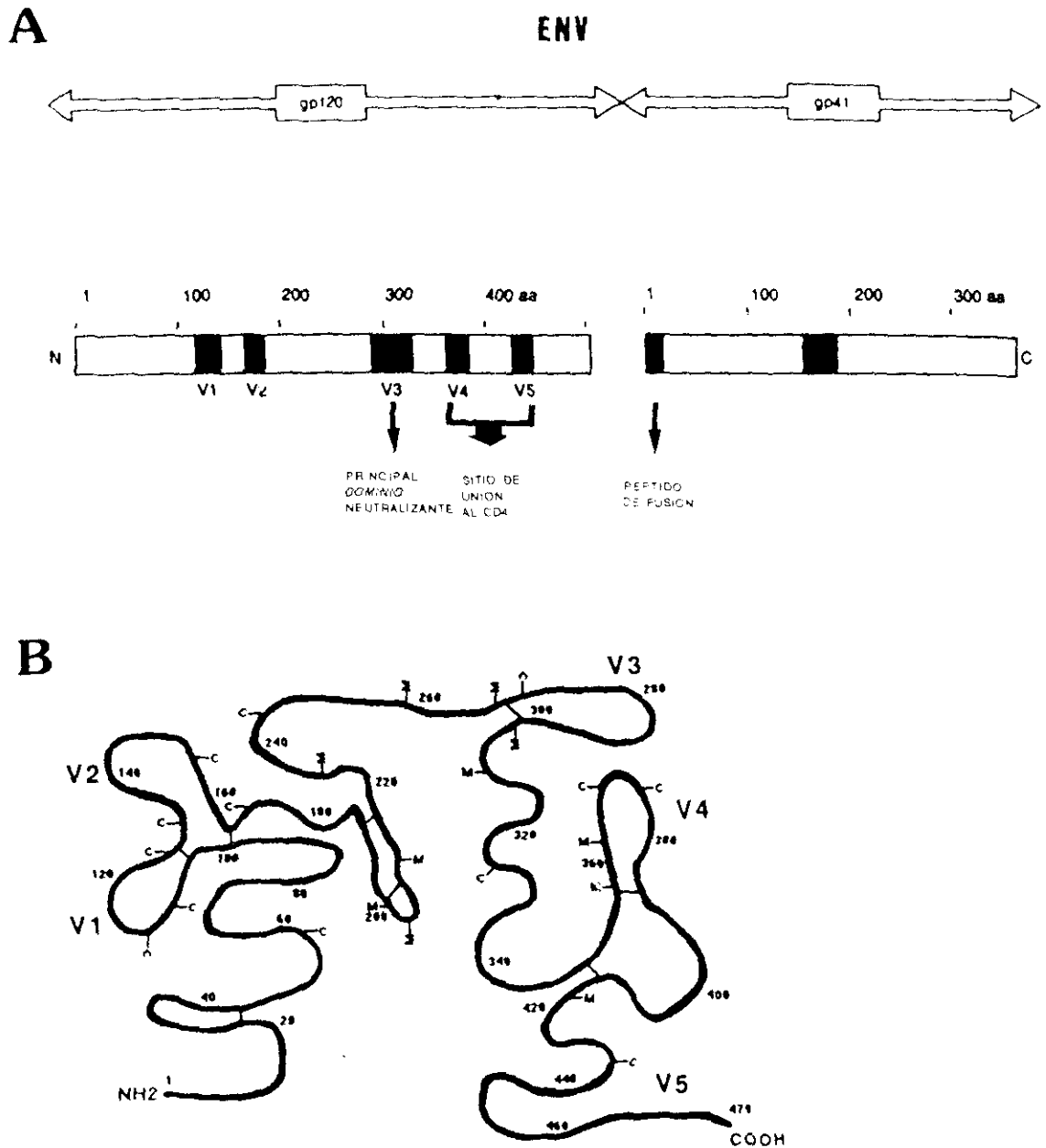


FIGURA 4. Esquema representativo del gen env del VIH-1

PANEL A: Gen env

Esquema representativo de la gp120 y de la gp41 (Page y cols., 1991). Se muestran los cinco dominios hipervariables (V1-V5) de la gp120.

PANEL B: GP120

Estructura presentada de la gp120, se muestran los cinco dominios hipervariables (V1-V5) (Barnes y cols., 1991).

En la gp120 se han localizado diferentes regiones: zonas altamente conservadas y otras hipervariables (Starcich y cols., 1986; Willey y cols., 1986; Modrow y cols., 1987). Hay 5 zonas hipervariables (de V1 a V5, con un 25% de aminoácidos conservados), separadas por 4 zonas conservadas (de C1 a C4, presentando un 75% de homología en sus aminoácidos). Todas las cisteínas localizadas en la gp120 están conservadas en las estirpes analizadas, al igual que los sitios de glicosilación, sugiriendo que a pesar de la gran variabilidad de secuencia la estructura secundaria de las glicoproteínas se conserva. En la gp 120 encontramos el sitio de unión al receptor CD4, en una de las regiones conservadas, la C4 (Kowalski y cols., 1987).

En la gp41 podemos encontrar en el extremo amino-terminal junto al sitio de procesamiento un péptido de fusión (Kawalski y cols., 1987), dominio implicado en la fusión celular y en la formación de sincitios. Esta función fue sugerida en base a estudios de homología de secuencias con otros retrovirus y con paramyxovirus (Gonzalez-Scarano y cols., 1987; Gallaher 1987).

En la mayoría de los pacientes con SIDA pueden encontrarse anticuerpos neutralizantes, en bajo título (Robert-Guroff y cols., 1985; Weiss y cols., 1985). Por diferentes estudios se ha podido observar que estos anticuerpos neutralizantes van dirigidos contra la gp120 y gp41 (Matthews y cols., 1986; Ho y cols., 1987). El principal dominio inmunodominante ha sido localizado en la zona variable V3 (zona de 35 aminoácidos). Se trata de un lazo situado entre dos residuos de Cys altamente conservados, los cuales se piensa que están unidos por un puente disulfuro (Putney y cols., 1986; Palker y cols., 1988; Leonard y cols., 1990). Aunque es un zona altamente variable (entre el 30-50%), se ha encontrado por comparación de secuencias de diferentes aislados una secuencia de 8 aminoácidos altamente conservados, IHGPGRAF, en el centro del lazo V3 (LaRosa y cols., 1990). Se han

encontrado anticuerpos neutralizantes contra esta región (Goudsmit y cols., 1988; Matsushita y cols., 1988). La V3 se ha relacionado también con la capacidad para formar sincitios, con la replicación (Moore y Nara, 1991; Kuiken y cols., 1992) y con el tropismo celular (O'Brien y cols., 1990; Hwang y cols., 1991; Shioda y cols., 1991). El tropismo del VIH-1 por las células CD4⁺ también ha sido relacionado con un sitio específico de unión al receptor CD4 (McDougal y cols., 1986; Dowbenko y cols., 1988).

1.3.2.2.- Genes no estructurales: genes reguladores

El gen *tat* codifica una proteína de 16 Kd, considerada transactivador viral (Sodroski y cols., 1984; 1985; 1986), incrementando la transcripción de 100 a 1000 veces (Arya y cols., 1985). Este gen presenta homologías con el gen *tax* presente en el HTLV-I y HTLV-II.

El gen *rev* codifica una proteína de 19 Kd (Cullen y cols., 1988), factor relacionado con la regulación viral y esencial para la replicación del virus (Feinberg y cols., 1986, Sodroski y cols., 1986). En ausencia de la proteína Rev son sintetizadas las proteínas reguladoras (Tat y Nef) pero no las proteínas estructurales del virus. Aunque los mecanismos de acción de Rev no están definidos, algunos datos sugieren que podría estar implicado en estabilizar y/o facilitar el transporte de RNAs de alto peso molecular del núcleo al citoplasma (Haseltine y Wong-Staal, 1988).

El gen *nef* codifica para una proteína de 27 Kd (Guy y cols., 1987). Su función es desconocida, aunque parece ser un regulador negativo de la replicación viral (Niederman y cols., 1989). Secuencias localizadas en las LTR son necesarias para la actividad de esta proteína.

1.3.2.3.- Genes no estructurales: genes accesorios

El gen *vif* codifica una proteína de 23Kd (Lee y cols., 1986), cuya función no está determinada. La observación de que mutantes defectivos en este gen presentaban una menor eficacia para infectar líneas celulares CD4⁺ y transmitirse por co-cultivo, hizo que se le denominase factor de infectividad. Sin embargo, virus mutantes en *vif* son morfológica y bioquímicamente indistinguibles del tipo normal (Fisher y cols., 1986; Strebel y cols., 1987).

El gen *vpr* codifica una proteína de 15 Kd (Wong-Staal y cols., 1987), primera proteína reguladora de retrovirus que se ha encontrado asociada con la partícula viral, ya que el resto de las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, y Vpu), no están asociadas al virión. Esta proteína se ha relacionado con los estados tempranos del ciclo de replicación del virus, tales como la formación e integración del provirus o en la transcripción de éste (Vaishnav y Wong-Staal, 1991).

El gen *vpu* codifica una proteína 15-20 Kd que se encuentra fosforilada (Strebel y cols., 1988; Cohen y cols., 1990). Este gen sólo está presente en el VIH-1. La proteína Vpu parece ser importante en la maduración del virión y en la liberación de partículas virales. Mutantes en este gen presentan un alto nivel de proteínas virales intracelulares (Terwilliger y cols., 1989; Klinkait y cols., 1990).

Una nueva proteína *Tev/Tnv* ha sido descrita en células infectadas por VIH-1 y codifica una proteína de 28 Kd de función desconocida (Benko y cols., 1990; Saffeld y cols., 1990).

1.3.3.- CICLO REPLICATIVO DEL VIH

El ciclo replicativo del VIH incluye varias etapas: entrada en la célula, síntesis e integración del DNA proviral, expresión del DNA en RNA y proteínas, y ensamblaje y liberación de los viriones (figura 5).

El inicio del ciclo infeccioso del VIH-1 comienza con el reconocimiento y adherencia por parte del virus a un receptor específico en la célula diana. Este resultó ser la proteína CD4 presente en la membrana plasmática de las células susceptibles, principalmente células T y monocitos/macrófagos (Maddon y cols, 1986; Greene, 1991). No obstante, en la actualidad se sabe que no todas las células que expresan CD4 se infectan por el VIH-1 y que algunas células que carecen de CD4 (como astrocitos, fibroblastos cutáneos o células epiteliales intestinales) pueden ser infectadas (Cheng Mayer y cols., 1987; Tateno y cols., 1989). El proceso de unión implica una interacción entre el complejo de la envuelta (gp120/gp41) y el receptor CD4. La fusión entre la envuelta del virus y la membrana de la célula huésped parece estar mediada por la gp41, a través del péptido de fusión, facilitando la fusión de la cubierta del virus con la membrana celular (Gallaher, 1987; Freed y cols., 1990). También contribuye en la fusión de membranas y en la entrada del virus el lazo V3 de la gp120. El dominio V3 sufre una proteólisis que implica un cambio en la estructura conformacional en la gp120 permitiendo que el péptido de fusión entre en contacto con la membrana de la célula diana (Hwang y cols., 1991).

Después, el core entra en la célula, pierde su cubierta, y el RNA viral es transcrito en el citoplasma a un DNA proviral de doble banda por la acción de la transcriptasa inversa (RT) asociada al virión. El DNA proviral migra al núcleo, probablemente unido a proteínas, donde se integra en el DNA genómico celular por acción de la integrasa viral (Coffin, 1990).

Una vez integrado el DNA proviral en el DNA cromosómico de la célula huésped, la transcripción, a partir del DNA proviral, está regulada por factores transcripcionales (constitutivos o inducibles) de la célula huésped así como por proteínas propias del virus. Los LTR contienen secuencias intensificadoras que sirven de sitios de unión de factores transcripcionales, algunos de los cuales son expresados constitutivamente (Sp1 y TFIID) y otros inducidos durante la activación de las células T, como NF κ B y NFAT-1 (García y cols., 1987; Jones y cols., 1988; Harrich y cols., 1989; Lu y cols., 1990; Greene, 1991). Estos factores transcripcionales celulares son suficientes para inducir un nivel basal de expresión de los genes de VIH-1 en la célula infectada, produciéndose RNAm que van a dar lugar, por un doble procesamiento, a los productos de los genes reguladores Tat, Nef y Rev (Malim y cols., 1989; Cullen y Greene, 1989).

El genoma de VIH-1 codifica dos tipos de RNAm que pueden ser diferenciados según su procesamiento y el momento en el que se expresan dentro del ciclo replicativo del virus: RNAm tempranos, que codifican para las proteínas Tat, Nef y Rev y RNAm tardíos que son de dos tipos: procesados y sin procesar, y que codifican las proteínas estructurales del virion y el RNA genómico viral.

La expresión de los distintos RNAm va a depender de la presencia o ausencia de la proteína Rev. Los niveles de Rev presentes en las células infectadas determina la producción diferencial de determinados RNA procesados o sin procesar, y permite la transición de la expresión de genes tempranos a genes tardíos, que lleva a la producción de proteínas estructurales (Cullen, 1991; Greene, 1991). La acción de Rev implica la unión directa a una secuencia específica de RNA, denominada elemento responsable de Rev (RRE) que se encuentra localizada en el gen env, en el extremo carboxi-terminal de la gp41. En ausencia de Rev se sintetizan sólo la primera clase de mensajeros (Feinberg y cols., 1986; Sodroski y cols., 1986; Felber y cols., 1989).

La proteína Tat, trans-activador, incrementa la expresión génica, hasta 1000 veces, incluyendo la del gen *tat* (Sodroski y cols., 1985). Tat para su funcionamiento necesita unirse a la secuencia de RNA, que actúa en cis, denominada TAR, responsable de la trans-activación y localizada en los LTR (Fisher y cols., 1986; Dingwall y cols., 1989).

La función de la proteína Nef aún no está definida. Se la ha relacionado con el establecimiento de la fase de latencia viral y con la patogénesis de la enfermedad (Niederman y cols., 1989; Kestler y cols., 1991).

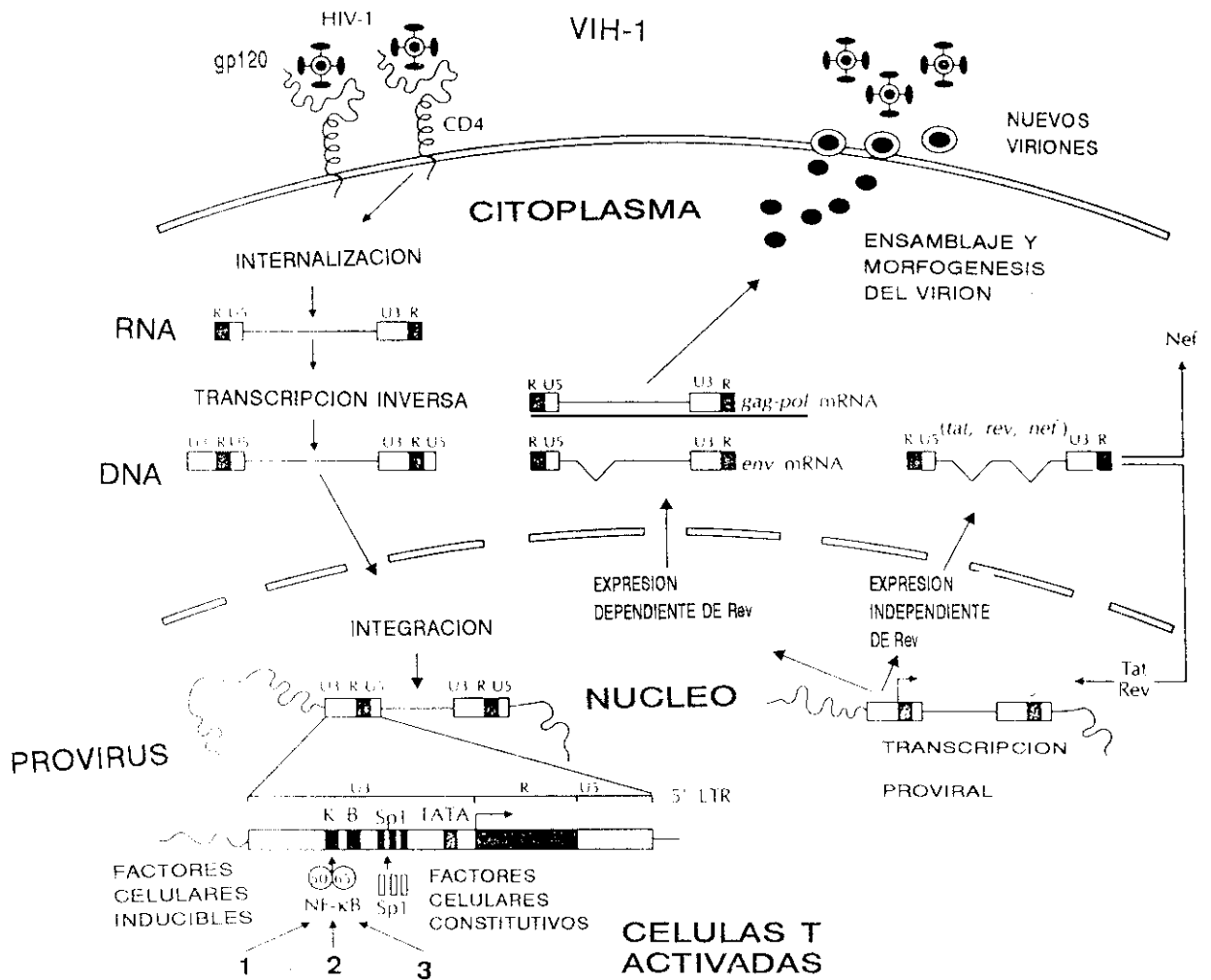


FIGURA 5. Ciclo replicativo del VIH-1

1. Citocinas, 2. TNF- α , 3. Antígenos, 4. Proteínas virales heterólogas. (Fenberg y cols., 1992)

1.4.- VARIABILIDAD DEL VIH-1

1.4.1.- VARIABILIDAD GENETICA

Una de las características más importantes del VIH-1 es su elevada variabilidad genética. Los primeros estudios que pusieron de manifiesto esta característica fueron realizados por mapeo de sitios de restricción del DNA proviral de diferentes aislados de VIH-1 de pacientes con SIDA o complejo relacionado con SIDA (CRS) (Hahn y cols., 1984; 1985; Shaw y cols., 1984; 1985). El clonaje y secuenciación de diferentes cepas permitió conocer la estructura del RNA viral y definir los diferentes genes que lo constituyen así como estimar la variación (Ratner y cols., 1985; Wain Habson y cols., 1985; Muesing y cols., 1985; Sánchez-Pescador y cols., 1985). Estos estudios permitieron afirmar que la variabilidad no se encontraba distribuida homogéneamente a lo largo del genoma. Así se vio que el gen env presentaba la mayor variabilidad, en comparación con otros genes. Al comparar secuencias del gen env se definieron cinco zonas hipervariables (V1-V5), zonas que presentaban al menos un 25% de homología de sus aminoácidos (Starcich y cols., 1986; Willey y cols., 1986). Estas regiones se encontraban separadas por zonas altamente conservadas, presentando un 75% de homología. Las regiones variables coincidían con sitios antigénicos (Modrow y cols., 1987).

Más tarde se comprobó que no sólo existía diferencia entre aislados independientes sino también entre aislados sucesivos de un mismo paciente (Hahn y cols., 1986). Los cambios que se observan en el gen env son tanto mutaciones puntuales como deleciones, inserciones y duplicaciones en tándem. Todos estos cambios fueron localizados en las regiones hipervariables. La tasa de sustitución de nucleótidos para el gen env se calculó entre $2,3 \times 10^{-5}$ sustituciones/sitio/año, y

$15,8 \times 10^7$ sustituciones/sitio/año. Para el gen gag entre $0,4 \times 10^3$ sustituciones/sitio/año y $1,9 \times 10^3$ sustituciones/sitio/año. Estas estimaciones se basaban en la comparación de secuencias de virus de aislados secuenciales. La variación entre aislados virales de un mismo individuo siempre fue menor que la encontrada entre aislados de diferentes individuos.

El estudio de la variabilidad del VIH-1 "in vivo", se centró en clones obtenidos de aislados de diferentes pacientes, comprobándose que estos aislados estaban formados por genótipos relacionados pero distinguibles por el patrón obtenido por enzimas de restricción. También se analizaron clones obtenidos de una segunda muestra del mismo paciente, y se comprobó la existencia de cambios progresivos pero relacionados (Saag y cols., 1988).

Goodenow y colaboradores (1989) confirmaron los datos ya mencionados por Saag y colaboradores (1988). Estudiaron por secuenciación clones obtenidos de diferentes regiones del genoma de VIH-1, amplificadas previamente por PCR, que correspondían con una zona del gag (p24) y zonas del gen env (V1 y V2). Compararon los virus obtenidos directamente de PBLs, con los obtenidos después de pases en cultivo de tejidos. De este estudio se concluye: 1) En el VIH existe una enorme complejidad genética, cada aislado está constituido por una mezcla heterogénea de variantes altamente relacionados pero distinguibles entre sí, como sucede en otros virus de genoma RNA, presentando una distribución en "cuasi-especies" (Domingo y cols., 1985; Eigen y Biebricher, 1988). 2) El genotipo predominante encontrado en la población de virus obtenidos de PBLs es diferente al de la población de virus que habían sido replicados en cultivos de tejidos, sugiriendo que los cultivos "in vitro" imponían un proceso de selección. La diversidad encontrada "in vivo" es mayor que la observada "in vitro". 3) Existen numerosos genomas defectivos en el gen tat (5-15% por "cuasi-especie") caracterizados por la presencia

de codones de terminación, inserciones, deleciones y sustituciones en algunos de los genes esenciales, lo cual impide la replicación del virus (Balfe y cols., 1990; Brinchmann y cols., 1991). 4) No existe correlación entre la estructura de una población y la progresión de la enfermedad. Esto fue confirmado también en otros estudios similares realizados (Meyerhans y cols., 1989; Delassus y cols., 1991; Martins y cols., 1991; Pang y cols., 1991; Vartanian y cols., 1991; Kusumi y cols., 1992).

Más tarde se ha descrito la variación de secuencias de VIH-1 de aislados de pacientes infectados con un mismo virus (Balfe y cols., 1990; Burger y cols., 1990; McNearney y cols., 1990; Klein y cols., 1991; Simmonds y cols., 1991). La variabilidad dentro de un mismo paciente es grande, pero ésta es menor que la encontrada en pacientes epidemiológicamente no relacionados (Balfe y cols., 1990; Burger y cols., 1990; Simmonds y cols., 1991).

Dentro de un paciente se comparó las diferencias en la frecuencia y distribución de las secuencias, entre virus obtenidos de cerebro y virus aislados de sangre. Los resultados muestran una separación entre las distintas "cuasi-especies" específicas en cada tejido (Epstein y cols., 1991; Pang y cols., 1991).

- Mecanismos de variación:

El grado de heterogeneidad existente en los Lentivirus, está condicionado por el número de ciclos de replicación y por el porcentaje de error producido por los enzimas implicados en la replicación del virus (Coffin, 1986). Además los retrovirus utilizan tres sistemas enzimáticos:

1) Transcriptasa inversa, implicada en la síntesis del DNA a partir del RNA viral.

2) DNA polimerasa celular, replica al provirus junto con el DNA celular.

3) RNA polimerasa II también celular, responsable de la síntesis de nuevos genomas virales (Varinus y cols., 1895; Varnus, 1987; Coffin, 1990).

Estos enzimas presentan muy diferente porcentaje de error, por lo que la tasa de mutación observada en estos virus puede depender de la contribución de cada uno de ellos en la replicación del virus (Coffin, 1986). Además, la RT y la RNA polimerasa II carecen de actividad exonucleasa, actividad correctora. Algunos autores han atribuido un mayor porcentaje de error a la RT del VIH-1 en comparación con otras RTs (Preston y cols., 1988; Roberts y cols., 1988; Ji y cols., 1992). Sin embargo, otros no lo apoyan (Ricchetti y col., 1990). La frecuencia de error para un molde DNA se encuentra entre 1/1700 y 1/7400 nucleótidos (Preston y cols., 1988; Roberts y cols., 1988; Weber y cols., 1989) y no difiere significativamente del molde RNA (Ji y cols., 1992). Cuando esta consideración se encuentra dentro de un ciclo de replicación, el porcentaje se oscila entre 2,5-10 errores por genoma de VIH-1. La incorporación de errores no se distribuye uniformemente a lo largo de todo el genoma; se ha visto que depende del contexto específico que le rodea. Los emparejamientos erróneos A:G, por ejemplo, ocurren cuando el molde de A se encuentra precedido por parejas de nucleótidos como AT, TT, CT o AC, y seguidos por parejas como NG, GT, TC, o GC (Ricchetti y cols., 1990). Cambios tanto de sustitución en una sola base, como cambios de más de un nucleótido se producen frecuentemente durante la síntesis del DNA por la RT (Roberts y cols., 1989).

La variabilidad observada depende por un lado de la tasa de mutación pero también de la tasa de fijación de la mutación. Esta viene condicionada por la selección, positiva o negativa que ejerce el entorno.

Otro importante punto en la variación puede ser el fenómeno de recombinación. Hu y Temin basándose en el porcentaje de replicación observado en

sistemas experimentales, determinaron que la frecuencia de recombinación era del orden de 0.2% por ciclo (Hu y Temin, 1990). Algunos ejemplos de recombinación en VIH-1 han sido descritos (Clavel y cols., 1989). Otros estudios demostraron la existencia de recombinación al replicar juntas dos cepas diferentes de VIH-1 (Vartanian y cols., 1991).

1.4.2.- VARIABILIDAD FENOTIPICA

Los numerosos variantes de VIH-1 encontrados muestran también diferentes propiedades biológicas: cinética de replicación, capacidad de infectar diferentes tipos celulares (tropismo), y capacidad de producir efecto citopático (Levy y cols., 1985; Asjö y cols., 1986; Anand y cols., 1987; Briesen von y cols., 1987; Dahl y cols., 1987; Evans y cols., 1987).

Aislados obtenidos de individuos con SIDA o con CRS muestran un alto porcentaje de replicación, frente a virus aislados de individuos asintomáticos, agrupándolos en "slow/low" a los primeros y como "high/rapid" a los virus aislados de individuos en estado avanzado de la enfermedad. Además, los virus obtenidos de individuos con síntomas pueden establecer una infección persistente en líneas celulares T. La relación entre el estado de la enfermedad y la capacidad de replicar "in vitro" sugiere que en el curso de la infección pueden seleccionarse aquellos variantes que replican mejor en células T (Asjö y col., 1986).

La capacidad de producir efecto citopático, con formación de sincitios característicos, ha sido otra de las propiedades biológicas que han permitido diferenciar los aislados de VIH-1. Los cambios citopáticos en cultivos infectados por VIH 1 pueden existir o no, y además pueden ser de diferentes tipos (Asjö y cols., 1986; Rübtsamen Waigmann y cols., 1986; Dahl y cols., 1987; Tersmette y cols.,

1988; Fenyö y cols., 1988). La capacidad de formar sincitios parece ser más frecuente en virus aislados en estados avanzados de la enfermedad (Fenyö y cols., 1988; Tersmette y col., 1988).

Cuando se analizan clones obtenidos de un aislado, se ha observado que los clones procedentes de los virus no sincitiales (NSI) tienen todos el mismo fenotipo. En contraste, con aislados sincitiales (SI) en los que se ha encontrado una mezcla de poblaciones, encontrando clones SI y clones NSI (Tersmette y cols., 1990; Groenink y cols., 1991; Schuitemaker y cols., 1992).

Se ha correlacionado el paso de virus NSI a virus SI con el progreso de la enfermedad (Cheng-Mayer y cols., 1988; Tersmette y cols., 1989). En consecuencia las propiedades biológicas del virus aislado podrían tener un valor pronóstico (Tersmette y cols., 1989).

Otra de las características fenotípicas del VIH-1 es el tropismo celular, que puede estar unido a la patogenicidad y a las manifestaciones clínicas de la enfermedad en el paciente, encontrando virus con tropismo por monocitos/macrófagos y virus con tropismo por células T o linfotrópicos (Popovic y cols., 1987). Se observó, por ejemplo, que virus aislados de cerebro y de médula espinal de un mismo paciente replicaban ambos en PBLs. Sin embargo, sólo el virus obtenido de cerebro infectaba eficientemente líneas monocito/macrófagos (Koyanagi y cols., 1987). Los aislados NSI, parecen ser mucho más monocitotrópicos que los virus SI y son menos transmisibles a líneas celulares T (Schuitemaker y cols., 1991). También se ha visto que clones NSI-monocitotrópicos son responsables de la infección persistente del VIH-1. La progresión de la enfermedad está relacionada con incremento de clones T-tropicos frente a los NSI mono-tropicos (Groenink y cols., 1991).

1.5.- OBJETIVOS

1.- Estudio de la variabilidad del VIH-1 "in vitro" para comparar con la variabilidad observada "in vivo".

2. Análisis de la heterogeneidad genética y fenotípica de un aislado natural del VIH-1 en cultivos de tejidos.

3. Estudio de la evolución de clones biológicos, seleccionados al azar a partir de un aislado natural de VIH-1, después de su propagación en cultivos celulares a diferentes condiciones de infección.

4.- Análisis del efecto de las diferentes multiplicidades de infección en la evolución de las distintas poblaciones virales.

5.- Cuantificación de la variabilidad del VIH-1 durante su propagación en cultivos celulares.

6. Comparación de la evolución de los virus obtenidos tras pases "in vitro" con la evolución natural producida "in vivo" en el paciente.

2.- MATERIALES

2.1.- MATERIALES BIOLÓGICOS

Linfocitos de sangre periférica (PBL):

de donantes seronegativos para VIH-1.

de un paciente VIH-1 positivo, hijo de madre drogadicta, VIH-1 positiva. De este paciente se tomaron dos muestras. Una primera denominada 61/89, cuando el niño tenía 4 años de edad. Y una segunda 14 meses después de la anterior, llamada 259/91 (tabla II). Fueron cedidos por el Servicio de Diagnóstico y Referencia del Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus (CNBCR).

AISLADO	ELISA COMPETITIVO DE ANTIGENO RECOMBINANTE		IFI	WESTERN BLOT							P24'
	GAG	ENV		p18	p24	p31	p41	p55	p65	gp120	
61/89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
259/91	-	+	+	+	-/+	+	+	+	+	+	+ [#]

Tabla II.- Característica serológicas de los aislados 61/89 y 259/91.

P24' : detección de antígeno p24 soluble por ELISA de captura.
1365 pg/ml

Monocitos/Macrófagos: De donantes seronegativos para VIH-1, (Departamento de Virología, del Instituto Karolinska de Estocolmo, Suecia).

- Líneas celulares establecidas:

- MT-4 y MT-2: Células linfoides CD4⁺, obtenidas por co-cultivo de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de dos pacientes con el virus de la leucemia de la células T humana tipo I (HTLV-I) con linfocitos de sangre de cordón umbilical de un individuo sano (Miyoshi y cols., 1982). Las líneas celulares fueron cedidas por el Dr. D.D. Richman.

Las células MT-4, se caracterizan por crecer en suspensión. Son células T, susceptibles de ser infectadas por el VIH-1, produciendo un marcado efecto citopático (ECP) y gran cantidad de virus. En ausencia de infección por VIH-1, las MT-4 se agregan formando grupos, que tras pipeteos son disgregados, volviéndose a formar después de 2 a 3 h, además de presentar una morfología característica, con prolongaciones citoplasmáticas (figura 11) (Pauwels y cols., 1987; Szucs y cols., 1988). Cuando estas células son infectadas por el VIH-1 estos agregados celulares se dispersan, las células cambian su morfología, volviéndose redondeadas y a continuación producen un ECP característico, sincitios (células multinucleadas gigantes, globosas) o lisis celular, como pudimos comprobar en nuestros ensayos de infección.

U937-clon 2: Línea celular derivada de un linfoma histiocítico (Sundström y Nilsson, 1976).

HuT-78: Línea celular derivada de linfoma cutáneo de células T (Popovic y cols., 1984).

- Cepas virales de referencia: VIH-1-IIIB (Popovic y cols., 1984) y VIH-1-RF (Starcich y cols., 1986). Cedidas por el Dr. R.C. Gallo.

2.2.- MEDIOS DE CULTIVO

2.2.1.- PARA CELULAS EUCARIOTICAS

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Flow) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF; Gibco), 2 mM L-glutamina (Flow), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de penicilina (Antibióticos, S.A.), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina (Antibióticos, S.A.) y 0,5% de tilosina (Flow).

Para el plaqueo se utilizó medio completo con 0,7% de agarosa (Sea-plaque Agarose, Marine Colloid Corp).

Se utilizaron para el crecimiento celular frascos de 25, 75, 150 cm^2 de superficie (Greiner); también se emplearon placas de 24 y 96 pocillos y placas de 8 cm^2 de superficie (p35, Costar).

2.2.2.- PARA CELULAS PROCARIOTICAS

La cepa DH5 de *E. coli* se creció en medio LB, compuesto por 1% de extracto de levadura (Difco), 2% de bacto triptona, 1% de ClNa y a pH 7,5. En la selección de transformantes, por resistencia a antibióticos, se añadió ampicilina hasta 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar al 1,5%.

2.3.- PLASMIDOS

El plásmido pBH10-R3 (Hahn y cols., 1984) que contiene el genoma completo de un clon de VIH-1-IIIB en el plásmido pSP64 (Promega), fue cedido por el Dr. R.C.

Gallo.

Los plásmidos que contienen diferentes zonas del genoma del VIH-1 fueron obtenidos en nuestro laboratorio a partir del pBH10-R3 (López-Galíndez y cols., 1991; figuras 6 y 7)

2.4.- ENZIMAS

Endonucleasas de restricción (Boehringer-Mannheim, New England Biolabs), fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Biolabs), transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT; BRL), DNasa I (Promega), proteinasa K (Merck), RNasa A (Pharmacia), lisozima (Merck), RNA polimerasas de los fagos T7, Sp6 y T3 (Promega y Stratagene), Ampli-Taq DNA polimerasa (Cetus) y polinucleótido quinasa del fago T4 (Boehringer Mannheim).

2.5.- ISOTOPOS Y AUTORRADIOGRAFIAS

Los isótopos fueron suministrados por Amersham, α -CTP- P^{32} (400 Ci/mmol), γ -ATP- P^{32} (3000 Ci/mmol), α -dGTP- P^{32} (400 Ci/mmol), α -dCTP- P^{32} (3000 Ci/mmol), α -dTTP- P^{32} (400 Ci/mmol).

Las películas de autorradiografía eran de las marcas Agfa y Kodak. Las pantallas intensificadoras de la señal radiográfica fueron de Dupont (Laskey y Mills, 1977).

El revelador y fijador de Kodak.

El líquido de centelleo de Pharmacia.

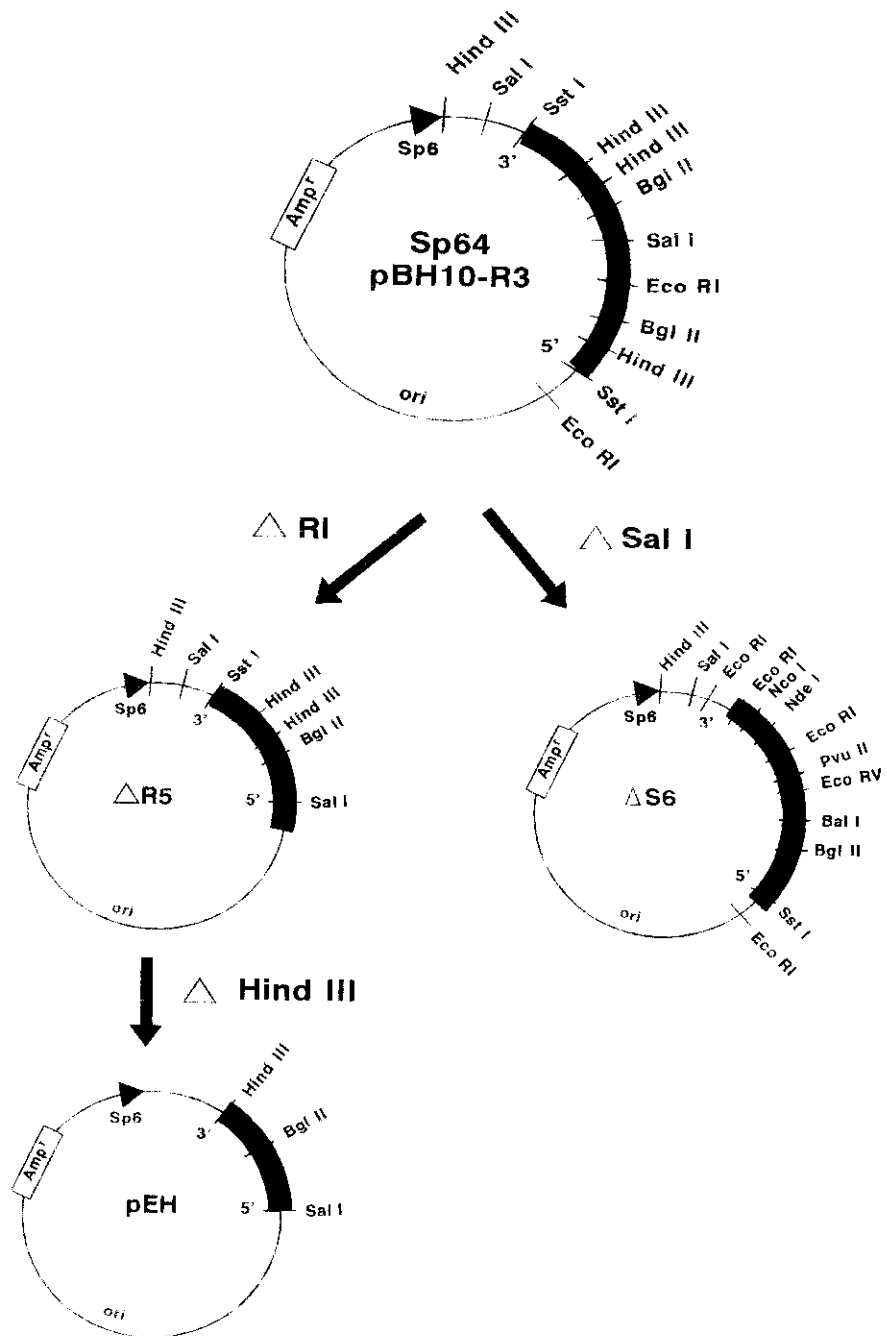


FIGURA 6. Esquema de la obtención de los plásmidos

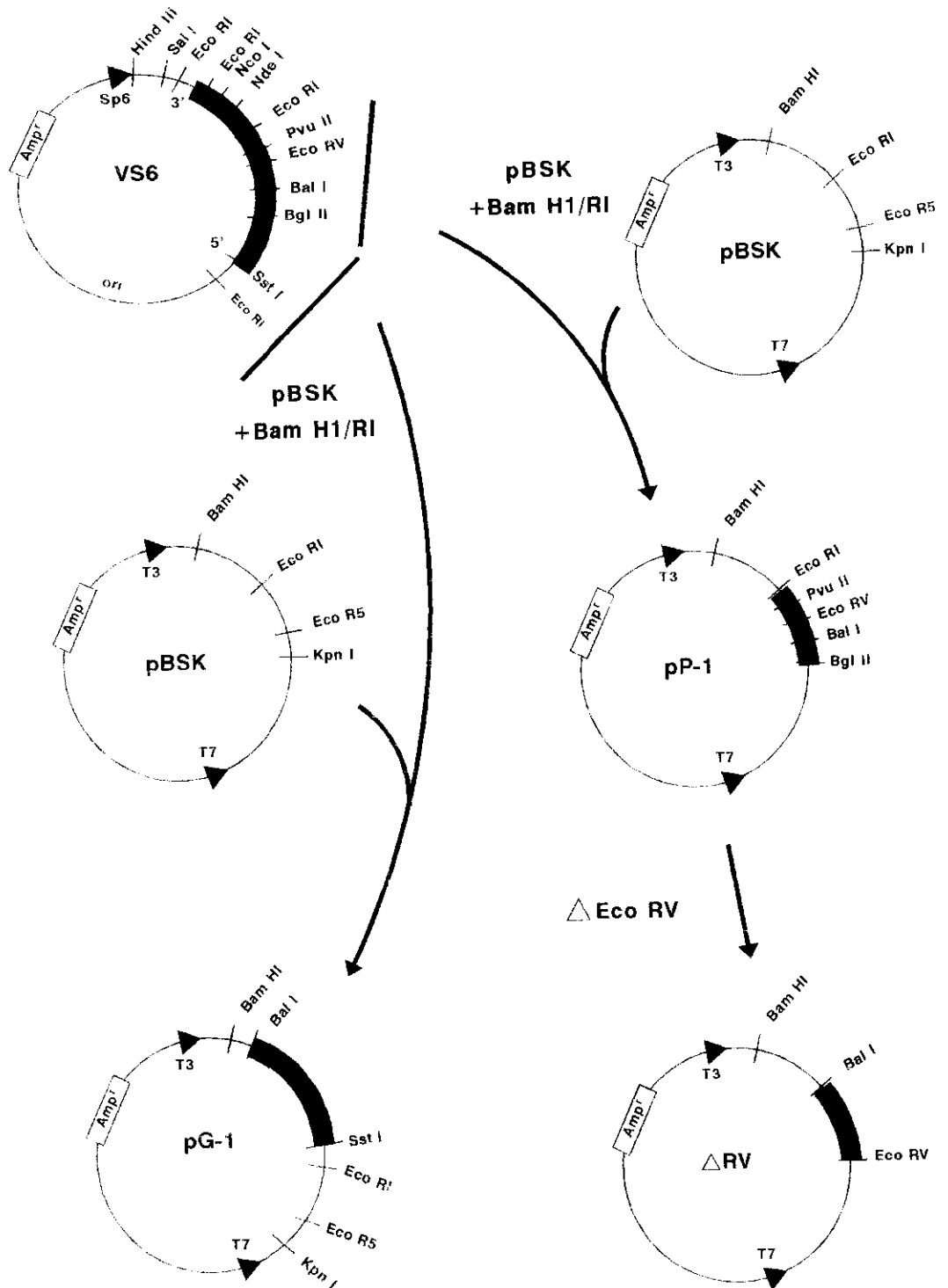


FIGURA 7. Esquema de la obtención de los plasmidos

2.6.- MATERIAL PARA ELECTROFORESIS

2.6.1.- GELES DE POLIACRILAMIDA

Se empleó acrilamida, N'-N'-metilen-bisacrilamida, urea y persulfato amónico (Boehringer). TEMED (N-N-N'-N'-tetrametil-etilen-diamina; BRL), Tris-base, EDTA, y ácido bórico (Merck).

En los geles de proteínas utilizamos glicina (Merck), SDS (Boehringer), 2-mercaptoetanol (Bio-Rad); azul de bromofenol, xilencianol y azul brillante de Coomassie-R (Merck).

2.6.2.- GELES DE AGAROSA

Se empleó agarosa ultra pura de Bio-Rad y Nu-Sieve GTG de FMC. Bromuro de etidio de Bio-Rad.

2.7.- SECUENCIACION

Se utilizaron dideoxinucleótidos (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP), deoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP; Pharmacia). Los oligonucleótidos (tabla III) fueron sintetizados por Genetic Design (Texas).

NOMBRE	5' SECUENCIA 3'	POSICION	GEN
3RU	CGCGAAGCTTGGGCCTGAGAATCCATAC	2278-2297	RT
20RD	TCAGTCCAGTCGTCTTTTTTCTGGC	2890-2867	RT
MAV3-1	GCTAAAACCATAATAGTACAGCTG	6642-6665	ENV
MAV3-2	ATGAATTCTGGGTCCCCTCCTGAGGA	6913-6893	ENV
7EU	CGCTGCAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA	7229-7250	ENV
43ED	GCGACTAGTGATGATCCCTGCCTAACTCTA	7919-7941	ENV

TABLA III.- *Secuencia de oligonucleótidos empleados.*

(numeración según Batner y cols., 1985)

2.8.- SOLUCIONES

Solución salina tamponada con fosfatos (PBS): ClNa 137mM, CLK 2,7mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, KH₂PO₄, pH 7,4 (Dulbecco y Vogt, 1954).

- Fenol equilibrado con TNE: fenol destilado: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v/v) con 1mg/ml de hidroxiquinoleína (Merck).

- TAE: Tris-base 90mM; ácido bórico 89mM; EDTA 10mM

- TBE: Tris base 90mM; ácido bórico 89mM; EDTA 10mM.

TNE: Tris-HCl 50mM a pH 7,5; NaCl 100mM; EDTA 10 mM.

- TE: Tris-HCl 10mM pH7,5; EDTA 1mM, (10:1); Tris-HCl 1mM pH7,5; EDTA 1mM, (1:1); Tris-HCl 10mM pH7,5; EDTA 0,1mM, (1:0,1).

- Solución de cloruro de Guanidina para extracción de RNA:

GuClH 7,5M a pH 7,0; acetato potásico 20mM; EDTA 4mM; y DTT a una concentración final de 0,14 mg/ml.

- Solución de extracción de RNA (XB): Tris 50mM a pH 9,0; ClNa 100mM; EDTA 10mM; 0,5% SDS.

SSC: ClNa 150mM; citrato sódico 15mM.

- Solución de azul de Coomassie: Azul de Coomassie al 0,5% en metanol: ácido acético: agua (6:1:7).

- Solución de colorantes de dideoxi: Formamida desionizada 98%, azul bromofenol 0,2%, xilenocianol 0,2%, EDTA 10mM.

2.9.- OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS

Agarosa para el plaqueo (Sea-plate Agarose, Marine Colloid Corp.) y Poly-L-Lisina (PLL, Sigma), rojo neutro (Merck) y azul tripano (Flow).

Interleuquina (IL-2, Amersham), y Fitohemaglutinina (PHA-P, Difco).

Lymphoprep (Nycomed. Pharma).

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y disolventes orgánicos fueron de Merck, Probus y Sigma.

Los detergentes: NP-40 (BDH) y Tween-20 (Bio-Rad).

Ditiotreitol (DTT) y seroalbumina bovina (BSA) de Sigma.

Poly A y oligo-pd(t)12-18 y Sephadex G-25 (Pharmacia).

Para inmunoelectrotransferencia se utilizó membrana de Immobilon (Millipore).

Los sueros utilizados fueron una mezcla de sueros humanos positivos a VIH-1 (Servicio de Diagnóstico y Referencia del CNBCR) y anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con peroxidasa de rabano picante (Bio-Rad).

Para ensayos de inmunofluorescencia se emplearon además de los sueros humanos positivos para VIH 1, anticuerpos monoclonales anti-p17 de VIH-1 y anti-

p19 de HTLV-I (Chemicon). Anti-Ig-G humana y anti-Ig-G de ratón marcado con fluoresceína (Behring).

Inmunoensayo enzimático para la detección de los antígenos del VIH-1 de Abbott.

2.10.- MICROSCOPIOS

Microscopio óptico de epifluorescencia y microscopio óptico invertido (Nikon).

3.- METODOS

3.1.- CULTIVO CELULARES

3.1.1.- SUBCULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares se crecieron en medio completo a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y con 95% de humedad. Fueron mantenidas en suspensión a una concentración entre 0,5x10⁶ y 1x10⁶ células/ml, cambiando el medio cada 2-3 días para continuar su cultivo y con una viabilidad entre el 90 y el 98%, determinada por tinción con azul tripano.

La conservación de las líneas celulares se hizo por congelación en nitrógeno líquido, en medio completo suplementado con 20% de SBF y 10% de DMSO como agente crioprotector. Se congelaron a una concentración de 5x10⁶ células/ml.

3.1.2.- CRECIMIENTO Y CLONAJE DE VIRUS

3.1.2.1.- Co-cultivo de linfocitos de sangre periférica

Linfocitos de sangre periférica (PBL) del paciente 61/89 se co-cultivaron con PBL de un individuo seronegativo para VIH-1, previamente estimulados con 2,5 µg/ml de PHA-P durante 3 días, antes de la infección. El co-cultivo se mantuvo en medio completo suplementado con 5 u/ml de IL-2, hasta la aparición del ECP, y detección de antígeno p24 soluble en sobrenadante por ELISA de captura antígeno.

3.1.2.2.- Producción del inóculo viral inicial

Se infectaron 1×10^7 células MT-4 con el virus correspondiente a una multiplicidad de infección (m.d.i) de 0,1, en un volumen de 5 ml de medio completo. Se incubaron a 37°C hasta la aparición del ECP. Cuando se observaba que un 75% de las células presentaban ECP se añadían directamente sobre un cultivo de 30×10^6 de células MT-4 sin infectar en un volumen de 30 ml. Se mantenían nuevamente hasta la aparición del ECP, cuando el 75% de las células presentaban un ECP (3+), según el siguiente criterio (Richman, 1990):

- + 1. Presentar de 2-5 sincitios (células multinucleadas gigantes, globosas) por campo observado.
- + 2: Presentar de 5-10 sincitios por campo.
- + 3: Un 75% de las células observadas presenta sincitios o muerte celular.

Las células infectadas se recogían por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min, separando por un lado el sobrenadante y por otro el sedimento. El sobrenadante se repartía en alícuotas de 1 ml y se conservaba a -70°C. El sedimento, una vez lavado con PBS también se guardaba a -70°C, hasta la extracción de RNA y de DNA.

3.1.2.3.- Infección viral en líneas celulares

Los cultivos celulares se infectaron, tras retirar el medio de mantenimiento de las células, con el volumen de virus adecuado. La absorción se realizó en el mínimo volumen, durante 1 h a 37°C. Tras el período de absorción se añadió medio completo, dejando las células a una concentración de 1×10^6 células/ml. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂, hasta la aparición del ECP característico.

3.1.2.4.- Plaqueo.

El plaqueo se realizó en células MT-4, básicamente según el protocolo de Harada y colaboradores (1985), en placas p35 tratadas con Poli-L-Lisina (PLL) a 50 $\mu\text{g/ml}$, durante 60 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavaron tres veces con PBS para retirar la PLL. A continuación se añadieron células MT-4, 3×10^6 células *por pocillo*, lavadas previamente dos veces con PBS y resuspendidas en 1,5 ml de PBS. Se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente. Una vez las células formaban la monocapa se retiró el PBS y se añadió 300 μl del inóculo viral, preparado en medio completo, previamente a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. La absorción del virus se realizó durante 60 min. a 37°C. Después de la absorción, se retiró el inóculo viral y se añadió 2 ml de medio completo con agarosa (Sea-Plaque Agarose, Marine Colloid Corp.) al 0,7%. Una vez adicionada la capa de agarosa se pusieron a 4°C durante 3 min, hasta su solidificación. A continuación, las placas se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ durante 3 días. Transcurrido este tiempo se añadió una segunda capa de agarosa. A los 7 días post-infección las placas se visualizaron a simple vista.

3.1.3.- VALORACION DE LA INFECCION

3.1.3.1.- Titulación.

Por unidades formadoras de placa (ufp) en células MT-4, siguiendo el protocolo de plaqueo descrito en el apartado 3.1.2.4.

· Por dosis infectivas 50% (DI₅₀), detectando el ECP producido en células MT-

2. Se preparaban diluciones del virus hasta 10^{-6} en medio completo. En placas de 96 pocillos se sembraron células MT-2, a 2×10^4 células/pocillo en $180 \mu\text{l}$ de medio, a las que se le añadía $20 \mu\text{l}$ de la dilución viral correspondiente. Como control se sembraban 8 pocillos sin infectar, se añadió $300 \mu\text{l}$ de medio completo. La placa se incubaron a 37°C en estufa de CO_2 durante 7 días. Después de este tiempo se observó si los pocillos tenían ECP. La DI_{50} se calculó según el método de Reed-Muench (Reed y Muench., 1938).

3.1.3.2.- Detección de antígeno soluble

La detección de antígeno p24 en los sobrenadantes de los cultivos se realizó por un ELISA de captura de antígeno siguiendo las indicaciones del proveedor (Abbott). Consiste en un inmunoensayo enzimático de fase sólida que permite la detección de antígenos de VIH-1. Los virus presentes en la muestra a analizar fueron inactivados con Tritón X-100. A continuación se adicionó unas esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpos humanos anti-VIH-1, que se incubaron con las muestras problema. Los antígenos de VIH-1 presentes en la muestra se unen a dichos anticuerpos. Después se añade un anticuerpo anti-VIH-1 de conejo que se une con el antígeno de VIH-1 y luego un anticuerpo de cabra contra IgG de conejo, conjugado con peroxidasa. A continuación se añade un sustrato específico (O-fenilendiamina) que contiene peróxido de hidrógeno. La lectura de la actividad enzimática se realizó mediante espectrofotometría y la determinación de la reactividad o no de la muestra depende de la comparación de su densidad óptica con la que presentan los controles positivos y negativos introducidos en el ensayo. La sensibilidad del test para detectar antígeno p24 de un lisado viral es de $50 \pm 20 \text{ pg/ml}$.

3.1.3.3.- Inmunofluorescencia indirecta

Células infectadas y no infectadas, lavadas previamente con PBS, fueron resuspendidas en PBS y añadidas a un porta de inmunofluorescencia a razón de 1×10^4 células/pocillo. Después de secar, se fijaron con una mezcla de metanol:acetona (1:1) a -20°C durante 15 min. Posteriormente, el inmunoensayo se realizó añadiendo sobre cada pocillo un suero, mezcla de sueros humanos positivos a VIH-1, a distintas diluciones, o bien en otros casos con un anticuerpo monoclonal determinado, incubándose siempre a 37°C durante 30 min. en cámara húmeda. A continuación se lavó cada porta tres veces con PBS. Una vez retirado el suero o el anticuerpo, se incubó con anti-inmunoglobulina humana (anti IgG) marcado con fluoresceína (a una dilución 1/20), cuando se utilizó el suero humano y anti-IgG de ratón marcado también con fluoresceína (a una dilución 1/60), en el caso de los anticuerpos monoclonales. Nuevamente los portas se lavaron tres veces con PBS y finalmente una vez con agua destilada. La visualización se realizó por microscopio óptico de epifluorescencia.

3.1.3.4.- Detección de actividad transcriptasa inversa

La detección de la actividad del enzima transcriptasa inversa (RT) se realizó según el protocolo descrito por Willey y colaboradores (1988). La valoración se realizó a partir de $10 \mu\text{l}$ de sobrenadante de cultivos infectados, mezclados en una placa de 96 pocillos con $50 \mu\text{l}$ de una mezcla de reacción que contenía: $10 \mu\text{Ci/ml}$ de $\alpha\text{-TTP-P}^{32}$, $5 \mu\text{g/ml}$ de Poly-A, $0,03 \text{ u.}$ de absorbancia a 260 nm/ml de oligo-dT, Tris 1 M pH 7,8; Cl₂Mg $0,15 \text{ M}$, NP-40 al 2%. Se incubó durante 90

min. a 37°C. Después, 5µl de la mezcla fueron transferidos a un papel de filtro DE81. Una vez seco, se lavó 4 veces con 2xSSC y 2 veces con etanol al 95%. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se expusieron para autorradiografía a -70°C de 4-6 h. Posteriormente se recortaron los filtros y la radioactividad se cuantificó en un contador beta, con líquido de centelleo.

3.1.4.- CARACTERIZACION BIOLOGICA

Los diferentes virus se caracterizaron por su capacidad de replicar distintas líneas celulares:

· Líneas celulares primarias: PBLs y monocito/macrófagos.

· Líneas celulares establecidas: Hut-78 y U937-2.

Los PBLs de donantes seronegativos fueron separados por gradiente de ficoll, y estimulados con 2.5 µg/ml de PHA-P, durante 3 días antes de la infección.

Los monocito/macrófagos fueron preparados según el protocolo descrito por Valentín y colaboradores (1990). Sangre heparinizada de donantes seronegativos, fueron separados por un gradiente de ficoll y colocados en un frasco de cultivo de 25 cm², en medio completo suplementado con 10% de suero de un individuo seronegativo para VIH-1 y con 20% de SBF. Después de 5 días de cultivo a 37°C, las células fueron lavadas con PBS para retirar las células no adheridas a la superficie de frasco de cultivo. El cultivo fue mantenido después en medio con 20% SBF.

Las líneas celulares empleadas para la caracterización biológica fueron mantenidas en las mismas condiciones que las MT-4 (apartado 3.1).

Durante la caracterización de los diferentes virus se valoró la producción de virus dos veces por semana a lo largo de 1 mes (apartado 3.1.3).

La caracterización biológica de los diferentes virus, presentadas en este trabajo, fue realizada por la Dra. E.M. Fenyö del Departamento de Virología, del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia).

3.2.- OBTENCION DE ACIDOS NUCLEICOS

3.2.1.- OBTENCION DE DNA

El DNA de células eucarióticas, lavadas previamente con PBS, se aisló según el método de Perucho y colaboradores (1981). Las células sedimentadas fueron resuspendidas en 10 volúmenes de solución Tris 10mM pH 7,5; EDTA 10mM; ClNa 0,15M, y proteinasa K a 200 μ g/ml y 0,5% de SDS. Incubándose la mezcla durante 60 min. a 65°C y después toda la noche a 37°C. Se añadió, posteriormente, un volumen de Tris 10mM pH 7,5; EDTA 10mM; ClNa 0,65M, y las muestra se trataron 3 veces con fenol y una con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -70°C durante 30 min. El DNA se recogió por centrifugación 14.000 rpm. durante 30 min. a 4°C. Se secó y se resuspendió el precipitado en TE. La lectura de la concentración se realizó por D.O a 260nm .

3.2.2.- OBTENCION DE RNA

Se realizó a partir de un extracto de células infectadas lavadas previamente con PBS, por el método del cloruro de guanidina (Winter y cols., 1985). Las células se resuspendieron en un solución a 4°C de cloruro de guanidina 7M (ver apartado

2.8), hasta su homogenización. Después, se añadió 0,5 volúmenes de etanol al 95% y se dejó toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min. a 4°C y el sedimento se resuspendió en solución XB. A continuación las muestras se trataron 2 veces con fenol, agitándose fuertemente durante 10 min. Después, de extraer la fase acuosa se realizó una re-extracción de la fase fenólica, añadiendo solución XB. Toda la fase acuosa obtenida se precipitó con ClNa 0,3M, y 3 volúmenes de etanol al 95%, a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó durante 60 min. a 14.000 rpm a 4°C y el sedimento se resuspendió en agua destilada estéril o 0,1x de TE

3.2.3.- OBTENCION DE DNA DE PLASMIDOS A GRAN ESCALA ("MAXI-PREP")

Se siguió el método de purificación del DNA plasmídico por precipitación con PEG 8000, tras lisis alcalina (Maniatis y cols., 1989). El sedimento de un cultivo de 250 ml, que había sido crecido durante toda la noche a 37°C, se resuspendió en una solución que contenía Tris-ClH 25mM pH 8,0 ; EDTA 10mM; 15% de sacarosa y lisozima (2 mg/ml). La mezcla se incubó durante 20 min. a 4°C. Seguidamente, se añadió una solución de SDS al 1% y NaOH 0,2M. El DNA cromosómico y los restos celulares se precipitaron por incubación de la mezcla con acetato potásico 3M pH 4,6 durante 15 min. a 4°C; el precipitado se eliminó por centrifugación a 4.000 rpm. en un rotor Sorvall GS3 a 4°C. El sobrenadante se trató con RNasa A (1mg/ml), 20 min. a 37°C. Seguidamente se realizaron 2 extracciones con fenol y se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto, a -20°C de 1-3 h.

El precipitado se resuspendió en TE. Después se añadió ClNa 1,6M que contenía 13% (v/v) de PEG 8000. El plásmido se recogió por centrifugación a 4.000

rpm en un rotor Sorvall GS3 a 4°C/15 min, eliminando muy bien el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en TE, y se trató sucesivamente con fenol. Se recogió por precipitación con etanol y se resuspendió en TE.

3.3.- TECNICA DE DETECCION DE DESAPAREAMIENTOS POR DIGESTION CON RNasa A

Se utilizó la técnica de detección de mutaciones basada en la capacidad de la RNasa A para cortar los desapareamientos puntuales en heterohíbridos (RNA:RNA o DNA:RNA). Esta técnica de detección de desapareamientos por digestión con la RNasa A la llamaremos técnica de "mismatches". Fue primeramente desarrollada para la búsqueda de mutaciones puntuales en genes eucarióticos: en heterohíbridos DNA:RNA (Myers y cols., 1985), como RNA:RNA (Winter y cols., 1985).

En la figura 8 se muestra el esquema de la técnica. Básicamente consiste en hibridar una sonda RNA, marcada radiactivamente (P^{32}), con RNA o DNA; posteriormente los híbridos son digeridos con RNasa A que corta donde existe un desapareamiento. Los productos son analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las mutaciones puntuales son detectadas por la presencia de subfragmentos de RNA específicos.

Su aplicación a estudios de variabilidad y epidemiología molecular en virus se realizó en el virus de la gripe (López-Galíndez y cols., 1988), en los cucumovirus (Owen y Palukaitis, 1988), en el virus respiratorio sincitial humano (Cristina y cols., 1990; 1991), y en el virus de la inmunodeficiencia humana (López-Galíndez y cols., 1991), todos ellos virus con genoma RNA. Esta técnica también se ha aplicado para detectar mutaciones directamente en DNA o bien DNA amplificado (Myers y cols.,

1985; Almoquera y cols., 1988; López-Galíndez y cols., 1991), además se ha utilizado para estudios de variabilidad y epidemiología molecular en virus de genoma DNA, como virus herpes simplex (Rojas, 1991).

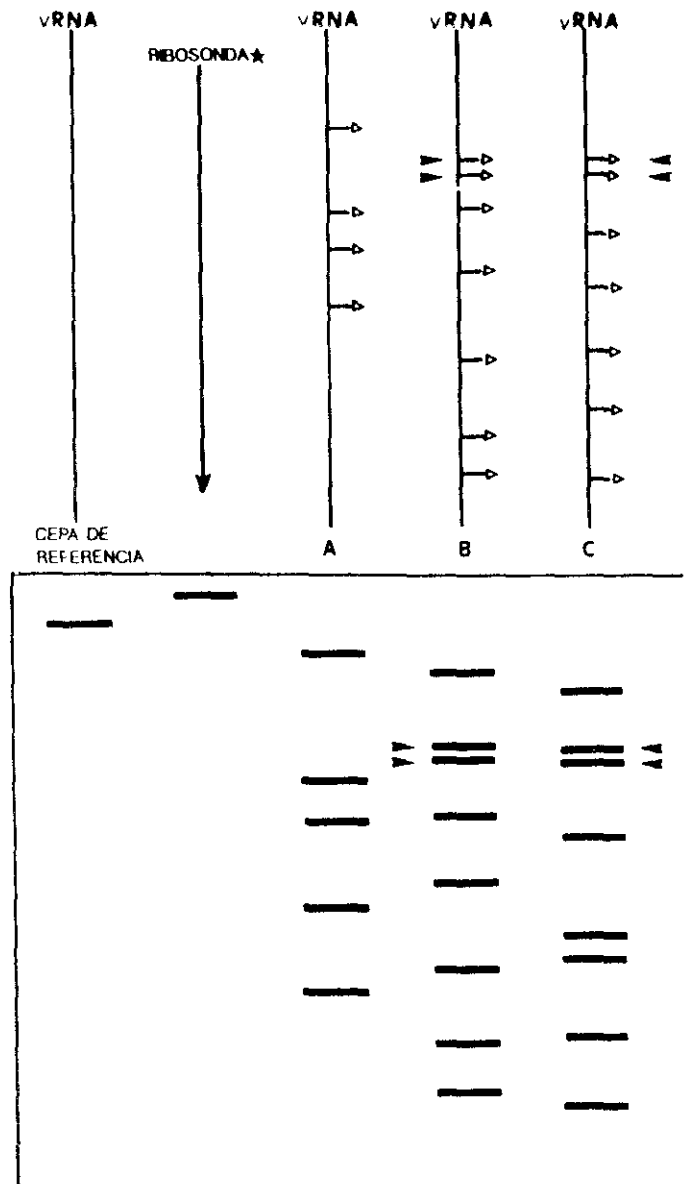


FIGURA 8.- Esquema de la técnica de "mismatches" aplicada a la comparación de cepas virales.

3.3.1.- SINTESIS DE RIBOSONDAS RADIATIVAS

Las ribosondas empleadas fueron (ver figura 9):

- **GAG**: Se sintetizó por la RNA polimerasa T3 a partir del plásmido pG-1, linearizando con Hind III. Ribosonda de 386 nucleótidos (n), localizada entre las posiciones 1259-1645 (numeración según Ratner y cols., 1985).

- **RT-5'**: Se sintetizó por la RNA polimerasa T7 a partir del plásmido pP1-delección de Eco RV, linearizando con Bal I. Ribosonda de 360 n, localizada entre las posiciones 2202-2562.

- **RT-3'**: Se sintetizó por la RNA polimerasa T7 a partir del plásmido pPSP, linearizando con Eco RV. Ribosonda de 325 n, localizada entre las posiciones 2559-2884.

- **VIF-VPR**: Se sintetizó por la RNA polimerasa Sp6 a partir del plásmido pS6, linearizando con Nde I. Ribosonda de 668 n, localizada entre las posiciones 4704-5372.

- **ENV**: Se sintetizó por la RNA polimerasa Sp6 a partir del plásmido pEH, linearizando con la endonucleasa BqI II. Ribosonda de 524 n, localizada entre las posiciones 7199-7723.

3.3.1.1.- Preparación de plásmidos

Los distintos fragmentos de DNA correspondientes a diferentes genes del virus habian sido clonados previamente en plásmidos del tipo pSP64 y pBSK (López-Galíndez y cols., 1991). Estos plásmidos se transcribieron a RNA por medio de secuencias promotoras para las RNA polimerasas de los bacteriofagos T7, T3 o Sp6,

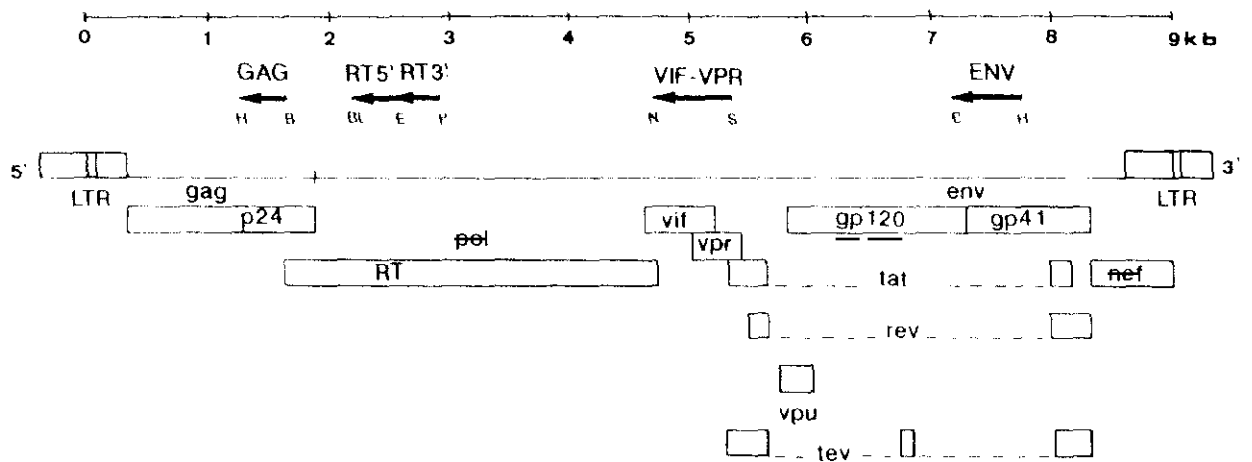


FIGURA 9 - Esquema de la localización de las diferentes ribosondas empleadas.

Las flechas indican cada una de las ribosondas. En la parte inferior de las flechas se indican los enzimas con los que son linealizadas: H: Hind III, B: Bam HI, B1: Bal I, E: Eco RV, P: Pvu II, N: Nde I y S: Sal I.

en extremos opuestos y una región con múltiples sitios para diferentes enzimas de restricción que cortan una única vez en el vector (figuras 6 y 7). Con el fin de obtener transcritos de longitud única, los plásmidos fueron previamente linearizados con enzimas de restricción adecuados, en las condiciones recomendadas por el suministrador. Normalmente se digirieron 1-5 μg de DNA en 50-100 μl de volumen final de reacción y se cuantificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TEA y se visualizó, por tinción con una solución de bromuro de etidio 10 $\mu\text{g/ml}$, y transiluminación con luz UV.

3.3.1.2.- Transcripción "in vitro"

Se sintetizaron sondas de RNA, ribosondas, por transcripción "in vitro", utilizando como molde los plásmidos descritos y usando los reactivos de Promega en las condiciones que indica el proveedor. Se utilizó una concentración de 500 μM de rATP, rTTP, y rGTP, y 50 μCi de $\alpha\text{-CTP-P}^{32}$ (400 Ci/mmol). Las reacciones se incubaron durante 45 min a 40°C con Sp6, o a 37°C con T7 o T3, y una segunda vez añadiendo de nuevo enzima. La reacción se paró por digestión del DNA molde con 1 u. de DNasa I (libre de RNasas) durante 15 min a 37°C. Las ribosondas se purificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y urea 7M. En la figura 10 se muestran diferentes ribosondas separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida urea, como control de su síntesis y para su posterior elución de la banda correspondiente en acetato amónico 2M y 0,1% de SDS (10h/37°C). Una vez eluida la sonda, se precipitó con etanol después de añadir 30 μg de tRNA de levadura. Al final, se resuspendió en 100 μl de solución de hibridación (85% de formamida; CINa 0.4M; EDTA 1mM; Pipes 40mM a pH 6,7) y se almacenó a -70°C.

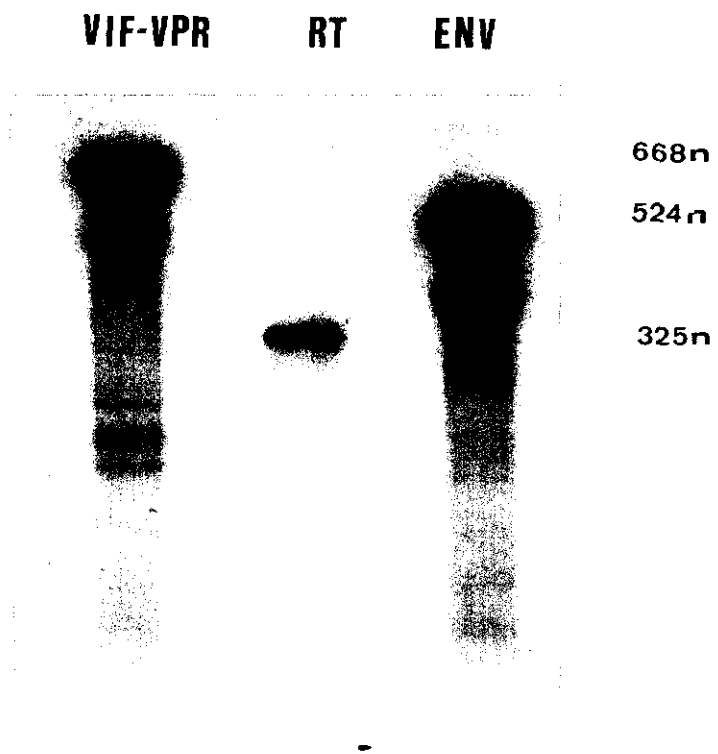


FIGURA 10 Diferentes ribosondas separadas en un gel de poliacrilamida-urea

3.3.2.- HIBRIDACION

Aproximadamente 1 μg de cada muestra de RNA celular total de células infectadas con las distintas cepas, se hibridó con $2,5\text{-}5 \times 10^6$ cpm de la correspondiente ribosonda (ver 3.3.1.2). La solución de hibridación consistía en: 85% de formamida; ClNa 0,4M; EDTA 1mM; Pipes 40mM a pH 6,7. (Winter, y cols., 1985; López-Galíndez, y cols., 1988).

La hibridación se realizó en un volumen final de 30 μl , en presencia de 30 μg de tRNA de levadura, a 55°C/4h (López-Galíndez y cols., 1991), después de desnaturalizar a 95°C durante 3 min.

3.3.3.- TRATAMIENTO CON RNasa A

La digestión con la RNasa A se realizó en condiciones de digestión parcial a 30°C durante 30 min. con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNasa A (type III, Pharmacia); en 300 μl de un tampón que contenía Tris 10mM, pH 7,5; EDTA 5mM; y NaCl 300mM (Winter y cols., 1985).

La reacción se paró añadiendo 20 μl de SDS 10% y 10 μl de proteinasa K (10 mg/ml) e incubándose a 37°C/15 min. Las muestras se desproteinizaron con fenol, después de añadir 10 μg de tRNA de levadura. Se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol y posteriormente se resuspendieron en solución de electroforesis (97% de formamida; 0,1% de SDS; Tris 10mM pH 7,0; 0,01% de azul de bromofenol y de xileno-cianol).

Finalmente se analizaron los fragmentos obtenidos por electroforesis, primeramente en geles analíticos de poliacrilamida al 8% en condiciones

desnaturalizantes con urea 7M, en TBE (geles de 20cm de largo y 1,5 de espesor), a 250V/2h. Tras el resultado de este primer gel, se utilizaban geles de secuencia de poliacrilamida al 6% y urea 7M; en TBE (geles de 0,3 mm de espesor y 50 cm de largo), a 1300V durante 3h. En ambos casos estos geles eran expuestos a -70°C, durante 1 2 días.

3.4.- MARCAJE DEL DNA DE Φ X174

El DNA del fago Φ X-174 digerido con el enzima de restricción HaeIII, se utilizó como marcador de tamaños moleculares. Para ello se marcó el extremo 3', con dGTP- P^{32} utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. Coli*. En la mezcla de reacción se puso 5 μ g de DNA de Φ X174 cortado con HaeIII, con 100 μ M de dNTP (dATP, dCTP y dTTP), 10 μ Ci de α -dGTP- P^{32} todo ello en Tris-ClH 0,5M a pH 7,5; Cl₂Mg 0,1M; DTT 10mM; y BSA 0,5 mg/ml. Se añadió el enzima (1u) y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente y se precipitó 2 veces en presencia de 10 mg/ml de tRNA, acetato amónico 0,3M y 3 volúmenes de etanol al 95%, siguiendo el procedimiento habitual. El sedimento se resuspendió en agua destilada esteril o en 0,1xTE.

3.5.- SECUENCIACION

La secuenciación se realizó a partir del DNA o del RNA obtenido de células infectadas (ver 3.2.1 y 3.2.2).

3.5.1.- SECUENCIACION A PARTIR DEL DNA

La secuenciación se realizó por secuenciación ciclica según Ruano y colaboradores (1991).

3.5.1.1.- Reacción de amplificación de DNA (PCR)

Cada reacción contenía, en un volumen de 50 μ l, 1 μ g de DNA, 1u por reacción de Taq DNA polimerasa, 125 μ M de cada uno de los deoxinucleótidos trifosfato, 0,25 μ g de cada uno de los dos oligonucleótidos iniciadores, en solución PCR que contenía Cl₂K 50mM, Tris 10mM a pH 8,3, y Cl₂Mg 1,5mM.

El perfil de ciclos empleados para las amplificaciones fue: un primer ciclo de desnaturalización durante 5 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos consistentes en desnaturalización 94°C durante 20 sec., hibridación durante 1 min. a 60°C y polimerización a 72°C durante 1 min. y finalmente un ciclo de polimerización de 10 min. a 72°C. La amplificación fue realizada en el Thermocycler Perkin-Elmer-Cetus. El resultado se analizó por electroforesis en geles de acrilamida al 5% en TBE 1x.

3.5.1.2.- Reacción de secuenciación por PCR

La secuenciación se realizó por una PCR asimétrica, empleandose el DNA amplificado, según el apartado 3.5.1.1. Se realizan 4 reacciones paralelas, cuya mezcla de reacción contenía solución de PCR de secuenciación (Cl₂K 50mM, Tris 10mM a pH 8,3 y Cl₂Mg 2,5mM), 12,5 μ M de los desoxinucleótidos trifosfato, un único oligonucleótido por reacción, del que se pone 0,5 μ g, 10 μ Ci de α -dCTP-P³², 2

u. por reacción de Taq DNA polimerasa y 1 μ l del DNA (amplificado anteriormente) como molde. De esta mezcla de reacción se tomaron 7,5 μ l junto con 7,5 μ l de cada uno de los dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTP): ddG (160 μ M), ddA (500 μ M), ddT (500 μ M) y ddC (800 μ M).

Los ciclos empleados para la secuenciación fueron 35, iguales a los empleados para amplificación del DNA. Dependiendo de las zonas a secuenciar y de los oligonucleótidos se adaptaron las temperaturas de hidridación.

Después se añadió a cada muestra 15 μ l de solución de electroforesis (ver 3.3.3) y se analizó por electroforesis en un gel de secuenciación al 6% de acrilamida y Urea 7 M.

3.5.2.- SECUENCIACION A PARTIR DEL RNA

3.5.2.1.- Síntesis de la primera banda del cDNA

La síntesis de cDNA a partir de RNA viral se realizó en varias fases:

1.- Transcripción en reverso para obtener el cDNA a partir del RNA. Hibridación del oligonucleótido complementario al RNA. Se utilizó 200ng de un oligonucleótido correspondiente junto a 200ng del RNA de células infectadas, se calentó a 90°C/2 min y a continuación se puso a 45°C/45 min y se pasó inmediatamente a hielo.

La reacción de transcripción del cDNA a partir del RNA se llevó a cabo en una solución que contenía Tris 10mM pH 8,3, Cl₂Mg 50mM, Cl₂Mg 1,5mM, 0,01% de gelatina, DTT 0,1M, RNasina 1u y 0,4mM de cada uno de los trifosfatos dATP, dGTP, dCTP y dTTP, además de 25 u. de AMV-RT por reacción. Se incubó a 42°C/30

min, a continuación a 95°C durante 1 min. y se puso en hielo.

2.- Síntesis de la segunda banda del cDNA.

Adición del segundo oligonucleótido, a la concentración adecuada para que los dos oligonucleótidos empleados se encuentren a igual concentración final y 2,5u. Taq polimerasa. Se realizaron 30 ciclos de: 93°C, 1 min., 37°C, 1 min., 72°C, 5 min. Los productos obtenidos son analizados gel de agarosa al 1,5% em TAE 1x.

3. Purificación del DNA amplificado por PCR.

La purificación del DNA se realizó en geles de agarosa Nu-Sieve GTG 3% en TBE 1x. La banda se visualizó por tinción con bromuro de etidio y se cortó. Después la banda fue electroeluida y precipitada en presencia de NaCl 0,1M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, en las condiciones habituales y se resuspendió en TE a una concentración de 0,1 µg/µl.

3.5.2.2.- Secuenciación del dsDNA lineal (PCR) con oligonucleótidos 5'-γ-P³²-ATP marcado.

1. Marcaje terminal en el extremo 5' de oligonucleótidos.

Se usaron cantidades equimoleculares de oligonucleótido y γ-ATP-P³². Se empleo la polinucleótido quinasa del fago T4. La reacción se llevó a cabo en una solución que contenía 6,66pmol del oligonucleótido a usar, 20 µCi, de γ-ATP-P³² (3000 Ci/mmol), 10u. de polinucleótido quinasa en tampón para quinasa (Tris 0,5M pH 8, MgCl₂ 0,1M, DTT 50mM). Se incubó a 37°C/30 min. y a continuación se puso en hielo. Se purificó por columna de Sephadex G-25 en TE. Se recogió el volumen excluido, se precipitó con 10mg/ml de tRNA, acetato amónico 0,3M y 3 volúmenes de etanol al 95%, siguiendo el procedimiento habitual. Se resuspendió en 6,6µl de

agua destilada esteril o en TE y se cuantificaron las cpm.

2.- Reacción de secuenciación.

Se pusieron a hibridar entre 20-100ng de DNA molde purificado con 1-2pmol de oligonucleótido iniciador en una solución que contenía: Tris-ClH 40mM pH 7,5, MgCl₂ 10mM, NaCl 50mM. Se calentó a 97°C/3 min y se metió en hielo. A continuación se repartió en cada uno de los tubos correspondientes (G,A,T,C) que contenían 2 μ l de la mezcla correspondiente:

MEZCLAS DE REACCION

	G	A	C	T
dGTP (1mM)	8 μ l	8 μ l	8 μ l	8 μ l
dATP (1mM)	8 μ l	8 μ l	8 μ l	8 μ l
dCTP (1mM)	8 μ l	8 μ l	8 μ l	8 μ l
dTTP (1mM)	8 μ l	8 μ l	8 μ l	8 μ l
ddGTP (100 μ M)	8 μ l	-	-	-
ddATP (100 μ M)	8 μ l	-	-	-
ddCTP (100 μ M)	-	-	8 μ l	-
ddTTP (100 μ M)	-	-	-	8 μ l
H ₂ O	60 μ l	60 μ l	60 μ l	60 μ l

Añadir 2 μ l de mezcla de polimerasa (DTT 0,1M y 12u de DNA polimerasa T7).

La reacción se incubó 8 min/37°C y la reacción se paró por adición de 4 μ l de colorantes dideoxi.

Las secuencias de la zona V3, presentadas en este trabajo, fueron realizadas por el Dr. M.A. Martínez, del Centro de Biología Molecular.

3.6.- ESTUDIO DE PROTEINAS

Para el análisis de proteínas se partió de extractos de células infectadas con los distintos virus y lavadas con PBS. Se añadió una solución que contenía SDS al 2%; glicerol al 1%; y Tris-ClH 0,08M a pH 6,8. Tras incubación durante 10 min a temperatura ambiente, las muestras se guardarón a -20°C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

Las proteínas de los extractos se separaron electroforéticamente por PAGE-SDS, 5% gel concentrador y 10% gel separador, por el procedimiento de Studier (1972), transfiriéndose a papel de Immobilon (Millipore). Para ello, el gel de poliacrilamida se equilibró durante 30 min a temperatura ambiente en tampón de transferencia (glicina 192mM, Tris 25mM a pH 8,3, 0,1% de SDS). El soporte de nitrocelulosa se incubó 5 min. en metanol y a continuación 20 min. en tampón de transferencia. La transferencia se realizó a 250 mA durante toda la noche a 4°C.

Una vez el gel transferido al papel de nitrocelulosa, se procedió a realizar el ensayo inmunoenzimático sobre dicho papel. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon 4 h a temperatura ambiente con PBS y 10% de leche desnatada en polvo. A continuación se lavó el filtro con Tween-20 0,05% (v/v) en PBS (PBS-Tw), y se añadió un suero humano positivo para VIH-1, (dilución de 1/100), incubándose 2 h a temperatura ambiente. Retirados los sobrenadantes y lavados los filtros con PBS-Tw, se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente en agitación orbital con anticuerpos de cabra anti IgG humana (diluido 1/3000) conjugados con peroxidasa

de rabano picante. El filtro se lavó con PBS-Tw y se incubó con solución de sustrato, que contiene peróxido de hidrógeno como sustrato específico y 3,3' diaminobenzidina como cromógeno, hasta la visualización de las bandas, parándose la reacción con lavando con agua.

3.7.- NOMENCLATURA

Las poblaciones virales se designaron con una letra correspondiente a cada clon inicial en mayúsculas, seguido por el número del pase en cultivo y el logaritmo de la multiplicidad de infección empleada, todo esto como subíndice, por ejemplo $F_{10^{-3}}$, nos indica la población resultante después de 15 pases de la población F_0 a una m.d.i de 10^{-3} ufp/ml (ver esquema, figura 14).

Toda la numeración tanto de nucleótidos como de aminoácidos empleada en el texto es según Ratner y colaboradores (1985).

3.8.- CALCULOS ESTADISTICOS

En el análisis de datos obtenidos en este trabajo se han utilizado distintos métodos estadísticos:

La comparación de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) simple y posteriormente se comprobaron los grupos por medio de una t-Student. Los valores de P se calcularon según el test de probabilidad directa de Fisher (Sokal y Rohlf, 1969).

4.- RESULTADOS

4.1.- OBTENCION DEL S61

Linfocitos de sangre periférica del paciente 61/89, positivos en aislamiento (ver apartado 2.1), se co-cultivaron con linfocitos de un individuo sano. A los tres días se valoró la infección, detectándose antígeno p24 soluble en el sobrenadante de cultivo por ELISA de captura (2354 ng/ml) y ECP +3, visible al microscopio óptico. En este momento se recogió, el sedimento de células y el sobrenadante.

Con el sobrenadante 61/89 obtenido del co-cultivo, se infectaron células MT-4 (ver 3.1.2.2), obteniéndose la semilla, denominada S61, utilizada como material original en este estudio. A los 3 días post-infección presentaba un ECP 3+, en el 75% de la células (Richman, 1990; ver apartado 3.1.2.2.; figura 11), $2,1 \times 10^8$ pg/ml de antígeno p24 soluble en sobrenadante y título de un $1,8 \times 10^6$ ufp/ml.

4.2.- OBTENCION DE CLONES BIOLOGICOS

4.2.1.- DESARROLLO DE LA TECNICA DE PLAQUEO PARA VIH-1

En este trabajo lo primero que se realizó fue la puesta a punto de un ensayo de plaqueo para el VIH-1, adaptando el protocolo empleado por el grupo de Harada (Harada y cols., 1985) con ciertas modificaciones (ver figura 12).

Se valoraron los siguientes parámetros:

- 1) Concentración de PLL.
- 2) Número de células MT-4 necesarias para formar la monocapa.
- 3) Preparación del inóculo viral.
- 4) Absorción del inóculo viral.

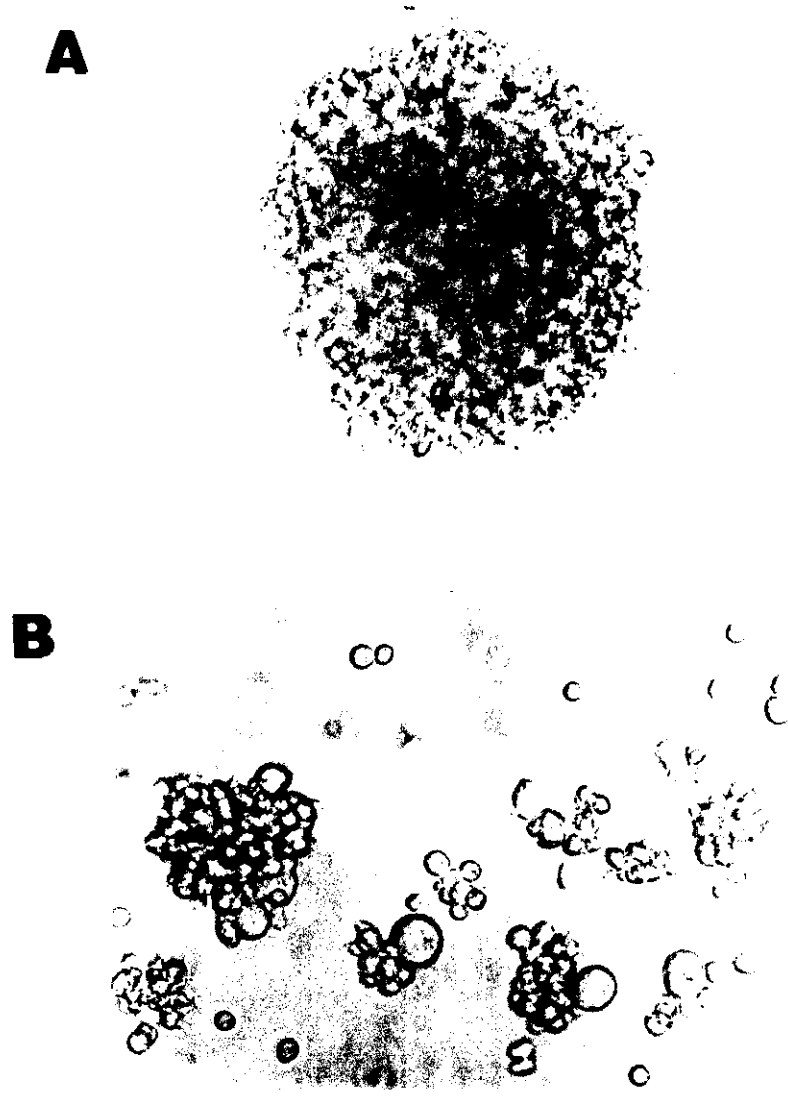


FIGURA 11 Aspecto de células MT-4 infectadas con el S61 y sin infectar.

A: Células MT-4 sin infectar

B: Células MT-4 infectadas con el S61

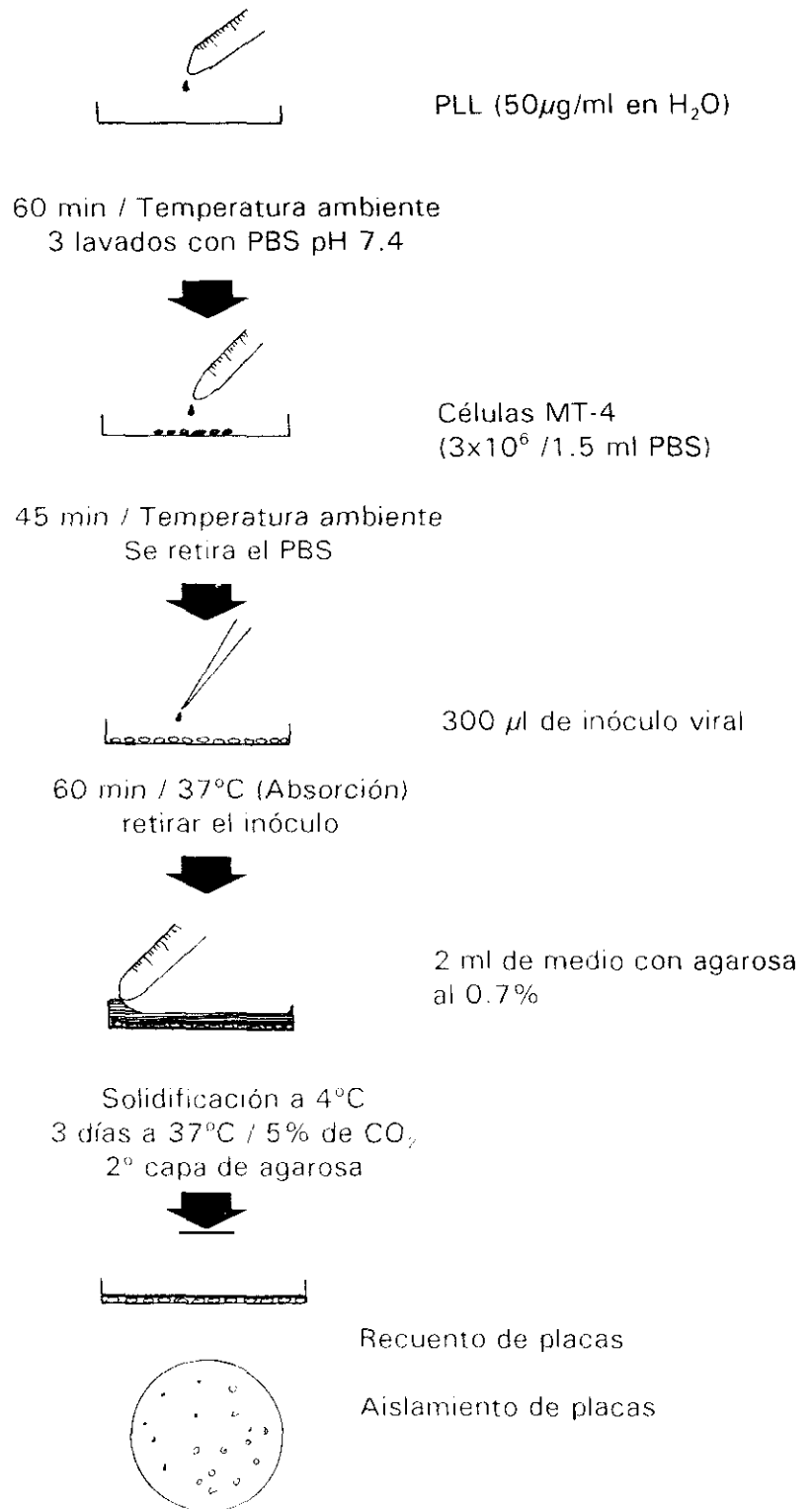
ENSAYO DE PLAQUEO

FIGURA 12.- Protocolo del ensayo de plaqueo del VIH-1 en células MT-4.

5) Soporte sólido.

6) Visualización.

Los primeros experimentos se centraron en determinar la concentración más adecuada de PLL para favorecer la adherencia de las células a la placa de cultivo. Se valoraron concentraciones desde $50\mu\text{g/ml}$ hasta $200\mu\text{g/ml}$, no encontrando diferencias entre ellas. Se consideró más adecuada la de $50\mu\text{g/ml}$, ya que al ser más baja sería menos tóxica para las células. El siguiente parámetro que se valoró fue el número de células MT-4 necesarias para formar la monocapa en una placa p35. El número óptimo fue 3×10^5 MT-4 por p35, después de haber valorado desde 1×10^6 hasta 6×10^5 MT 4 por placa.

Una vez formada la monocapa se procedió a la infección de la misma, $300\mu\text{l}$ fue el mínimo volumen de inóculo viral necesario para cubrir totalmente la superficie de la monocapa. Uno de los parámetros que encontramos más críticos, en todos los ensayos, fue el pH del inóculo viral; cualquier oscilación de este producía efectos negativos sobre la adherencia de las células a la placa. Se decidió preparar el inóculo viral en medio completo, previamente mantenido a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%, para mantener un pH de 7.

La absorción del inóculo se realizó durante 60 min. a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. A continuación se retiró el inóculo viral y se procede a la adición de un soporte sólido que impide la diseminación del virus (agarosa al 0,7% en medio completo, 2 ml por pocillo). Una vez adicionada la capa de agarosa, se incubó a 4°C durante 3 min. para favorecer su solidificación.

A los 7 días post-infección se visualizaban las placas. Según los protocolos descritos, se visualizaban por tinción con colorantes vitales como son el rojo neutro o el tetrazolium (Harada y cols., 1985; Nakashima y cols., 1989). Después de realizar

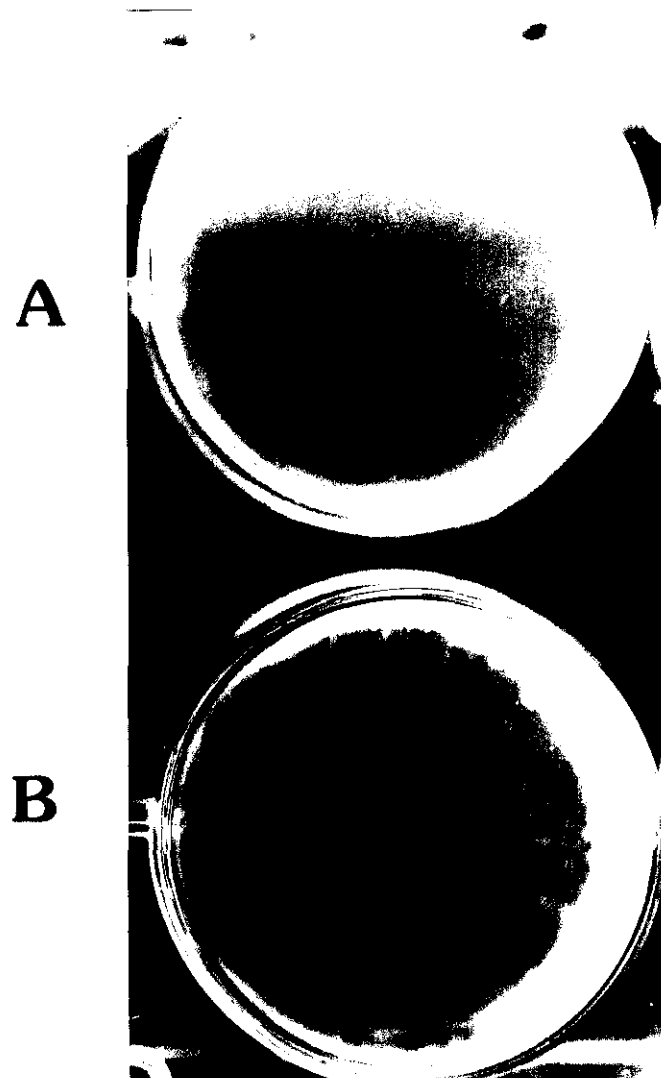


FIGURA 13.- Plaqueo de VIH-1 en MT-4.

A: Células MT-4 sin infectar

B: células MT-4 infectadas con VIH-1-III_B, donde se pueden apreciar las placas

varios ensayos, se comprobó que las placas podían ser visualizadas a simple vista sin necesidad de ser teñidas con ningún colorante (figura 13).

Los primeros ensayos se llevaron a cabo con sobrenadantes de las cepas de referencia VIH-1-III B (Popovic y cols., 1984) y con el VIH-1-RF (Starcich y cols., 1986) y posteriormente con el aislado español 61/89.

Una vez visualizadas las placas, se pinchaban y se resuspendían en 300 μ l de medio completo.

Las placas obtenidas se analizaron por:

1. Detección de VIH-1 en el sobrenadante de la placa resuspendida mediante la determinación del antígeno p24, por ELISA de captura de antígeno (tabla IV).

CEPAS	PLACA	P24 (pg/ml)
VIH-1-III B	A	9000
	B	13000
	C	23900
	D	42900
	E	28700
	control I	negativo
	control II	negativo
61/89	A	26700
	B	24000
	C	20300
	control I	negativo
	control II	negativo
control(-)	a	negativo

TABLA IV.- Valores de antígeno de p24 soluble de las placas pinchadas.

Las placas son nombradas con letras en mayúsculas.

Con números romanos se indican los controles de zonas pinchadas donde no existían placas.

Control I. Células MT 4 sin infectar.

Todas las valoraciones del antígeno p24 fueron realizadas por ELISA de captura de antígeno. Se realizaron a una dilución 1/100.

a: aislamiento del pocillo control sin infectar.

2. Capacidad infectiva de las placas. El sobrenadante de resuspender las placas obtenidas se volvió a plaquear, en distintos ensayos, permitiendonos valorar el título que presentaba por ufp/ml (tabla V).

CEPA	PLACA	ufp/ml
VIH-III B	A	$2,3 \times 10^3$
	B	$1,6 \times 10^4$
	C	$2,4 \times 10^4$
	D	$1,7 \times 10^3$
	E	$1,3 \times 10^4$
61:89	A	$4,0 \times 10^3$
	B	$3,0 \times 10^4$
	C	$3,0 \times 10^2$
	D	$4,0 \times 10^4$
	E	$1,0 \times 10^3$

TABLA V.- Títulos de los virus obtenidos de las placas en ufp/ml.

3. Cinética replicativa de las placas en células MT-4. Se valoró la presencia de antígeno p24 y el ECP a los 6 y 10 días post-infección (tabla VI).

CEPA	PLACA	DIAS POST-INFECCION			
		6° DIA		10° DIA	
		P24*	ECP	P24*	ECP
VIH-1 III B	A	+	-	++	+
	B	+	+	++	++
61/89	A	+	+	++	++
	B	+	+	++	++
1		#	-	+	+
2		-	-	-	-
3		-	-	-	-

TABLA VI.- Cinética de replicación de diferentes placas en células MT-4.

Las placas son nombradas con letra mayúscula

* Valoración de antígeno p24 soluble en el sobrenadante del cultivo por ELISA de captura de antígeno.

En p24: + indica $>$ de 2750 pg/ml.

++ indica $>$ de $2.7 \cdot 10^4$ pg/ml.

indica positiva pero con niveles inferiores a 2750 pg/ml.

En ECP: + indica cultivo positivo, el aumento en el número de + indica aumento en el ECP.

- indica cultivo negativo en los parámetros valorados.

1. Aislamiento de virus, de una zona donde no aparecía placa, dentro de un pocillo con placas.

2. Aislamiento del pocillo control sin infectar.

3. Células MT 4 utilizadas como control negativo.

4.2.2.- CLONAJE DEL VIRUS S61

A partir del S61 (ver apartado 4.1), tras un primer plaqueo, se pincharon, 5 placas (denominadas A,B,D,E,F) que fueron nuevamente purificadas por cinco plaqueos consecutivos. El experimento se esquematiza en la figura 14.

Al final de este proceso, se analizaron dos placas de cada placa inicial, eligiéndose placas de tamaño diferente (grandes y pequeñas).

Este proceso se realizó en paralelo con la cepa de referencia, VIH-1-IIIB, de la cual se analizaron 4 placas de cada placa inicial.

Al final del proceso de clonaje en el que se contaba con poblaciones virales genéticamente homogéneas se preparó una semilla, de cada placa final. A estas placas se les denominó clones virales.

4.2.3.- CARACTERIZACION Y SELECCION DE LOS CLONES

4.2.3.1.- Caracterización genotípica

4.2.3.1.1.- Análisis de los clones por la técnica de "mismatches"

De los clones aislados directamente de placa y amplificados una vez en MT-4, se extrajo el RNA y se caracterizaron 10 clones del S61 y 20 en el caso del VIH-1-IIIB.

Se caracterizarón genéticamente estos clones en base al patrón de bandas obtenido por la aplicación de la técnica de "mismatches" (López-Galíndez y cols., 1988; 1991).

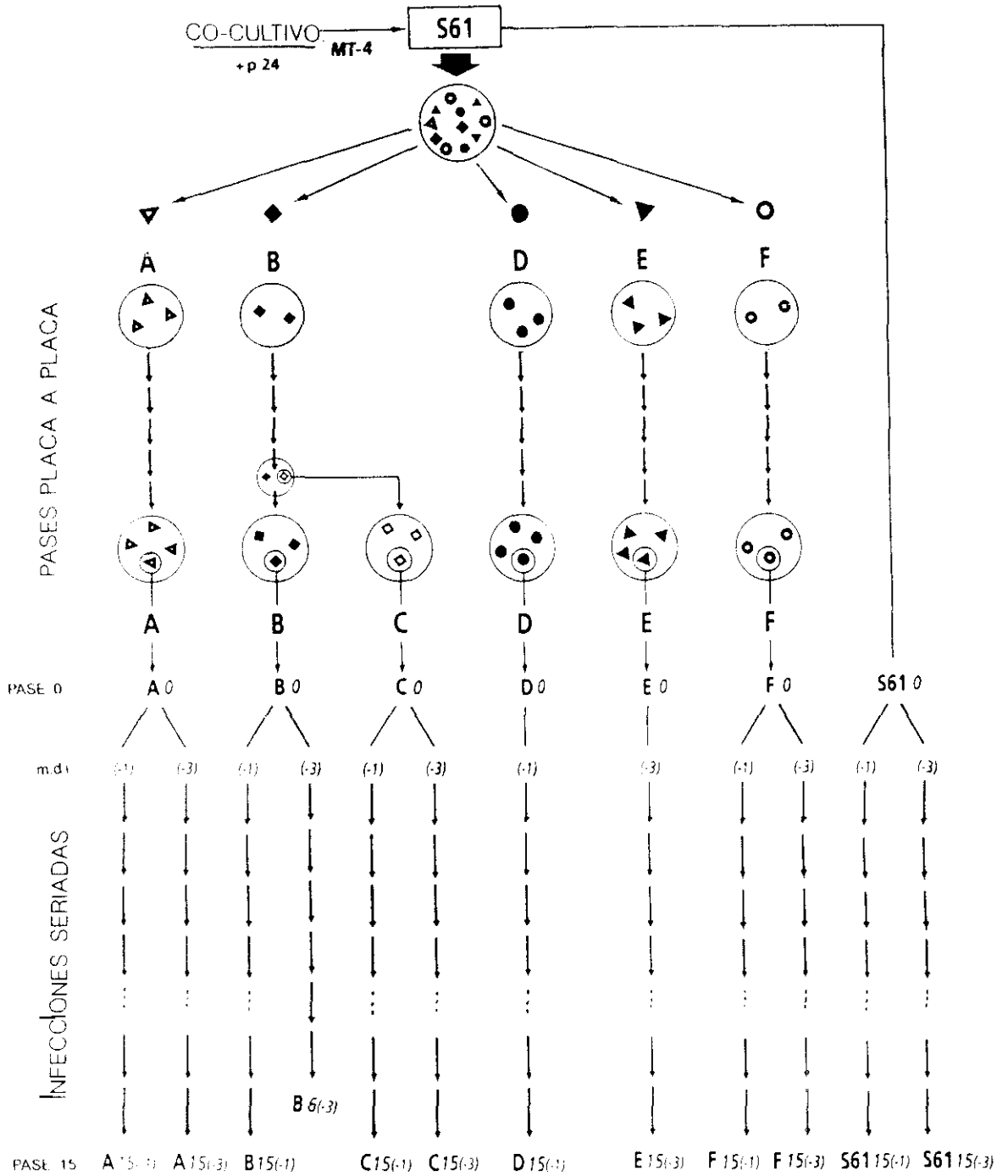


FIGURA 14. Esquema del aislamiento de placa y pases seriados a diferentes condiciones de infección del aislado 61/89.

Se utilizaron las ribosondas de las regiones genómicas (previamente descritas en 3.3.1): GAG (386 n), RT-5' (360 n), RT-3' (324 n), VIF-VPR (668 n) y ENV (524 n), de la cepa de referencia VIH-1-IIIB (ver figura 9). Con las 5 ribosondas empleadas se analizaron un total de 2267 nucleótidos, lo que representaba aproximadamente un 25% de todo el genoma. Las síntesis de las ribosondas, junto con el resto del ensayo de detección de desapareamientos por digestión con RNasa A, se realizó según lo descrito en métodos (López-Galíndez y cols., 1991; apartado 3.3).

Se comprobó que las dos placas procedentes de la misma placa presentan patrones idénticos de bandas con todas las ribosondas analizadas (RT-3', VIF-VPR y ENV). Después del estudio de las placas del S61 con estas ribosondas se seleccionaron 5 clones del S61; diferentes entre sí en al menos un patrón de "mismatches" con alguna ribosonda. Además se seleccionó un clon con patrón idéntico a otro, el clon C que procedía del penúltimo plaqueo de la serie B (ver esquema del experimento, figura 14), presentando un patrón de "mismatches" idéntico al clon B.

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran los resultados de la comparación de los patrones de bandas que presentan los seis clones elegidos del S61 junto con el de la semilla (S61), con las 5 diferentes ribosondas (GAG; RT-5'; RT-3'; VIF-VPR y ENV).



FIGURA 15.- Análisis genético por la técnica de "mismatches" en el gen GAG de los 6 clones elegidos en comparación con el S61.

IIIIB: Cepa de referencia homóloga

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones

* Bandas que corresponden a mutaciones específicas del clon BH10, utilizado para la síntesis de la sonda y que está presente en el virus VIH 1-IIIIB. Se consideran como fondo del ensayo

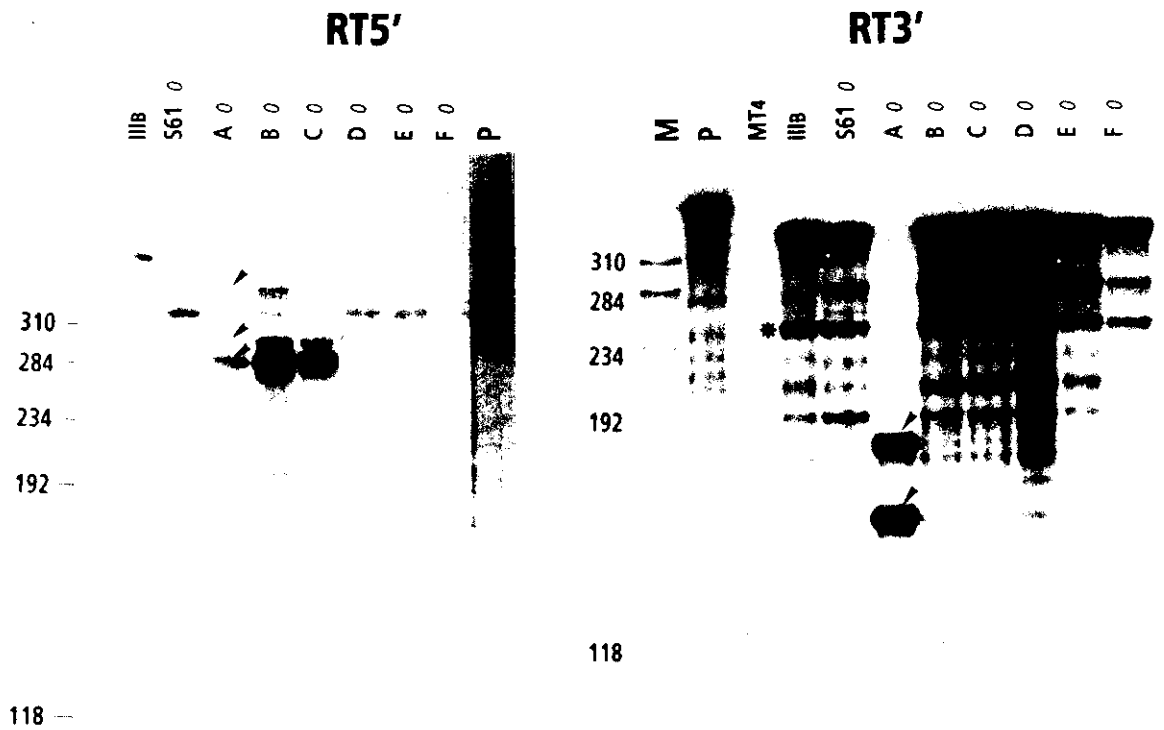


FIGURA 16.- Análisis genético por la técnica de "mismatches" de la zona RT de los 6 clones del S61 elegidos y del S61.

Panel A: Experimento con la zona 5' del gen RT.

Panel B: Experimento con la zona 3' del gen RT.

IIIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

* Bandas que corresponden a mutaciones específicas del clon BH10, utilizado para la síntesis de la sonda y que está presente en el virus VIH-1-IIIIB. Se consideran como fondo del ensayo

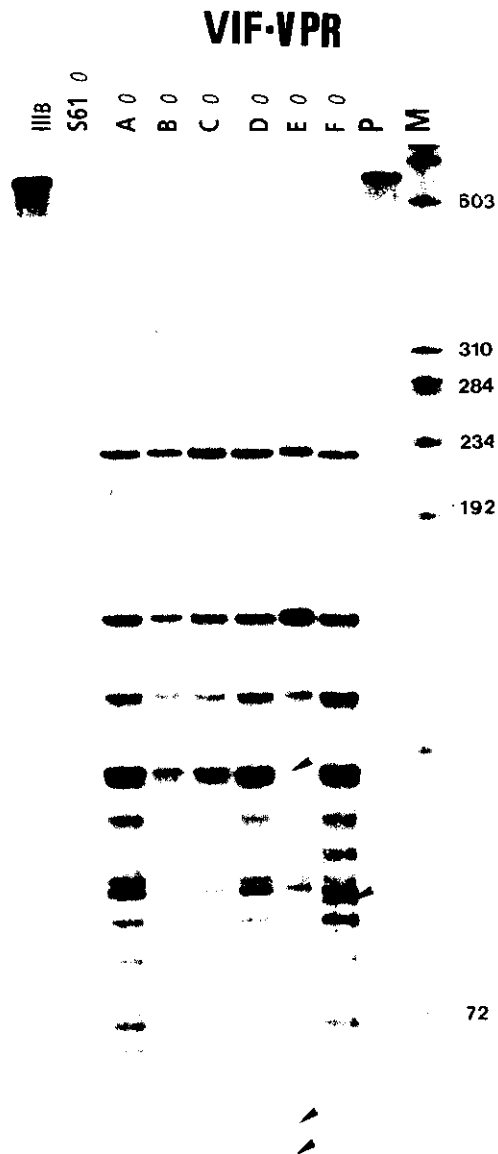


FIGURA 17.- Análisis genético por la técnica de "mismatches" de las zona VIF-VPR de los 6 clones elegidos comparándolos con el S61.

IIIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones

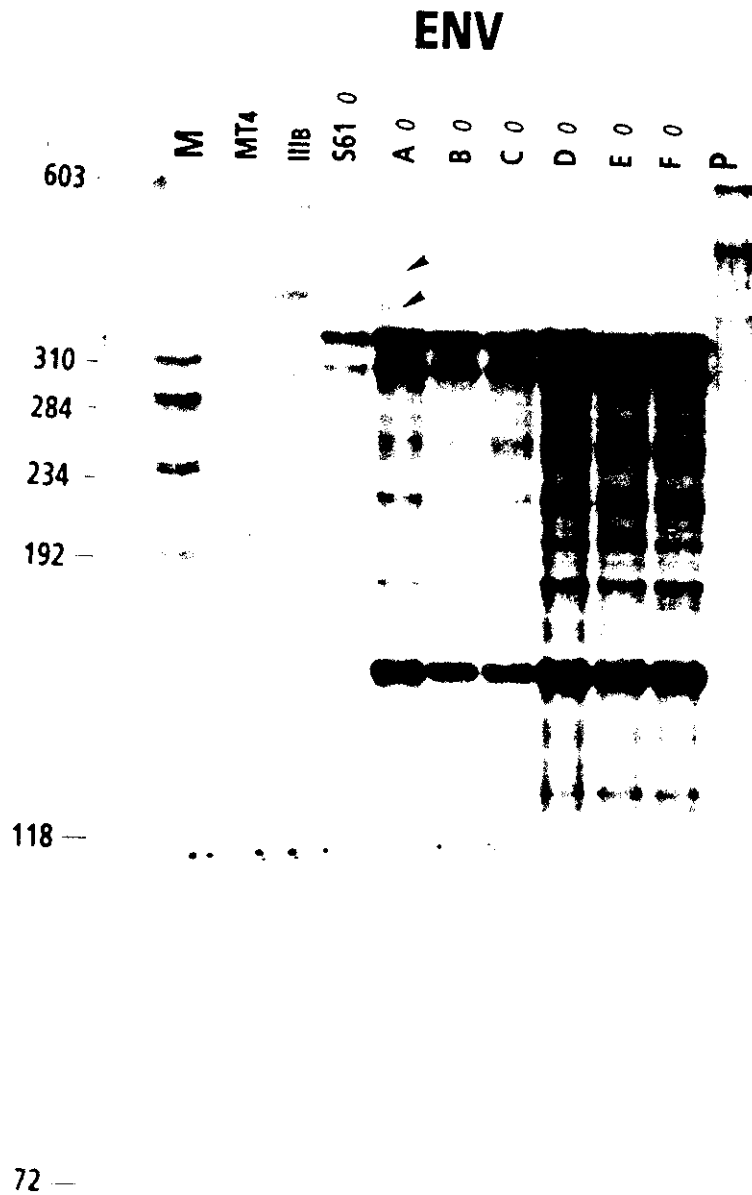


FIGURA 18.- Análisis genético por la técnica de "mismatches" de los 6 clones elegidos comparándolos con el S61 en una zona del gen ENV.

IIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT 4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

En la tabla VII se resume los patrones de los diferentes clones, comparándolos con el del S61.

CLONES	PATRON DE BANDAS				
	GAG	RT-5'	RT-3'	VIF-VPR	ENV
S61	N	N	N	N	N
A ₁	N -1	D	D	N	N -1; +2
B ₁	N -1	D	N	N	N -1; +2
C ₁	N -1	D	N	N	N -1; +2
D ₁	D*	N	N	N	N -3
E ₁	D**	N	N	N +3; -1	N 3
F	N	N	N	N +2	N -3

TABLA VII. Comparación del patrón de bandas entre los clones seleccionados y el S61.

N: Patrón del S61

D: Patrón diferente.

- y + indican pérdida o ganancia de bandas, respectivamente.

* indica patrón distinto.

Se observa que los clones A_0 , B_0 y C_0 , presentan similar patrón de bandas en las zonas GAG, RT-5', VIF-VPR y ENV. El A_0 se diferencia en la zona RT-3' de los otros clones.

Los clones D_0 , E_0 y F_0 , son idénticos en las zonas: RT-5', RT-3 y ENV.

El clon D_0 presenta el mismo patrón en la zona VIF-VPR que los clones A_0 , B_0 y C_0 .

El clon F_0 presenta el mismo patrón en la zona GAG al A_0 , B_0 y C_0 .

También se analizaron 20 clones procedentes del VIH-1-IIIB con las ribosondas de las zonas RT-3', VIF-VPR y ENV, encontrándose de todas las placas analizadas solamente un patrón diferente respecto a la semilla del VIH-1-IIIB en la zona VIF-VPR (dato no mostrado).

Sólo se estudiaron, por pases seriados, los clones procedentes de la semilla S61, pero no los obtenidos de VIH-1-IIIB ya que presentaba idénticos patrones de "mismatches".

4.2.3.1.2.- Secuenciación de las mutaciones observadas por "mismatches"

Una vez analizada la diversidad genética por medio de la técnica de "mismatches", decidimos caracterizar las mutaciones que diferenciaban los clones. Entre ellas la localizada en la zona RT-3' del clon A (ver figura 16). Para ello secuenciamos la zona localizada entre las posición 2655 y 2794. Se secuenció a partir del DNA de cultivos infectados amplificado por PCR con los oligonucleótidos 20RD y 3RU (ver tabla III) y una segunda amplificación asimétrica con el oligonucleótido 20RD, según el protocolo descrito en el apartado 3.5.1. Se secuenció el S61, como representante del patrón mayoritario, y el A_0 (figura 19).

Al comparar la secuencia del clon A_0 con el S61 se vieron dos cambios de

nucleótidos, mutaciones responsables del diferente patrón observado por "mismatches". Los cambios se localizan en la posición 2727, en el que cambia una A presente en S61 por una G en el A₀; y en la posición 2734, en el que cambia una T por una C. Estos dos cambios van acompañados de cambio en los respectivos aminoácidos, en el primer caso cambia una Thr por una Ala (aminoácido 200), y en el segundo una Ile por una Thr (aminoácido 202). El cambio Thr por Ala se encuentra también en la cepa VIH-1-MN, el segundo cambio Ile por The no se encuentra en ninguna de las cepas descritas (Myers y cols., 1990).

En la zona secuenciada encontramos dos mutaciones en los clones y en el S61 con respecto al BH10 (clon procedente del VIH-1-IIIB), una localizada en el nucleótido 2761 en el que cambia una G por una A y la 2769 en el que cambia una C por una T en el S61 y en el A₀. Estos cambios producen cambio de aminoácido, en el primero cambia una Arg por una Lys (aminoácido 211) y en el segundo Leu por Phe (aminoácido 214). Estos dos cambios también se encuentran en el A₀. Ambos cambios se encuentran cerca del sitio catalítico del enzima (Kohistaedt y cols., 1992).

A.**SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS**

	2655				
	↓				
BH10:	CCAGACATAG	TTATCTATCA	ATACATGGAT	GATTTGTATG	TAGGATCTGA
MN:
SF2:
S61 _U :
A ₀ :
BH10 :	CTTACAAATA	GGGCAGCATA	GAACAAAAAT	AGAGGAACTG	AGACAACATC
MN :G.....G.....
SF2 :G.....
S61 _U :
A ₀ : <u>G</u> <u>C</u>
				2794	
				↓	
BH10:	TGTTGAGGTG	GGGACTTACC	ACACCAGACA	AAAAACATCA	
MN:T.....	
SF2:T.....	
S61 _U : A T	
A ₀ : A T	

B.**SECUENCIA DE AMINOACIDOS**

	186				220
	↓				↓
BH10 :	PDIVIQYMDDL	VGSDLEIGQH	RTKIEELRQ	HLLRWGLT	TPDKH
MN :	A.....	R.....	F.....
SF2 :	F.....
S61 _U :	K	F
A ₀ :	<u>A</u> <u>T</u>	K F

FIGURA 19. Secuencia de nucleótidos (panel A) y de aminoácidos (panel B) de la zona RT.

En negrita se señalan las mutaciones características del S61.

Los nucleótidos y aminoácidos que se encuentran con doble subrayado son los cambios de A₀ con respecto al S61.

BH10 es el clon 10 del VIH 1 HIE con el que se realizó la sonda que empleamos para caracterizar por la técnica de "mismatches" (Ratner y cols., 1985).

MN y SF2 secuencias de diferentes aislados de referencia con los que hemos encontrado homologías (Shaw y cols., 1984; Sánchez Pescador y cols., 1985).

4.2.3.2.- Caracterización fenotípica

La selección de clones para los pases seriados a diferentes condiciones de infección, se realizó teniendo en cuenta primero su diferente genotipo, que nos permitía diferenciarlos (ver 4.2.3.1) y en segundo lugar, el tamaño de placa de donde procedían.

Los aislados de VIH-1 se diferencian en características fenotípicas: capacidad de inducir sincitios, en su cinética de replicación y en su trópismo (Asjö y cols., 1986; Cheng-Mayer y cols., 1988; Tersmette y cols., 1988).

Los clones seleccionados del S61 se analizaron fenotípicamente según:

- Efecto citopático en células MT-4.

La capacidad para inducir sincitios es una de las características fenotípicas más estudiadas. Esta característica permite clasificar los aislados de VIH-1 y correlacionarlos con el estado de la enfermedad (Tersmette y cols., 1988). Los aislados NSI se consideran característicos de los virus aislados de individuos en estado asintomático de la enfermedad. Con el progreso de la enfermedad hacia SIDA, los virus pasan de ser NSI a ser SI.

En la figura 20 se observa el ECP de los diferentes clones junto con el S61 en células MT-4. Los clones, A₀, B₀, C₀, D₀ y E₀, son SI al igual que el S61, aunque se pueden apreciar ciertos matices en el aspecto del ECP, como el clon C₀ que produce sincitios mayoritariamente de aspecto grumoso.

Sorprendentemente, el clon F₀ carece de la capacidad de inducir sincitios en MT-4, es un virus no sincitial (NSI), se caracteriza por producir lisis celular.

En resumen, dentro de un aislado viral podemos encontrar clones con diferente características fenotípicas.

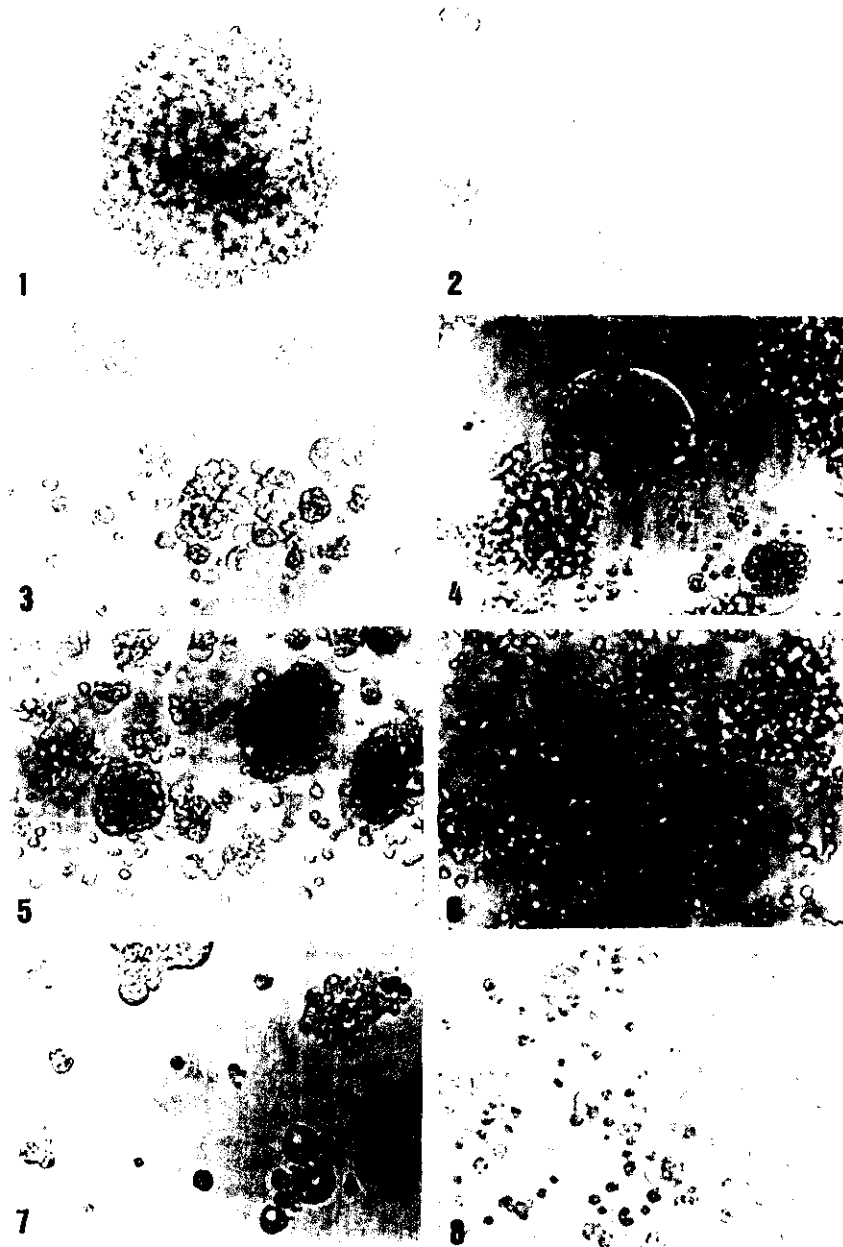


FIGURA 20.- ECP observado en el S61 y en los diferentes clones.

- | | |
|--|--|
| 1: Células MT 4 sin infectar | 2: MT-4 infectadas con el S61 |
| 3: MT-4 infectadas con el clon A _{ii} | 4: MT-4 infectadas con el clon B _{ii} |
| 5: MT-4 infectadas con el clon C _{ii} | 6: MT-4 infectadas con el clon D _{ii} |
| 7: MT-4 infectadas con el clon E _{ii} | 8: MT-4 infectadas con el clon F _{ii} |

Fotografías a microscopio invertido realizadas a 60 aumentos

Tamaño placa

La capacidad de formar placas en células MT-4 junto con el tamaño de dichas placas han sido utilizadas para clasificar los diferentes aislados de VIH-1 (Cheng-Mayer y cols., 1988).

En la figura 21 se presenta una fotografía que muestra diferentes tamaños de placa. Se puede observar el panel A placas grandes y en el panel B placas de menor tamaño.

En la tabla VIII se resume algunas características fenóticas de los clones elegidos, ECP y tamaño de las placas.

	S61	A ₀	B ₀	C ₀	D ₀	E ₀	F ₀
ECP	SI	SI	SI	SI	SI	SI	NSI
TIPO DE PLACA	G + P	P	P	P	G	P	G

TABLA VIII.- Características fenóticas.

SI: Sincitios NSI: No sincitios
 P: Placa pequeña G: Placa grande

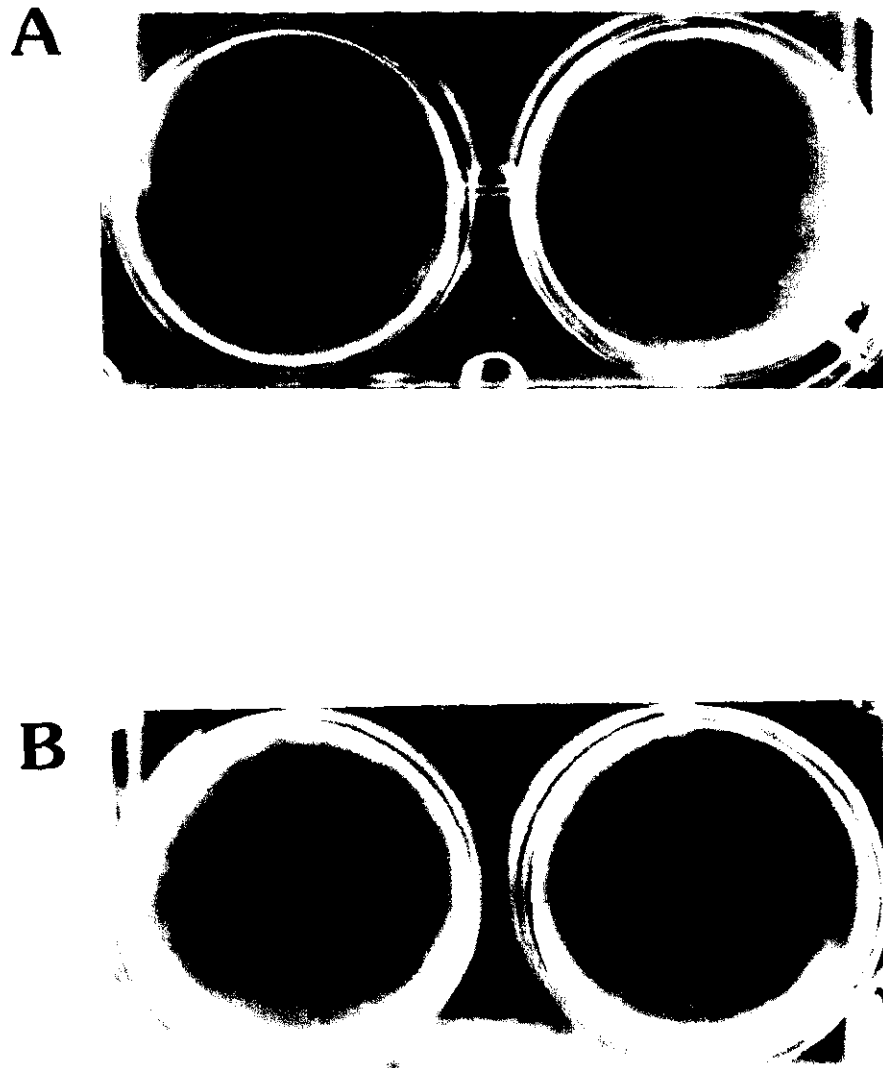


FIGURA 21.- Diferentes tamaño de placas

A: placas grandes (S61)

B: placas pequeñas (clon B₁)

· Título infectivo de cada clon

Los clones elegidos fueron titulados bien en ufp/ml en células MT-4, o bien en DI_{50} /ml en células MT-2 (tabla IX). Como se puede observar el virus que presenta mayor título es el clon D ($2,2 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^7$ ufp/ml o $2,0 \times 10^7$ DI_{50} /ml) y el clon F es el que presenta menor título ($5,9 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$ pfu/ml o $3,3 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$ DI_{50} /ml). El valor obtenido en ufp/ml en MT-4 es siempre mayor al de DI_{50} /ml en MT-2.

Al titular los distintos virus se observó que los clones B y C presentaban disminuida su capacidad de formar placas. Las placas que se obtenían en algunos de los ensayos con estos clones eran de tamaño muy pequeño lo que impedía su recuento y por tanto su titulación en ufp/ml. Por lo cual estos clones fueron titulados en DI_{50} /ml solamente.

· Actividad transcriptasa inversa.

En la tabla X se muestran los valores de actividad RT de cada clon junto con el S61.

La actividad RT es uno de los métodos más empleados para cuantificar la cantidad de virus presente en una muestra. Nosotros hemos observado, que no existe correlación directa entre el título obtenido en ufp/ml o en DI_{50} /ml y la actividad RT detectada, como se puede ver al comparar las tablas IX y X, lo mismo que han encontrado otros grupos (Harada y cols., 1987; Potts, 1990). La actividad RT y el título varían con cada uno de los aislados, encontrando virus con menor título en ufp/ml o en DI_{50} /ml, pero con mayor actividad RT como por ejemplo el clon F.

VIRUS	ufp/ml	DI ₅₀ /ml
S61	$6,1 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$
A ₀	$1,0 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
B ₀	ND	$6,1 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^6$
C ₀	ND	$4,5 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^4$
D ₀	$2,2 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
E ₀	$1,6 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$
F ₀	$5,9 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$

TABLA IX. Títulos de los diferentes virus en ufp/ml y en DI₅₀/ml.

ND. No determinado.

VIRUS	RT (cpm/ml)
S61	$9,9 \times 10^6$
A ₀	$1,6 \times 10^6$
B ₀	$4,7 \times 10^6$
C ₀	$5,6 \times 10^5$
D ₀	$2,3 \times 10^6$
E ₀	$6,4 \times 10^6$
F ₀	$1,2 \times 10^7$

TABLA X.- Niveles de RT de cada uno de los virus.

4.3.- PASES SERIADOS DE LOS CLONES

4.3.1.- DETERMINACION DE LAS CONDICIONES

El proceso de replicación de los retrovirus y en particular del VIH-1 es complejo y en el intervienen numerosos componentes tanto del virus como de la célula. También hay que tener en cuenta la composición en "cuasi-especies" que presenta todos los virus, dentro de la cual se incluyen variantes con diferentes propiedades. Para tratar de comprender el posible papel de diferentes factores en la variación de VIH-1, se realizaron pases seriados en MT-4 (de los clones y la semilla del aislado 61/89) a dos multiplicidades de infección (m.d.i).

Para buscar las dos m.d.i más idóneas se consideraron varios factores, primero que el período de aparición de la infección no fuera demasiado largo y en segundo lugar, que la diferencia entre ambas diluciones fuera de por lo menos 100 veces. Teniendo en cuenta por un lado el título de los diferentes clones (ver tabla IX) y por otro evitando altas multiplicidades que favorecerían la aparición de partículas defectivas interferentes (Huang, 1988). Para decidir las m.d.i apropiadas se infectaron 1×10^6 MT-4 con el S61 o con la cepa de referencia (VIH-1-III B), a m.d.i. desde (-1) hasta (-5) (de 10^1 ufp/célula hasta 10^5 ufp/célula). Durante un período de 15 días se siguieron las infecciones, determinándose diariamente los siguientes parámetros: viabilidad, aparición de ECP, % de células positivas por IFI y antígeno p24 soluble en sobrenadante por ELISA de captura de antígeno. El ensayo se realizó también con el VIH-1-III B, como control y para comprobar la existencia de virus con diferente cinética de replicación.

En la figura 22 se representa como evoluciona la viabilidad en las diferentes infecciones, por tinción con azul tripano, durante 15 días, en el panel A con VIH-1-III B y en el panel B con S61. Se observa como se produce un descenso pronunciado en la viabilidad de las células a partir del tercer día post-infección en m.d.i de (-1) y (-2). En m.d.i de (-3), (-4) y (-5) el descenso de la viabilidad, por debajo del 50%, se alcanza a partir de los 11 días en el caso de VIH-1-III B, y a partir de los 8 días en el S61.

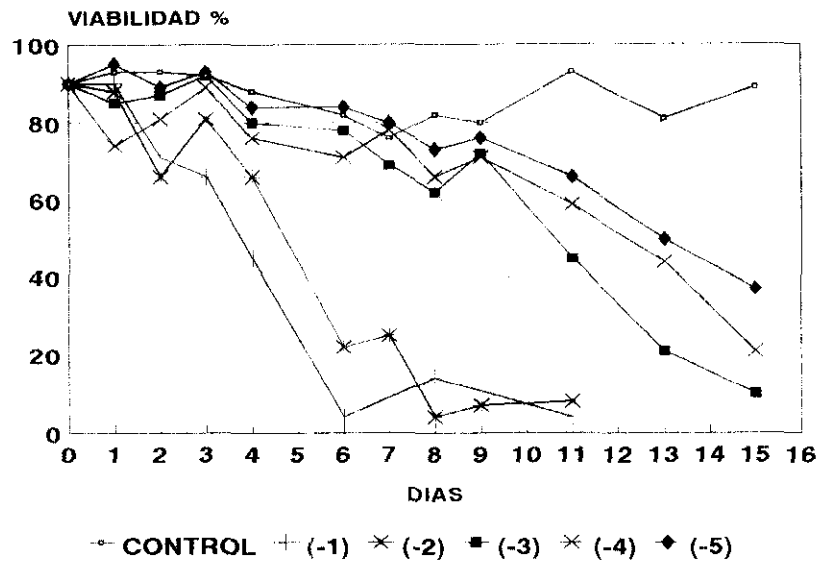
La aparición del ECP en los dos virus fue diferente. A m.d.i de (-1) S61 presenta un ECP de 3+ (Richman, 1990) entre el 2º y 3º día post-infección y en el VIH-1-III B al 2º día. A m.d.i de (-3) el ECP +3 aparece entre el 4º y 6º día con S61 y entre el 7º y 8º con VIH-1-III B.

Se han encontrado por tanto diferencias significativas en la evolución de S61 vs el VIH-1-III B, tanto en la cinética de viabilidad celular como en la aparición del ECP a m.d.i bajas de (-3), (-4) y (-5).

Teniendo en consideración los criterios antes expuestos, consideramos como condiciones más adecuadas para realizar los pases seriados las m.d.i. de (-1) y (-3), cuya duración de la infección (con el S61) se encontraba alrededor de 3 días a (-1) y de 6 días a (-3).

En la figura 23 se resume la evolución de las infecciones a las m.d.i de (-1) y (-3), valorando viabilidad y % de células infectadas por IFI, tanto con S61 como con VIH-1-III B.

viabilidad IIB



viabilidad S61

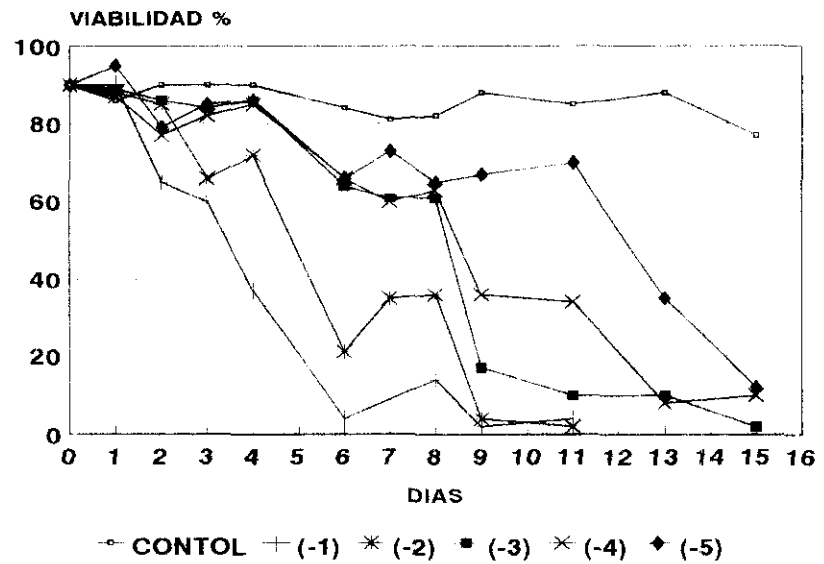


FIGURA 22. Evolución de la viabilidad de células MT-4 infectadas a diferentes m.d.i con VIH-1-IIB y S61.

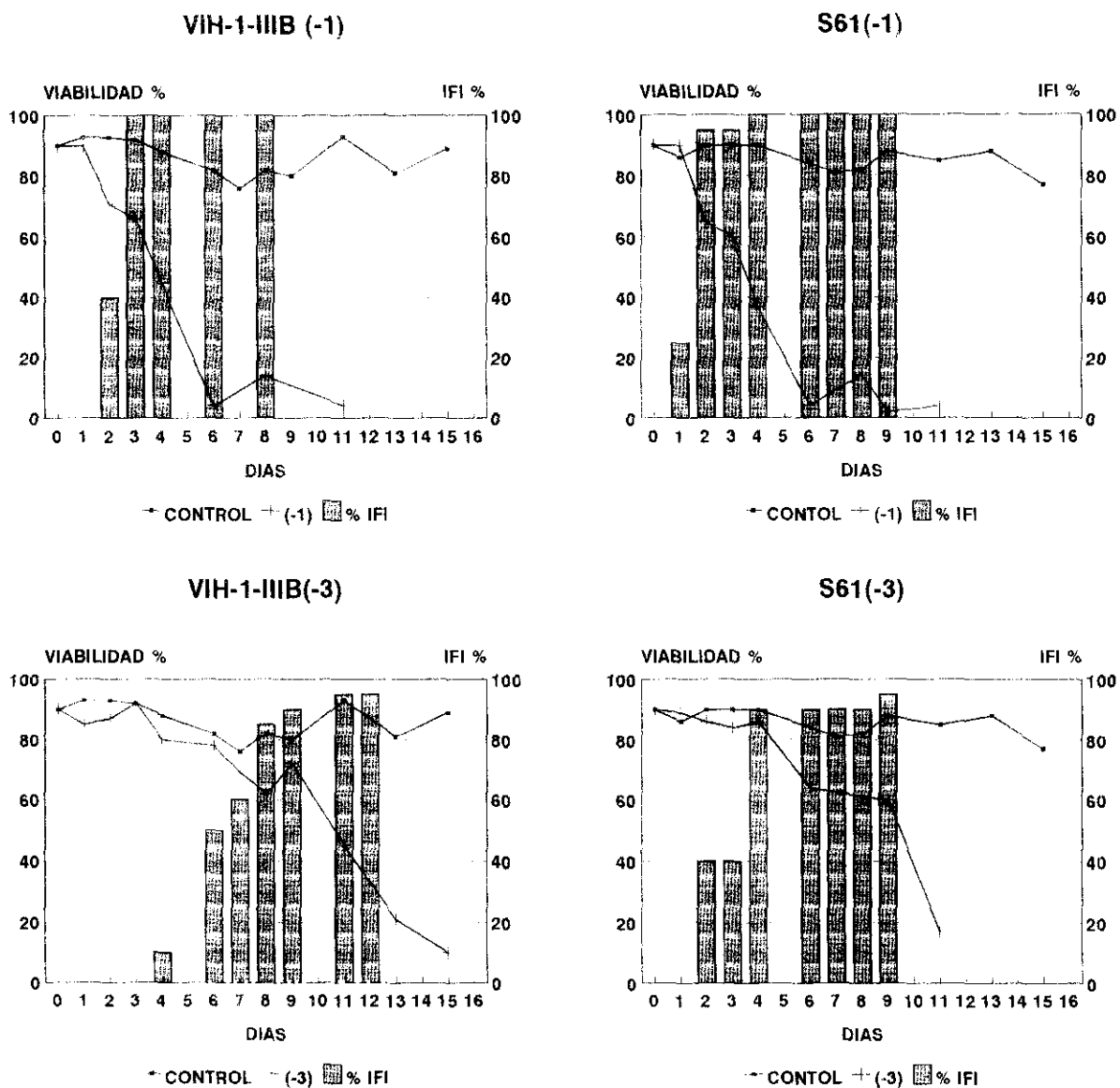


FIGURA 23. Evolución de la infección de células MT-4 infectadas con VIH-1-IIIB y S61 a dos m.d.i respectivamente (-1) y(-3).

Se valoró el % de células infectadas por IFI hasta alcanzar un valor entre el 90 y 100%. También se muestra la evolución de la viabilidad de las células infectadas.

4.3.2.- REALIZACION DE LOS PASES SERIADOS

Después de determinar las condiciones de infección, se pasaron los distintos clones elegidos del S61 (ver apartado 4.2.3) y el S61 sin clonar hasta un total de 15 pases a m.d.i de (-1) y (-3). En todos los pases, excepto en el 10 y el 15, se infectaron 5×10^6 MT-4. En los pases 10 y 15 se infectaron 10×10^6 de MT-4.

La infección en cada pase se mantenía hasta que el ECP era de 3+ (Richman, 1990) y la viabilidad por debajo del 50%. Se centrifugaba el cultivo y se infectaban nuevas células con el volumen adecuado del sobrenadante para el siguiente pase. El sedimento se lavaba con PBS y se guardaba en dos alícuotas para posterior extracción de RNA y de DNA. Cuando fue necesario confirmar la infección se valoró antígeno p24 soluble en sobrenadante, % de células infectadas detectado IFI o actividad RT en sobrenadante.

El período de tiempo que duraba cada pase (a cada m.d.i) dependía del clon en concreto; pero siempre dentro del rango obtenido en los estudios preliminares. La media de este valor se muestra en la tabla XI.

Los clones D a m.d.i de (-3) y el E a m.d.i de (-1) presentaron problemas en sus pases por los que no se continuaron.

El clon B a una m.d.i de (-3) solo fue pasado 6 veces, aunque en la actualidad se ha realizado 15 pases.

Como se ve reflejado en la tabla XI, a m.d.i de (-1) el período de tiempo medio de duración de los pases seriados se encuentra entre 3 y 7 días y a m.d.i de (-3) entre 6 y 10 días.

Mediante un análisis de la varianza (ANOVA) se comprobó que la diferencia de tiempo medio de duración de los pases seriados a una m.d.i. de (-1) era estadísticamente significativo ($F_{(1,14)} = 5,921$; $p \leq 0,0001$). Posteriormente se

compararon los clones dos a dos mediante una prueba de t-Student observando que el clon D tenía valores significativamente mayores al resto de los clones ($p \leq 0,005$). Por lo tanto podemos concluir que el clon D cuando es pasado a m.d.i de (-1) es más lento que el resto de los clones ($6,4 \pm 0,45$ días).

Cuando se analiza el tiempo medio de duración de los pases seriados a m.d.i de (-3) se observa al aplicar un análisis de la varianza (ANOVA) que no existen diferencias estadísticamente significativas ($F_{5,14} = 4,093$; $p \leq 0,3$).

VIRUS	DÍAS [*]	
	m.d.i (-1)	m.d.i (-3)
S61	4,6 ± 0,33	5,8 ± 0,35
A	4,3 ± 0,30	6,7 ± 0,67
B	4,8 ± 0,47	7,8 ± 0,54 [#]
C	3,4 ± 0,29	6,4 ± 0,37
D	6,4 ± 0,45	-
E	-	6,8 ± 0,42
F	5,2 ± 0,50	6,6 ± 0,56

TABLA XI.- Tiempo medio de duración de los pases seriados con los diferentes virus, a las dos m.d.i.

* Tiempo medio de duración de la infección (en días) calculado después de 15 pases seriados.

El clon B a m.d.i (-3) solo se realizó 6 pases.

- No realizado.

4.3.3.- CARACTERIZACION DE LOS CLONES DESPUES DE LOS PASES.

4.3.3.1.- Caracterización genotípica

4.3.3.1.1.- Análisis del patrón de bandas obtenido por la técnica de "mismatches"

Para cuantificar y estudiar las variaciones genéticas que ocurren en los diferentes clones biológicos durante los 15 pases, los RNAs de los virus obtenidos fueron caracterizados por "mismatches" con las mismas sondas utilizadas inicialmente (GAG, RT-5', RT 3', VIF-VPR y ENV). Los patrones obtenidos a las dos m.d.l se compararon con los respectivos virus iniciales (ver apartado 3.2.5, figura 14 para el esquema del experimento y figuras 24, 25, 26, 27 y 28).

Se han encontrado variaciones entre los distintos RNAs analizados. Las diferencias respecto a los clones iniciales se encuentran en las siguientes zonas:

RT-5' donde se detectó la aparición de dos bandas nuevas en el clon $C_{15i,3i}$. Bandas de un tamaño de aproximadamente 90 y 80 nucleótidos respectivamente, señaladas con flechas en la figura 25.

ENV donde detectamos dos variaciones con respecto al RNA viral inicial:

1. En el S61, donde desaparecen tres bandas quedando un patrón de bandas igual al que presentan los clones D_n , E_n , y F_n .

2.-En el clon $E_{21i,3i}$ donde se observa la desaparición de una banda y a la vez la aparición de otra nueva banda (figura 28). Esta última variación sucedió progresivamente; en el $E_{1,1}$ se comenzaba a detectar el cambio, todavía se ve la banda, aunque con menor intensidad, que después desaparece y comienza a verse

la nueva banda (datos no mostrados).

Los cambios detectados en el patrón de bandas con las 5 ribosondas sólo suceden en los virus procedentes de los pases seriados a baja multiplicidad de infección, m.d.i (3). En los virus pasados a (-1) no se observa ningún cambio, se mantiene en todos el patrón inicial.

- Cuantificación de la variabilidad

Los cambios genéticos obtenidos entre los virus antes y después de los pases permiten cuantificar el número de mutaciones. Para realizar la cuantificación tenemos que considerar que aproximadamente un 60% de las mutaciones que son reconocidas y cortadas por la RNasa A (Myers y cols., 1985; López Galíndez y cols., 1988; Perucho, 1989).

Se han encontrado un total de seis cambios (ver figuras 25 y 28). Teniendo en cuenta que se han analizado 2267 nucleótidos por virus, por tanto un total de 43073 nucleótidos, podemos considerar que la población obtenida después de los pases difiere de la población parental al menos en un 0,02% de sus nucleótidos.

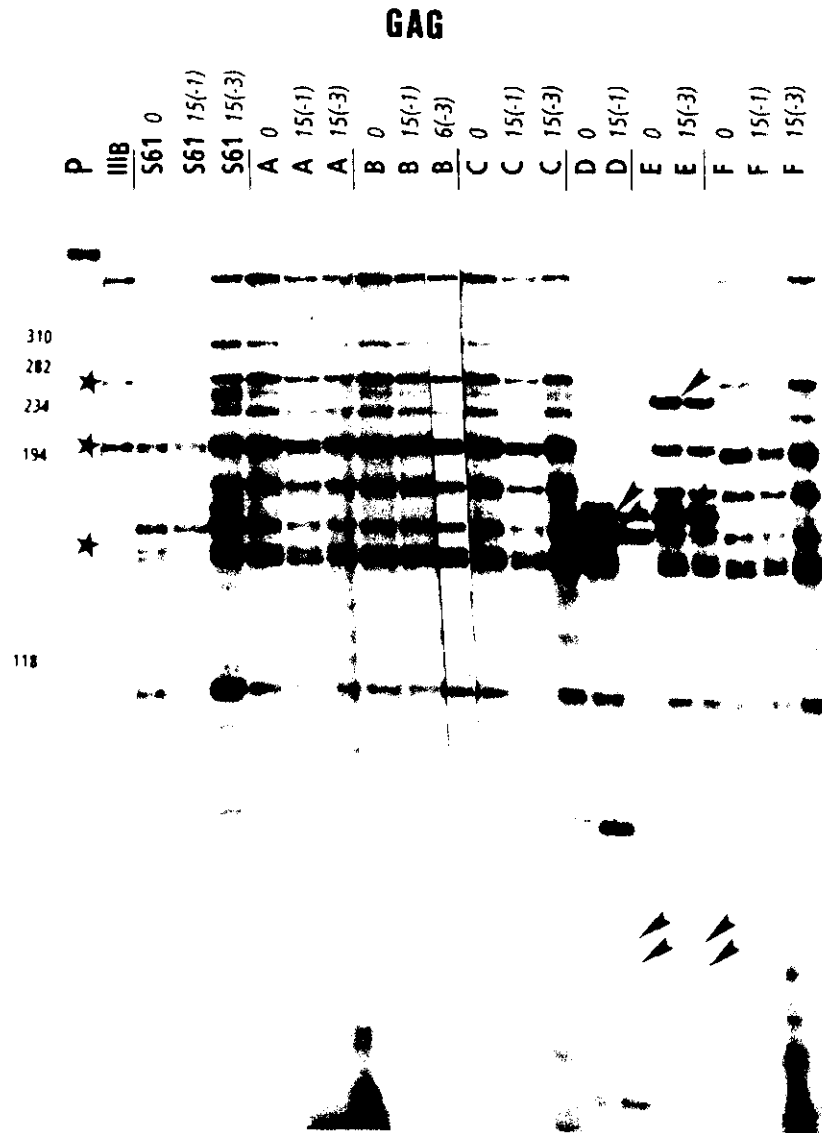


FIGURA 24.- Caracterización genética por "mismatches" de la zona del gen GAG de los clones después de los pases seriados, comparándolos con los clones iniciales.

IIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

* Bandas que corresponden a mutaciones específicas del clon BH10, utilizado para la síntesis de la sonda y que está presente en el virus VIH-1-IIIB. Se consideran como fondo del ensayo.

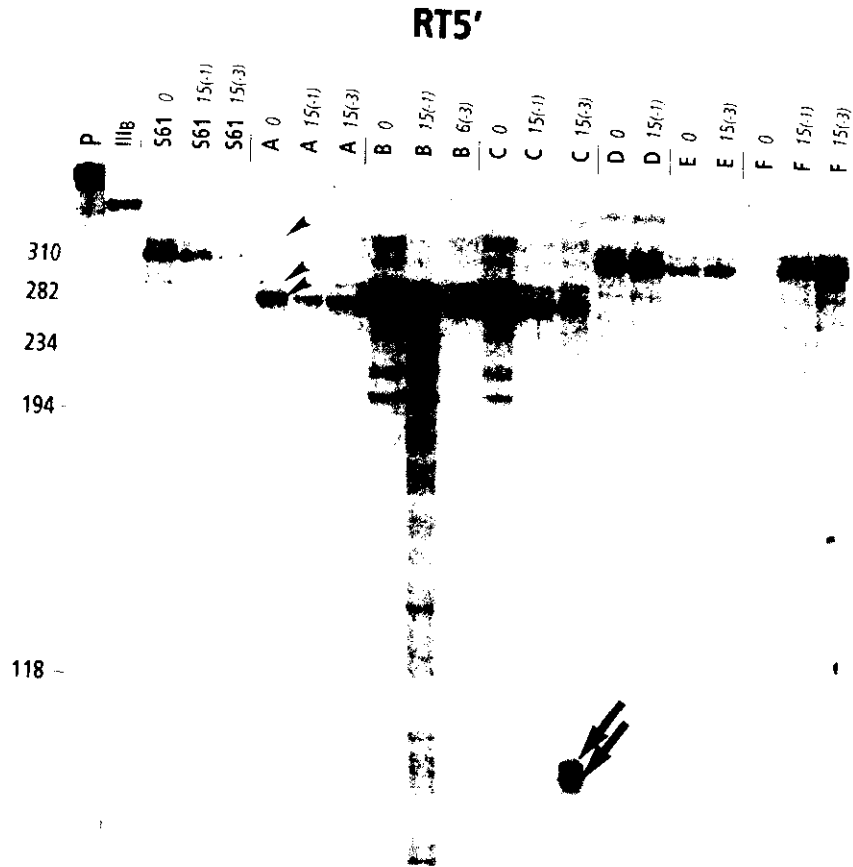


FIGURA 25. Caracterización genética por "mismatches" de la zona RT-5' de los clones después de los pases seriados, comparándolos con los clones iniciales.

IIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de $\Phi X174$ digerido con *HaeIII* y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

Las flechas indican cambios obtenidos después de los pases seriados con respecto al patrón original.

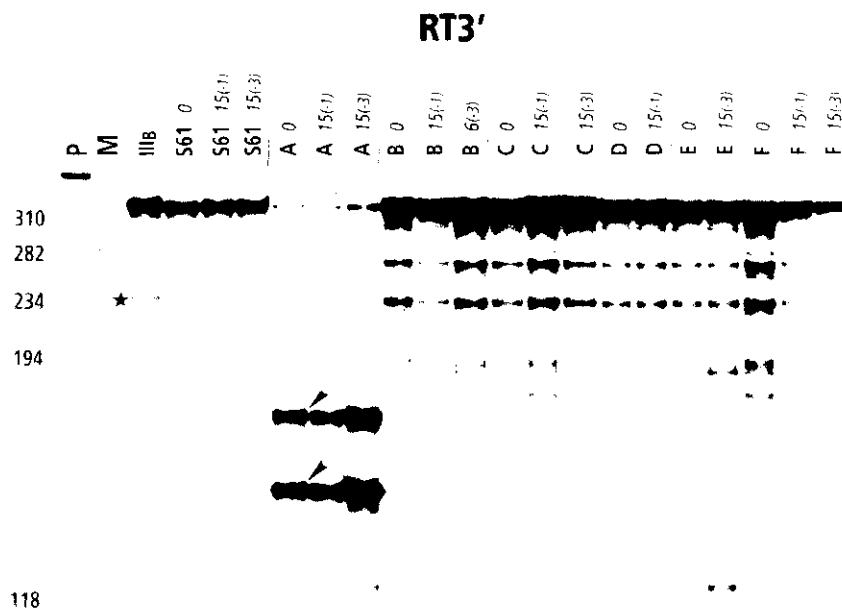


FIGURA 26.- Caracterización genética de la zona RT-3' de los clones después de los pases seriados, comparándolos con los clones iniciales.

IIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

* Bandas que corresponden a mutaciones específicas del clon BH10, utilizado para la síntesis de la sonda y que está presente en el virus VIH-1-IIB. Se consideran como fondo del ensayo.

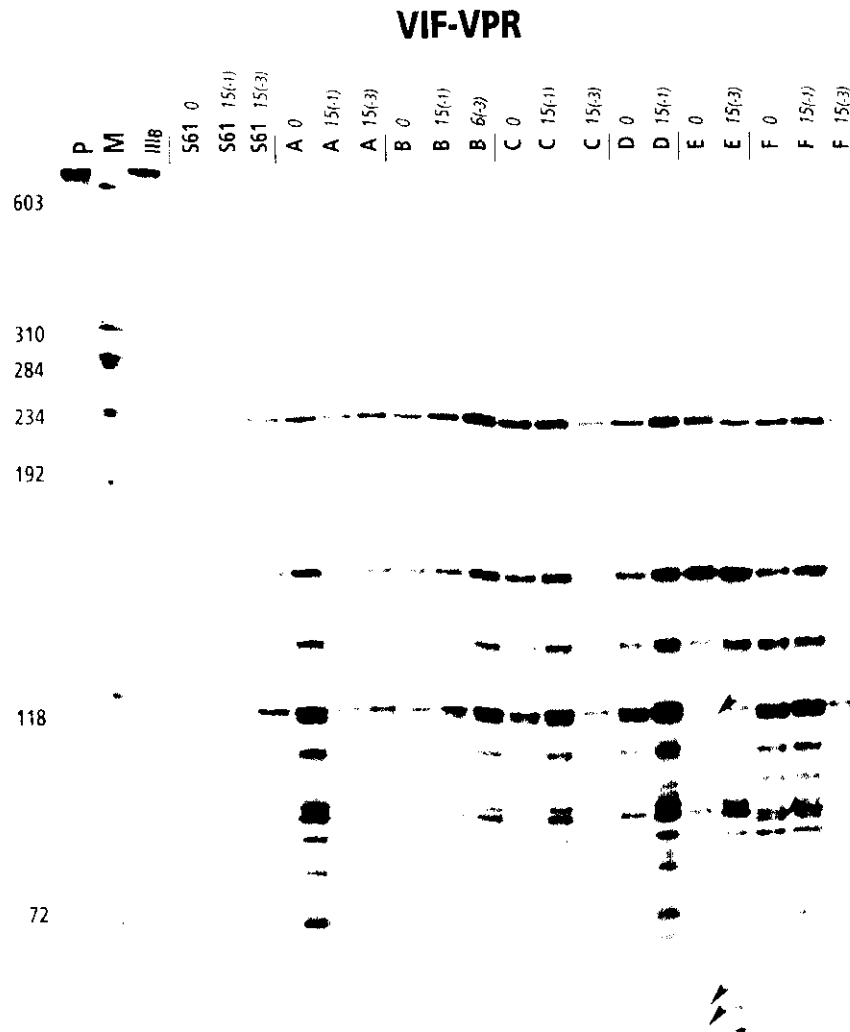


FIGURA 27.- Caracterización genética de la zona gen VIF-VPR de los clones después de los pases seriados, comparándolos con los clones iniciales, por la técnica de "mismatches".

IIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

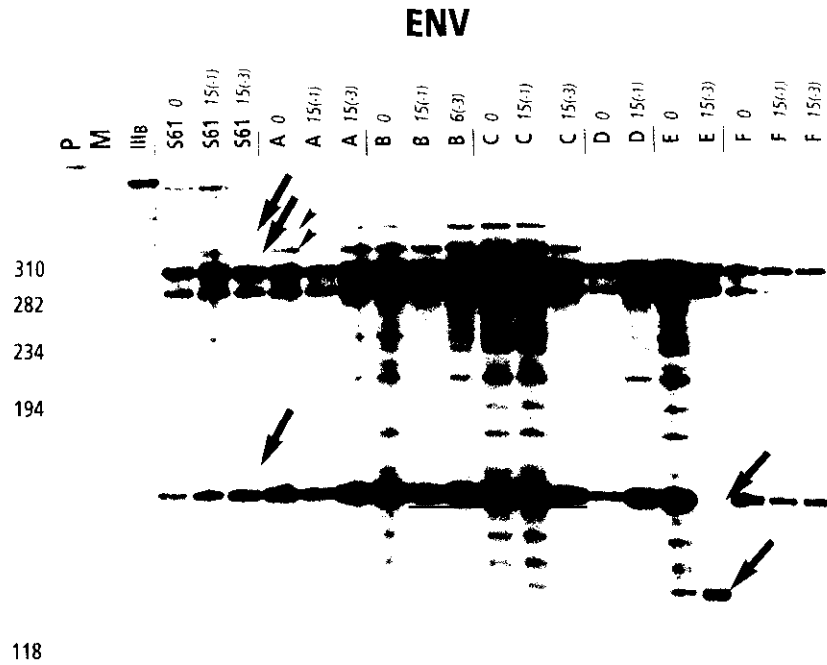


FIGURA 28.- Caracterización genética por "mismatches" de la zona ENV de los clones después de los pases seriados, comparandolos con los clones iniciales.

IIIB: Cepa de referencia homóloga.

Los clones son nombrados igual que en la figura 14.

M: DNA de Φ X174 digerido con HaeIII y utilizado como marcador de tamaños (en nucleótidos).

P: Ribosonda sin digerir.

MT-4: Control de células sin infectar.

Las puntas de flecha indican bandas diferentes, respecto al patrón del S61, estas bandas han servido para la selección de los clones.

Las flechas indican los cambios obtenidos después de los pases seriados.

4.3.3.1.2.- Secuenciación

Una vez analizada la diversidad genética por medio de la técnica de "mismatches" decidimos confirmar y cuantificar estos resultados por secuenciación. Para ello se eligieron dos zonas del genoma del gen ENV:

- El lazo V3, en el que se ha localizado el principal sitio neutralizante (Putney y cols., 1986; Rusche y cols., 1988).
- La región del sitio de procesamiento de la gp160 en gp120 y gp41, incluyendo el péptido de fusión (Gallagher, 1987).

Se secuenciaron todos los virus tanto antes como después de los pases.

La zona V3 (desde el nucleótido 6669 hasta el 6884) se secuenció a partir del RNA viral (ver apartado 3.7.2), utilizando los oligonucleótidos MAV3-1 (posiciones 6642 a 6665; tabla III) y MAV3-2 (complementaria a las posiciones 6913 a 6893; Tabla III). En las figuras 29 y 30 se muestran las mutaciones encontradas entre los distintos virus secuenciados con respecto a la secuencia del S61. Se secuenciaron 215 nucleótidos aproximadamente de cada virus encontrándose 3 mutaciones, no silenciosas, que son las sustituciones de los aminoácidos, Asn por Ile (en el clon F₁₅₍₃₎), Ser por Arg (en el clon E₁₅₍₃₎), y por último Gln por His (en el S61₁₅₍₃₎), resultado de las siguientes transversiones de A (en la posición 6706) por T, T (6719) por A, y G (6833) por T, respectivamente.

La zona que corresponde a la sonda ENV utilizada para caracterizar los RNAs, correspondiente a la zona del péptido de fusión (comprendida entre el nucleótido 7324 y el 7524), fue secuenciada a partir del DNA de los respectivos virus por secuenciación directa por PCR del fragmento correspondiente a los oligonucleótidos 7EU (posiciones 7229 a 7250; tabla III) y el 43ED (posiciones 7919 a 7941; tabla III).

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

CONSENSO	C.....C.....A.A...
S61#	GAATCTGTAG AAATTAATTG TACAAGACTC AACAACAATA CAAGGAGAAG
S61 ₁₅₀₋₃
E ₁₅₀₋₃
F ₁₅₀₋₃ <u>T</u>
CONSENSO	...C.G..AC -----... ..G.. ..T..GT.T....A
S61#	TATACATGTA GGACATGTAG GACCAGGCAG AGCAATTTAT ACAACAGGA-
S61 ₁₅₀₋₃
E ₁₅₀₋₃	<u>A</u>
F ₁₅₀₋₃
CONSENSO	AA...---... ..T..G.....
S61#	--ATAATAGG AAAAATAAGA CAAGCACATT GTAACATTAG TAGAGCAAAA
S61 ₁₅₀₋₃
E ₁₅₀₋₃
F ₁₅₀₋₃
CONSENSOA..GC
S61#	TGCAATAACA CTTTAAAACA GATAGTTACA AAATTAAGAG AACAATTT
S61 ₁₅₀₋₃ <u>T</u>
E ₁₅₀₋₃
F ₁₅₀₋₃

FIGURA 29.- Secuencia de nucleótidos de la zona del lazo V3.

S61# secuencia consenso de todos los virus secuenciados.

Los nucleótidos que se encuentran subrayados son los que cambian con respecto a la secuencia consenso S61#

"CONSENSO" secuencia consenso del lazo V3 descrita por Myers y colaboradores (1990).

ENV

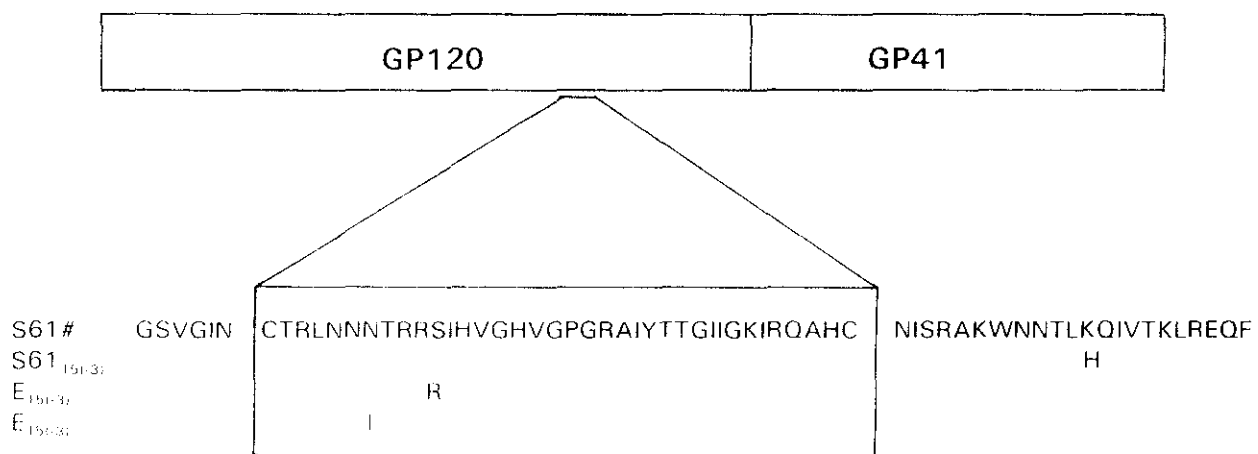


FIGURA 30.- Secuencia de aminoácidos de la zona V3.

La secuencia denominada S61# incluye todos los virus que presentaban igual secuencia al S61, secuencia consenso.

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

	7323				
	↓				
BH10	AGAGAAAAAA	GAGCAGTGGG	A...ATAGGA	GCTTTGTTCC	TTGGGTTCTT
SF2ATAG.....	...A.....
S61#ATA.....	...A..C...
BH10	GGGACCAGCA	GGAAGCACTA	TGGGCGCAGC	GTCAATGACG	CTGACGGTAC
SF2T...	.T.....
S61#*..CG
BH10	AGGCCAGACA	ATTATTGTCT	GGTATAGTGC	AGCAGCAGAA	CAATTTGCTG
SF2
S61#
BH10	AGGCCTAATFG	AGGCGCAACA	GCATCTGTFG	CAACTCACAG	TCTGGGGCAT
SF2A.....
S61#
	7527				
	↓				
BH10	CAAG				
SF2				
S61#				

FIGURA 31. Secuencia de nucleótidos de la zona del la gp41, del péptido de fusión.

S61# es la secuencia consenso encontrada en todos los virus secuenciados.

SF2: Secuencia con las que se ha encontrado homologías en esta zona (Sánchez-Pescador y cols., 1985).

BH10 es el clon 10 del VIH 1-IIIb con el que se realizó la sonda que empleamos para caracterizar por la técnica de "mismatches" (Ratner y cols., 1985).

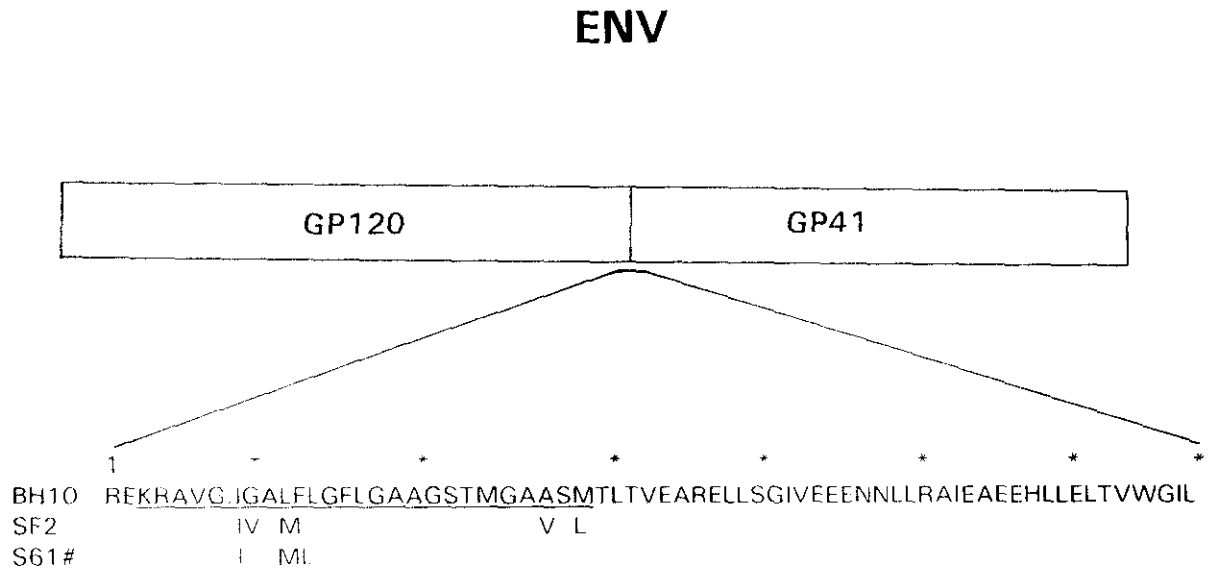


FIGURA 32. Secuencia de aminoácidos correspondiente a la gp41, al péptido de fusión.

La secuencia S61# es la secuencia encontrada en todos los virus secuenciado procedentes del S61 antes y después de los pases.

SF2: secuencia con la que encontramos homologías (Sanchez-Pescador y cols., 1985).

La zona que se encuentra subrayada corresponde al péptido de fusión (Gallagher, 1987).

BH10 es el clon 10 del VIH 1 IIIB con el que se realizó la sonda que empleamos para caracterizar por la técnica de "transmaches" (Ratner y cols., 1985).

La amplificación de la secuencia se realizó sólo con el oligonucleótido 7EU (ver apartado 3.7.1). No se ha observado ningún cambio entre ellos, pero existen cambios con respecto a BH10 (figuras 31,32).

Las secuencias de la zona V3, presentadas en este trabajo, fueron realizadas por el Dr. M.A. Martínez del la Centro de Biología Molecular.

- Cuantificación de la variabilidad

A partir de las secuencias obtenidas tanto de la zona de V3 como de la zona del péptido de fusión se cuantificó el porcentaje de cambios obtenidos después de los pases en comparación con la población inicial. De un total de 7200 nucleótidos secuenciados entre ambas zonas se han encontrado 3 cambios (cambios localizados en la V3). Teniendo en cuenta los nucleótidos secuenciados podemos cuantificar que se producen cambios en un 0,04% de sus nucleótidos, en la población después de los pases.

4.3.3.2.- Caracterización fenotípica

- Efecto citopático

Después de los 15 pases seriados en cultivos en células MT-4 se comprobó el ECP. Se observó la capacidad o no de formar sincitios, comparándolo con el ECP característico inicial (figura 20).

Se observó que tanto los clones (A, B, C, D y E) como el S61, pasados 15 veces en cultivo en células MT-4, mantienen su ECP, tanto a alta como a baja multiplicidad de infección (ver algunos ejemplos en la figura 33). La excepción es el clon F que a una m.d.i de (-3) pasa de ser NSI a ser SI (figura 33, panel 7 y 8); de nuevo este cambio sólo sucede a baja m.d.i.

El cambio de un virus NSI a SI se ha correlacionado con el progreso de la enfermedad. Los virus NSI era virus aislados de pacientes asintomáticos, mientras que los SI se encontraban en pacientes con SIDA o CRS (Tersmette y cols., 1988). Este cambio en la capacidad de inducir sincitios está relacionada a la vez con la respuesta inmune que presenta el paciente en cada momento de la enfermedad.

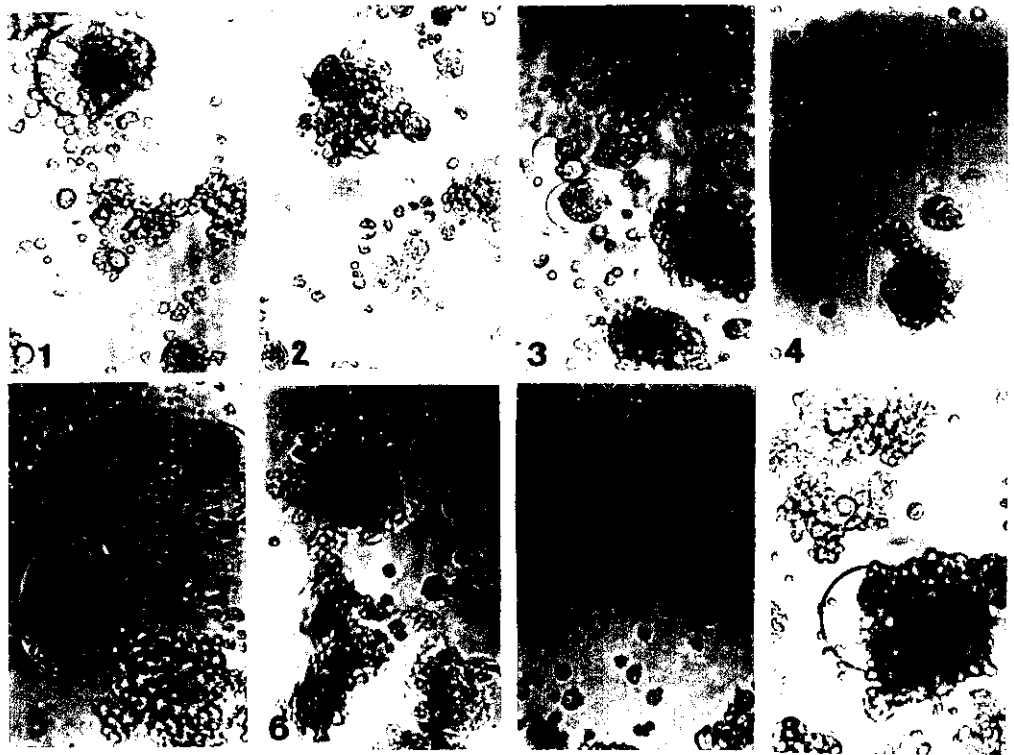


FIGURA 33.- Caracterización de los diferentes ECP después de 15 pases seriados en células MT-4, a diferentes condiciones de infección.

- 1: S61₀ 2: S61_{15:31}
 3: C₀ 4: C_{15:31}
 5: B₀ 6: B_{15:31}
 7: F₀ 8: F_{15:31}

- Cinética de replicación

Un aspecto fenotípico que tiene evidente repercusión en la evolución viral, es la capacidad replicativa. Se han descrito dos tipos de variantes los que producen una infección rápida en cultivos celulares y altos niveles de replicación, denominados "high/rapid", y por el contrario los virus lentos y que producen bajos niveles de replicación, denominados "slow/low" (Asjö y cols., 1986, revisión Fenyö y cols., 1989).

Nosotros hemos analizado la cinética de replicación de los diferentes virus valorando la actividad transcriptasa inversa (RT) antes y después de los 15 pases seriados, en el sobrenadante de cultivos durante siete días, según el protocolo descrito por Willey y colaboradores (1988). En la figura 34 se muestran los resultados de la actividad transcriptasa inversa en los distintos virus por un "ensayo de detección rápida". Una vez observada la actividad transcriptasa inversa se cuantificó sus cpm/ml en cada punto del ensayo (datos no mostrados). Estas valoraciones de la actividad RT se realizaron dos veces en ensayos independientes, obteniéndose resultados similares.

Se consideró que dos virus cambiaban en su cinética de replicación cuando se encontraban diferencias de cpm/ml entre ellos de por lo menos 4 veces en el primer día de detección de RT y además presentaban niveles de RT durante los siete días que duraba la infección significativamente diferentes entre ellos.

Según estos criterios se pueden distinguir dos grupos:

Virus que después de los pases no cambian: S61 y los clones B, C y F.

- Virus que cambian después de los pases:

· virus más lentos: D₁₅₀₋₁₇₁ y E₁₅₀₋₃₇

· virus más rápidos: A₁₅₀₋₃₇

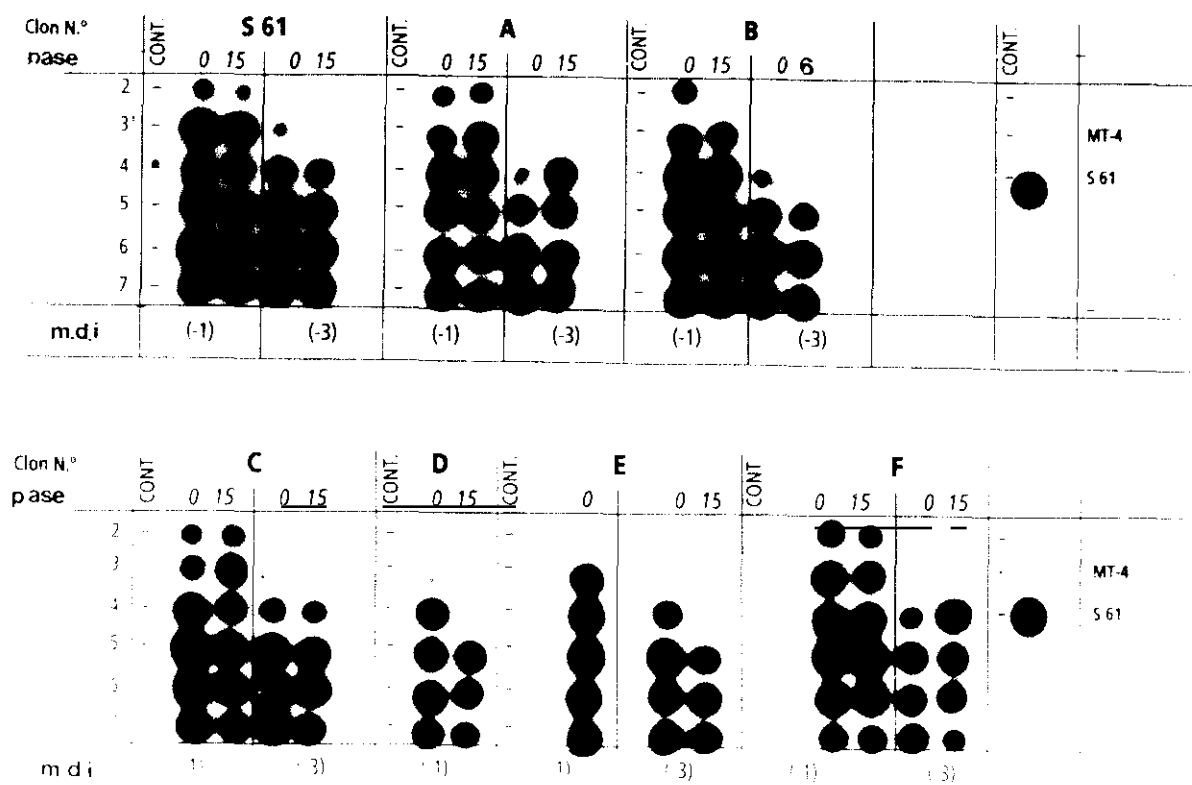


FIGURA 34.- Análisis de la actividad transcriptasa inversa durante 7 días post-infección de los diferentes clones y el S61.

Se valoró la cinética de replicación de todos los virus obtenidos antes y después de los pases seriados en células MT 4 a diferentes m.d.i.

Cada punto indica la valoración de actividad transcriptasa inversa en el sobrenadante de cultivo a partir de 5 µl de la mezcla de reacción (ver apartado 3.1.3.4).

La actividad transcriptasa inversa en sobrenadante de cultivos se valoró durante siete días post-infección. Los datos mostrados fueron verificados por 2 ensayo idénticos independientes entre los que no se observaban diferencias.

- Tropismo

Los virus iniciales como los obtenidos después de los 15 pases fueron caracterizados por su capacidad de replicación en diferentes sustratos celulares:

- en células primarias (PBL, y monocitos/macrófagos)
- en líneas celulares establecidas (HuT-78 y U937-2).

Los clones iniciales presentaban al igual que el aislado original bajos niveles de replicación (determinado por niveles de RT) en PBL y monocitos/macrófagos. No existe diferencia entre los distintos clones y el S61 en la capacidad de producir ECP en PBL.

Todos los virus replican con altos niveles en U937-2, se observa una diferencia de actividad RT de al menos 10 veces más alta que la detectada en líneas celulares primarias.

Los clones A₁₇, C₁₇, D₁₇ y F₁₇ no replican a niveles apreciables en HuT-78. Los clones B₁₇ y E₁₇ y el S61 presentan una baja replicación, detectable sólo por antígeno p24 soluble en sobrenadante. Esto es sorprendente ya que estos virus sólo habían sido replicados en células T (nunca habían sido pasados en otras líneas celulares), por lo que se esperaba una mejor replicación en Hut-78 (células T) que en U937-2 (monocito/macrófago).

Los virus analizados después de los 15 pases no presentaban grandes diferencias en su tropismo con respecto a los virus no pasados. Aunque se puede detectar ciertas variaciones:

- Los virus obtenidos del clon C son capaces de replicar en HuT-78, mientras que el clon inicial C no lo hacía.

El virus $F_{15(3)}$ es capaz de replicar en HuT-78, mientras que F_0 y $F_{15(1)}$ no lo hacían.

- En el $F_{15(3)}$ se observa que no replicación en monocitos/macrófagos.

- Por último, podemos destacar un cambio en la replicación de $E_{15(3)}$, en monocitos/macrófagos con respecto a E_0 .

Este trabajo fue realizado por la Dra. E.M. Fenyö del Departamento de Virología, del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia).

- Estudio de proteínas

En la figura 35 se estudian las proteínas de los diferentes virus antes y después de los pases seriados. El estudio se realizó para ver si existía cambios fenotípicos importantes que alteraran las movilidades de las proteínas virales. Se puede observar un cierto cambio de movilidad de la proteína p55 del clon D_0 y del $D_{15(3)}$, respecto al resto de los clones así como una variación en el clon B en la migración de la gp120. Estas diferencias necesitarían confirmarse con ayuda de ensayos de "Western Blot" con anticuerpos monoclonales específicos.

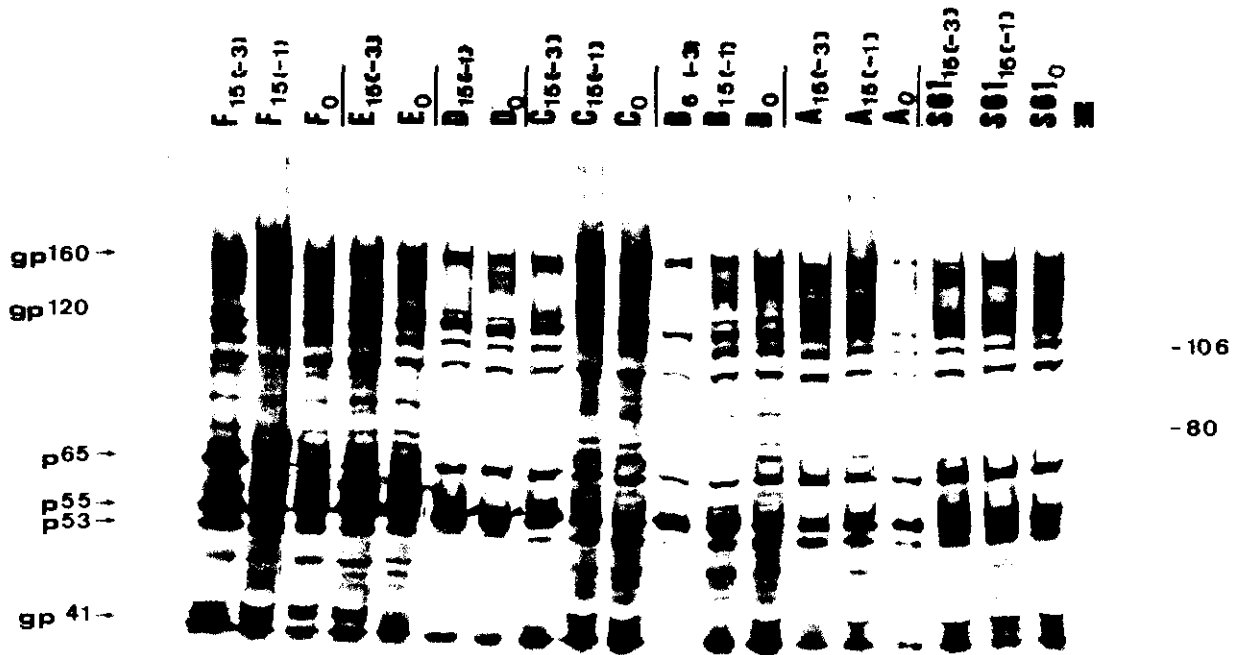


FIGURA 35. Análisis de las proteínas de los diferentes virus antes y después de los pases seriados a diferentes m.d.i.

M: Marcador de peso molecular

4.3.3.3.- Cambios genotípicos y fenotípicos observados en poblaciones virales clonadas a baja m.d.i.

Después de 15 pases seriados a diferentes m.d.i de los distintos clones biológicos obtenidos del aislado 61/89 hemos podido observar un total de 13 cambios (tanto genotípicos como fenotípicos). De los 13 cambios más significativos, 12 de estos ocurren cuando el virus es pasado a una m.d.i de (-3), 9 son genéticos y 4 fenotípicos, frente a uno que sucede a m.d.i (-1), variación observada al estudiar la cinética de replicación por actividad RT en el clon D.

Existen otros cambios menores como los encontrados al analizar por la técnica de "mismatches" la zona RT-3' encontrando variaciones en la intensidad de una banda de aproximadamente de 194 nucleótidos en el clon $E_{15(-3)}$ (no están señaladas) y el aumento de la intensidad en otra, de aproximadamente 120 nucleótidos. Son bandas presentes en la población inicial S61 y en el pase inicial del clon E_0 (figura 26) y también cambios en la capacidad para replicar en Hut-78 ($F_{15(-3)}$) o en monocitos/macrófagos ($F_{15(-3)}$ y $E_{15(-3)}$), antes comentadas.

4.4.- EVOLUCION "IN VIVO" DEL AISLADO 61/89

Después de 14 meses del aislamiento del 61/89 se realizó un nuevo aislamiento del mismo paciente, denominado 259/91. Las características serológicas de este paciente quedan resumidas en la tabla II.

El RNA del 259/91 fue analizado por la técnica de "mismatches" (en GAG, RT3', RT5' y ENV) obteniéndose unos patrones de bandas similares al S61. Al comparar con los patrones encontrados en los diferentes clones del S61 presenta similitud con el patrón mayoritario representado por el clon F (datos no mostrados).

Por otro lado se secuenció la zona V3, observándose tres mutaciones con respecto al S61, sustitución del aminoácidos Asn por Ile, Thr por Ala y Gln por His, que es el resultado de las siguientes transversiones de A por T, C por G y G por una T. Dos de dichos cambios coinciden con los cambios encontrados en virus procedentes del S61 después de los pases, concretamente el cambio de Asn por Ile que se encuentra en el F_{151,31} y el de Gln por His en el S61_{151,31}. El tercer cambio observado no se ha encontrado en ninguno de las secuencias de la V3 estudiadas (Figura 36).

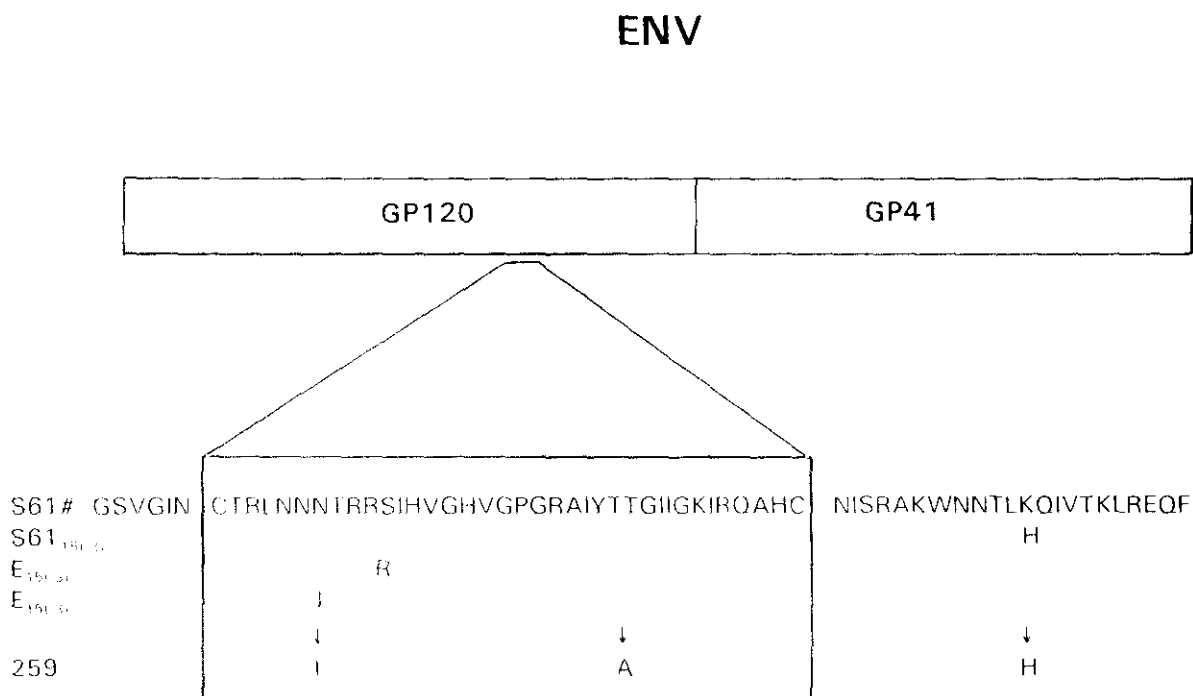


FIGURA 36.- Secuencia de V3 de los aislados virales S61 y del 259.

S61#: secuencia consenso entre la secuencia obtenida de todos los virus antes y después de los pases.

5.- DISCUSSION

El objetivo de este trabajo consistió en establecer un modelo "in vitro " que nos permitiera estudiar la variabilidad genética y fenotípica del VIH-1, como forma de comprender la variabilidad observada "in vivo".

El VIH-1 como todo virus de genoma RNA se caracteriza por estar formado por poblaciones heterogéneas cuya distribución coincide con el modelo teórico de "cuasi-especies" propuesto por Eigen y aplicado a diferentes virus de genoma RNA (Eigen, 1971; Domingo y cols., 1978; 1985; Eigen y Biebricher, 1988; Goodenow y cols., 1989; Meyerhans y cols., 1989; Domingo y Holland, 1992; Holland y cols., 1992).

Nosotros hemos estudiado un aislado natural de VIH-1 (61/89) obtenido de un niño de 4 años, hijo de madre seropositiva para el virus. En el caso de una transmisión vertical se ha descrito que sólo una subpoblación minoritaria del virus es transmitida de la madre al hijo (Wolinsky y cols., 1992). El porcentaje de infección descrito en este tipo de transmisión se encuentra entre el 13-30% de los hijos de madres seropositivas (Andiman y col., 1990; European Collaborative Study, 1991). El aislamiento del virus 61/89 se realizó en 1989, en ese momento el paciente ya presentaba síntomas, estadio P2CD2, según la clasificación del CDC de EEUU (Centro de Control de Enfermedades) para infección por VIH en niños menores de 13 años (MMWR, 1987). La enfermedad se encontraba estabilizada desde los primeros estudios serológicos que se efectuaron a los 2,5 años de vida (los datos serológicos se resumen en la tabla II). En 1991 se detectó un empeoramiento de la enfermedad (estadio P2C2D1), realizándose un segundo aislamiento denominado 259/91.

Para realizar el estudio partimos de clones biológicos, genéticamente homogéneos por aislamiento tras 5 plaqueos consecutivos en células MT-4, del virus S61 (semilla del 61/89). Los clones presentaban diferentes características genéticas y fenotípicas que ponen de manifiesto la heterogeneidad de la población viral. Esta heterogeneidad está presente incluso después de la selección que el cultivo "in vitro" ejerce sobre la población viral (Meyerhans y cols., 1989). La evolución del virus en cultivo de tejidos se estudió por pases seriados siguiendo el modelo llevado a cabo con el bacteriofago Q β (Domingo y cols., 1978) y con diferentes virus animales (Sobrino y cols., 1983; Díez y cols., 1989; Steinhauer y cols., 1989). Sin embargo, para analizar el papel que distintos factores pueden desempeñar en la evolución viral, introdujimos una variable que consistió en realizar los pases seriados a dos m.d.i.

La caracterización genética se realizó por comparación de los patrones de bandas obtenidas por la técnica de "mismatches" de determinadas zonas del genoma. Esta técnica ha sido utilizada para la caracterización de aislados de VIH-1, permitiendo distinguir de forma rápida los diferentes aislados, así como establecer relaciones filogenéticas entre ellos (López Galíndez y cols., 1991), de acuerdo con esto se observó que el aislado S61 se podría incluir dentro del grupo SF-2/RF según su patrón de bandas obtenido tras digestión con la RNasa A (Rojas y cols., enviado a publicar).

En la tabla VII se resumen los distintos patrones de digestión encontrados al estudiar los clones del S61. Este estudio nos permitió:

- 1.- Determinar la heterogeneidad de la población viral en estudio.

Se observó que al analizar 2 clones de cada una de las 5 placas iniciales del S61 encontrábamos 5 patrones de "mismatches" diferentes. Los clones podían ser diferenciados entre ellos en al menos un patrón de bandas.

2.- La representación relativa de cada uno de los clones en la población viral global.

Al compararse los patrones de bandas obtenidos para cada clon con el patrón característico del S61 ("patrón consenso"), en cada una de las zonas genómicas en concreto, se observó que los clones D y F presentaban mayor número de patrones de "mismatches" iguales al de la población "consenso"; por lo que estas poblaciones virales deben ser las más representativas dentro de las "cuasi-especies". Por el contrario, el clon A presenta patrones diferentes al S61 en la zona RT, que codifica para la transcriptasa inversa, una de las regiones del genoma considerada más conservada (encontrado cambios al estudiar la zona RT3' y RT5'). Seguramente se trata de una población minoritaria ya que las bandas características de este clon en la región RT3' (ver figura 16) no son observadas en el patrón global de la población. Además, al secuenciar la región RT3' del clon A encontramos que las mutaciones se localizaron cerca del sitio catalítico del enzima y del sitio donde se mapea la principal mutación de resistencia a AZT (Kohlstaedt y cols., 1992) y sin embargo, nosotros no encontramos cambios fenotípicos respecto a su cinética de replicación (valorada por niveles de actividad transcriptasa inversa en sobrenadante) ni a la susceptibilidad a determinados antivirales, sin cambios de la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) frente al AZT (trabajo realizado en el laboratorio del Dr.D.D. Richman, Universidad de San Diego California).

Las características fenotípicas, como la cinética de replicación, capacidad de inducir sincitios o tropismo celular, se han correlacionado con el deterioro del sistema inmune y con el desarrollo de la enfermedad (Tersmette y cols., 1989). Los virus aislados de individuos asintomáticos se caracterizan por presentar una baja cinética

de replicación, no ser capaces de inducir sincitios (virus NSI) y por un tropismo por células monocito/macrófagos. Por el contrario, los aislados virales de individuos sintomáticos se caracterizan por una alta cinética de replicación, por formar sincitios (virus SI) y por presentar tropismo por células T (ver revisión Fenyö y cols., 1989; Asjö y cols., 1990). Al estudiar clones individuales de aislados virales de un paciente, en diferentes estadios de la enfermedad, se ha detectado la existencia de los dos tipos de fenotipos (NSI y SI) en diferente proporción dentro de la población global (Schuitemaker y cols., 1992). Nosotros hemos observado que el aislado natural estudiado presenta un fenotipo sincitial (SI), además de altos niveles de replicación valorados por detección de antígeno p24 y por actividad transcriptasa inversa. Al estudiar clones individuales del aislado viral hemos encontrado dentro de la población los dos tipos de variantes fenotípicas descritos: SI (en los clones A, B, C, D, y E) y NSI (en el clon F). Nuestros datos apoyan la existencia, dentro de la población viral, de una heterogeneidad fenotípica, donde las diferentes poblaciones (NSI y SI) coexisten. La proporción de clones NSI que hemos encontrado es bajo frente al SI, datos que concuerdan con los descritos en una población viral obtenida de un paciente sintomático (Schuitemaker y cols., 1992). Al estudiar la población global sólo observamos el fenotipo SI el cual representa el fenotipo mayoritario frente al variante NSI. El fenotipo NSI queda oculto dentro de la población "consenso", y sólo cuando se analizan clones individuales de dicha población puede ser apreciado.

Después de seleccionar los clones biológicos se realizaron pases seriados a dos multiplicidades de infección en células MT-4, encontrándose 13 cambios con respecto a la población inicial. Nueve de estos cambios eran genéticos (6 cambios en el patrón de "mismatches" y 3 en la secuencia de nucleótidos) y 4 fenotípicos, paso de ser NSI

a St observado en el clon F y cambios en la capacidad de replicar en MT-4 en los clones A, D y E (tabla XIII).

Los cambios genéticos, en el patrón de "mismatches", se han localizado no sólo en la zona del gen *env* sino también en zonas más conservadas (ver figuras 26 y 28). En la región del gen *pol*, que codifica la transcriptasa inversa, se han observado cambios en el virus $C_{19/31}$ con respecto al C_{31} . En este virus no se han encontrado diferencias en su cinética de replicación cuando se valoró su actividad transcriptasa inversa antes y después de los pases (ver figura 34).

Al estudiar la ribosonda ENV se ha observado cambios en dos virus después de pases a baja multiplicidad de infección. En el $S61_{19/31}$ se obtiene el mismo patrón que en los clones D, E y F iniciales. Lo que podía explicarse como un variante que inicialmente se encontraba en la población global y sólo es detectado cuando es clonado (como es el caso de los clones D, E y F) o al imponerse tras ser pasado a baja m.d.i. Y en el $E_{19/31}$ con respecto al E_{31} se observa la aparición progresiva de una banda específica y la desaparición de otra.

Por otro lado, hemos estudiado la zona del lazo V3, en la gp120. Se han descrito variaciones genéticas a lo largo de la infección en él y sus posibles implicaciones tanto en la respuesta antigénicas como en las propiedades fenotípicas del virus (Wolfs, 1992). Aunque es una zona altamente variable se han encontrado secuencias y elementos estructurales conservados entre diferentes aislados (LaRosa y cols., 1990). Esta región codifica el principal epítipo neutralizante (Putney y cols., 1986; Rusche y cols., 1988). Numerosos estudios han puesto de manifiesto su relación con cambios en el tropismo (O'Brien y cols., 1990; Hwang y cols., 1991;

Shioda y cols., 1991), en la capacidad de formar sincitios, en la cinética de replicación (Moore y Nara, 1991; De Jong y cols., 1992; Fouchiers y cols., 1992; Kuiken y cols., 1992), y por último en la infectividad del virus (Freed y cols., 1991; Ivanoff y cols., 1991). Se han descrito cambios de aminoácidos que afectan tanto a la capacidad para inducir sincitios como al tropismo celular (Freed y cols., 1991; Takeuchi y cols., 1991; De Jong y cols., 1992a; 1992b; Fouchier y cols., 1992).

Al comparar nuestra secuencia consenso S61 del lazo V3 con la secuencia consenso descrita por Myers y colaboradores (1990) observamos los siguientes cambios de aminoácidos: Leu por Pro en la posición 299, Arg por Lys en la posición 305, Ile por Phe en la posición 315, en la posición 320 presentamos una delección y en la posición 324 tenemos Lys en vez de Asp. Además nuestra secuencia consenso se caracteriza por presentar una inserción de tres aminoácidos (Val, His, Gly), que supone una duplicación, inserción que se ha descrito sólo en un aislado africano (ver figura 37). Sin embargo la longitud total del lazo V3 se mantiene en 38 aminoácidos y la secuencia GPGRA en la punta del lazo coincide con la más frecuente en otros aislados virales.

Después de los pases seriados a diferente m.d.i. encontramos dos cambios en la secuencia del lazo V3 y un cambio en la zona C-Terminal adyacente con respecto a nuestra secuencia consenso (S61#) inicial. Cambio de Asn por Ile en la posición 299 (en F_{100-3}), de Ser a Arg en la posición 306 (en el E_{100-3}) y por último de Lys por His en la posición 340, fuera del lazo V3 (en los virus $S61_{100-3}$). En la figura 37 se localizan estos cambios de secuencia obtenidos en los clones en la zona del lazo V3 y el fenotipo que presentan.

Se han descrito cambios de aminoácidos implicados en alteraciones en la capacidad de inducir sincitios por De Jong y colaboradores (1992) y por Fouchier y

colaboradores (1992), cambios en el aminoácido 306 (numeración según De Jong y cols., 1992) de una Ser por una Arg, en el 317 Ala por Thr, en el 320 de Asp por Gly o en el 324 Asp por Arg. Estos cambios han sido considerados necesarios para la expresión del fenotipo SI. Por otro lado, Fouchier y colaboradores sugieren la existencia de dos aminoácidos en el dominio V3 responsables de las características fenotípicas localizados en las posiciones 11 (correspondiendo a la 306 considerada por De Jong y colaboradores) y la 28 (320).

El único cambio de secuencia que hemos encontrado, que se correlaciona con cambio de fenotipo en la capacidad formar sincitios, en el clon F (NSI) frente al F_{15i-3j} (SI), al estudiar la región V3 es el cambio de Asn por Ile (en la posición 302). Este cambio se produce en un aminoácido altamente conservado (93%, Myers y cols., 1990; ver figura 37) y además en un aminoácido que no ha sido relacionado con ningún cambio en las características fenotípicas del virus (de Jong y cols., 1992; Fouchier y cols., 1992).

Como se puede observar uno de nuestros cambios de secuencia (Ser por Arg en la posición 306, en el clon E) es uno de los aminoácidos junto con el cambio en la posición 320 (aminoácido que en la secuencia del S61# está deletado) asociados con el cambio de NSI a SI (De Jong y cols., 1992; Fouchier y cols., 1992). Sin embargo nosotros no encontramos cambios fenotípicos en ese clon. Según nuestros resultados podríamos considerar que los cambios de aminoácidos que De Jong y colaboradores (1992), y Fouchier y colaboradores (1992) han asociado con las características fenotípicas del virus reflejan cambios que en un determinado contexto se han relacionado con una variación en las características pero que no necesariamente son los únicos responsables y que se localizan en posiciones que aceptan más cambios como se ve por el porcentaje de conservación de estos.

A:

		306		317	320	324		
		↓		↓	↓	↓		
168.1	CTRPNNNTRKSI---		HIGP	GRAFYATG	DIIGD	IRQAHC	<u>ECP</u> NSI	
168.10	CTRPNNNTRKRI-----		HIGP	GRAFYTTG	QIIGN	IRQAHC	SI	
S61#	CTRLNNNTRRSIH	<u>V</u>	<u>V</u>	G	P	G	RAIYTTG-IIGKIRQAHC	SI
E ₁₅₍₃₎		R				-		SI
F ₀						-		NSI
F ₁₅₍₃₎	I					-		SI
259	I			A		-		SI
		93%	63%	54%	34%	98%		

B:

296	330																																	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓																									
C	I	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	D	Q	A	H	C
100	87	99	98	85	93	93	94	98	73	63	94	86	75	94	97	99	86	86	75	82	54	88	75	34	95	80	98	85	94	98	81	100	91	99

FIGURA 37.- Análisis del lazo V3

PANEL A:

S61# Secuencia consenso del lazo V3 de los todos nuestros clones.

La secuencia S61# se ha alineado con las secuencia de virus que presentan algún cambio

Los aminoácidos subrayados coinciden con una duplicación (que en nuestras secuencias es HVG) característica del aislado viral S61. Este tipo de duplicación sólo se ha descrito en un aislado africano (Myers y cols., 1990)

En la parte inferior del panel A se localiza el porcentaje de conservación que presenta los aminoácidos marcados con una flecha respecto a la secuencia consenso.

Los clones (168.0 y 168.10) y la numeración localizada en la parte superior de la secuencia se refiere a los aminoácidos correspondientes, como posibles implicados en cambios en la capacidad de formar sincitios por de Jong y colaboradores (1992)

ECP: Efecto citopático; SI (sincitial) y NSI (no sincitial).

PANEL B:

Se muestra la secuencia consenso del lazo V3 y los porcentajes de cada aminoácido (Myers y cols., 1990)

Con flechas se indican los aminoácidos que cambian en la secuencia S61# con respecto a la secuencia consenso descrita por Myers y colaboradores (1990).

En cuanto a las variaciones fenotípicas obtenidas merece destacar el paso de virus NSI a SI (clon F) en ausencia de presión inmune. Este es uno de los cambios que "in vivo" se ha relacionado con la evolución de la enfermedad y promovido por la selección ejercida por la presión inmune. El fenotipo NSI/ monocitotrópico es característico de pacientes asintomáticos y el SI/ linfotrópico de aparición de síntomas (Tersmette y cols., 1988; 1989; 1989b; Schuitemaker y cols., 1991). El sistema inmune ha sido considerado el principal responsable del paso de virus NSI a SI (Tersmette y cols., 1989). Así se ha descrito, que en un primer momento de la infección la respuesta inmune actuaría en contra de los variantes más virulentos presentes en la población viral (virus SI) y sólo se observarían los virus NSI. El progreso de la enfermedad y la pérdida de células T helper favorecerían la aparición de los variantes SI, aunque los NSI permanecerían en un pequeño porcentaje (Schuitemaker y cols., 1991). Los variantes NSI/monocitotrópicos probablemente realizan un importante papel en la persistencia viral, siendo la células monocito-macrófago el reservorio viral más probable (Schnittman y cols., 1989; Massari y cols., 1990; Miedema y cols., 1990).

Todos los cambios anteriormente mencionados ocurren en virus pasados a baja m.d.i y solamente hemos encontrado un cambio a alta m.d.i (variación en la capacidad de replicación en el clon D), como se resume en la tabla XIII. De esta distribución podría deducirse que la aparición de cambios se ve favorecida cuando los virus son pasados a baja m.d.i. Para confirmar estos resultados se realizó un test estadístico de significación binaria, se aplicó una distribución binomial con $P = 6,4 \times 10^{-4} < \alpha = 0.05$. La probabilidad de obtener 12 cambios, en virus pasados a una multiplicidad de (-3) de un total de 13 variaciones observadas es menor de

0.1%, y lo esperado sería obtener la mitad de los cambios a cada una de la m.d.i, es decir 6 o 7 variantes en cada multiplicidad de infección. Por otro lado, utilizando la tabla de contingencia para ajustar lo observado a lo esperado el porcentaje de variantes producidos con una $X^2 = 9,37 > X^2_{0,05}$, lo cual nos indica que los cambios tras pases a baja multiplicidad de infección son promovidos significativamente en el VIH 1 frente a los cambios obtenidos a alta. Además, si se consideran otros cambios minoritarios, como variaciones en la capacidad de replicar en cultivos primarios o en diferentes líneas celulares (apartado 4.3.3.2), o cambios en la intensidad de ciertas bandas al estudiar la zona RT-3' (apartado 4.3.2.3) está aún más favorecida la expresión de variantes a baja multiplicidad de infección.

Una de las posibles explicaciones de estos resultados, mayor número de variaciones a baja m.d.i, podría ser debida a la presencia de partículas defectivas. Se ha descrito que la población de VIH-1 contiene un considerado número de genomas defectivos (Meyerhans y cols., 1989), con lo cual el número de partículas virales utilizadas en cada infección sería mayor al número de ufp consideradas. Nos encontraríamos por tanto, con genomas defectivos que interferirían con las partículas virales no defectivas en la replicación, esto favorecería un desequilibrio y una rápida evolución de la población (Holland y cols., 1982). Si esto se estuviera produciendo en nuestro caso se detectaría un aumento de la expresión de variantes, que serían detectados mayoritariamente en las infecciones realizadas a multiplicidad de infección alta. Sin embargo cuando elegimos las condiciones de infección en las que se realizaron los pases se tuvo en cuenta la posible formación de estas partículas defectivas, eligiéndose m.d.i menores de 1 ufp/célula. Además los resultados presentados apoyan que los variantes obtenidos no son producidos en este caso por

la formación de partículas defectivas, ya que se encuentran en los virus pasados a más baja m.d.i. (0,001 ufp/célula).

VIRUS	CAMBIOS			
	m.d.i. (-1)		m.d.i. (-3)	
	G	F	G	F
S61			M,M,M/V3	
A				R
B				
C			M,M	
D		R		
E			M /V3	R
F			/V3	S

TABLA XIII.- Cambios genéticos y fenotípicos después de los pases seriados en células MT-4 a diferente multiplicidad de infección.

- F: Cambios fenotípicos.
 G: Cambios genéticos
 M: Cambio en el patrón de "mismatches"
 V3: Cambios en la secuencia del lazo V3.
 R: Cambios en la cinética de replicación.
 S: Cambio de SI a NSI.

Otra posibilidad para explicar estos resultados es la presión ejercida por las diferentes poblaciones de la "cuasi-especie" sobre variantes minoritarios con una mayor ventaja, los cuales se encuentran englobados dentro del espectro mutante de la población y por tanto no son detectados. Esta observación fue precedida por estudios de simulación de "cuasi-especies" (Eigen y Biebricher, 1988) y demostrada experimentalmente con el VSV (de la Torre y Holland, 1990), en donde clones altamente competitivos (variantes con mejores capacidades), del VSV pueden estar escondidos dentro del complejo de "cuasi-especies" y sólo se expresan y son detectados cuando sobrepasan un nivel umbral durante los pases en cultivos de tejidos. Nuestros resultados sugieren la presencia de variantes de VIH-1 con distintas propiedades genéticas y fenotípicas los cuales están por debajo del nivel umbral, siendo indetectables al menos que se elimine el efecto supresor ejercido sobre estos por el conjunto de "cuasi-especies" donde se encuentran (de la Torre y Holland, 1990). Un ejemplo claro es lo observado con el S61₁₈₇₃, cuyo patrón de bandas por "mismatches" al estudiar la zona de la ribosonda ENV sólo lo encontramos al estudiar los clones individuales del S61 (clones D, E y F) o cuando ha sido pasado el S61 a baja m.d.i. Esto muestra que no sólo el efecto de cuello de botella (Chao, 1990; Duarte y cols., 1992) sino también el tamaño de la población va a contribuir y a influir en la heterogeneidad de los virus RNA y en su evolución, al favorecer o suprimir *variantes dominantes*.

Por último, se ha observado que los cambios tanto genéticos como fenotípicos además de producirse mayoritariamente cuando los virus son pasados a baja m.d.i, como hemos comentado, también se producen en poblaciones virales concretas, en los que se acumulan la mayoría de los cambios.

. En el S61₁₃₁₃, se encuentran dos cambios, cambios en el patrón de "mismatches" (en ENV), y un cambio en la secuencia de la V3 (Lys por His en la posición 341, localizada fuera del lazo V3).

. En el E₁₃₁₃, se encuentra un cambios en el patrón de "mismatches" (en ENV), un cambio en la secuencia de V3 (en la posición 306, Ser por Arg), y cambio en la cinética de replicación (el virus se vuelve más lento).

. En el F₁₃₁₃, donde encontramos un cambio en la secuencia de la V3 (en la posición 302, Asn por Ile) y cambio en el ECP pasando NSI a SI.

Estos variantes parece que son mayoritarios dentro de las "cuasi-especies" y los que se impone tanto "in vivo" como "in vitro" quizás debido a su mayor adaptabilidad al acumular y aceptar mayor número de cambios.

Variaciones fenotípicas y genotípicas del VIH-1 encontradas "in vivo", tales como capacidad de formar sincitios, niveles de replicación, tropismo celular, o cambios en la secuencia de la región V3 de la gp120, las hemos observado cuando virus clonados son pasados en cultivos celulares (condiciones "in vitro"). Dichas modificaciones por tanto no son el resultado de estados particulares de la enfermedad ni de alteraciones fisiológicas o inmunológicas del paciente, ya que estas modificaciones pueden encontrarse dentro de un contexto controlado; es decir dentro de un sistema de cultivos celulares. En nuestros resultados, se han producido sustituciones de aminoácidos (Asn por Ile, Ser por Arg y Lys por His) en el principal lazo antigénico, en la V3 de la gp120, (Goudsmit y cols., 1988; Palker y cols., 1988; Javaherian y cols., 1989; Meloen y cols., 1989; Emini y cols., 1992) y cambios fenotípicos (de NSI a SI). Esto está en correlación con lo observado en estudios realizados en dominios antigénicos de virus RNA, como en el virus de la fiebre aftosa

(Diez y cols., 1989; 1990; Domingo y cols., 1992), en el virus de la rabia (Benmansour y cols., 1992), en el virus de la gripe (Both y cols., 1983; Rocha y cols., 1991), o en lentivirus como el virus de la anemia infecciosa equina (Carpenter y cols., 1990).

Los cambios que hemos detectado en los diferentes virus en cultivos de tejidos pueden no tener relación con los que suceden "in vivo". Para comprobarlo hemos analizado un segundo aislamiento del mismo paciente después de 14 meses (259/91). El paciente se encontraba en un estado más avanzado en la enfermedad. Se secuenció del lazo V3 encontrándose tres cambios con respecto a la secuencia consenso del S61. Dos de estos cambios coincidían con los obtenidos en pases "in vitro" y sólo el cambio localizado en la posición 317 (Thr por Ala) es localizado sólo en el virus 259. Estos resultados nos permiten pensar: primero que lo que nosotros estamos observando "in vitro" sucede también "in vivo", y en segundo lugar, en contra de las teorías ya mencionadas, cambios en la zona del lazo V3, principal dominio neutralizante, pueden producirse tanto en ausencia como en presencia de presión inmune. Todos estos resultados podrían indicar que la variación intrínseca del virus y su evolución están ejerciendo un importante papel en la evolución de la infección.

El porcentaje de heterogeneidad estimada considerando las poblaciones analizadas después de los pases, es de un 0,03% frente al total de los nucleótidos secuenciados lo que supone aproximadamente 3 mutaciones por genoma. Este porcentaje es muy similar al encontrado al estudiar clones individuales derivados del FMDV de una población viral clonada tras pases líticos o de infección persistente en cultivos celulares (Sobrino y col., 1983; de la Torre y col., 1988). Esto sugiere que

probablemente más influenciada por los largos períodos de incubación, lo que debe favorecer, durante su replicación, el aumento de variantes. Estos datos irían en contra de las teorías que suponen que el alto grado de heterogeneidad y la alta variabilidad observada está motivada por la mayor variación del virus.

El modelo "in vitro" que hemos desarrollado para el estudio de la variabilidad del VIH-1 resalta la dificultad de distinguir variantes virales que fortuitamente aparecen (e incluso son dominantes) de aquellos que han sido seleccionados por una determinada actividad biológica bajo determinadas circunstancias (fisiológicas, inmunológicas, etc.) ambientales.

6.- CONCLUSIONES

1.- En un aislado natural del VIH-1 hemos encontrado un conjunto de variantes con distintas características genéticas y fenotípicas, conforme al modelo de "cuasi-especies".

2.- La técnica de detección de desapareamientos tras digestión con la RNasa A o "mismatches", nos ha permitido analizar la heterogeneidad genética de una población viral y determinar la proporción de cada variante en la población global.

3.- Hemos reproducido en un sistema "in vitro" algunas de las variaciones observadas en el virus durante la infección.

4.- El cambio fenotípico de virus no sincitiales a virus sincitiales, relacionado con la progresión de la enfermedad, ha sido observado también "in vitro".

5.- "In vitro", esto es en ausencia de presión inmune, hemos detectado cambios de aminoácidos en V3, principal determinante antigénico de la gp120.

6.- Dos de los tres cambios de aminoácidos observados en la evolución "in vitro" en V3 y en regiones adyacentes de la gp120, coinciden con los observados en la evolución "in vivo".

7.- La tasa de variación de nucleótidos de 0,03%, calculada después de 15 pases seriados en cultivos celulares, es comparable a la obtenida en otros virus de genoma RNA.

8.- Se ha observado que los pases a menor multiplicidad de infección promueven la expresión de variantes en el VIH-1.

7.- BIBLIOGRAFIA

- Andiman, W.A., B. Joyce Simpson, B. Olsen, L. Dember, T.J. Silva, and G. Miller.** 1990. Rate of transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection from mother to child and short term outcome of neonatal infection. *Am. J. Dis. Child.* **144**:758-766.
- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martín, N. Arnheim, and M. Perucho.** 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**:549-554.
- Allan, J.S., J.E. Coligan, F. Barin, M.F. McLane, J.G. Sodroski, C.A. Rosen, W.A. Haseltine, T.H. Lee and M. Essex.** 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* **228**:1091-1094.
- Ayala, F.J.** 1980. *Evolución molecular.* Omega, Barcelona.
- Anand, R., F. Siegal, C. Reed, T. Cheung, S. Forlenza, and J. Moore.** 1987. Non-cytocidal natural of human immunodeficiency virus isolated from AIDS patients with neurological disorders. *The Lancet* **ii**:234-238.
- Arya, S.K., C. Guo, S.F. Josephs, and F. Wong-staal.** 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* **229**:69-73.
- Asjö, B., J. Albert, A. Karlsson, L. Morfeld-Manson, G. Biberfeld, K. Lindman, and E. M. Fenyö.** 1986. Replicative properties of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* **ii**:660-662.
- Asjö, B., U.K. Sharma, L. Morfeld-Manson, A. Magnusson, T. Barkhen, J. Albert, E. Olausson, A. Von Gegerfelt, B. Lind, P. Biberfeld, and E.M. Fenyö.** 1990. Naturally occurring HIV-1 isolated with differences in replicative capacity are distinguished by in situ hybridization of infected cell. *AIDS Res human Retroviruses* **6**:1177-1182.
- Balfe, P., P. Simmonds, A. Ludlam, J.O. Bishop, and J.A. Leigh Brown.** 1990. Concurrent evolution of human immunodeficiency virus type 1 in patients infected from the same source: rate of sequence change and low frequency of inactivating mutations. *J Virol* **64**:6221-6233.
- Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**:1209-1211.
- Barré-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
- Benko, D.M., S. Schwartz, G.N. Pavlakis, and B.K. Felber.** 1990. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J Virol* **64**:2505-2518.
- Benmansour, A., M. Brahimi, C. Tuffereau, P. Coulon, F. Lafay, and A. Flamand.** 1992. Rapid sequence evolution of street rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the population. *Virology* **187**:33-45.
- Both, G.W., M.J. Sleight, N.J. Cox, and A.P. Kendal.** 1983. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathway and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol* **48**:52-60.
- Briesen von, H., W.B. becker, K. Henco, E.G. Helm, H.R. Gelderblom, H.D. Brede, and**

H. RübSamen- Waigmann. 1987. Isolation frequency and growth properties of HIV variants: multiple simultaneous variants in a patient demonstrated by molecular cloning. *J Med Virol* 23:51-66.

Brinchmann, J.E., J. Albert, and F. Vartdal. 1991. Few infected CD4⁺ T cells but a high proportion of replication competent provirus copies in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 65:2019-2023.

Burger, H. R.A. Gibbs, P.N. Nguyen, K. Flaherty, J. Gulla, A. Belman, and B. Weiser. 1990. HIV 1 transmission within a family: generation of viral heterogeneity correlates with duration of infection. In: *Vaccines 90*, edited by F. Brown, R.M. Chanock, H.S. Ginsberg, and R.A. Lerner. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 255-262.

Camerine, D., and I.S.Y. Chen. 1991. Molecular genetics of human immunodeficiency virus type 1 CD4 interaction. In: *Virus that affect the immune system*, edited by H.Y. Fan. American Society for Microbiology, Washington, 71-91.

Cao, Y., A.E. Friedman-Kien, Y. Huang, X.L. Li, M. Mirabile, T. Moudgil, D. Zucker-Franklin, and D.D. Ho. 1990. CD4⁺-independent, productive human immunodeficiency virus type 1 infection of hepatoma cell lines in vitro. *J Virol* 64:2553-59.

Carpenter, S., L.H. Evans, M. Sevoian, and B. Chensebro. 1990. *In vivo* and *In vitro* selection of equine infectious anemia virus variants. *Appl. Virol. Res.* 2:99-115.

Center for disease control. 1981. Pneumocystis pneumonia. Los Angeles. *MMWR*. 30:250-252.

Center for disease control. 1982. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR* 31:365-367.

Center for disease control. 1982. Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS)- California. *MMWR*. 31:652-654.

Center for disease control. 1982. Update on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons- United State. *MMWR*. 31:294-301.

Center for disease control. 1982. Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants- New York, New Jersey, California. *MMWR*. 31:665-654.

Center for disease control. 1987. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR*. 36:225-236.

Chao, L. 1990. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 348:454-455.

Chakraborti, L., M. Guyader, M. Alizon, M.D. Daniel, R.C. Desrosiers, P. Tiollais, and P. Somigo. 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retrovirus. *Nature* 328:543-547.

Cheng-Mayer, C., M. Quiroga, J.W. Tung, D. Dina, and J.A. Levy. 1990. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol* 64:4390-4398.

Cheng-Mayer, C., J.T. Rutka, M.L. Rosenblum, T. McHugh, D.P. Stites, and J.A. Levy. 1987. The human immunodeficiency virus (HIV) can productively infect cultured glial

cells. *Proc. Natl. Acad. USA.* **84**:3526-3530.

Cheng-Mayer, C., D. Seto, and J.A. Levy. 1991. Altered host range of HIV-1 after passage through various human cell types. *Virology* **181**:288-294.

Cheng-Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J.A. Levy. 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* **240**:80-82.

Clavel, F., D. Guétard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M.A. Rey, M.O. Santos Ferreira, A.G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J.L. Champalimaud, and L. Montagnier. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.

Clavel, F., M.D. Hoggan, R.L. Willey, K. Strebel, M.A. Martin, and R. Repaske. 1989. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* **63**:1455-1459.

Cristina, J., J.A. López, C. Albo, B. García -Barreno, J. García, J.A. Melero, and A. Portela. 1990. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatches cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* **174**:126-134.

Cristina, J., A. Moya, J. Arbiza, J. Russi, M. Hortal, C. Albo, B. García-Barreno, O. García, J.A. Melero, and A. Portela. 1991. Evolution of the G and P Genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) Studied by the RNase A mismatch cleavage method. *Virology* **184**:210-218.

Coffin, J.M. 1986. Genetic variation in AIDS viruses. *Cell.* **46**:1-4.

Coffin, J.M. 1990. Retroviridae and their replication. In: *Virology, Second Edition.* ed. Fields, B.N., Knipe D.M. et al. Raven Press, New York 11-33.

Coffin, J.M. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch virology supp* **2**:290-299.

Coffin, J.M., A. Haase, J.A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and R. Weiss. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* **321**:10.

Cohen, E.A., E.F. Terwilliger, Y. Jalinos, J. Proulx, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1990. Identification of HIV-1 product and function. *J AIDS* **3**:11-18.

Cullen, B.R. 1991. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J* **5**:2361-2368.

Cullen, B.R., and W.C. Greene. 1989. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* **58**:423-426.

Cullen, B.R., J. Hauber, K. Campbell, J.G. Sodroski, W.A. Haseltine, and G.A. Rosen. 1988. Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting *art* gene product. *J Virol* **62**:2498-2501.

Dahi, K., K. Martin, and G. Miller. 1987. Differences among immunodeficiency virus strains in their capacities to induce cytolysis or persistent infection of a lymphoblastoid cell line immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol* **61**:1602-1608.

Daniel, M.D., N.L. Letvin, M. Kannagi, P.K. Sehgal, R.D. Hunt, P.J. Kanki, M. Essex,

and R.C. Desrosiers. 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**:1201-1204.

Delassus, S., R. Cheyrier, and S. Wain-Hobson. 1991. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 nef and long terminal repeat sequences over 4 years in vivo and in vitro. *J Virol* **65**: 225-231.

De Jong J.J., J. Goudsmit, W. Keulen, B. Klaver, W. Krone, M. Tersmette, and A. De Ronde. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J Virol* **66**:757-765.

De Jong J.J., A. De Ronde, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* **66**:6777-6780.

de la Torre, J.C., and J.J. Holland. 1990. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol* **64**:6278-6281.

de la Torre, J.C., E. Martínez-Salas, J. Díez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Dávila, and E. Domingo. 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**:2050-2058.

Díez, J., M. Dávila, C. Escarmís, M.G. Mateu, J. Domínguez, J.J. Pérez, E. Giral, J.A. Melero, and E. Domingo. 1990. Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cellculture. *J Virol* **64**:5519-5528.

Díez, J., M.G. Mateu, and E. Domingo. 1989. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth virus in the absence of antibodies, as revealed by an *in situ* assay. *J Gen Virol* **70**:3281-3289.

Dingwall, C., I. Ernberg, M.J. Gait, M.S. Green, S. Heaphy, J. Karn, A.D. Lowe, M. Singh, M.A. Skinner, and R. Valerio. 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. USA*. **86**:6925-6929.

Domingo, E., C. Escarmís, M.A. Martínez, E. Martínez-Salas, and M.G. Mateu. 1992. Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **176**:33-47.

Domingo, E., and J.J. Holland. 1988. High error rates, population equilibrium, and evolution of RNA replication systems. In: RNA genetics. Variability of RNA genomes. ed. Domingo, E., Holland, J.J. and Ahlquist, P. Boca Raton, Florida 3-36.

Domingo, E., E. Martínez-Salas, F. Sobrino, J.C. de la Torre, A. Portela, J. Ortin, C. López-Galíndez, P. Perez-Breña, N. Villanueva, R. Najera, S. VandePol, D. Steinhauer, N. DePolo, and J.J. Holland. 1985. The quasispecies (extremely heterogenous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance-a review. *Gene* **40**:1-8.

Domingo, E., M.G. Mateu, M.A. Martínez, J. Dopazo, A.Moya, and F. Sobrino. 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: Kurstak E, Marusyk R.G., Murphu F.A., van Regenmortel M.H.V.(eds) Applied virology reseasch, vol 2 Plenum, New York, pp 233-266.

Domingo, E., D. Sabo, T. Taniguchi, and C. Weissman. 1978. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* **13**:735-744.

- Doolittle, R.F., D.F. Feng, M.S. Johnson, and M.A. McClure. 1989. Origins and evolutionary relationships of retrovirus. *O Rev Biol* **64**:1-30.
- Dowbenko, D., G. Nakamura, C. Fennie, C. Shimasaki, L. Riddle, R. Harris, T. Gregory, and L. Lasky. 1988. Epitope mapping of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 with monoclonal antibodies. *J Virol* **62**:4703-4711.
- Duarte, E., D. Clarke, A. Moya, E. Domingo, and J.J. Holland. 1992. Rapid fitness losses in mammalian RNA virus due Muller's ratchet. *Proc. Natl. Acad. USA*. **89**:6015-6019.
- Dulbecco, R., and G. Freeman. 1959. Plaque production by polyomavirus. *Virology* **8**:396-401.
- Eigen, M. 1971. Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**:465-523.
- Eigen, M., and C.K. Biebricher. 1988. Sequence space and quasispecies distribution, p.211-245. In E. Domingo, J. J. Holland, and P. Ahlquist (ed), *RNA genetics*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Eigen, M., and K. Nieselt-Struwe. 1990. How old is the immunodeficiency virus? *AIDS* **4**(suppl 1):S85-S93.
- Emini, E.A., W.A. Schleif, J.H. Nunberg, A.J. Conley, Y. Eda, S. Tokiyoshi, S.D. Putney, S. Matsushita, K.E. Cobb, C.M. Jett, J.W. Eichberg, and K.K. Murthy. 1992. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* **335**:728-730.
- Epstein, L.G., C. Kuiken, B.M. Blumberg, S. Hartman, L.R. Sharer, M. Clement, and J. Goudsmit. 1991. HIV-1 V3 domain variation in brain and spleen of children with AIDS: tissue-specific evolution within host-determined quasispecies. *Virology* **180**:583-590.
- European collaborative study. 1991. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet* **337**:253-55
- Evans, L.A., T.M. McHugh, D.P. Stites, and J.A. Levy. 1987. Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells. *J Immunol* **138**:3415-3418.
- Feinbrg M.G., and W.C. Greene. 1992. Molecular insights into human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Curr. Op. Immunology* **4**:446-474.
- Feinberg, M.B., R.F. Jarrett, A. Aldovine, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the level of splicing and translation of viral RNA. *Cell* **46**:807-817.
- Feinberg, A.P., and B.A Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**:6-13.
- Felber, B.K., M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, and G.N. Pavlakis. 1989. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. USA*. **86**:1495-1499.
- Fenyő, E. M., J. Albert, and B. Asjö. 1989. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* **3**(Suppl.1):s5-s12.

Fenyő, E.M., L. Morfeldt-Manson, F. Chiodi, B. Lind, A. Von Gegerfelt, J. Albert, E. Olausson, and B. Asjö. 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* **62**:4414-4419.

Fisher, A.G., B. Ensoli, D. Looney, A. Rose, R.C. Gallo, M.S. Saag, G.M. Shaw, B.H. Hahn, and F. Wong-Staal. 1988. Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate. *Nature* **334**:444-447.

Fisher, A.G., M.B. Feinberg, S.F. Josephs, M.E. Harper, L.M. Marselle, G. Reyes, M.A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**:367-371.

Fouchier, R.A.M., M. Groenink, N.A. Kootstra, M. Tersmette, H.G. Huisman, F. Miedema, and H. Schuitemaker. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the trid variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* **66**:3183-3187.

Freed, E.O., D.J. Myers, and R. Risser. 1990. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. USA*. **87**:4650-4654.

Freed, E.O., D.J. Myers, and R. Risser. 1991. Identification of principal neutralizing determinat of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J Virol* **65**:190-194.

Gallaher, W.R. 1987. Characterization of the domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Cell* **50**:327-328.

Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, and F.D. Markham. 1984. Frequent detection and isolated of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503.

Garcia, J.A., F.K. Wu, R. Mitsuyasu, and R.B. Gaynor. 1987. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J* **6**:3761-3770.

Goodenow, M., T. Huet, W. Saurin, S. Kwok, J. Sninsky, and S. Wain-Hobson. 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: Evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **2**:344-352.

Gonzalez-Scarano, F., M.N. Waxham, A.M. Ross, and J.A. Hoxie. 1987. Sequence similarities between human immunodeficiency virus gp41 and Paramyxovirus fusion proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* **3**:245-252.

Gorman, O.T., W.J. Bean, Y. Kawaobka, and R.G. Webster. 1990. Evolution of nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol* **64**:1487-1497.

Gottlieb, M.S., R. Schroff, H.M. Schanker, J.D. Weisman, P.T. Fan, R.A. Wolf, and A. Saxon. 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *New Engl J Med.* **305**:1426-1431.

Goudsmit, J., C. Debouck, R.H. Melen, L. Smit, M. Bakker, D.M. Asher, A.V. Wolff, C.J.Jr. Gibbs, and D.C. Gajdusek. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. USA.* **85**:4478-4482.

- Greene, W.C. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infección. *N Engl J Med* **324**:308-317.
- Groenink, M., R.A.M. Fouchier, R.E.Y. Goede de, F. Wolf de, R.A. Gruters, H.Th.M. Cuypers, H.G. Huisman, and M. Tersmette. 1991. Phenotypic heterogeneity in a panel of infectious molecular human immunodeficiency virus type 1 clones derived from a single individual. *J Virol* **65**:1968-1975.
- Guy, B., M.P. Kieny, Y. Riviere, C. Le Peuch, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier, and J.P. Lecocq. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**:266-269.
- Guyader, M., M. Emerman, P. Somigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon. 1987. Genome organization and transactivation of human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-669.
- Hahn, B.H., M.A. Gonda, G.M. Shaw, M. Popovic, J.A. Hoxie, R.C. Gallo and Wong-Staal F. 1985. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: Different viruses exhibit greatest divergence in their envelope. *Proc. Natl. Acad. USA*. **82**:4813-4817.
- Hahn, B.H., G.M. Shaw, S.K. Arya, M. Popovic, R.C. Gallo and Wong-Staal F. 1984. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* **312**:166-169.
- Hahn, B.H., G.M. Shaw, M.E. Taylor, R.R. Redfield, P.D. Markham, S.Z. Salahuddin, F. Wong-Staal, R.C. Gallo, E.S. Parks, and W.P. Parks. 1986. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* **232**:1548-1553.
- Hansen, J., T. Schulze, and K. Moelling. 1987. RNase H activity associated with bacterially expressed reverse transcriptase of human T-cell lymphotropic virus III/Lymphadenopathy-associated virus. *J Biol Chem*. **262**:12393-12396.
- Harada, S., Y. Koyanagi, and N. Yamamoto. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-Carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**:563-566.
- Harada, S., N. Yamamoto, and Y. Hinuma. 1987. Clonal analysis of functional differences among strains of human immunodeficiency virus (HIV). *Journal of Virological Methods*. **18**:291-304.
- Harrich, D., J. Garcia, F. Wu, R. Mitsuyasu, J. Gonzalez, and R. Gaynor. 1989. Role of SP1-binding domains in *in vivo* transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* **63**:2585-2591.
- Haseltine, W., and F. Wong-Staal. 1988. The molecular biology of the AIDS virus. *Sci Am* **259**:655-659.
- Helseth, E., U. Olshevsky, D. Gabuzda, B. Ardman, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1990. Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein affect membrane fusion. *J. Virol*. **64**:6314-6318.
- Ho, D.D., M.G. Sarngadharan, M.S. Hirsch, R.T. Schooley, T.R. Rota, R.C. Kennedy, T.C. Chana, and V.L. Sato. 1987. Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins. *J Virol* **61**:2024-2028.

- Holland, J.J., J.C. de la Torre, and D.A. Steinhauer. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol.* **176**:1-20.
- Holland, J.J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Gradau, S. Nichol, and S. Vande Pol. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* **215**:1577-1585.
- Hu, W.S., and H.M. Temin. 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-1233.
- Huang, A.S. 1988. Modulation of viral disease processes by defective interfering particles. In: RNA genetics. Variability of RNA genomes. ed. Domingo, E., Holland, J.J. and Ahlquist, P. Boca Raton, Florida 195-208.
- Hwang, S.S., T.J. Boyle, H. Kim-Lyerly, and B.R. Cullen. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**:71-74.
- Ivanoff, L. A., D. J. Looney, C. McDanal, J. F. Morris, F. Wong-Staal, A. J. Langlois, S. R. Petteway, S. R. Jr. Petteway and T. J. Matthews. 1991. Alteration of HIV-1 infectivity and neutralization by a single amino acid replacement in the V3 loop domain. *AIDS Research and Human Retroviruses.* **7**:595-603.
- Javaherian, K., A.J. Langlois, C. McDanal, K.L. Ross, L.I. Eckler, C.L. Jellis, A.T. Profy, J.R. Rusche, D.P. Bolognesi, S.D. Putney, and T.J. Matthews. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. USA.* **86**:6768-6772.
- Jones, K.A., P.A. Luciw, and N. Duchange. 1988. Structural arrangements of transcription control domains within the 5' untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev* **2**:3447-3447.
- Kalyanaraman, V.S., M.S. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, I. Miyoshi, D. Blayney, D. Golde, and R.C. Gallo. 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-I) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**:571-577.
- Kanki, P.J., M.F. McLane, N.W. Jr. King, N.L. Letvin, R.D. Hunt, P. Sehgal, M.D. Daniel, R.C. Desrosiers, and M. Essex. 1985. Serological identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. *Science* **228**:1199-1201.
- Kestler, H.w., D.J. Ringler, K. Mori, D.L. Panicali, P.K. Sehgal, M.D. Daniel, and R.C. Desrosiers. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and development of AIDS. *Cell* **65**:651-662.
- Kinnunen, L., A. Huovilainen, T. Pöyry, and T. Hovi. 1990. Rapid molecular evolution of wild 3 poliovirus during infection in individual hosts. *J Gen Virol* **71**:317-324.
- Kleim, J.P., A. Ackermann, H.H. Brackmann, M. Gahr, and K.E. Schneeweis. 1991. Epidemiologically closely related viruses from hemophilia B patients display high homology in two hypervariable regions of the HIV-1 env gene. *AIDS Res Human Retrov* **7**:417-421.
- Klimkait, T., K. Strebel, M. Hoggan, M.A. Martin, and J.M. Orenstein. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**:621-629.
- Kohlstaedt, L.A., J. Wang, J.M. Friedman, P.A. Rice, and T.A. Steitz. 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor.

Science **256**:1783-1790.

Koyanagi, Y., S. Miles, R.T. Mitsuyasu, J.E. Merrill, H.V. Vinters, and I.S.Y. Chen. 1987. Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* **236**:819-822.

Kozarsky, K., M. Penman, L. Basiripour, W. Haseltine, J. Sodroski, and M. Krieger. 1989. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Acquired Immune Defic Syndr* **2**:163-169.

Kowalski, M., J. Potz, L. Basiripour, T. Dorfman, W.C. Goh, E. Terwilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodroski. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* **237**:1351-1355.

Kuiken, C.L., J.J. de Jong, E. Baan, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit. 1992. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transitions of the viral biological phenotype. *J Virol* **66**:4622-4627

Kusumi, K., B. Conway, S. Cunningham, A. Berson, C. Evans, A. K. N. Iversen, D. Colvin, M.V. Gallo, S. Coutre, E. G. Shpaer, D. V. Faulkner, A. deRonde, S. Volkman, C. Williams, M. S. Hirsch, and J. I. Mullins. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gene structure and diversity in vivo and after cocultivation in vitro. *J Virol* **66**:875-885

Larder, B., D. Purifoy, K. Powell, and G. Darby. 1987. AIDS virus reverse transcriptase defined by high level expression in *Escherichia coli*. *EMBO J* **6**:3133-3137.

LaRosa, G.J., J.P. Davide, K. Weinhold, J.A. Waterbury, A.T. Profy, J.A. Lewis, A.J. Langlois, G.R. Dreesman, R.N. Boswell, P. Shadduck, L.H. Holley, M. Karplus, D.P. Bolognesi, T.J. Matthews, E.A. Emini, and S.D. Putney. 1990. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* **249**:932-935.

Laskey, R.A., and A.D. Mills. 1977. Enhanced autoradiographic detection of ³²P and ¹²⁵I using intensifying screens and hypersensitized films. *FEBS Lett.* **82**:314-316.

Lee, T.H., J.E. Coligan, J.S. Allan, M.F. McLane, J.E. Groopman, and M. Essex. 1986. A new HTLV III(LAV) protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science* **231**:1546-1548.

Leonard, C.K., M.W. Spellman, L. Riddle, R.J. Harris, J.N. Thomas, and T.J. Gregory. 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **225**:10373-10382.

Levy, J.A., A.D. Hoffman, S.M. Kramer, J.A. Landis, J. Shimabukuro, and L.S. Oshiro. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**:840-842.

Levy, J.A., J. Shimabukuro, T. McHugh, C. Casavant, D. Stites, and L. Oshiro. 1985. AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* **147**:441-448.

López-Galíndez, C., J.A. López, J.A. Melero, L. de la Fuente, C. Martínez, J. Ortín, and M. Perucho. 1988. Analysis of genetic variability and mapping of point mutations in

influenza virus by RNase A mismatch cleavage method. *Proc. Natl. Acad. USA.* **85**:3522-3526.

López-Galíndez, C., J.M. Rojas, R. Najera, D.D. Richman, and M. Perucho. 1991. Characterization of genetic variation and 3'-azido-3'-deoxythymidine- resistance mutations of human immunodeficiency virus by the RNase A mismatch cleavage method. *Proc. Natl. Acad. USA.* **88**:4280-4284.

Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.

Lu, Y., N. Touzjian, M. Stenzel, T. Dorfman, J.G. Sodrodki, and W.A. Haseltine. 1990. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**:5226-5229.

Maddon, P.J., A.G. Dalgleish, J.S. McDougal, P.R. Clapham, R.A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.

Malim, M.H., J. Hauber, S.Y. Le, J.V. Maizel, and B.R. Cullen. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.

Maniatis, T., J. Sambrook, and E.F. Fritsch. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 2 edition.

Martins, L.P., N. Chenciner, B. Asjö, A. Meyerhans, and S. Wain-Habson. 1991. Independent fluctuation of human immunodeficiency virus type 1 rev and gp41 quasispecies in vivo. *J Virol* **65**:4502-4507.

Massari, F.E., G. Poli, S.M. Schnittman, M.C. Psallidopoulos, V. Davey, and D.C. Fauci. 1990. In vivo T lymphocytes origin of macrophage-tropic strains of HIV. Role of monocytes during in vitro isolation and in vivo infection. *J. Immunol* **144**:4628-4632.

Masuda, T., M. Kannagi, M. Nakamura, K. Ohtani, Y. Hinuma, and S. Harada. 1989. Emergence of large plaque-producing clones of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Journal of medical Virology* **27**:170-177.

Masur, H., M.A. Michelis, J.B. Greene, I. Onorato, R.A. Stouwe vande, R.S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H.W. Murray and S. Cunningham-Rundles. 1981. An outbreak of community-acquired pneumocystis carinii pneumonia. *New Engl J Med.* **305**:1431-1438.

Matthews, T.J., A.J. Langlois, W.G. Robey, N.T. Chang, R.C. Gallo, P.J. Fischinger, and D.P. Bolognesi. 1986. Restricted neutralization of divergent human T-Lymphotropic virus type III isolates by antibodies to the major envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. USA.* **83**:9709-9713.

McDougal, J.S., M.S. Kennedy, J.M. Sligh, S.P. Cort, A. Mawle, and J.K.A. Nicholson. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4⁺ T cell by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**:382-385.

McNearney, T., P. Westervelt, B.J. Thielan, D.B. Trowbridge, J. Garcia, R. Whittier, and R. Ratner. 1990. Limited sequence heterogeneity among biologically distinct human immunodeficiency virus type 1 isolates from individuals involved in a clustered infectious

outbreak. *Proc. Natl. Acad. USA.* **87**:1917-1921.

Meloen, R.H., R.M. Liskamp, and J. Goudsmit. 1989. Specificity and function of the individual amino acids of an important part of human immunodeficiency virus type 1 that induces neutralizing activity. *J Gen Virol* **70**:1505-1512.

Mervis, R.J., N. Ahmad, E.P. Lillehoj, M.G. Raum, F.H.R. Salazar, H.W. Chan, and S. Venkatesan. 1988. The gag gene products of human immunodeficiency virus type 1: alignment within the gag open reading frame, identification of posttranslational modifications, and evidence for alternative gag precursors. *J Virol* **62**:3993-4002.

Meyerhans, A., R. Cheyneir, J. Albert, M. Seth, S. Kwok, J. Sninsky, L. Morfeldt-Manson, B. Asjö, and S. Wain-Hobson. 1989. Temporal Fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**:901-910.

Miedema, F., M. Tersmette, and A.W van Lier. 1990. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunology Today* **11**:293-297.

Modrow, S., B.H. Hahn, D.H. Shaw, R.C. Gallo, F. Wong-Staal, and H. Wolf. 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* **61**:570-578.

Moore, J.P., and P.L. Nara. 1991. The role of V3 domain of gp120 in HIV infection. *AIDS Suppl.* **2**:s21-s33.

Muesing, M.A., D.H. Smith, C.D. Cabradilla, C.V. Benton, L.A. Lasky, and D.J. Capon. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**:450-458.

Myers, R.M., Z. Larin, and T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science* **230**:1242-1246.

Myers, G., A.B. Rabson, S.F. Josephs, T.F. Smith, J.A. Berzofsky, and F. Wong-Staal (ed.). 1990. *Human retroviruses and AIDS 1990*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex.

Nakashima, H., R. Pauwels, M. Baba, D. Schols, J. Desmyter and E. De Clercq. 1989. Tetrazolium-based plaque assay for HIV-1 and HIV-2, and its use in the evaluation of antiviral compounds. *Journal Virological Methods.* **26**:319-329.

Niederman, T.M.J., B.J. Thielan, and L. Ratner. 1989. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. USA.* **86**:1128-1132.

O'Brien, W.A., Y. Koyanagi, A. Namazie, J.Q. Zhao, A. Diagne, K. Idler, J.A. Zack, and I.S. Chen. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* **348**:69-73.

Ogawa, K., R. Shibata, T. Kiyomasu, Y. Higuchi, Y. Kishida, A. Ishimoto, and A. Adachi. 1989. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J Virol* **63**:4110-4114.

Owen, J., and P. Palukaitis. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* **166**:495-502.

Palker, T.J., M.E. Clark, A.J. Langlois, T.J. Matthews, K.J. Weinhold, R.R. Randall, D.P. Bolognesi, and B.F. Haynes. 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. USA.* **85**:1932-1936.

Pang, S., H.V. Vinters, T. Akashi, W.A. O'Brien, and I.S.Y. Chen. 1991. HIV-1 env sequence variation in brain tissue of patients with AIDS-related neurologic disease. *J AIDS* **4**:1082-1092.

Page, K.A., N.R. Landau, and D.R. Littman. 1991. Human immunodeficiency virus entry into cells. In: *Virus that affect the immune system*, edited by H.Y. Fan. American Society for Microbiology, Washington. 103-112.

Pauwels, R., E. De Clercq, J. Desmyter, J. Balzarini, P. Goubau, P. Herdewijn, H. Vanderhaeghe, and M. Vandeputte. 1987. Sensitive and rapid assay on MT-4 cell for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *J Virological Methods* **16**:171-185.

Peden, K., M. Emerman, and L. Montagnier. 1991. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1_{LAI}, HIV-1_{MAI}, and HIV-1_{III}. *Virlogy* **185**:661-672.

Perucho, M. 1989. Detection of single base substitutions with the RNase A mismatch cleavage method. *Strategies* **2**:37-41.

Perucho, M., M. Goldfarb, K. Shimizu, C. Lama, J. Fogh, and M. Wigler. 1981. Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* **27**:467-476

Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, M.S. Reitz, V.S. Kalyanaraman, and R.C. Gallo. 1981. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV-I) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukemia. *Nature* **294**:268-271.

Popovic, M., and S. Gratner. 1987. Isolation of HIV-1 from monocytes but not T lymphocytes. *Lancet* **ii**:916.

Popovic, M., M.G. Sarngadharan, E. Read, and R.C. Gallo. 1984. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.

Potts, B.J. 1990. "mini" reverse transcriptase (RT) assay. *Courier* **90-03**:103-106.

Putney, S.D., T.J. Matthews, W.G. Robey, D.L. Lynn, M. Robert-Guroff, W.T. Mueller, A.J. Langlois, J. Ghryed, S.R. Jr. Petteway, K.J. Weinhold, P.J. Fischinger, F. Wong-Staal, R.C. Gallo, and D.P. Bolognesi. 1986. HTLV-III/LAV-neutralizing antibodies to an E.Coli-produced fragment of the virus envelope. *Science* **234**:1388-1390.

Ratner, L., W. Haseltine, R. Patarca, K.J. Livak, B. Starcich, S.F. Josephs, E.R. Doran, J.A. Rafalski, E.A. Whichorn, K. Baumeister, L. Ivanoff, S.R. Jr. Petteway, M.L. Pearson, J.A. Lautenberg, T.S. Papas, J. Chrayeb, N.T. Chang, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**:277-284.

Reed, L., and H. Muench. 1938. A simple method for estimating fifty percent end points. *Amer. J. Hyg.* **27**:493-497.

Ricchetti, M. and H. Buc. 1990. Reverse transcriptase and genomic variability: the

accuracy of DNA replacation is enzyme specific and sequence dependent. *EMBO J* **9**:1583-1593.

Richman, D. 1990. Protocol development. Propagation of AZT-Resistant clinical isolates. *Courier* **90-03**:7-10.

Roberts, J.D., B.D. Preston, L.A. Johnston, A. Soni, L.A. Loeb, and T.A. Kunkel. 1989. Fidelity of two retroviral reverse trnascriptases during DNA- dependent DNA synthesis in vitro. *MOI Cell Biol* **9**:469-476.

Robert-Guroff, M., M. Brown, and R.C. Gallo. 1985. HTLV-III-neutralizing in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Nature* **316**:72-74.

Robey, W.G., B. Safai, S. Oroszlan, L.O. Arthur, M.A. Gonda, R.C. Gallo, and Fischinger. 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* **228**:593-595.

Rocha, E., N.J. Cox, R.A. Black, M.W. Harmon, C.J. Harrison, and A.P. Kendal. 1991. Antigenic and genetic variation in influenza A (H1 N1) virus isolates recovered from a persistently infected immunodeficient child. *J Virol* **65**:2340-2350.

Rojas, J.M. 1991. Estudio de epidemiologia molecular de los virus herpes simplex tipos 1 y 2. *Universidad Autónoma de Madrid. Tesis doctoral.*

Ruano, G., and K.K. Kidd. 1991. Coupled amplification and sequencing of genomic DNA. *Proc Natl Acad. USA.* **88**:2815-2819.

Rusche, J.R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D.L. Lynn, R. Grimaila, A. Langlois, R.C. Gallo, L.O. Arthur, P.J. Fischinger, D.P. Bolognesi, S.D. Putney, and T.J. Matthews. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc. Natl. Acad. USA.* **85**:3198-3202.

Saag, M.S., B. Hahn, J. Gibbons, Y. Li, W.P. Parks, and G.M. Shaw. 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Nature* **334**:440-444.

Sakai, K., X Ma, I. Gordienko, and D.J. Volsky. 1991. Recombinational analysis of a natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: role of vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytophaticity. *J. Virol.* **65**:5765-5773.

Salfeld, J., H.G. Gottlinger, R.A. Sia, R.E. Park, J. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1990. A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO J* **9**:965-970.

Sanchez-Pescador, R., M.D. Power, P.J. Barr, K.S. Steiner, M.M. Stempien, S.L. Brown-Shimer, W.W.A. Renard, A. Randolph, J.A. Levy, D. Dina, and P.A. Luciw. 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**:484-492

Schnittman, S.M., M.C. Psallidopoulos, H.C. Lane, L. Thompson, M. Baselar, M. Massari, C.H. Fox, N.P. Salzman, and A.S. Fauci. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305-308.

Schuitemaker, H., M. Koot, N.A. Kootstra, M.W. Dercksen, R.E.Y. Goede de, R.P. Steenwijk, J.M.A. Langer, J.K.M. Eeftink Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to

T-cell-tropic virus populations. *J Virol* **66**:1354-1360.

Schuitemaker, H., N.A. Kootstra, R.E.Y. Goede de, F. de Wolf, F. Miedema, and M. Tersmette. 1991. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell tropism and syncytium-inducing ability in primary T cell culture. *J Virol* **65**:356-363.

Shaw, G.M., B.H. Hahn, S.K. Arya, J.E. Gropman, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1984. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in acquired immune deficiency syndrome. *Science* **226**:1165-1171.

Shaw, G.M., M.E. Harper, B.H. Hahn, L.G. Epstein, D.C. Gajdusek, R.W. Price, B.A. Navia, C.K. Petito, C.J. O'Hara, J.E. Gropman, E.S. Cho, J.M. Oleske, F. Wong-Staal, and R.C. Gallo. 1985. HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* **227**:177-182.

Shioda, T., J.A. Levy and C. Cheng-Mayer. 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* **349**:167-169.

Siegal, F.P., C. Lopez, G.S. Hammer, A.E. Brown, S.J. Kornfeld, J. Gold, J. Hassett, S.Z. Hirschman, C. Cunningham-Rundles, B.R. Adelsberg, D.M. Parham, M. Siegal, S. Cunningham-Rundles, and D. Armstrong. 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *New Engl J Med*. **305**:1439-1444.

Simmonds, P., P. Balfe, C.A. Ludlam, J.O. Bishop, and Leigh Brown. 1990. Discontinuous sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**:5840-5850.

Smith, F.L., and P. Palese. 1988. Influenza virus: high rates of mutation and evolution. In: RNA genetics. Variability of RNA genomes. ed. Domingo, E., Holland, J.J. and Ahlquist, P. Boca Raton, Florida 123-135.

Sobrinho, F., M. Dávila, J. Ortin, and E. Domingo. 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell cultures. *Virology* **128**:310-318.

Sobrinho, F., E.L. Palma, E. Beck, M. Dávila, J.C. de la Torre, P. Negro, N. Villanueva, J. Ortin, and E. Domingo. 1986. Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and mouth disease: heterogeneity and rate variations. *Gene* **50**:149-159.

Sodroski, J., R. Patarca, C. Rosen, F. Wong-Staal, and W. Haseltine. 1985. Location of trans activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**:74-77.

Sodroski, J., W. Goh, C. Rosen, K. Campbell, and W. Haseltine. 1986. Role of the HTLV III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **322**:470-474.

Sodroski, J., W.C. Goh, C. Rosen, A. Dayton, E. Terwilliger, and W. Haseltine. 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* **321**:412-417.

Sodroski, J., C. Rosen, and W. Haseltine. 1984. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science*

225:381-385.

Sokal, R.R., and F.J. Rohlf. 1969. *Biometry*. Freeman, San Francisco.

Starcich, B.R., B.H. Hahn, G.M. Shaw, P.D. Mcneely, S. Modrow, H. Wolf, E.S. Parks, W.P. Parks, S.F. Josephs, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.

Steinhauer, D.A., J.C. de la Torre, E. Meier, and J.J. Holland. 1989. Extreme heterogeneity in populations of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **63**:2072-2080.

Steinhauer, D.A., and J.J. Holland. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev: Microbiol* **41**:409-433.

Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M.A. Martin. 1987. The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-730.

Strebel, K., T. Klimkait, and M. Martin. 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-Kilodalton product. *Science* **241**:1220-1223.

Studier, F.W. 1972. Bacteriophage T7. Genetic and biochemical analysis of this simple phage gives information about basic genetic processes. *Science*. **176**:367-376.

Stulting, R.D., and G. Berke. 1973. Nature of lymphocyte-tumor interaction. a general method for cellular immunoabsortion. *J. Exp. Med.* **137**:932-942.

Sunström, C., and K. Nilsson. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J Cancer* **17**:565-577.

Szucs, G., J.L. Melnick, and F.B. Hollinger. 1988. A simple assay based on HIV preventing the reclustering of MT-4 cell. *Bulletin of the World Health Organization*. **66**:729-737.

Takeuchi, Y., M. Akutsu, K. Murayama, N. Shimizu, and H. Hoshino. 1991. Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene. *J. Virol.* **65**:1710-1718.

Tateno, M., F. Gonzalez-Scarano, and J.A. Levy. 1989. Human immunodeficiency virus infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *proc Natl Acad Sci USA* **86**:4287-4290.

Tateno, M., and J.A. Levy. 1988. MT-4 plaque formation can distinguish cytopathic subtypes of the human immunodeficiency virus (HIV). *Virology* **177**:790-794.

Temin, H.M. 1970. Malignant transformation of cells by viruses. *Perspec Biol Med.* **339**:254-255.

Temin, H.M. 1989. Is HIV unique or merely different?. *AIDS* **2**:1-9.

Temin, H.M., and S. Mizutani. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-1213.

Tersmette, M., R.E.Y. de Goede, B.J.M. Al, I.N. Winkel, R.A. Gruters, H.T. Cuypers, H.G. Huisman, and F. Miedema. 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients

with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* **62**:2026-2032.

Tersmette, M., R.A. Gruters, F. de Wolf, R.E.Y. de Goede, J.M. A. Lange, P.T.A. Schellekens, J. Goudsmit, J.G. Huisman, and F. Miedema. 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* **63**:2118-2125.

Tersmette, M., J.M.A. Lange, R.E.Y. de Goede, F. de Wolf, J.K. M. Eeftink Schattenkerk, P.T.A. Schellekens, R.A. Coutinho, J.G. Huisman, J. Goudsmit, and F. Miedema. 1989. Differences in risk for AIDS and AIDS mortality associated with biological properties of HIV variants. *Lancet* **i**:983-985.

Tersmette, M., and F. Miedema. 1990. Interactions between HIV and the host immuno system in the pathogenesis of AIDS. *AIDS* **4**:S57-S66.

Terwilliger, E.F., E.A. Cohen, Y. Lu, J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type I vpu. *Proc. Natl. Acad. USA* **86**:5163-5167.

Vaishnav, Y.N., and F. Wong-Staal. 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* **60**:577-630.

Valentin, A., J. Albert, E.M. Fenyö, and B. Asjö. 1990. HIV-1 infection of normal human macrophage cultures: implication for silent infection. *Virology* **177**:790-794.

Varmus, H. 1988. Retroviruses. *Science* **240**:1427-1435.

Vartanian, J.P., A. Meyerhans, B. Asjö, and S. Wain-Hobson. 1991. Selection, recombination and G-A hypermutation of immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* **65**:1779-1788.

Veronese, F., A.L. DeVico, T.D. Copeland, S. Oroszlan, R.C. Gallo, and M.G. Sarngadharan. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**: 1402-1405.

Wain-Hobson, S., P. Somigo, O. Danos, S. Cole, and M. Alizon. 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**:9-17.

Weiss, R.A., P.R. Clapham, B. Cheingsong-Popov, A.G. Dalgleish, C.A. Carne, I.V.D. Weller, R.S. Tedder. 1985. Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS risk patients. *Nature* **16**:69-72.

Willey, R.L., J.S. Bonifacino, B.J. Potts, M.A. Martin, and R.D. Klausner. 1988. Biosynthesis cleavage and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. USA* **85**:9580-9584.

Willey, R.L., R.A. Rutledge, S. Dias, T. Folks, T.S. Theodore, C.E. Buckler, and M.A. Martin. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc. Natl. Acad. USA* **83**:5038-5042.

Willey, R.L., D.H. Smith, L.A. Lasky, T.S. Theodore, P.L. Earl, B. Moss, D.J. Capon, and M.A. Martin. 1988. In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol* **62**:139-147.

Winter, E., F. Yamamoto, C. Almoguera, and M. Perucho. 1985. Detection of high incidence of K ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* **327**:298-303.

Wolfs., T. 1992. Genetic variation of the third variable envelope region in natural HIV-1 infection. Tesis doctoral. Amsterdam. 1992.

Wolfs, T.F.W., G. Zwart, M. Bakker, M. Valk, C.L. Kuiken, and J. Goudsmit. 1991. Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution. *Virology* **185**:195-205.

Wolinsky, S.M., C.M. Wike, B.T.M. Korber, C. Hutto, W.P. Parks, L.L. Rosenblum, K.J. Kunstman, M.R. Furtado, and J.L. Muñoz. 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* **255**:1134-1137.

Wong-Staal, F., K. Chardrasekhar, and J. Ghayeb. 1987. human immunodeficiency virus: the eighth gene. *AIDS Res Human Retrov* **3**:33-38.

Wong-Staal, F., G.M. Shaw, B.H. Hahn, S.Z. Salahuddin, M. Popovic, P. Markham, R. Redfield, and R.C. Gallo. 1985. Genomic diversity of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* **229**:759-762.

Yamamoto, N., M. Okada, Y. Koyanagi, M. Kannagi, and Y. Hinuma. 1982. Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science* **217**:373-379