

UCH-FC
MAG-B
5133

COMPARACION DEL PROGRESO DE LA INFECCION EN
MELLIZOS INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA
IMUNODEFICIENCIA HUMANA

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Aldo Andrés Gaggero Brillouet

Enero 1996



Director de Tesis: Romilio Espejo T.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

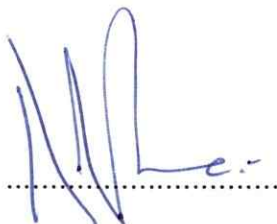
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por el candidato

ALDO ANDRES GAGGERO BRILLOUET

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología, en el Exámen de Defensa de Tesis rendido el Día de de 1995.

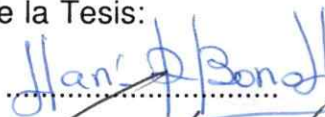
Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo T.



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. María Rosa Bono



Dr. Juan Kuznar



Dr. Eugenio Spencer



INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE FIGURAS	
Figura 1. Recuento del número de linfocitos CD4+ en los mellizos durante el período de seguimiento	28
Figura 2. Reactividad de los sueros de los mellizos frente a proteínas recombinantes y péptidos sintéticos analizados mediante la técnica de LiaTek (Organon Teknika)	29
Figura 3. Tiempo de aparición de antígeno viral producido en cocultivos de PBMC de los mellizos obtenidos a diferentes edades	31
Figura 4. Cantidad de antígeno producido en los cocultivos de diferentes aislados de los mellizos	32
Figura 5. (A) Secuencia de aminoácidos deducida de la región V3 de los clones de JeH y JoH. (B) Comparación de la secuencia de aminoácidos entre los clones de JeH y JoH. El guión corresponde al mismo aminoácido en la secuencia	37
Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la región V3 de los clones de JoH y JeH y el prototipo norteamericano MN. El guión corresponde al mismo aminoácido en la secuencia	38
Figura 7. Secuencia de nucleótidos de la región V3 de los clones de JoH y JeH. El guión corresponde al mismo nucleótido en la secuencia	39
Figura 8. Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región V3 de los clones de JeH y JoH con el prototipo norteamericano MN. El guión corresponde al mismo nucleótido en la secuencia	40
LISTA DE CUADROS	
Cuadro 1. Fenotipo de los aislados de HIV-1 de los mellizos	34
Cuadro 2. Variación de la carga viral en los mellizos	35
Cuadro 3. Promedio de las diferencias en sitios sinónimos y no-sinónimos en la secuencia de nucleótidos de la región V3 entre los aislados de los mellizos y el aislado MN	41

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	4
MATERIAL Y METODO	14
RESULTADOS	27
DISCUSION	42
BIBLIOGRAFIA	49

RESUMEN

En esta tesis se presentan los resultados del estudio del progreso de la infección en dos mellizos nacidos de una madre infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana. Para ello se determinaron distintas propiedades de la respuesta inmune y de los virus aislados de cada mellizo. Los resultados obtenidos indicaron diferencias importantes en la respuesta inmune sérica y en los virus presentes en cada mellizo.

Los niveles de anticuerpos contra diferentes proteínas virales y péptidos sintéticos de estas proteínas fueron distintos en ambos niños y variaron a través del tiempo, siendo los títulos generalmente mayores en uno de ellos. Se obtuvieron un total de 7 aislados virales de cada niño durante el período de seguimiento. El progreso de la infección se reflejó en el aumento de la infectividad *in vitro*, expresada por la rapidez de generación de antígeno viral en los cultivos, y en la presencia de virus infectivo en plasma. El progreso de acuerdo a estos parámetros fue más rápido en uno de ellos y se correlacionó con la disminución de células T CD4+ y la presentación de cuadros clínicos.

Los virus aislados de cada mellizo a los 4 años 9 meses se compararon por la secuencia nucleotídica de la región V3 de gp120. El análisis por homología de las secuencias mostró una relación entre los virus aislados de cada mellizo menor a la esperada. La homología observada entre virus de los mellizos no fue superior a la que presentaron con un aislado prototipo de Norteamérica, con el cual no hay una relación epidemiológica. Sin embargo el análisis comparando el grado de diferencias sinónimas, que no están sometidas a la presión selectiva del sistema inmune, indicó una relación filogenética más estrecha entre los virus de los mellizos. Esto sugiere que, de acuerdo

a lo esperado, ambos niños fueron infectados con una población similar pero estas han divergido debido a una fuerte presión selectiva hacia sustituciones no-sinónimas, ejercida probablemente por el sistema inmune de cada uno.

SUMMARY

This thesis deals with the progression of the infection in a pair of twins born to a mother infected with the Human Immunodeficiency Virus. Different properties of the immune response and virus in each twin were determined. The results obtained indicated important differences in the seric immune response and in the virus present in each twin. The antibody levels against viral proteins and synthetic peptides were different between twins and varied along the time. The level was consistently higher in one of them.

A total of 7 isolates were obtained from each child during the follow-up. The progression was noticed by an increased *in vitro* infectivity, indicated by a faster viral antigen generation in culture, and by the appearance of infective virus in plasma. Progression, as indicated by viral isolation, T CD4⁺ cell level and clinical symptoms was faster in one of the twins.

The isolated virus from each twin at the age of 4 years and 9 months, were compared by their nucleotide sequences of the V3 region of gp120 gene. Unexpectedly, the homology observed between the isolates from each twin was similar to the homology observed between each isolate with a North-american prototype virus. However, comparison of the synonymous differences, which are not subjected to immune response selective pressure, showed a close filogenetical relationship between isolates from the twins. This last observation suggests that, as expected, both children were infected by a similar viral population but this have diverged due to a strong selective pressure in to non-synonymous replacement probably carried out by the immune system.

INTRODUCCION

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA, es una enfermedad de aparición reciente causada por el virus de la inmunodeficiencia humana, HIV, y constituye el resultado final de la infección con este microorganismo. Este virus pertenece a la familia Retroviridae, subfamilia Lentivirus. Dicha clasificación está basada en la morfología del virión, el tipo de genoma y su organización, como también en sus características patogénicas. Los virus animales clasificados en esta subfamilia, como son el virus visna, el virus de la anemia infecciosa equina y el HIV entre otros, causan enfermedades que presentan un largo período de incubación, estableciendo infecciones persistentes que inducen enfermedades progresivas y degenerativas lentas (1).

La estructura del virión está conformada por una envoltura de naturaleza lipídica en la cual se encuentran insertas dos glicoproteínas virales, gp120 y gp41, la primera involucrada en los eventos de adsorción del virus a la célula y la segunda en el proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped. La cara interna de la envoltura viral está cubierta por la proteína de la matriz p17, que ayuda a mantener la integridad de la estructura del virión. La nucleocápside o nucleoide, está constituida por la proteína p24 y encierra al genoma compuesto por dos hebras de RNA de la misma polaridad, no complementarias, al cual se encuentran asociadas las enzimas requeridas para la transcripción en-reverso y la integración del genoma viral (complejo transcriptasa reversa, integrasa, proteasa y ribonucleasa H) y las proteínas de la nucleocápside, p6 y p9. El genoma de HIV-1 tiene un tamaño de 9.8 kb y al igual que otros retrovirus, contiene dos extremos repetidos o regiones LTR, flanqueando los tres genes

estructurales **gag**, **pol** y **env**, que codifican para las proteínas de la matriz y la nucleocápside, las enzimas virales y las glicoproteínas de la envoltura respectivamente. Otros seis marcos de lectura abierto están localizados en el genoma: los genes que codifican para las proteínas regulatorias Tat, Rev y Nef y también para las proteínas accesorias Vif, Vpr y Vpu. La regulación de la expresión viral involucra la interrelación de la mayoría de estas proteínas virales (2,3).

La glicoproteína de envoltura gp120, interactúa con la molécula CD4 que se encuentra en la membrana de diversas células del sistema inmune. Las células derivadas de la médula ósea, que expresan este marcador en su superficie, son el blanco principal del virus. La infección *in vivo* ha sido demostrada en linfocitos T ayudadores, monocitos-macrófagos, células dendríticas en los ganglios linfáticos y células de la microglia en el cerebro. Sin embargo, diversas células que no presentan esta molécula en la membrana como son células gastrointestinales, pulmonares y renales, son también susceptibles a la infección por el virus, lo que permite especular otro tipo de interacción para el ingreso de HIV-1 a la célula huésped.

La adsorción del virus es seguida por la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular; proceso en que está involucrada la glicoproteína gp41, permitiendo la penetración de la partícula viral al interior de la célula. Una vez que el virión ha ingresado a la célula se producen una serie de eventos que dan cuenta de la producción de DNA viral a partir del RNA genómico, mediante la actividad de la enzima transcriptasa reversa, el cual posteriormente se integra al genoma celular quedando como provirus (4).

Aunque HIV-1 *in vitro* puede infectar tanto células T CD4+ quiescentes o activadas, su habilidad para replicar es dependiente del estado de activación celular (5).

La infección por HIV-1 constituye una enfermedad crónica caracterizada por un deterioro progresivo del sistema inmune. El curso normal de esta infección involucra una infección primaria o aguda, seguido de un largo período de latencia clínica sin síntomas y finalmente de una fase sintomática caracterizada por signos constitucionales, alteraciones neurológicas, infecciones oportunistas y neoplasias (6).

Durante la infección primaria la respuesta inmune del individuo es capaz de controlar la infección y destruir la mayoría de las células infectadas, como también las partículas virales libres en circulación. Sin embargo, una proporción de células infectadas escapa a la respuesta inmune del huésped y se establece una infección crónica, fundamentalmente a nivel de ganglios linfáticos. Posterior a la infección primaria, diseminación viral, aparición de anticuerpos anti HIV-1 y una aparente cesación de la replicación viral, la mayoría de los individuos infectados entra en un período de latencia clínica o asintomático que en promedio dura 8 años. Sin embargo, durante este período se produce un deterioro gradual del sistema inmune, manifestado principalmente por una depleción progresiva del número de células T CD4+ periféricas (6,7,8). Es importante considerar que la medición de provirus en células sanguíneas periféricas no refleja la totalidad de la carga viral del individuo infectado. Esto debido a que los órganos linfoides constituyen el sitio de mayor replicación viral y son en consecuencia, un reservorio de virus dentro del individuo. Los mecanismos que llevan a la disminución de las células CD4+ no están completamente aclarados y aunque el virus por sí mismo tiene un rol directo e indirecto en el proceso citopatológico, otros mecanismos como apoptosis, fenómenos autoinmunes, de anergia y estimulación por superantígenos se han planteado para explicar este hecho (1,6).

El curso de la infección por HIV-1 presenta diferencias respecto al período de incubación o de latencia clínica, presencia de antígeno viral en plasma, recuento de linfocitos TCD4+, signos y síntomas del desarrollo de la enfermedad, etc. La variación entre los individuos en relación a su respuesta inmune como también, las diferencias en los virus podrían explicar esta situación. Al igual que los adultos, los niños con infección perinatal por HIV-1, exhiben diferencias en la presentación clínica; mientras algunos desarrollan SIDA dentro de los primeros meses de vida, otros permanecen asintomáticos o presentan síntomas esporádicos durante varios años (9).

Las tres principales vías de transmisión de la infección por HIV-1 son la sangre y hemoderivados, el contacto sexual y la transmisión vertical de madre a hijo. Actualmente el contacto sexual y particularmente heterosexual, es el medio más común de contagio de la infección por HIV. Esto se ha traducido en que la proporción de nuevos casos en mujeres haya aumentado de manera importante y consecuentemente, el riesgo de transmisión vertical (10,11,12). Esta puede ocurrir antes, durante o posterior al parto, sin embargo, ha sido difícil precisar la contribución de cada una de esas rutas en la transmisión vertical (13,14,15,16,17).

Hay observaciones clínicas que señalan que el 20-30% de los niños infectados por HIV-1 manifiestan síntomas de infección durante los primeros meses de vida, lo que es compatible con una infección intrauterina (15). Por otra parte, la detección de virus por aislamiento *in vitro* en células linfoides o mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR), desde muestras de sangre de cordón o al parto en niños nacidos de madres infectadas, proveen evidencias adicionales en relación a la transmisión intrauterina de este virus (15).

Factores tanto del virus como de la madre se han asociado con un incremento del riesgo de transmisión perinatal. Entre ellos están una disminución en el recuento de linfocitos CD4, un aumento en la carga viral, una pérdida de anticuerpos neutralizantes frente a los aislados de HIV, la presencia de síntomas clínicos durante el embarazo, modalidad de parto, lactancia materna, etc.

Se han realizado numerosos estudios para estimar el riesgo de transmisión de la madre infectada al niño. Los primeros señalaron cifras tan altas como 65%, sin embargo, consideraban a una población de mujeres clínicamente sintomáticas al momento del parto. Debido a que estos estudios no eran representativos de la población total de mujeres infectadas por HIV-1, muchas de las cuales son asintomáticas durante la gestación y el parto, sobreestimaron el riesgo de transmisión vertical. Trabajos posteriores, que consideraron una población de estudio más representativa, mostraron tasas menores, con un rango entre 14 y 45%, dependiendo del país en estudio (18,19). Estas diferencias geográficas observadas en las tasas de transmisión vertical pueden obedecer a diversos factores, como severidad de la infección en las madres, genotipo y fenotipo de las variantes virales circulantes en el área geográfica, incidencia de enfermedades de transmisión sexual, frecuencia de lactancia materna, etc. (19).

El diagnóstico precoz de la infección por HIV-1 en niños nacidos de madres infectadas es importante ya que permite establecer un manejo clínico adecuado. A diferencia de la infección en individuos adultos, en los cuales el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos específicos contra el virus, en niños recién nacidos la detección de estos anticuerpos no constituye certeza de infección, debido a la presencia de IgG materna (1,18;19). Esta situación dificulta la realización de un

diagnóstico precoz y certero, ya que estos anticuerpos pueden persistir en el niño durante varios meses, lo que hace necesario emplear otras técnicas diagnósticas para precisar la infección. Debido a que la inmunoglobulina A (IgA) no atraviesa la placenta, la detección de estos anticuerpos en el suero del recién nacido confirma la infección con el virus (20). Por otra parte se puede determinar la producción de anticuerpos específicos anti HIV-1 en cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica del niño, mediante el uso de mitógenos de linfocitos B (21). Sin embargo, tanto este método como la detección de IgA requieren de mayores estudios para su estandarización.

Otras técnicas diagnósticas más adecuadas para detectar la infección en el recién nacido son el aislamiento viral, la detección de antígeno p24 y también de RNA viral o provirus mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena, PCR (22,23,24,25). Estos diversos métodos diagnósticos permiten evidenciar cambios en diferentes marcadores, que se correlacionan con un progreso de la infección por HIV. HIV-1, al igual que otros Lentivirus, está sujeto a variabilidad genética durante su ciclo replicativo. Estas variantes se generan por los errores que ocurren durante la transcripción en reverso. Dicha variabilidad es probablemente un factor importante en la capacidad del virus de escapar a la respuesta inmune del individuo y persistir en él, infectando cada vez más células linfoides hasta provocar el SIDA. Otros factores como la duración de la infección, presión del sistema inmune del huésped, estado de la enfermedad y el uso de terapia antiviral pueden contribuir al grado y velocidad de la variación genética del virus.

Aislados virales obtenidos en lugares geográficos diferentes son más divergentes que aquellos obtenidos en una población de área geográfica definida. Por otra parte, pacientes infectados con virus proveniente de una fuente común, como es el caso de

hemofílicos infectados con hemoderivados contaminados con la misma variante de HIV-1, contienen virus que son más relacionados entre sí que respecto a virus de la población general. Además la variación dentro de un mismo paciente, observada por los cambios a través del tiempo, generan variantes relacionadas dentro de un mismo aislado inicial (26).

La variabilidad antigénica de HIV-1 se refleja en la respuesta de anticuerpos neutralizantes del paciente frente a sus propios virus. La respuesta de anticuerpos neutralizantes es importante ya que generalmente se considera como una respuesta inmune protectora. Aún cuando el virus que replica durante la infección primaria es aparentemente clonal o muy similar, debido a la baja fidelidad de la enzima transcriptasa reversa viral, una población de provirus genéticamente distintos se desarrolla gradualmente. Estas poblaciones virales relacionadas entre sí son llamadas cuasi-especies (26,27). Esto involucra que un mismo individuo puede contener una enorme variedad de provirus diferentes, que son un reservorio de variantes virales con distintas propiedades biológicas.

No todas las regiones del genoma viral varían a la misma velocidad a través del tiempo. Entre los genes estructurales del virus, el gen de la envoltura *env*, exhibe el mayor grado de diversidad genética a diferencia del gen *gag*, por ejemplo, que codifica para proteínas de la cápside y está sometido a mayores restricciones (28). El análisis de estas variaciones involucra la comparación de múltiples secuencias que abarcan una o más regiones del genoma viral.

La distribución de la diversidad en el gen *env* no es uniforme, como se evidencia por la presencia de dominios conservados y variables dispersos en la glicoproteína gp120

(29). El loop V3, que corresponde a una región de 32-35 aminoácidos que está entre 2 residuos de cisteína altamente conservados y forma parte de la tercera región variable (V3) de la glicoproteína gp120, ha sido identificado como el principal determinante de neutralización de HIV-1 (30). El análisis de la secuencia que codifica para este dominio, en diferentes aislados obtenidos durante el transcurso de la infección, permite observar los cambios producidos a través del tiempo. Dichas variaciones pueden también ser evidenciadas por cambios en las propiedades biológicas o fenotípicas de los virus *in vitro* como son la velocidad de replicación, tropismo celular, citopatogenicidad, capacidad de formar sincicios, etc. (31,32).

Aislados de HIV-1 muestran distintos comportamientos biológicos de acuerdo a la severidad de la infección en el individuo. Virus de pacientes asintomáticos replican lenta o ineficientemente en cultivos de PBMC. Intentos para propagar estos virus en líneas celulares CD4+ usualmente fallan o resultan en una replicación transiente. Estos aislados se denominan "slow-low". En cambio, virus de pacientes con severa inmunodeficiencia replican rápida y eficientemente en PBMC como en líneas celulares linfoides. Estos aislados se denominan "rapid-high". Dentro de un cultivo de PBMC, células infectadas con virus que replican lentamente contienen bajos niveles de RNA viral, mientras que células infectadas con virus que replican rápidamente contienen altos niveles. Entonces, la replicación de virus "slow-low" y "rapid-high" puede ser distinguida a nivel de la célula sugiriendo la presencia de restricciones sobre la replicación viral a nivel transcripcional. Estos dos grupos de virus pueden también distinguirse por el tipo de efecto citopatológico inducido en PBMC cultivados *in vitro*. Virus "rapid-high" inducen la aparición de sincicios en gran cantidad, en cambio cultivos infectados con virus "slow-low" muestran signos de

muerte celular y ausencia de efecto citopático evidenciado por la inducción de sincicios (33,34).

Intentos para mapear las propiedades biológicas de HIV-1 en el genoma viral, sugieren que las proteínas de envoltura juegan un rol importante tanto en la determinación de la capacidad replicativa como citopática del virus. En particular variaciones dentro de la región V3 de la proteína de envoltura gp120 determinan tropismo por distintas células como macrófagos o linfocitos T CD4 y en algunos casos, sustituciones de aminoácidos en esa región han sido relacionadas con la habilidad del virus para crecer en diversas líneas celulares (35).

Por otra parte, los aislados virales que replican rápidamente *in vitro*, contienen secuencias V3 con un mayor número de aminoácidos con carga positiva que aquellos que replican lentamente. Las diferencias en las cargas pueden ser atribuidas a la alta variabilidad de los aminoácidos ubicados a ambos lados del loop V3. Estas sustituciones pueden resultar en cambios en la estructura secundaria del loop V3 y se ha sugerido que esos cambios conformacionales podrían influenciar el fenotipo del aislado de HIV-1 (36).

La carga viral detectable en plasma y en linfocitos T circulantes mediante PCR, tiende a incrementarse con el progreso de la infección. Junto a este aumento de la carga, generalmente se observa una variación en el tropismo celular de los virus, cambiando de aislados monocitotrópicos y de lento crecimiento a aislados de rápida replicación y que crecen fácilmente en líneas linfoides *in vitro*. Estas últimas son variantes que a menudo inducen fusión celular, dando origen a sincicios o policariocitos. De manera similar, estos aislados virales han sido detectados en algunos individuos durante la infección aguda previo a la seroconversión. Por lo tanto, el fenotipo del aislado viral de

un paciente puede correlacionarse con la severidad de la infección en ese individuo y constituye un marcador del progreso de ésta (37).

Como se mencionó anteriormente, durante la infección aguda con HIV-1, previo a la seroconversión, la población viral es relativamente homogénea a nivel de la secuencia de V3 en cada individuo (38). Estudios realizados en infecciones por HIV-1 en parejas sexuales o en binomios madre-hijo sugieren una transmisión selectiva de variantes con secuencias únicas. Se ha observado que madres que contienen virus circulantes con el fenotipo "rapid-high" durante la gestación tienen un mayor riesgo de infectar a sus hijos que aquellas que presentan virus "slow-low", lo que sugiere que el fenotipo del aislado prevalente puede influenciar su transmisión vertical (39). Sin embargo, niños nacidos de madres con aislados "rapid-high" pueden contener variantes "slow-low" como también "rapid-high".

Otros estudios de transmisión entre madre-hijo señalan que las secuencias de aminoácidos de la región V3 de los virus de las madres mostraron un importante grado de heterogeneidad, en cambio las secuencias de los niños, a los 4 meses de edad, fueron homogéneas (40,41). Esto concuerda con otros hallazgos previos y sugiere que un único genotipo es transmitido o bien que se produce una selección del crecimiento de ciertos genotipos durante la infección primaria (42).

En esta tesis se determinó la variación tanto en la respuesta inmune como en el virus, durante el progreso de la infección en dos mellizos infectados, hijos de madre seropositiva. La determinación de estos parámetros permitió además contar con elementos importantes para la decisión de instaurar un manejo clínico adecuado.

MATERIAL Y METODO

1. Niveles de anticuerpos frente a diferentes proteínas virales

1.1. Técnica de LiaTek

Para determinar la reactividad de los sueros de estos niños frente a diferentes proteínas virales y péptidos, se usó el *kit* comercial LiaTek HIV 1+2 (Organon Teknika, Turnhout, Holanda) según las instrucciones del fabricante. Esta técnica inmunoenzimática contiene tiras de nitrocelulosa con proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de HIV-1 (p24, p17, gp41 y p31) y un péptido sintético de HIV-2 (gp36). Además de los antígenos de HIV, las tiras contienen tres líneas de control de inmunoglobulina G (IgG) humana y una línea control de IgG anti-humana.

La tira de nitrocelulosa se incubó en 1 ml de una dilución 1:100 de la muestra de suero o plasma, por 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces, se incubó en 1 ml de la solución con el conjugado (IgG anti-humana marcada con fosfatasa alcalina diluída 1:100) durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. Posterior al lavado, se agregó 1 ml de la solución con el sustrato (bromo-cloro-indol-fosfato en dimetilformamida diluído 1:100) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación. Luego de eliminar la solución con el sustrato, se adicionó 1 ml de la solución de detención (ácido sulfúrico 0.1 M) y se incubó por 30 minutos, dejando secar posteriormente las tiras.

2. Aislamiento viral mediante cocultivo de células mononucleares de sangre perisférica (PBMC).

2.1. Separación de los PBMC desde las muestras de sangre

En la separación de los PBMC se usaron protocolos descritos (43). A partir de 2 bolsas de sangre, provenientes de donantes seronegativos, se procedió a separar las células sanguíneas empleando para ello una gradiente de densidad (Histopaque 1077, Sigma Chemical Company). Para esto se colocó en un tubo cónico de 50 ml (Nunc), 10 ml de Histopaque y se agregó lentamente 20 ml de sangre. Luego de centrifugar a 300xg por 30 minutos, se colectó la fracción enriquecida en PBMC y se lavó dos veces con medio RPMI (Sigma Chemical Company) adicionado de 10% de suero bovino fetal (SBF; GIBCO BRL), 100 UI de penicilina/ml y 100 µg de estreptomicina/ml (medio de crecimiento). Las células fueron sembradas a una concentración de 1×10^6 /ml en medio de crecimiento adicionado de 2 µg de polibreno/ml (Sigma Chemical Company) y 2.5 µg de fitohemaglutinina/ml (PHA, Difco) y se incubaron a 37°C por 3 días para permitir la activación celular. Posteriormente los PBMC se lavaron dos veces con medio RPMI sin suero y las células de ambos donantes se mezclaron y se resuspendieron en medio de crecimiento adicionado de 2 µg de polibreno/ml y 20 U de interleukina 2/ml (IL-2, Boehringer Mannheim).

2.2. Cocultivo de los PBMC

Para realizar el cocultivo se mezclaron 5×10^6 PBMC activados de donantes sanos con 5×10^6 PBMC del paciente infectado. La separación de los PBMC a partir de muestras de sangre del paciente infectado se realizó de la misma manera a la descrita en el punto

2.1., con la diferencia de que estas células no fueron activadas *in vitro* con PHA, sino que fueron cocultivadas directamente luego de la separación. Las células fueron mantenidas en frascos de cultivo de 25 cm² con 10 ml de medio de crecimiento, adicionado de polibreno e IL-2, e incubado a 37°C por 30 días. Dos veces a la semana, se cambió el medio de cultivo, guardando el sobrenadante a 4°C hasta la detección de antígeno viral. Los cocultivos fueron observados diariamente al microscópio para detectar la presencia de efecto citopático (ECP) característico.

2.3. Infección de PBMC con sobrenadante de cultivos positivos o con plasma

Para la infección se incubaron 5×10^6 PBMC con 0.5 ml de sobrenadante o plasma durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar las células dos veces en medio de cultivo, se resuspendieron en 10 ml de medio de crecimiento adicionado de polibreno e IL-2 en las concentraciones antes señaladas y se sembraron en frascos de cultivo plásticos de 25 cm². El medio se cambió dos veces por semana y se guardó a 4°C hasta la detección de antígeno viral. Al igual que en el punto 2.2., los cultivos fueron mantenidos por 30 días, siendo observados al microscópio diariamente para detectar la presencia de ECP.

2.4. Detección de antígeno viral en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante una técnica inmunoenzimática

Para la detección de antígeno viral se empleó la técnica inmunoenzimática (Vironostika HIV Antigen, Microelisa system, Organon Teknika) que se usó según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 50 µl de una solución de NP-40 en cada pocillo y luego 200 µl del sobrenadante a testear. En cada ensayo se incluyó un

control negativo, que correspondió al medio de cultivo utilizado para crecer las células y un control positivo que viene en el *kit* comercial empleado. Luego de incubar la microplaca a 37°C por 1 hora, se lavaron los pocillos cuatro veces con la solución de lavado y luego se agregó 200 µl del conjugado (anticuerpo anti HIV-1 marcado con peroxidasa). Posterior a una incubación de 1 hora a 37°C, se lavó cuatro veces y se agregó 200 µl de la solución que contenía el sustrato cromógeno (tetrametilbencidina). Después de incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 2N y se determinó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. En base a lo señalado por el fabricante, se calculó el "cut-off" lo que permitió determinar los sobrenadantes positivos y negativos.

3. Determinación del comportamiento biológico de los aislados virales

Para determinar el fenotipo de los aislados obtenidos, se infectaron 5×10^6 PBMC activados con 1 ml de sobrenadante de los diferentes aislados virales. Luego de detectar la producción de antígeno viral, se realizó cocultivo con las líneas celulares linfoides CEM, Jurkat-tat y MT-2. Para esto se mezclaron 1×10^6 de los PBMC infectados con 3×10^6 células de cada línea celular y los cultivos fueron mantenidos durante 30 días con cambio de medio de crecimiento sin IL-2 dos veces por semana. La determinación de la infección fue realizada por la observación microscópica para detectar la presencia de ECP y la determinación de la producción de antígeno en los sobrenadantes de los cultivos infectados mediante la técnica de inmunoenzimática descrita en el punto 2.4. Los aislados virales capaces de crecer en PBMC y en la línea Jurkat-tat son clasificados como "slow/low", mientras que los aislados que replican en al menos otra línea celular

adicional, como CEM o MT-2, se clasifican como "rapid/high" (33,34).

4. Amplificación del DNA mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR)

4.1. Extracción del DNA desde células mononucleares periféricas (PBMC)

Para la extracción del DNA desde las células infectadas se empleó el protocolo descrito (44). Se resuspendieron alrededor de 5×10^6 PBMC en 200 μ l de medio RPMI sin suero y se incubaron con 400 μ l de solución de lisis (0.02 M Tris pH 7.8, 0.15 M NaCl, 0.025 M EDTA y 1% SDS) y 40 μ l de proteinasa K (5 mg/ml) durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se agregó 750 μ l de fenol saturado con 1 M Tris pH 7.5, se agitó y se centrifugó a 300xg por 5 minutos; la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 750 μ l de cloroformo, agitándose y centrifugándose nuevamente a 300xg por 5 minutos. A la fase acuosa resultante se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.5 y se mantuvo a -20°C durante la noche. Al día siguiente se centrifugó a 3.000xg por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se secó el precipitado al vacío y se resuspendió en 125 μ l de TE (0.01 M Tris, 0.01 M EDTA, pH 7.5). Posteriormente se cuantificó la cantidad de DNA midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro.

4.2. Reacción de amplificación del DNA

La reacción se realizó en un volumen total de 26 μ l de mezcla que contenía aproximadamente 0.25 μ g de DNA, 10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl, 0.02% gelatina, 0.225 mM de cada nucleótido (ATP,CTP,GTP y TTP), 0.1 μ M de cada partidor y 0.3 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus).

Previo a la amplificación, las muestras se hirvieron durante 5 minutos en un baño

de agua, se enfriaron en hielo por 2 minutos y se centrifugaron a 2.000 rpm por 20 segundos. En cada tubo eppendorf de 0.5 ml, que contenía 13 μ l de la mezcla de reactivos, se agregó 13 μ l de la muestra d1xDNA a amplificar y 75 μ l de aceite mineral. La reacción de amplificación fue realizada en un termociclador Ericomp (San Diego, California) empleando un programa de 38 ciclos. Cada ciclo constaba de lo siguiente: 15 segundos de denaturación a 94°C, 30 segundos a 58°C para el apareamiento y 30 segundos a 72°C para la elongación, salvo en el último ciclo donde la elongación demora 10 minutos.

Para la amplificación de la secuencia del gen pol, se emplearon los partidores ADP813-814 (MRC AIDS Reagent Project, Herts, UK) que corresponden a los partidores P3-P4 descritos por Laure *et al.* (45). De acuerdo a estos partidores el producto amplificado tiene un tamaño esperado de 308 pares de bases.

Para la amplificación de la región V3 del gen env se usaron los partidores 3'-KSI y 5'-KSI descritos por Goudsmit *et al.* (45). De acuerdo a los partidores usados, el producto amplificado tiene un tamaño esperado de 319 pares de bases. Los fragmentos usados en los ensayos de clonamiento fueron amplificados con partidores de la región V3 del gen env, en cambio, para determinar la carga viral se emplearon los partidores del gen pol.

La visualización del producto amplificado de tamaño específico se realizó mediante electroforésis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata (47), comparando la migración con un estándar de pesos moleculares adecuados.

Para el clonamiento se realizó reamplificación del producto amplificado inicialmente, en un volumen total de 100 μ l de mezcla de reacción, de manera de

contar con una cantidad de DNA adecuado para los ensayos. El producto amplificado fue purificado, previo al clonamiento, en geles de agarosa al 2% en TBE (0.089 M Tris, 0.089 M ácido bórico y 0.002 M EDTA) adicionado de bromuro de etidio para visualizar su migración. Para extraer el DNA del gel, se cortó un trozo de agarosa frente al carril de migración el cual se llenó de TBE y se esperó que la banda cayera al pocillo para sacar la solución amortiguadora junto con el DNA. Posterior a la extracción con fenol y cloroformo y la precipitación con etanol, el precipitado se resuspendió en agua destilada estéril y se realizó una nueva electroforesis en un gel de poliacrilamida para cuantificar la cantidad de DNA recuperada.

4.3. Determinación de la carga viral

Para esto previamente se extrajo el DNA de los PBMC como se señaló anteriormente y se cuantificó la concentración en un espectrofotómetro. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas del DNA (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, etc.) y se realizó la amplificación empleando los partidores del gen *pol* descritos anteriormente. Posteriormente, basado en el número de células usadas y las diluciones realizadas, se calculó el número de provirus por célula.

5. Clonamiento de los productos amplificados por PCR

Los fragmentos amplificados fueron clonados usando el fago M13 como vector, empleando para ello el *kit* comercial M13 Cloning (Bethesda Research Laboratories). Este método permite evidenciar la presencia de transformantes por la simple observación de colonias claras respecto de aquellas que no contienen el inserto, que producen

colonias azules. La producción de colonias azules se debe a la actividad β -galactosidasa, que en presencia de IPTG (Isopropiltio- β -D-galactósido) y Bluo-gal da origen a placas de ese color, en cambio, la inserción del fragmento amplificado en el sitio de múltiple clonamiento del DNA del fago (región entre los sitios Eco R1 y Hind III, 6.286 y 6.235 pb respectivamente), anula la actividad de la enzima y en consecuencia la producción de placas azules, dando origen a placas claras.

5.1. Digestión del DNA del vector con endonucleasas de restricción

El DNA RF de M13mp18 fue digerido incubando 2 μ g del DNA con 10 U de la enzima EcoR1 y 20 U de HindIII en tampón de reacción 3 provisto por el *kit* (en este tampón HindIII presenta un 50% de actividad en relación al tampón recomendado por el fabricante, por lo que se usó el doble de concentración de la enzima) y agua destilada estéril en un volumen total de 20 μ l, durante 1 hora a 37°C. La digestión se verificó comparando la migración con el DNA RF del vector no cortado en un gel de 1% agarosa en TBE. Si la digestión era completa, se agregó 3 μ l de 0.25 M EDTA y 27 μ l de agua destilada estéril para detener la reacción y se realizó la extracción y precipitación con etanol como se mencionó anteriormente.

5.2. Ligamiento de los fragmentos amplificados

En la reacción de ligamiento se usaron 10 ng de DNA del vector linealizado (2 fmoles de DNA), aproximadamente 0.8 ng del fragmento (4 fmoles de DNA), 1 U de la enzima (DNA ligasa del fago T4), tampón de reacción de la ligasa y se llevó a un volumen final de 5 μ l con agua destilada estéril. Luego de incubar a 15°C por 12 horas,

la reacción se detuvo agregando 2 μl de 0.25 M de EDTA y 18 μl de agua destilada.

5.3. Preparación de las células competentes

No se usaron las bacterias que vienen en el *kit* comercial (E. coli JM 101 y 107) sino que la cepa E. coli JM 105; esto debido a que la eficiencia de obtención de transformantes fue mucho mayor con esta cepa que con las que vienen en el *kit* comercial.

Para esto se inoculó 1 ml de medio YT (8 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl pH 7.5) con una colonia de la bacteria y se incubó a 37°C con agitación, durante la noche. Se realizó una dilución 1:100 en medio YT y se creció con agitación a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0.4-0.5 a 550 nm. Posteriormente las bacterias se centrifugaron a 2.500 xg durante 15 minutos a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron, en la mitad del volumen original, en 50 mM CaCl_2 y se incubaron en hielo por 30 minutos. Después de centrifugar a 2.500 xg durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas, en 1/10 del volumen original, en una solución 50 mM de CaCl_2 .

5.4. Transformación de las células competentes

Se tomaron 300 μl de las células competentes, se agregó 25 μl de la mezcla de ligamiento y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron a 42 °C durante 2 minutos y se mezclaron con 200 μl de una suspensión de bacterias en crecimiento logarítmico (durante 3 horas a 37 °C). Esta mezcla se adicionó a 3 ml de agar blando YT mantenido líquido a 42 °C que contenía 10 μl de 100mM IPTG y 50 μl

2% Bluo-gal y fue vertido sobre una placa de petri antes de que solidificara. Luego se incubó a 37 °C durante la noche y al día siguiente se observaron para ver la aparición de los recombinantes.

6. Secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR

6.1. Preparación del DNA RF

Para esto se creció una colonia de *E. coli* JM105 en 1 ml de medio YT durante la noche, con agitación a 37°C. Al día siguiente, se diluyó a 1:50 en medio YT y se creció en agitación a 37°C hasta alcanzar una absorbancia entre 0.4-0.5 a 550 nm. Se tomaron 5 ml de esta suspensión y se inoculó con una placa clara, creciéndose a saturación. Posteriormente se centrifugó a 10.000xg por 3 minutos y el precipitado se resuspendió en 100 µl de solución GTE (glucosa 50 mM, Tris-Cl 26 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM), incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 200 µl de una solución NaOH/SDS (NaOH 0.2 M y SDS 1%) y se incubó por 5 minutos en hielo. Después se agregó 150 µl de una solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8 y se dejó en hielo por otros 5 minutos. Luego de centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos, se transfirió 0.4 ml del sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó 0.8 ml de etanol 95% y se dejó toda la noche a -20°C.

Al día siguiente se centrifugó a 10.000xg rpm por 10 minutos y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se secó al vacío. El precipitado se resuspendió en 30 µl de tampón TE y se usaron 3 µl para visualizar la migración del DNA en un gel de agarosa al 1% en TBE.

6.2. Preparación del DNA de simple hebra

Con el sobrenadante de los clones que resultaron positivos, se infectaron bacterias y fueron crecidas en 20 ml de medio YT durante 8 horas en agitación a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 10.000xg por 10 minutos y por cada 1.2 ml de sobrenadante se agregó 300 μ l de una solución de PEG 20% / NaCl 2.5 M y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Luego de centrifugar por 10 minutos a 10.000xg, se resuspendió el precipitado en 100 μ l de TES (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 10 mM y Na₂EDTA 0.1 mM) y se realizó la extracción y precipitación del DNA como se mencionó anteriormente. El precipitado se resuspendió en 15 μ l de TE y se cargaron 3 μ l en un gel de agarosa al 1% para observar la migración y cuantificar el DNA obtenido.

6.3. Secuenciación de los clones obtenidos

Para la secuenciación de los clones se usó el *kit* comercial Sequenase, Versión 2.0, DNA Sequencing Kit (United States Biochemical), según las instrucciones del fabricante.

6.3.1. Alineamiento del DNA templado y el partidador

Para esto se mezclaron 5 μ l de una suspensión del DNA de hebra simple (1 μ g), 1 μ l del partidador (0.5 pmol), 2 μ l de la solución de reacción 5X y 2 μ l de agua destilada estéril. Luego de incubar a 65 oC durante 2 minutos, se dejó enfriar lentamente hasta 30-35 °C. Posteriormente se dejó en hielo hasta la próxima etapa.

6.3.2. Marcación del DNA

A la mezcla anterior se agregó 1 μl de DTT 0.1 M, 2 μl de una solución de marcación previamente diluída 5 veces, 0.5 μl de [α - ^{35}S]dATP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (actividad específica 1000 Ci/mmol) y 2 μl de la enzima diluída (DNA polimerasa del fago T7) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

6.3.3. Reacción de terminación

La reacción se detuvo agregando a cada tubo con 2.5 μl de mezcla de terminación que contenía los didesoxinucleótidos (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP), 3.5 μl de la mezcla marcada y se incubó a 37 °C por 5 minutos. Posteriormente se adicionó 4 μl de la solución de detención, se calentó a 75 °C por 2 minutos y se cargó 3 μl en cada pocillo del gel de secuenciación.

6.3.4. Electroforesis en gel de acrilamida

Una vez realizada la electroforesis en un gel de acrilamida al 8% (relación acrilamida:bis-acrilamida 19:1) y en condiciones denaturantes (urea al 8%), el gel se fijó en una solución de ácido acético 10%/metanol 10% durante 10 minutos. Posteriormente fue puesto sobre un papel filtro Whatman #3 y secado durante 1 hora a 80 °C. Luego que el gel se expusiera por 48-72 horas a una placa radiográfica sensible, se reveló y la secuencia fue leída observando la migración de las diferentes bandas (A, C, T, G).

Las secuencias de nucleótidos, como la de aminoácidos deducida, de los diferentes clones de JeH y JoH, fueron comparadas entre ellas, como con la secuencia del prototipo norteamericano MN (47) usando el programa computacional SEQUAID.

Para cada caso fueron calculadas las frecuencias de sustituciones sinónimas (K_s), aquellas que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos, y no sinónimas (K_a), aquellas que producen cambios en la secuencia de aminoácidos.

RESULTADOS

En esta tesis se describe el progreso de la infección en dos mellizos nacidos de una madre infectada. Para ello se estudiaron distintos parámetros de la respuesta inmune de los niños, como también de las características de los virus aislados de cada uno.

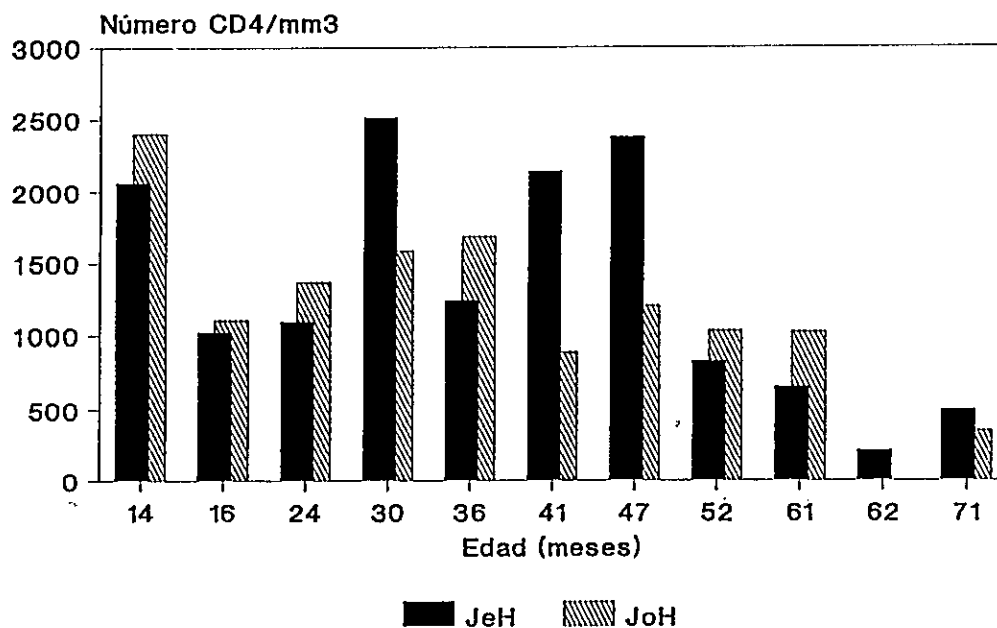
Estos mellizos, JeH (niña) y JoH (niño) nacieron el 25 de Junio de 1988. Tanto la madre como el padre, fueron diagnosticados HIV seropositivos en Febrero 1989, falleciendo la madre en Abril de ese año. Los mellizos a su vez, fueron confirmados infectados en Noviembre de 1989 mediante la técnica de PCR. Según los antecedentes clínicos y epidemiológicos, no existen otros factores de riesgo asociado que sugieran una vía de transmisión diferente a la perinatal y a su vez, lo más probable es que ambos niños fueron infectados por la misma población viral inicial.

1. Estudio de la respuesta inmune de los mellizos

1.1. Recuento del número de linfocitos T CD4 a través del tiempo

Un parámetro considerado como un marcador importante del progreso de la infección en un individuo infectado, es la concentración de células T CD4+ y su variación en el tiempo, como también la razón de células CD4+/CD8+ (1,6,49,50). En la Figura 1, se muestra el recuento de linfocitos CD4+ en ambos niños durante el período de seguimiento. Como puede observarse hubo una fluctuación importante, sin embargo, a partir de los 52 meses de edad se observó una disminución permanente en JeH, disminución que aparentemente comenzó a manifestarse en JoH a los 71 meses de edad. Esta caída en el recuento de linfocitos T CD4+ en JeH, junto con la

evaluación de su estado clínico, implicó el inicio de tratamiento alternado con las drogas antivirales, AZT y ddl, a los 62 meses de edad. El alza en el último recuento de células CD4+ en JeH (493 versus 207/mm³) podría ser atribuido a dicho tratamiento.



• recuento de JoH a los 62 meses no se realizó

Figura 1. Recuento del número de linfocitos CD4+ en los mellizos durante el período de seguimiento.

Es de interés considerar que existen variaciones importantes, de entre un 20 a 30% en el número total de células linfoides, que se asignan como normales en los recuentos obtenidos en un mismo individuo durante el transcurso de horas o días, situación que debe considerarse cuando se comparan estos valores (51).

1.2. Reacción frente a diferentes proteínas virales

La determinación de los niveles de anticuerpos anti HIV permitió comparar las reactividades en ambos niños y determinar la evolución de la respuesta inmune a través del tiempo, correlacionando estos parámetros con un progreso de la infección. Debido a que suponemos que ambos niños fueron infectados por la misma población viral, probablemente a tiempos muy cercanos o al mismo tiempo, es plausible postular que las diferencias que se encuentren en la respuesta inmune de los mellizos se deberán fundamentalmente a la distinta respuesta de cada uno.

Mediante la técnica de LiaTek se estudió la reactividad de los sueros de ambos mellizos frente a proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de HIV-1 (p24, p17, gp41 y p31) y HIV-2 (gp36), que están fijados a una tira de nitrocelulosa en este sistema.

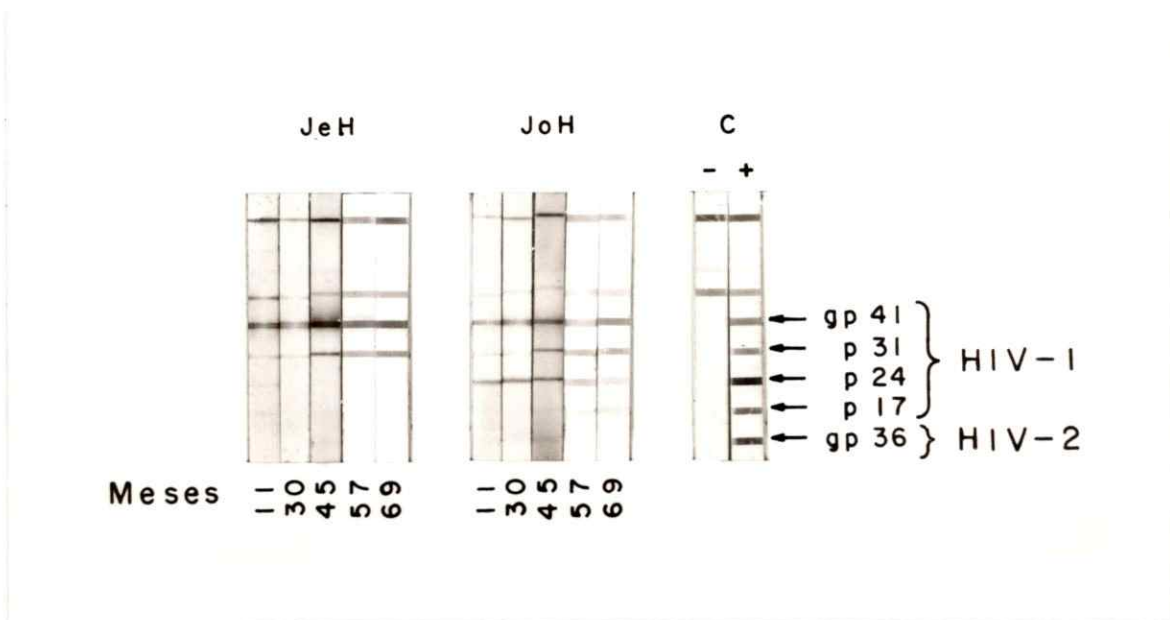


Figura 2. Reactividad de los sueros de los mellizos frente a proteínas recombinantes y péptidos sintéticos analizados mediante la técnica de LiaTek (Organon Teknika).

En la Figura 2, se muestran los resultados obtenidos con los diferentes sueros analizados. La reactividad contra las proteínas gp41 y p31 fue similar en ambos niños a través del tiempo (11, 30, 45, 57 y 69 meses de edad) y en ambos se observó un aumento de los anticuerpos contra la proteína p31. Sin embargo, la respuesta contra p24 fue diferente; mientras JoH presentó una clara reactividad que se mantuvo a través del tiempo, JeH tuvo una baja respuesta frente a esta proteína y desapareció posterior a los 11 meses de edad.

2. Obtención y caracterización biológica de los aislados de los mellizos

2.1. Aislamiento viral

2.1.1. Cocultivo

De un total de 8 muestras de sangre de cada mellizo, obtenidas cada 6 meses durante el período de seguimiento, se logró aislar HIV en 7 muestras de cada uno. En general la aparición de antígeno viral detectable en los cultivos fue más temprana a medida que aumentó la edad de los mellizos. En la Figura 3 se muestra el tiempo de aparición de antígeno viral en los cocultivos realizados a los 33, 37 y 63 meses de edad de los niños. La aparición de antígeno en los cocultivos se observó más tempranamente en JeH. Una situación similar se detectó al comparar los tiempos de cocultivo necesarios para obtener una máxima producción de antígeno. En la Figura 4 se muestra la cantidad de antígeno producido en los cocultivos de diferentes aislados de los niños. La producción de antígeno en los cocultivos fue mayor y más temprana en JeH. También se observó que la cantidad de antígeno producido aumentó con la edad de los mellizos.

Todos los aislados obtenidos pudieron ser propagados posteriormente en PBMC

a excepción del primer aislado de JoH. La aparición más temprana de antígeno en los cocultivos de JeH indicó la presencia de células infectadas en mayor cantidad o actividad en este mellizo.

2.1.2. Aislamiento de virus de plasma

La detección de antígeno de HIV-1 en el plasma de un individuo infectado es considerada una indicación indirecta de mayor replicación viral, pero no está relacionado directamente con la presencia de partículas virales infectivas en el plasma. En cambio, la detección de virus en plasma mediante cultivo en células señala una activa replicación viral y se correlaciona con un progreso de la infección (52;53). Por otra parte, los aislados obtenidos de esta manera, reflejan los virus que están en circulación escapando a la respuesta inmune del individuo.

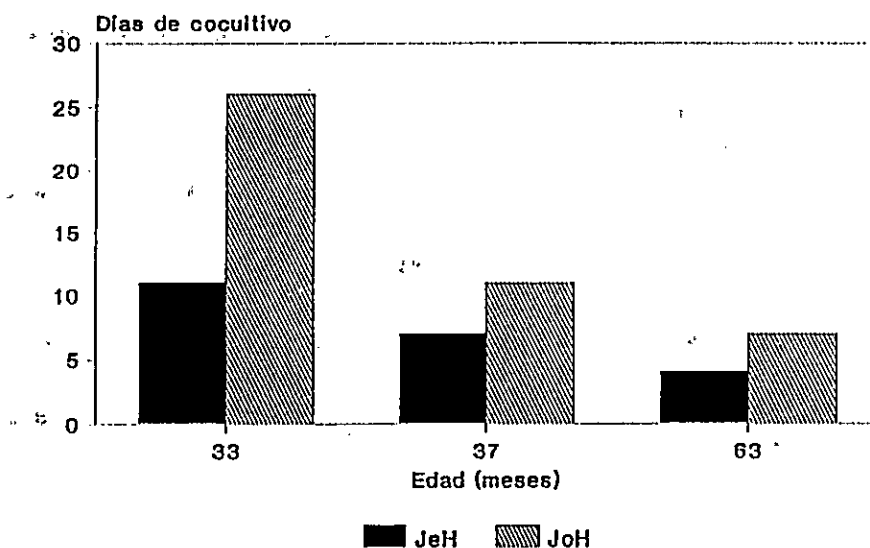


Figura 3. Tiempo de aparición de antígeno viral producido en cocultivos de PBMC de los mellizos obtenidos a diferentes edades.

Sólo fue posible aislar virus de plasma a partir de los 4 años de edad en JeH. La presencia de virus en plasma capaces de replicar en cultivo se mantuvo en las muestras posteriores, excepto en la última obtenida después de iniciado el tratamiento con antivirales.

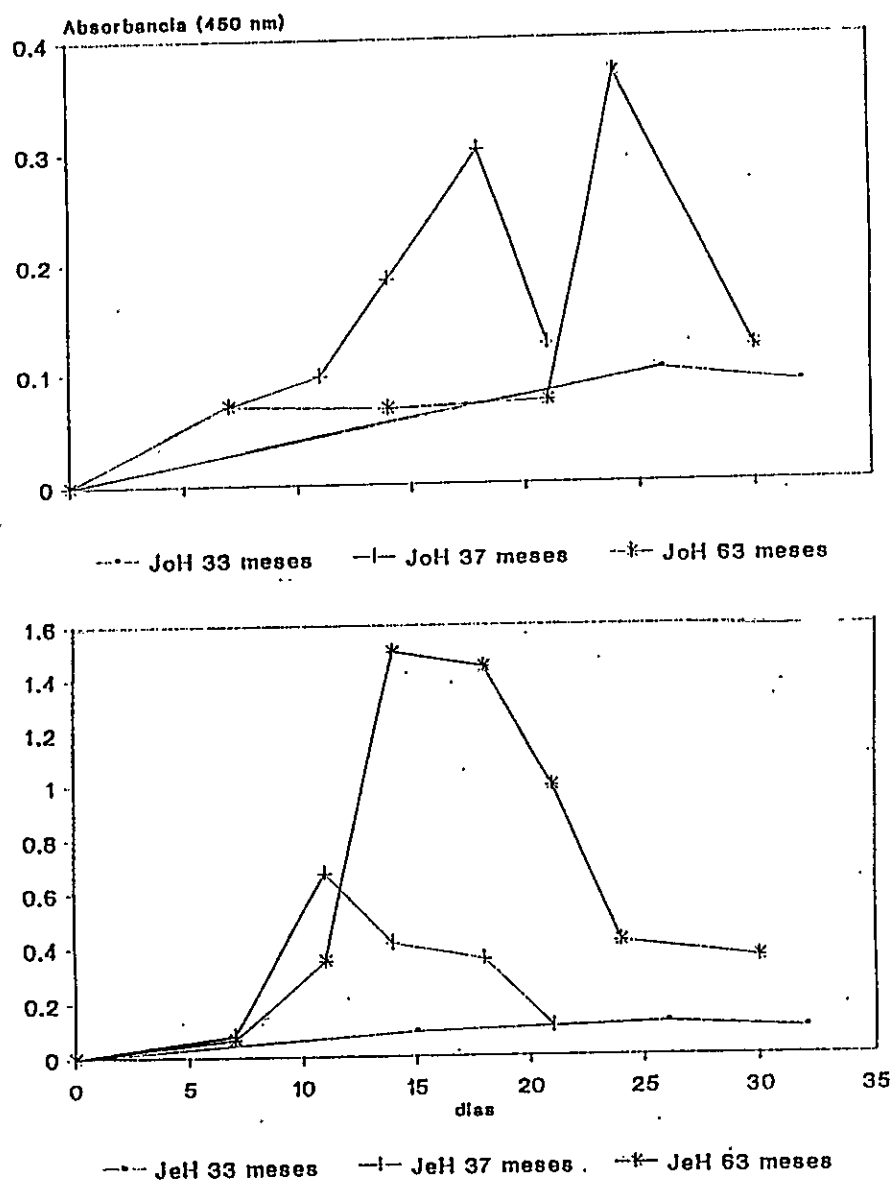


Figura 4. Cantidad de antígeno viral producido en los cocultivos de diferentes aislados de los mellizos.

En JoH en cambio, sólo se aisló virus de plasma a la edad de 4 años 6 meses y no fue posible obtenerlo en muestras posteriores. Esto podría explicarse por una susceptibilidad de los PBMC utilizados en cada intento de aislamiento. Sin embargo, el aislamiento de HIV en JeH en las muestras cultivadas paralelamente después de los 4 años 6 meses sugiere que la ausencia de virus cultivable en el plasma de JoH, reflejó más bien una presencia transitoria de virus en el plasma de este mellizo.

2.2. Caracterización fenotípica de los aislados

Los aislados de HIV-1 pueden distinguirse por su capacidad de crecer en distintos tipos celulares y en su capacidad de formar sincicios. De acuerdo a estas características pueden agruparse en dos fenotipos: "slow/low", aquellos de crecimiento lento en PBMC, no formadores de sincicios e incapaces de crecer en líneas celulares linfoides, excepto en Jurkat-tat que tiene un gen activador de HIV-1 (53), y "rapid/high", a los de crecimiento rápido en PBMC, formadores de sincicios y capaces de crecer en líneas celulares linfoides. La detección inicial de aislados "slow/low" y la posterior aparición de variantes "rapid/high" en un individuo, se ha correlacionado con un progreso de la infección (33,34,55).

Como se observa en el Cuadro 1, los resultados señalan que los aislados de ambos niños, obtenidos durante el transcurso del seguimiento, se comportaron como aislados "slow-low". Esto debido a que crecieron en PBMC y la línea celular Jurkat-tat, pero no crecieron en las líneas celulares CEM y MT-2 y no formaron sincicios (34). Lo anterior concuerda con el estado clínico de ambos niños.

Cuadro 1. Fenotipo de los aislados de HIV-1 de los mellizos

FECHA AISLAMIENTO (edad en meses)	COCULTIVO		PROPAGACION VIRAL EN:			
	producción antígeno	formación sincicios	PBMC	Jurkat-tat	CEM	MT-2
32	+	-	+ ¹	+ ¹	n.r.	- ¹
36	+	-	+	+	-	-
45	+	-	+	+	-	-
50	+	-	+	+	-	-
57	+	-	+	+	-	-
63	+	-	+	+	-	-
69	+	-	n.r. ²	n.r.	n.r.	n.r.

¹ sólo pudo propagarse el aislado de JeH de esa fecha

² n.r.= no realizado

* la propagación viral fue determinada por la detección de antígeno en el sobrenadante de los cultivos, como se describe en Materiales y Método.

3. Carga viral

La determinación de la carga viral, es decir la cantidad de provirus por célula, permite detectar la expresión del virus en un individuo infectado, predecir el progreso de la infección en éste y determinar la eficacia de tratamientos antivirales (56,57).

Para medir la carga viral se determinó la menor concentración de DNA obtenido desde PBMC que contenían provirus amplificable por PCR. Como se muestra en el Cuadro 2, la medición de la carga realizada cuando los niños tenían alrededor de 2 años de edad, mostró que en ambos había aproximadamente 1 provirus por 2500 células.

Cuadro 2. Variación de la carga viral en los mellizos

Edad (meses)	Carga viral*	
	JeH	JoH
48	1/2500	1/2500
57	>1/438	1/625
63	>1/438	>1/625
71	1/1750	1/313

* la carga viral se calculó realizando ampliaciones a partir de diluciones seriadas del DNA, extraído desde PBMC obtenidos en las diferentes edades señaladas.

Mediciones posteriores señalaron un aumento en el número de provirus por célula en ambos niños de cinco o más veces. También se observó diferencia entre ellos, JeH presentó una carga mayor que JoH a los 57 y 63 meses de edad. La última medición de la carga viral, realizada a los 71 meses de edad de los niños, mostró una disminución de la carga en JeH, en cambio, en JoH la carga aumentó, lo que podría correlacionarse con el deterioro observado en el último recuento de linfocitos CD4+ de este niño. La disminución en el número de provirus por célula observado en JeH podría ser el resultado del tratamiento con drogas antivirales al cual está sometida desde los 62 meses de edad.

4. Clonamiento y secuenciación de los aislados

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales mecanismos de cronicidad y progreso de la infección es la constante variación en las características antigénicas de los virus presentes en un individuo infectado, lo que les permite evadir la respuesta inmune. En parte, esta variación se origina por la alta tasa de mutaciones introducidas por la enzima transcriptasa reversa, debido a la poca fidelidad con que esta enzima copia el genoma viral.

La comparación de secuencias de nucleótidos permite establecer relaciones filogenéticas entre aislados virales diferentes. Con el propósito de observar las variaciones entre los virus de los mellizos se determinó la secuencia nucleotídica de la región hipervariable V3 de la proteína viral gp120. Se escogió esta región de gp120, ya que es una de las más estudiadas y de la cual se disponen secuencias provenientes de diversos aislados (48).

Productos de PCR de 319 pb fueron obtenidos por amplificación de la región V3. Luego del clonamiento en el fago M13, los productos fueron secuenciados usando el método de terminación de la cadena (Sequenase, U.S.B.).

En este trabajo se compararon diferentes clones obtenidos con los virus aislados de los mellizos en cocultivo a la edad de 4 años y 9 meses: JoH 1.1, 1.8, 1.12 y JeH 6.4, 20.1 y 20.3.

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos, se dedujeron las secuencias de aminoácidos. Posteriormente se realizó la comparación de las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos, entre los clones de los niños y entre éstos y el prototipo norteamericano MN.

4.1. Homología en la secuencia de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos de la región V3, deducidas de las secuencias nucleotídicas, fueron muy similares entre clones de un mismo mellizo y se muestran en la Figura 5. En JoH las secuencias de los tres clones fueron iguales excepto la del clon 1.8 que presentó un cambio (una leucina por una prolina). En JeH las secuencias fueron también muy similares observándose sólo un cambio entre los clones 20.1 y 6.4 y dos entre el clon 20.1 y 20.3.

Las secuencias de aminoácidos deducidas para esta región entre los mellizos, fueron sin embargo muy diferentes, observándose sólo un 73% de homología (Figura 5).

(A)

JoH

```
clon 1.1  NNAKTIIIVHLNESVQINCTRPNNNTRKGIHLGPGKAFYATGAIIGNIRKAHCN
clon 1.12  -----
clon 1.8   -----P-----
```

JeH

```
clon 20.1 DNAKTVIVQLNTSVTINCTRPNNNTRRSITIGPGRAFYATENIIGDIRQAHCN
clon 6.4  -----I-----
clon 20.3  -----GD-----
```

(B)

JoH vs JeH

```
clon 1.1  NNAKTIIIVHLNESVQINCTRPNNNTRKGIHLGPGKAFYATGAIIGNIRKAHCN
clon 20.1 D----V--Q--T--T-----RS-TI---R-----EN---D--Q----
```

Figura 5. (A) Secuencia de aminoácidos deducida de la región V3 de los clones de JeH y JoH. **(B)** Comparación de la secuencia de aminoácidos entre los clones de JoH y JeH. El guión corresponde al mismo aminoácido en la secuencia.

En la Figura 6 se comparan la secuencias de aminoácidos de los clones de ambos mellizos con el prototipo norteamericano MN. En promedio, los clones de JoH presentaron un 79% homología y los de JeH un 77% de homología en la secuencia de 53 aminoácidos del HIV prototipo MN. Estos resultados señalaron que la similitud en la secuencia de aminoácidos deducida entre aislados de los mellizos fue inesperadamente menor que la observada al comparar los aislados de cada mellizo y el prototipo MN.

```

MN          DNAKTIIVHLNESVQINCTRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHCN

JoH
clon 1.1   N-----N-T-G-L---K---A-GA---N-K----
clon 1.8   N-----N-T-G-P---K---A-GA---N-K----
clon 1.12  N-----N-T-G-L---K---A-GA---N-K----

JeH
clon 6.4   -----Q--T--T-----N-T-RS-T-----A-E----D-----
clon 20.1  -----V--Q--T--T-----N-T-RS-T-----A-E----D-----
clon 20.3  -----V--Q--T--T-----N-T-RS-T-----A-GD----D-----

```

Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de la región V3 de los clones de JoH y JeH y el prototipo norteamericano MN. El guión corresponde al mismo aminoácido en la secuencia.

4.2. Homología en la secuencia de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos entre clones de un mismo mellizo fueron muy semejantes y se muestran en la Figura 7. Las secuencias para los tres clones de JoH fueron prácticamente iguales, observándose un sólo nucleótido diferente entre ellos. Entre los clones de JeH se observó una mayor diferencia, aunque sólo en 4 de los 159 nucleótidos comparados.

Al comparar la secuencia de nucleótidos entre los mellizos (los clones 1.1 de JoH

y 20.1 de JeH) se observó un 86% de homología.

En la Figura 8 se muestran las secuencias de nucleótidos de los clones de los mellizos y la correspondiente del prototipo MN. Al comparar dichas secuencias se observó que en promedio los clones de JoH (1.1, 1.8 y 1.12) presentaron un 88% de

```

JoH
clon 1.1  AACAAATGCTAAAACCTATAATAGTACATCTGAATGAATCTGTACAAATTAATTG
clon 1.12  -----
clon 1.8   -----

clon 1.1  TACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAGGTATACATCTAGGACCAGGGAAAG
clon 1.12  -----
clon 1.8   -----C-----

clon 1.1  CATTTTATGCAACAGGAGCCATAATAGGAAATATAAGAAAAGCACATTGTAAT
clon 1.12  -----
clon 1.8   -----

JeH
clon 20.1 GACAATGCTAAAACCGTAATAGTACAGCTGAATACATCTGTAACAATTAATTG
clon 6.4  -----A-----
clon 20.3  -----

clon 20.1 TACAAGACCCAACAACAATACAAGAAGAAGTATCACTATAGGACCAGGGAGAG
clon 6.4  -----
clon 20.3  -----

clon 20.1 CATTTTATGCAACAGAGAACATAATAGGAGATATAAGACAAGCACATTGTAAT
clon 6.4  -----
clon 20.3  -----GAG-----

```

Figura 7. Secuencia de nucleótidos de la región V3 de los clones de JoH y JeH. El guión corresponde al mismo nucleótido en la secuencia.

homología con la secuencia de MN y los clones de JeH (20.1, 6.4 y 20.3) presentaron en promedio un 85% de homología con la misma secuencia. Estas homologías

observadas fueron muy similares a las obtenidas al comparar los clones entre mellizos (86%).

```

MN                GATAATGCTAAAACCATCATAGTACATCTGAATGAATCTGTACAAATTAATTG
JoH clon 1.1      A-C-----T--A-----
JeH clon 20.1     --C-----G-A-----G-----AC-----AC-----

MN                TACAAGACCCAACTACAATAAAAGAAAAAGGATACATATAGGACCAGGGAGAG
JoH clon 1.1      -----A-----C-----G-T-----C-----A--
JeH clon 20.1     -----A-----C-----G-AGT--CAC-----

MN                CATTTTATACAACAAAAAATATAATAGGAACTATAAGACAAGCACATTGTAAC
JoH clon 1.1      -----G-----GG-GCC-----A-----A-----T
JeH clon 20.1     -----G-----G-G--C-----GA-----T

```

Figura 8. Comparación de la secuencia de nucleótidos de la región V3 de los clones de JeH y JoH con el prototipo norteamericano MN. El guión corresponde al mismo nucleótido en la secuencia.

4.3. Sustituciones sinónimas y no-sinónimas

Se ha descrito previamente que la frecuencia de sustituciones sinónimas observada entre diferentes aislados de HIV-1, correlaciona bastante bien con el tiempo de divergencia estimado entre variantes (58).

En base a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas para cada clon, se calcularon las diferencias sinónimas, K_s (aquellas que no producen cambios en la secuencia de aminoácidos), y no-sinónimas, K_a (aquellas que producen cambios en la secuencia de aminoácidos).

En el Cuadro 3 se muestran las frecuencias de sustituciones sinónimas (K_s) y no-sinónimas (K_a) entre los clones de los mellizos y el prototipo norteamericano MN. El K_s

observado entre los mellizos fue menor al calculado entre éstos y el aislado MN. En cambio, el Ka calculado entre los aislados de los mellizos y entre MN y los mellizos fue similar. Estos resultados sí muestran la relación entre los virus de los niños y éstos y el prototipo MN. Los valores de Ks sugieren que el tiempo de divergencia entre los virus de los mellizos es bastante menor que entre el prototipo MN y los virus de estos niños, lo que sin duda está de acuerdo con la relación epidemiológica existente entre los virus de los niños.

Cuadro 3. Promedio de las diferencias en sitios sinónimos y no-sinónimos en la secuencia de nucleótidos de la región V3 entre los aislados de los mellizos y el aislado MN.

	SITIOS SINONIMOS (Ks)	SITIOS NO-SINONIMOS (Ka)
JeH vs.		
JoH	0.055	0.165
MN	0.175	0.147
JoH vs.		
MN	0.146	0.130

DISCUSION

El relativamente lento desarrollo del cuadro clínico en ambos niños, hace pensar que la transmisión del virus ocurrió durante el parto o bien en el último período de la gestación. Esto se basa en la correlación que existe entre la rapidez en la progresión de la infección y el momento de la infección vertical; cuanto antes es el momento de la transmisión perinatal, los síntomas clínicos en los niños infectados aparecen más tempranamente (14,15,19). Sin embargo habrían otros factores que pueden explicar esta relación, por ejemplo, se puede postular que la infección se produjo con una variante materna poco virulenta, lo que se tradujo en un lento progreso de la infección en ambos niños (19).

El hecho de que ambos niños hayan sido infectados por la misma población viral permitió estudiar, por una parte, la respuesta inmune de estos niños frente a la infección viral como también, las variaciones de los virus en el tiempo. El conocimiento de estos parámetros permitió tener una mejor estimación del progreso de la infección viral.

Respuesta inmune de los niños

La disminución en el número de células CD4+, junto con los otros marcadores observados, reflejó un lento progreso de la infección en ambos niños, situación que se tradujo en la tardía aparición de cuadros clínicos relacionados con SIDA en ambos.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias en la respuesta inmune de ambos niños frente a proteínas y péptidos sintéticos de HIV, como también variaciones de sus reactividades a través del tiempo de seguimiento. Estas diferencias pueden ser atribuidas

a la distinta respuesta de cada uno. La reactividad de JoH siempre fue mayor que JeH frente a todas las proteínas de HIV, a excepción de las proteínas gp41 y p31, en que la respuesta en ambos niños fue similar. Por otra parte, resultados obtenidos en el laboratorio, con los mismos sueros de los niños, empleando la técnica de radioinmunoprecipitación (RIPA) fueron concordantes con los obtenidos por la técnica de LiaTek (P. Uribe, comunicación personal). Con la técnica de RIPA se observó que el título de anticuerpos frente a gp120 de HIV-1 en JoH, fue 10 veces más alto que la respuesta de JeH durante todo el período de seguimiento. A su vez, JoH fue el único de los mellizos que presentó reactividad contra las proteínas gp140 y p25 de HIV-2. Sin embargo, esta reactividad no significó una doble infección, sino que reflejó más bien una reacción cruzada entre las glicoproteínas de superficie de HIV-1 y HIV-2 (59). Además, la reacción observada contra la proteína p24 en ambos mellizos fue también similar a la observada por LiaTek.

Adicionalmente, estudios realizados en nuestro laboratorio con péptidos sintéticos, que corresponden a diferentes regiones inmunodominantes de las glicoproteínas de envoltura, gp120 y gp41 de HIV-1 como también gp36 de HIV-2, reflejaron una mayor reactividad de los sueros de JoH frente a casi todos los péptidos estudiados, salvo JB-4 que corresponde a la región de los aminoácidos 594-613 de gp41, frente al cual ambos mellizos reaccionaron de la misma manera (P. Uribe, comunicación personal). Los péptidos fueron gentilmente cedidos por la Dra Britta Wharen, Laboratorio de Inmunología, Instituto Sueco para el Control de Enfermedades Infectocontagiosas, Estocolmo, Suecia.

El nivel de anticuerpos mayor en JoH no se correlacionó con el progreso de la

infección mostrado por este mellizo ya que ha sido relativamente similar al de JeH. La aparición de anticuerpos anti p24 se ha correlacionado con un progreso de la infección (59). Sin embargo, a pesar que JeH mostró una baja o nula cantidad de anticuerpos contra esta proteína desde el año de edad, ha tenido una larga sobrevida y un progreso similar a JoH. Una explicación posible para esta diferencia observada entre ambos es que en JeH, los anticuerpos anti p24 se encuentran mayoritariamente formando complejos inmunes no detectados con las técnicas empleadas, sin embargo, en JoH la producción de p24 puede ser insuficiente para acomplejar la totalidad de los anticuerpos anti p24. Por otra parte, el título de anticuerpos en JeH fue aproximadamente diez veces inferior al de JoH contra la glicoproteína gp120 y péptidos de esta proteína. Sin embargo, la reactividad contra la proteína gp41 como contra el péptido JB4, fue igual en ambos niños. Estos resultados indican que las diferencias en título no representan una baja global en la producción de anticuerpos en JeH sino que más bien reflejan una diferencia específica. Posiblemente esta similitud en la respuesta frente a la proteína gp41 como contra el péptido JB4, esté involucrada con el progreso similar de la infección en ambos niños.

Obtención de aislados y determinación de la carga viral

El aislamiento de virus desde PBMC y plasma, como también la determinación de la carga viral evidenciaron un progreso continuo de la infección, como ya se había observado en las determinaciones de anticuerpos contra HIV-1 y en la concentración de células CD4+. Si bien es cierto se observaron diferencias entre los niños, en relación a los marcadores mencionados, el progreso ha sido muy similar en

ambos niños.

Es importante señalar, que al estimar la carga viral expresado como provirus por célula, debe considerarse la citopatogenicidad del aislado prevalente en el individuo, puesto que un virus más patogénico induce una mayor mortalidad en las células que infecta, lo cual altera la relación provirus por célula. Esto último podría distorsionar los valores obtenidos cuando se compara la carga viral en dos individuos que están en distinta fase clínica de la enfermedad.

Fenotipo de los aislados

En este estudio no se observó variación del fenotipo en los aislados de los niños durante el período de seguimiento. Si bien es cierto, ambos niños han presentado síntomas compatibles con un deterioro de su estado clínico, como también una disminución progresiva del número de células CD4+, no se detectó un cambio en el comportamiento biológico de los aislados de los mellizos. Estudios previos han demostrado diferencias fenotípicas entre aislados de HIV-1 obtenidos de pacientes asintomáticos o sintomáticos y han sido clasificados como "slow-low" o "rapid-high" respectivamente (33,55). Sin embargo, hay estudios que señalan que no todos los aislados obtenidos de individuos sintomáticos son capaces de replicar en líneas celulares linfoides e inducir la formación de sincicios (61).

Tratamiento antiviral en JeH

El tratamiento con AZT/ddI de JeH se reflejó en un aumento del recuento del número de linfocitos CD4+ (493 versus 203/mm³), una ausencia de virus

cultivable en plasma y una disminución de la carga viral. Esto demuestra la importancia del monitoreo de estas variables para determinar la efectividad del tratamiento y evaluar el reemplazo por otro de distinta especificidad, cuando ésta disminuye.

Clonamiento y secuenciación

Los aislados clonados y secuenciados fueron aquellos capaces de crecer en cocultivo a la edad de 4 años y 9 meses.

Las secuencias de nucleótidos fueron muy semejantes entre clones aislados de un mismo mellizo. Esto era esperable ya que los clones moleculares fueron obtenidos a partir de virus aislado en cocultivo y es conocido que esto selecciona fuertemente aquellas variantes más aptas para crecer *in vitro*.

El análisis simple de la homología de las secuencias de los virus de los mellizos mostró diferencias entre los aislados de cada niño, siendo el porcentaje de homología entre los virus de los niños comparables al observado entre los virus de los niños y el prototipo MN. Sin embargo la relación epidemiológica entre los aislados de cada niño pudo visualizarse cuando se analizó la frecuencia de cambios sinónimos (Ks) y no-sinónimos (Ka). Las sustituciones no-sinónimas, en las secuencias de nucleótidos determinadas, fueron similares al comparar los aislados de los niños con el prototipo norteamericano MN, lo que reflejó la presión selectiva por cambios antigénicos descritos en esta región. Sin embargo, las sustituciones sinónimas, que no están sujetas a presión selectiva, evidenciaron más adecuadamente la cercanía genética entre los aislados de los niños, respecto del prototipo norteamericano. Como se ha descrito, la frecuencia de sustituciones sinónimas observada en diferentes aislados de HIV-1 correlaciona bastante

bien con el tiempo de divergencia estimado entre variantes (58). El valor de K_s obtenido en este estudio es uno de los menores observados -el promedio de K_s en HIV es de 10×10^{-3} - y es compatible con un tiempo de divergencia de cinco años (58).

Los resultados obtenidos sugieren que las variantes virales maternas que infectaron, divergieron grandemente en el lapso de tiempo transcurrido desde la infección, con una presión selectiva por las sustituciones no-sinónimas.

Análisis filogenéticos, basados en la comparación de secuencias de nucleótidos ha permitido identificar 5 subtipos (A-E) diferentes en HIV. El subtipo B está ampliamente distribuido geográficamente e incluye secuencias obtenidas en Europa, Norte y Sudamérica, África y Asia. Los otros cuatro subtipos reúnen principalmente secuencias encontradas en África, India y Tailandia (47). Utilizando el programa computacional DNAPARS, se determinó que los aislados de ambos niños corresponden al Subtipo B (comunicación personal, D. Escanilla).

Basado en los resultados mostrados es de interés conocer la secuencia común original que infectó inicialmente. Si bien es cierto, no tenemos el aislado de la madre ni del padre, disponemos de DNA extraído de PBMC cuando los niños tenían 2 años de edad. Debido a que los provirus en PBMC persisten por varios años (62), la amplificación directa del DNA de esas células y su posterior secuenciación, podría permitirnos determinar secuencias virales más cercanas al momento de la infección en ambos mellizos, que potencialmente corresponderían a las originales que los infectaron. Por otra parte, el análisis genético de los aislados obtenidos en el seguimiento de ambos niños a través del tiempo, y no sólo la comparación en un momento determinado como se muestra en esta tesis, permitiría visualizar la evolución de la secuencia en el tiempo y

correlacionarlos más adecuadamente con el progreso de la infección en ellos.

Adicionalmente, la posibilidad de disponer de estas técnicas para el apoyo clínico permitirá contar con elementos más objetivos para el manejo de los pacientes basado no sólo en el recuento de células CD4+ o en algunos marcadores inmunológicos. Por el contrario, poder estimar la carga viral, el fenotipo de los aislados, la presencia de virus infectivo en plasma, etc., podría tener un valor predictivo más acucioso del progreso en un individuo infectado.

BIBLIOGRAFIA

1. **Levy, J.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* **57**:183-289.
2. **Greene, W.** 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**:308-317.
3. **Vaishnav, Y & Wong-Staal, F.** 1992. The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:578-630.
4. **Haseltine, W.** 1991. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* **5**:2349-2360.
5. **Zack, J., Arrigo, S., Weitsman, S., Go, A., Haislip, A. & Chen, I.** 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* **61**:213-222.
6. **Pantaleo, G. Graziosi, C. & Fauci, A.** 1993. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **328**:327-335.
7. **Fauci, A.** 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanism of pathogenesis. *Science* **239**:617-622.

8. **Graziosi, C., Pantaleo, G., Demarest, J., Cohen, O., Vaccarezza, M., Butini, L., Montroni, M. & Fauci A.** 1993. HIV-1 infection in the lymphoid organs. *AIDS* 7 (suppl 2):S53-S58.

9. **De Rossi, A., Pasti, M., Mammano, F., Ometto, L., Gianquinto, C. & Chieco-Bianchi, L.** 1991. Perinatal infection by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): relationship between proviral copy number in vivo, viral properties in vitro, and clinical outcome. *J. Med. Virol.* 35:283-289.

10. **Ades, A.E., Newell, M.L. & Peckham, C.S.** 1991. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet* 337:253-260.

11. **Cowan, M.J., Walker, C., Culver, K., Weinrub, P.S., Wara, D.W. & Levy, J.A.** 1988. Maternally transmitted human immunodeficiency virus (HIV) infection in children. *AIDS* 2:437-441.

12. **Lindgren, S., Anzen, B., Bohlin, A.B. & Lidman, K.** 1991. HIV and child-bearing: clinical outcome and aspects of mother-to-infant transmission. *AIDS* 5:1111-1116.

13. **Mano, H. & Chermann, J.C.** 1991. Fetal human immunodeficiency virus type 1 infection of different organs in the second trimester. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7:83-88.

14. **Rossi, P.** 1992. Maternal factors involved in mother-to-child transmission of HIV-1. Report of a Consensus Workshop, Siena, Italy, January 1992. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 5:1019-1029.
15. **Courgnaud, V., Laure, F., Brossard, A., Goudeau, A., Barin, F. & Brechot, C.** 1991. Frequent and early in utero HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7:337-341.
16. **Van de Perre, P., Simonon, A., Msellati, P., Hitimana, D.G., Vaira, D., Bazubagira, A., Van Goethem, C., Stevens, A.M., Karita, E., Sondag-Thull, D., Dabis, F. & Lepage, P.** 1991. Postnatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mother to infant. *N. Engl. J. Med.* 325:593-598.
17. **Chandwani, S., Greco, M.A., Mittal, K., Antoine, C., Krasinski, K. & Borkowsky, W.** 1991. Pathology and human immunodeficiency virus expression in placentas of seropositive woman. *J. Infect. Dis.* 163:1134-1138.
18. **European Collaborative Study.** 1991. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet* 337:253-260.
19. **Rossi, P. & Moschese, V.** 1991. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus. *FASEB J.* 5:2419-2426.

20. **Quinn, T.C., Kline, R.L., Halsey, N., Hutton, A., Ruff, A., Butz, A., Boulos, R. & Modlin, J.F.** 1991. Early diagnosis of perinatal HIV infection by detection of viral-specific IgA antibodies. *JAMA* **266**:3439-3442.
21. **Pahwa, S., Chirmule, N., Leombruno, C., Lim, W., Harper, R., Bhalla, R., Rahwa, R., Nelson, R.P. & Good, R.A.** 1989. In vitro synthesis of human immunodeficiency virus-specific antibodies in peripheral blood lymphocytes of infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7532-7536.
22. **Burgard, M., Mayaux, M.J., Blanche, S., Ferroni, A., Guihard-Moscato, M.L., Allemon, M.C., Ciraru-Vigneron, N., Fittion, G., Gloch, C., Guillot, F., Lachassine, E., Vial, M., Griscelli, C. & Rouzioux, C.** 1992. The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. *N. Engl. J. Med.* **327**:1192-1197.
23. **De Rossi, A., Ometto, L., Mammano, F., Zanotto, C., Gianquinto, C. & Chieco-Bianchi, L.** 1992. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): lack of detectable virus in peripheral blood cells of infected children at birth. *AIDS* **6**:1117-1120.
24. **Edwards, J.R., Ulrich, P.P., Weintrub, P.S., Cowan, M.J., Levy, J.A., Wara, D.W. & Vyas, G.N.** 1989. Polymerase chain reaction compared with concurrent viral cultures for rapid identification of human immunodeficiency virus infection among high-risk infants

and children. *J. Pediatr.* **115**:200-203.

25. **De Rossi, A., Ades, A., Mammano, F., Del Mistro, A., Amadori, A., Gianquinto, C. & Chieco-Bianchi, L.** 1991. Antigen detection, virus culture, polymerase chain reaction and in vitro antibody production in the diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection. *AIDS* **5**:15-20.

26. **Vartanian, J., Meyerhans, A., Henry, M. & Wain-Hobson, S.** 1992. High-resolution structure of an HIV-1 quasispecies: identification of novel coding sequences. *AIDS* **6**:1095-1098.

27. **Cichutek, K., Merget, H., Norley, S., Kreuz, W., Gahr, M. & Kurth, R.** 1992. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:7365-7369.

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

29. **Aiit-Khaled, M. & Emery, V.** 1993. Sequence variation within the human immunodeficiency virus V3 loop at seroconversion. *J. Med. Virol.* **41**:270-274.

30. **Goudsmit, J., Kuiken, C. & Nara, P.** 1989. Linear versus conformational variation

of V3 neutralization domains of HIV-1 during experimental and natural infection. *AIDS* **3** (suppl. 1): S119-S123.

31. **Cheng-Mayer, C., Quiroga, M., Tung, J., Dina, D. & Levy, J.** 1990. Viral determinants of HIV-1 T-cell/macrophage tropism, cytopathicity, and CD4 antigen modulation. *J. Virol.* **64**:4390-4398.

32. **York-Higgins, D., Cheng-Mayer, C., Bauer, D., Levy, J. & Dina, D.** 1990. Human immunodeficiency virus type 1 cellular host range, replication, and cytopathicity are linked to the envelope region of the viral genome. *J. Virol.* **66**:4966-4971.

33. **Fenyo, E., Albert, J. & Asjo, B.** 1989. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* **3** (suppl 1):S5-S12.

34. **Koot, M., Vos, A., Keet, R., De Goede, R., Dercksen, M., Terpstra, F., Coutinho, R., Miedema, F. & Tersmette, M.** 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* **6**:49-54.

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

36. **Milich, L., Margolin, B. & Swanstrom, R.** 1993. V3 loop of the human

immunodeficiency virus type 1 env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* **67**:5623-5636.

37. Tersmette, M, Lange, J., De Goede, R., De Wolf, F., Eeftink-Schattenkerk, J., Coutinho, R., Huisman, R., Goudsmit, J. & Miedema, F. 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* **i**:983-985.

38. Zhu, T., Hongmei, M., Wang, N., Nam, D., Cao, Y., Koup, R. & Ho, D. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* **261**:1179-1181.

39. Scarlatti, G., Hodara, V., Rossi, P., Muggiasca, L., Buccheri, A., Albert, J. & Fenyo, E. 1993. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* **197**:624-629.

40. Scarlatti, G., Leitner, T., Hodara, V., Halapi, E., Rossi, P., Albert, J. & Fenyo, E. 1993. Neutralizing antibodies and viral characteristics in mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS* **7** (suppl 2):S45-S48.

41. Scarlatti, G., Leitner, T., Halapi, E., Wahlberg, J., Marchisio, P, Clerici-Schoeller, M., Wigzell, H., Fenyo, E., Albert, J., Uhlen, M. & Rossi, P. 1993. Comparison of variable region 3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 from infected

children with the RNA and DNA sequences of the virus populations of their mothers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:1721-1725.

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

43. **Castro, B. & Levy, J.** 1988. Optimal conditions for recovery of the HIV from PBMC. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2371-2376.

44. **Maniatis, T., Fritsch, E. & Sambrook, J.** 1982. Molecular cloning (a laboratory manual). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

45. **Laure, F., Courgnaud, V., Rouzioux, C., Blanche, S., Veber, F., Burgard, M., Jacomet, C., Griscelli, C. & Bréchet, C.** 1988. Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* **ii**:538-541.

46. **Goudsmit, J., Geelen, J., Keulen, W., Notermans, D., Kuiken, C., Ramautarsing, C., Smit, L., Koole, L., van Genderen, M., Buck, H., Sninsky, J. & Krone, W.** 1990. Characterization of the African HIV-1 isolate CBL-4 (RUT) by partial sequence analysis and virus neutralization with peptide antibody and antisense phosphate-methylated DNA. *AIDS* **4**:559-564.

47. Herring, A., Inglis, N., Ojeh, C., Snodgrass, D. & Menzies, J. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by detection of viral nucleic acid in silver-stained gels. *J. Gen. Microbiol.* **16**:473-477.
48. Myers, G., Korber, B., Berzofsky, J., Smith, R. & Paviakis, G. 1992. Human retroviruses and AIDS: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.M.
49. Phillips, A., Lee, C., Elford, J., Janossy, G., Timms, A., Bofill, M. & Kernoff, P. 1991. Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS. *Lancet* **337**:389-392.
50. Hoover, D., Grahm, N., Chen, B., Taylor, J., Phair, J., Zhou, S. & Muñoz, A. 1992. Effect of CD4+ cell count measurement variability on staging HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **5**:794-802.
51. Darbyshire, J., Schoenfeld, D. & Weller, I. 1991. Clinical trials in HIV infection: current problems and future directions. *AIDS* **5** (suppl 2):S167-S173.
52. Coombs, R., Collier, A., Allain, J., Nikora, B., Leuther, M., Gjerset, G. & Corey, L. 1989. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **321**:1626-1631.
53. Saag, M., Crain, M., Decker, W., Campbell-Hill, S., Robinson, S., Brown, W.,

- Leuther, M., Whitley, R., Hahn, B. & Shaw, G.** 1991. High-level viremia in adults and children infected with human immunodeficiency virus: relation to disease stage and CD4+ lymphocyte levels. *J. Infect. Dis.* **164**:72-80.
54. **Asjo, B., Albert, J., Chiodi, F. & Fenyo, E.** 1988. Improved tissue culture technique for production of poorly replicating human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol. Methods* **19**:191-196.
55. **Fenyo, E., Morfeldt-Manson, L., Chiodi, F., Lind, B., von Gegerfeldt, A., Albert, J., Olausson, E. & Asjo, B.** 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol.* **62**:4414-4419.
56. **Daar, E. Hiroshi, M. & Ho, D.** 1991. Virologic markers in the assessment of antiretroviral therapy. *AIDS* **5** (suppl 1):S175-S179.
57. **Michael, N., Vahey, M., Burke, D. & Redfield, R.** 1992. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in human: evidence for replication in all stages of HIV disease. *J. Virol.* **66**:310-316.
58. **Li, W., Tanimura, M. & Sharp, P.** 1988. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* **5**:313-330.

59. **Espejo, R. & Uribe, P.** 1990. Immunoprecipitation of HIV-2 glycoproteins by sera positive for HIV-1. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2107-2110.
60. **Chargelegue, D., Colvin, B. & O'Toole, C.** 1993. A 7-year analysis of anti-Gag (p17 and p24) antibodies in HIV-1 seropositive patients with haemophilia: immunoglobulin G titre and avidity are early predictors of clinical course. *AIDS* **7** (suppl 2):S87-90.
61. **Fenyo, E.** 1993. Viral phenotype and severity of HIV-1 infection: are children different from adults? *AIDS* **7**:1673-1674.
62. **Zhang, L. Q., Mackensie, P., Cleland, A., Holmes, E., Leigh Brown, A. & Simmonds, P.** 1993. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J. Virol.* **67**:3345-3356.