



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Caracterización funcional de glicoproteínas de
envoltura provenientes de aislamientos de HIV-1
de un paciente infectado por transmisión vertical

N° 630

Fiorella M. Spinelli

Directora de Tesina: Dra. Silvia A. González
Co-Director de Tesina: Dr. José L. Affranchino
Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, CONICET-
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad
de Belgrano

Departamento de Investigaciones
Febrero de 2014

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

RESUMEN

La glicoproteína de envoltura (Env) de HIV-1 media la entrada del virus a sus células blanco interactuando en la superficie celular con el receptor primario CD4 y con el correceptor CCR5 o CXCR4. Es por ello que la glicoproteína Env determina el tropismo viral e influencia la patogénesis de la infección. El Laboratorio de Virología (CONICET-Universidad de Belgrano) recibió del Laboratorio de Retrovirus y Biología Celular del Hospital de Pediatría Garrahan tres genes env (C5, C6 y C88) derivados de muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1 para que se investigaran las propiedades biológicas de las proteínas Env codificadas por estos genes. Para ello, en primer lugar, analizamos en cultivos celulares la biosíntesis y el procesamiento de las glicoproteínas C5, C6 y C88. Luego, mediante ensayos de fusión célula-célula en presencia de antagonistas de CCR5 y de CXCR4, se identificó para cada glicoproteína Env el correceptor utilizado. Finalmente, se determinó la capacidad infectiva conferida por las proteínas Env C5, C6 y C88 a un virus defectivo que no expresa Env. Estos estudios constituyen el primer paso en la construcción de un panel de referencia funcional de las glicoproteínas Env de los HIV-1 que circulan en la Argentina.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi Directora de tesina: la Dra. Silva Adriana González por brindarme generosamente un lugar dentro del Laboratorio de Virología-CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Belgrano. Este trabajo fue posible gracias a su dedicación, enseñanzas y orientación durante estos dos años. De igual forma, los agradecimientos se extienden al Dr. José Luis Affranchino quien también participó, con sus conocimientos y consejos, durante el transcurso de este trabajo.

A la Dra. Paula Aulicino y al Bioquímico Andrés Rossi del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan por proporcionarnos los genes env de los aislamientos virales de un paciente.

A mis compañeros de laboratorio, María Jimena Esteva, Juan Carlos Abdusetir y Juan Ignacio Falcón. Por la infinita paciencia, por toda la ayuda y por la dedicación que me brindaron. Sin duda esta experiencia no hubiese sido la misma sin ello.

A mis compañeros de cursada, Antonella Pisera Fuster, Mariana Amorós, Florencia Clavelli y Maximiliano Burroni, por todas las risas, buenos momentos y apoyo, por todo lo que pasamos durante estos años de estudio.

A mis papás, Gloria Coppola y Raúl Spinelli, por todo su incondicional apoyo, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría, y que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para llegar a los objetivos. También le agradezco al resto de mi familia, en especial a mi tía Sonia Coppola que siempre que la necesité estuvo ahí para ayudarme y brindarme contención.

ÍNDICE

Introducción	7
1. Origen y epidemiología del virus de la inmunodeficiencia de humanos (HIV-1).....	7
1.1. Descubrimiento	7
1.2. Origen y relación filogenética con SIVcpz.....	7
1.3. Mecanismos de transmisión.....	8
2. Transmisión madre-hijo de HIV-1 e infecciones pediátricas con HIV-1	8
2.1. Estadísticas a nivel mundial y en Argentina	8
2.2. Curso de la infección por HIV-1 en niños y SIDA pediátrico	9
2.3. Prevención de la infección vertical	9
3. Biología de HIV-1.....	10
3.1. Organización genómica y estructura del virión	10
3.2. Ciclo de replicación	12
3.3. Proteínas virales que contrarrestan la acción antiviral celular	12
4. Estructura y funciones de la glicoproteína Env	13
4.1. Síntesis y transporte de Env.....	13
4.2. La subunidad gp120	13
4.3. La subunidad gp41	14
4.4. Incorporación de Env a los viriones.....	14
5. Bases moleculares de la entrada de HIV-1 a las células blanco.....	15
Objetivos	17
Objetivos generales.....	17
Objetivos específicos.....	17
Materiales y métodos	18
1. Amplificación de los genes env a partir de muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1	18
2. Clonado de los genes env en el vector de expresión pcDNA 3.1 (+)	18
3. Purificación de ADN plasmídico	19
4. Células y virus	19
5. Expresión de genes env en células de mamífero.....	19
6. Generación de pseudovirus llevando diferentes glicoproteínas Env en su superficie por complementación en trans	20
7. Ensayo de infectividad de ciclo único	20
8. Ensayo de capacidad fusogénica de las glicoproteínas Env.....	20
9. Ensayos de utilización de correceptor celular	21

10. Análisis de las secuencias de los genes env	21
Resultados	21
1. Obtención de los genes env a partir de muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1	21
2. Comparación de las secuencias aminoacídicas de cada glicoproteína Env	22
3. Análisis de la expresión y procesamiento de las glicoproteínas Env C5, C6 y C88.....	26
4. Determinación de la utilización de correceptor celular	27
5. Capacidad infectiva de pseudovirus llevando las glicoproteínas Env	34
Discusión	36
Bibliografía	38

INTRODUCCIÓN

1. Origen y epidemiología del virus de la inmunodeficiencia de humanos (HIV-1)

1.1. Descubrimiento

Las primeras evidencias clínicas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) surgieron entre 1980 y 1981 en Estados Unidos, cuando un grupo de cinco hombres jóvenes homosexuales inexplicablemente manifestó síntomas de neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci* (anteriormente llamado *P. carinii*) (Gottlieb et al., 1981). Esta enfermedad consistía en una infección oportunista rara que normalmente se manifiesta solo en individuos inmunocomprometidos. Simultáneamente, se reportaron otros casos de pacientes con un patrón similar de anomalías, tales como disminución de linfocitos T CD4⁺, linfadenopatías, sarcoma de Kaposi y enfermedades causadas por infecciones oportunistas. A esta condición se la denominó SIDA, sin embargo, se desconocía el agente causal.

Dos años después, Gallo y colaboradores aislaron a partir de los linfocitos T de sangre periférica de un paciente con SIDA, el virus responsable de la enfermedad. Este virus presentaba características similares al virus linfotrópico humano de células T (HTLV): los viriones tenían actividad de transcriptasa reversa típica de los retrovirus y eran detectados con anticuerpos contra las proteínas virales de la cápside p19 y p24. Estos resultados permitieron sugerir que el virus del SIDA pertenecía a la familia de HTLV y, por lo tanto, lo llamaron HTLV-III (Gallo et al., 1983). Al mismo tiempo, el grupo de Montagnier aisló de un paciente con linfadenopatías un virus que presentaba actividad de transcriptasa reversa pero que no estaba relacionado inmunológicamente con las proteínas p19 y p24 de HTLV, lo cual se contradecía con lo observado por el laboratorio de Gallo. Por lo tanto, Montagnier y sus colaboradores denominaron al nuevo aislamiento como LAV, virus asociado a linfadenopatías (Barre-Sinoussi et al., 1983). Otro equipo de investigadores liderado por Levy también aisló un virus a partir de linfocitos T de individuos infectados en San Francisco al que llamó ARV, retrovirus asociado al SIDA (Levy et al., 1984).

Finalmente, los numerosos análisis filogenéticos y el estudio del ciclo de replicación viral demostraron que el virus del SIDA pertenece a los lentivirus, un género dentro de la familia *Retroviridae*. Por lo tanto, los aislamientos HTLV-III, LAV y ARV correspondían al mismo virus al que se denominó virus de la inmunodeficiencia de humanos (HIV).

1.2. Origen y relación filogenética con SIVcpz

La epidemia global causada por el HIV tipo 1 (HIV-1) en la población humana resultó de al menos tres eventos de infección con el virus de la inmunodeficiencia de simios SIVcpz, un lentivirus de chimpancé que provoca una infección natural asintomática en las especies *Pan troglodytes* y *P. t. schweinfurthii* (Gao et al., 1999). Se cree que la transmisión al hombre, que tuvo lugar en África central y oriental, ocurrió por contacto con la sangre o los fluidos corporales de simios infectados, durante la caza de estos animales para el consumo (Peeters et al., 2002).

HIV-1 se clasifica en cuatro grupos genéticamente diferentes: M (*main*), O (*outlier*), N (*non-M, non-O*) y P (“pending the identification of further human cases”), cada uno de los cuales surgió de un evento de transmisión independiente entre especies. El grupo M fue el primero en ser descubierto y es el principal responsable de la pandemia mundial. En base a análisis evolutivos se estima que el grupo M de HIV-1 fue introducido en la población humana en 1931 (Korber, 2000). El grupo O fue descubierto en 1990, representa menos del 1% de la infección global con HIV-1 y está restringido a Camerún, Gabón y países vecinos (Gurtler et al., 1994). El grupo N fue identificado en 1998, solo se hallan documentados 13 casos en individuos de Camerún (Vallari et al., 2010). Por último, el grupo P, relacionado evolutivamente con el SIV de gorila, fue descubierto en 2009 en una mujer de Camerún viviendo en Francia (Plantier et al., 2009) y hasta el presente solo se ha aislado de otro individuo de Camerún (Vallari et al., 2011). Numerosos estudios moleculares y evolutivos han establecido que el inicio de la pandemia con los grupos M y O ocurrió durante las primeras décadas del siglo XX (Korber, 2000; Lemey et al., 2004; Worobey et al., 2008).

De acuerdo a los reportes oficiales de las Naciones Unidas sobre HIV/SIDA (UNAIDS), a fines del 2011 había 34 millones de personas infectadas con HIV-1 (UNAIDS, 2012). El África Subsahariana sigue siendo la zona más afectada, ya que 1 de cada 20 adultos está infectado con HIV-1, lo cual representa el 69% de los individuos infectados a nivel mundial. Después de esta región, le siguen el Caribe, Europa del Este y Asia Central, en donde se calculó en 2011 que el 1% de los adultos está infectado con HIV-

1. A pesar de que la prevalencia de HIV es 25 veces mayor en África que en Asia, aproximadamente 5 millones de personas viven con HIV en el este y sudeste asiático (UNAIDS, 2012).

1.3. Mecanismos de transmisión

La principal ruta de transmisión de HIV-1 es la vía sexual (de Vincenzi, 1994; Leynaert et al., 1998; Vittinghoff et al., 1999). La transmisión ocurre a través del contacto de los fluidos corporales de individuos infectados que presentan niveles elevados de virus y de células infectadas (sangre, semen o secreciones vaginales) con las mucosas o regiones dañadas de la piel.

El modo de contagio por transfusión con sangre de un individuo infectado con HIV-1 es muy alto ya que el virus es directamente inoculado en sangre. Sin embargo, esto es actualmente muy poco probable, ya que se controla de manera exhaustiva la sangre donada para las transfusiones. En consecuencia, el contagio a partir de sangre de un individuo infectado con HIV-1 está limitado a personas adictas a drogas de administración endovenosa que reutilizan agujas y jeringas contaminadas con HIV (Vermund & Leigh-Brown, 2012).

Además, HIV puede transmitirse verticalmente, esto es de la madre infectada al hijo. Esta vía de transmisión se desarrollará detalladamente en la próxima sección.

2. Transmisión madre-hijo de HIV-1 e infecciones pediátricas con HIV-1

2.1. Estadísticas a nivel mundial y en Argentina

El principal modo de infección con HIV en niños es la transmisión vertical, es decir, de la madre al hijo. La transmisión puede ocurrir durante el embarazo, el parto o durante la lactancia. En las últimas décadas, el desarrollo y la implementación de la terapia antirretroviral conocida como HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) en las etapas preparto y posparto (tanto en la madre como en el recién nacido) han permitido virtualmente eliminar las infecciones pediátricas con HIV en los países desarrollados (Connor & McSherry, 1994; Cooper et al., 2002). En efecto, las tasas de transmisión madre-hijo se redujeron aproximadamente a un 1-2%. Sin embargo, la infección pediátrica con HIV sigue siendo un problema de salud importante en los países subdesarrollados (Shetty, 2013).

Las estadísticas del año 2011 estiman que hay 34 millones de personas infectadas con HIV globalmente, dentro de los cuales 3,3 millones pertenecen a niños menores de 15 años. A nivel mundial, se infectan 2,5 millones de personas con HIV; es decir, hay más de 7.000 nuevos infectados con HIV por día, dentro de los cuales hay 330.000 menores de 15 años. En particular, se estima que alrededor de 230.000 casos involucran a niños entre 0 y 14 años, de los cuales aproximadamente un 90% vive en la zona de África Subsahariana (Shetty, 2013).

En Argentina, desde el inicio de la epidemia hasta diciembre de 2010, el Ministerio de Salud recibió 4.618 casos de niños infectados con HIV entre 0 y 14 años. Resulta importante destacar que se registraron más diagnósticos de transmisión vertical en la década del '90 (50%) que en los últimos diez años (41%) (Fig. 1) (Durán et al., 2011), lo que refleja el éxito del diagnóstico temprano y de la implementación de las terapias antirretrovirales en la prevención de la transmisión madre-hijo.

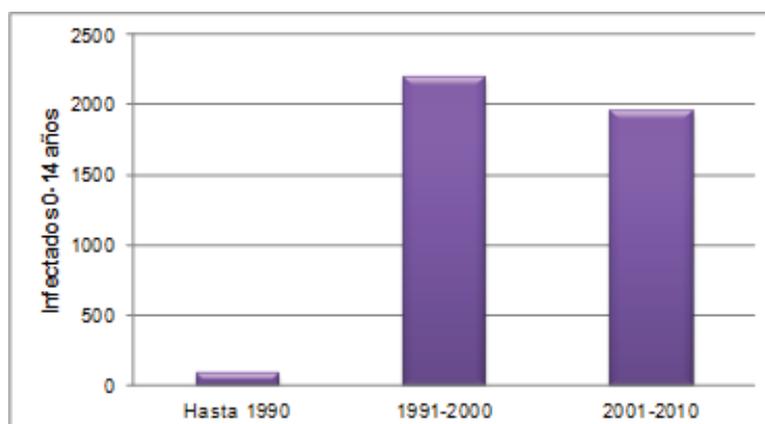


Figura 1. Casos de infección con HIV-1 en niños argentinos de 0 a 14 años, según año de diagnóstico. (Adaptado de Durán et al., 2011)

2.2. Curso de la infección por HIV-1 en niños y SIDA pediátrico

En los niños, el sistema inmune adaptativo, mediado por los linfocitos T y B, es inmaduro ya que no han sido expuestos a gran cantidad de antígenos. No obstante, el sistema inmune innato está diseñado para montar una respuesta inmediata no específica luego de la exposición a un microorganismo. Esta respuesta es mediada por células dendríticas, células Natural Killer, fagocitos (neutrófilos y monocitos/macrófagos), mastocitos y proteínas humorales como las proteínas del complemento, citoquinas y quimioquinas, entre otras. Dado que durante los primeros años de vida el sistema inmune innato prevalece sobre el adquirido, los tipos celulares que unen ambos sistemas tienen un rol importante en la patogénesis de la infección pediátrica con HIV. (Tiemessen & Kuhn, 2006).

El curso clínico de la infección con HIV-1 en niños causa un amplio rango de enfermedades, entre las que se incluyen hepatoesplenomegalia, candidiasis oral, diarrea recurrente, parotitis, cardiomiopatía, hepatitis, nefropatía, retraso en el crecimiento y en el desarrollo, encefalopatías, e infecciones bacterianas recurrentes (Chakraborty, 2005). En particular, la neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii* es una infección oportunista común en niños con HIV-1 y provoca un alto índice de mortalidad entre los 3 a 6 meses de edad. En África, la principal causa de mortalidad en niños infectados con HIV-1 es la tuberculosis reactivada. Otros patógenos oportunistas que aparecen durante el curso de la infección con HIV-1 son los herpesvirus y las micobacterias atípicas (Chakraborty, 2005).

Los niños recién nacidos presentan niveles más elevados que sus madres de las quimioquinas CC, tales como CCL3, CCL4 y CCL5, las cuales son los ligandos naturales del correceptor CCR5, uno de los correceptores que utiliza HIV-1 para entrar a sus células blanco (Shalekoff et al., 2004). Por otra parte, las células del sistema inmune del neonato expresan bajos niveles de CCR5 (Shalekoff et al., 2004). Estas condiciones inmunes en los neonatos permitirían explicar las diferencias que se observan en el curso de la infección entre los adultos y los niños (Shalekoff et al., 2004).

CCL3-L1, uno de los dos genes activos que codifica para CCL3, presenta un número variable de copias en los humanos (Menten et al., 2002). Se ha demostrado que un número alto de copias de CCL3-L1 correlaciona con una reducción en la frecuencia de la transmisión madre-hijo de HIV-1. En este sentido, se ha observado que niños argentinos con copias de CCL3-L1 menores a la media poblacional presentan mayor riesgo de adquirir HIV verticalmente que aquéllos con un número mayor a la media poblacional (Gonzalez et al., 2005). La infección con HIV-1 en niños tiene una progresión más rápida que en adultos porque presentan mayores niveles de linfocitos T CD4⁺ y de ARN viral (carga viral) que los adultos. Por lo tanto, se requerían niveles más altos de CCL3 para controlar de manera efectiva la replicación viral (Tiemessen & Kuhn, 2006).

2.3. Prevención de la infección vertical

Los programas destinados a evitar la transmisión vertical de HIV se basan en los cuatro componentes recomendados dentro del enfoque estratégico de la Organización Mundial de la Salud (OMS): (i) prevenir el contagio con HIV en las mujeres; (ii) prevenir embarazos no programados en las mujeres infectadas con HIV; (iii) aplicar las estrategias terapéuticas disponibles para prevenir la transmisión vertical de HIV, es decir, de la madre infectada al hijo; (iv) proveer de tratamiento, cuidado y apoyo a las mujeres HIV positivas y a sus familias (WHO, 2002). Por lo tanto, el enfoque terapéutico actual para una mujer embarazada que está infectada con HIV es tratarla con drogas antirretrovirales, lo cual reduce significativamente la posibilidad de infección del niño por transmisión vertical. Se utiliza la terapia HAART ya mencionada que, por lo general, consta de la combinación de tres drogas antirretrovirales como profilaxis a todas las mujeres infectadas que están embarazadas o están amamantando (Ngemu et al., 2014; WHO, 2012a). Esto va acompañado de prácticas de parto seguras como la cesárea, de manera tal de evitar el paso del bebé por el canal de parto reduciendo así la posibilidad de contagio (Ngemu et al., 2014). Como se mencionó, la terapia HAART se basa en la combinación de tres drogas antirretrovirales cuya enzima blanco es la transcriptasa reversa: (i) zidovudina (AZT) que es un análogo de nucleósido; (ii) lamivudina (3TC), otro análogo de nucleósido; y (iii) nevirapina (NVP) que es un inhibidor no nucleosídico. En países subdesarrollados, en especial en la zona de África Sub-sahariana, las terapias para las mujeres embarazadas infectadas y los neonatos se basan en una sola dosis de NVP durante el parto (WHO, 2012b).

El riesgo de contagio a través de la leche materna es del 5-20% (WHO & UNAIDS, 2004). Por lo tanto, solo se recomienda la alimentación con leche materna de una madre infectada en aquellos casos en los que ésta no pueda ser reemplazada por leche materna sustituta adecuada o por alimentos complementarios.

3. Biología de HIV-1

3.1. Organización genómica y estructura del virión

Los HIV pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus*. El genoma de estos virus está compuesto por dos moléculas de ARN de cadena positiva unidas no covalentemente cerca de sus extremos 5' (Coffin, 1992). Al igual que el resto de los retrovirus, los HIV se caracterizan por poseer la enzima transcriptasa reversa la cual sintetiza el ADN copia (ADNc) a partir del ARN genómico viral. Posteriormente, el ADNc viral es integrado en el genoma de la célula hospedadora por acción de la integrasa viral. A la forma integrada del genoma viral se la conoce como provirus (Coffin, 1992).

Los extremos del ADN proviral están flanqueados por las repeticiones terminales largas (LTR) que contienen regiones regulatorias involucradas en la iniciación de la transcripción y la poliadenilación de los transcriptos virales (**Fig. 2**). El genoma contiene los tres genes estructurales principales: *gag*, *pol* y *env* (**Fig. 2**). El gen *gag* codifica para la poliproteína Gag de 55 kDa que luego es procesada por la proteasa viral originando las proteínas estructurales: p17 (matriz, MA), p24 (cápside, CA), p7 (nucleocápside, NC) y el péptido C-terminal p6. La región *pol* es traducida en el precursor Gag-Pol que genera las enzimas proteasa (PR), transcriptasa reversa (TR) e integrasa (IN). La PR se encarga de clivar los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol, la TR sintetiza el ADN proviral y la IN media la integración de éste en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1992; Goff, 2007) (**Fig. 2 y Fig. 3**). Por su parte, el gen *env* codifica para la glicoproteína de envoltura (Env; gp160), la cual es procesada en la *trans*-Golgi en las subunidades de superficie (SU; gp120) y de transmembrana (TM; gp41) (**Fig. 2**). En la superficie de los viriones, Env se halla bajo la forma de trímeros del complejo gp120-gp41 (**Fig. 3**; Zhu et al., 2006).

Además de las proteínas estructurales y las enzimas virales, el genoma de HIV-1 codifica para proteínas adicionales cuyos marcos abiertos de lectura están superpuestos entre los genes *pol* y *env* (es el caso de los genes *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* y *vpu*) o se hallan entre *env* y la LTR 3' (es el caso del gen *nef*) (**Fig. 2**). Dos de estas proteínas tienen funciones regulatorias esenciales: Tat y Rev. Tat actúa como transactivador de la expresión génica, uniéndose al elemento TAR (*trans-activation responsive element*) del ARN genómico, lo que resulta en la activación de la iniciación y de la elongación de la transcripción desde el promotor LTR (Goff, 2007). Por su parte, la proteína Rev facilita el transporte desde el núcleo al citoplasma de los ARN mensajeros (ARNm) virales no procesados (esto es, que no sufren empalme de exones) o monoprocesados (Coffin, 1992; Goff, 2007). Este mecanismo es mediado por la asociación de Rev al elemento respondedor a Rev (RRE; *Rev-responsive element*). La secuencia RRE es una región de aproximadamente 350 nucleótidos (nt) dentro del gen *env* que, como consecuencia del proceso de eliminación de intrones, solo se halla presente en los ARNm virales no procesados y monoprocesados. El rol de las proteínas accesorias Vif, Vpu, Nef y Vpr será discutido en la sección 3.3.

ARTÍCULO DE REVISIÓN (2016)

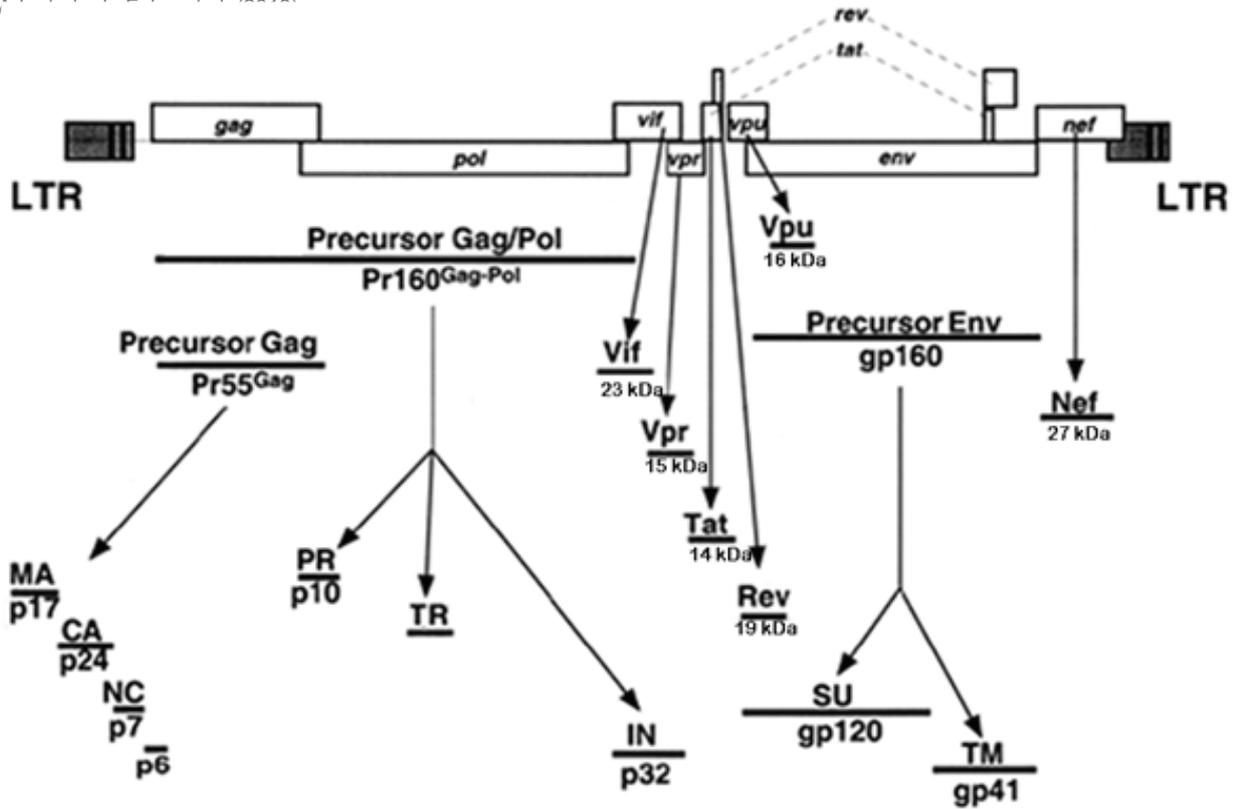


Figura 2. Organización del genoma de HIV-1.

Se indican la localización de los genes de HIV-1, los tamaños de los precusores (que son poliproteínas en los casos de Gag y Gag-Pol) y de las proteínas maduras derivadas de dichos precusores, así como las masas moleculares de las proteínas regulatorias y accesorias. Adaptado de Freed & Martin (2007).

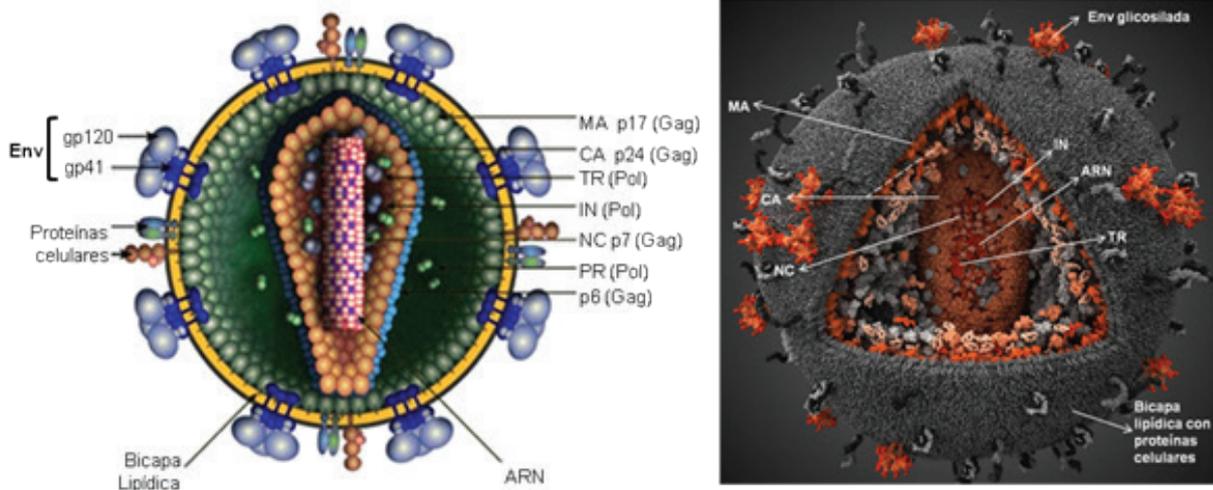


Figura 3. Estructura de los viriones de HIV-1. Esquemas de la organización de las partículas virales.

3.2. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de HIV-1 comienza con la unión de la subunidad gp120 de Env al complejo receptor-correceptor presente en la membrana plasmática de las células blanco. Brevemente, gp120 interactúa en primer lugar con la molécula CD4 y luego con los correceptores específicos de quimioquinas, CXCR4 (presente en los linfocitos T) o CCR5 (presente en los macrófagos) (Berger, 1998; Feng et al., 1996). Estas interacciones provocan cambios conformacionales en Env que activan la capacidad fusogénica de la subunidad gp41 permitiendo la fusión de las membranas viral y celular y la entrada del core viral al citoplasma de la célula (Freed & Martin, 2007). En el interior celular, el core viral se desarma y se sintetiza el ADNc a partir del ARN genómico viral mediado por la enzima viral TR. Esta enzima, que tiene actividad tanto de ADN polimerasa ARN y ADN dependiente como de ribonucleasa H, genera primero la cadena de ADN de polaridad negativa usando como molde el ARN genómico viral y luego hidroliza el ARN molde para generar la cadena positiva de ADN (Goff, 2007). El ADN viral recién sintetizado junto con otras proteínas virales y celulares forma el complejo de preintegración. Se ha sugerido que las proteínas MA, IN y Vpr jugarían un rol en la translocación al núcleo del complejo de preintegración (Lee et al., 2010). Una vez dentro del núcleo, la enzima viral IN media la integración del ADNc proviral al genoma de la célula, formando el provirus. Mediante la maquinaria de la célula hospedadora, el ADN proviral es transcrito dando lugar inicialmente a los ARNm virales multiprocesados que codifican para las proteínas Tat, Rev y Nef (Freed & Martin, 2007).

Tat actúa estimulando la síntesis de los ARNm virales mientras que Rev media el transporte al citoplasma de los ARNm no procesados y monoprocesados que codifican para Gag, Gag-Pol y Env (Freed & Martin, 2007). Por lo tanto, durante la replicación de HIV-1 se generan tres clases de ARNm virales: los ARNs de tamaño genómico que son empaquetados como genoma en la progenie viral y que también sirven como ARNm para las poliproteínas Gag y Gag-Pol; los ARNm monoprocesados que codifican para las proteínas Env, Vpu, Vif y Vpr; y los ARNm multiprocesados que se van a traducir en Rev, Tat y Nef (Goff, 2007).

Los precursores Gag y Gag-Pol se sintetizan en ribosomas citosólicos, mientras que Env se sintetiza en el retículo endoplasmático como un precursor altamente glicosilado de 160 kDa (gp160). Durante su transporte a la superficie celular, el precursor gp160 es procesado en el trans-Golgi en sus dos subunidades gp120 y gp41 por acción de proteasas celulares del tipo de las furinas (Moulard et al., 1999). Las proteínas gp120 y gp41, que se mantienen asociadas por uniones no covalentes, se hallan bajo la forma de complejos triméricos tanto en la membrana plasmática de la célula infectada como en la superficie del virión (Affranchino & González, 2014; Zhu et al., 2003, 2006).

En las últimas etapas del ciclo de vida lentiviral, el precursor Gag se ensambla en la membrana plasmática en partículas virales, las cuales incorporan al ARN genómico viral, al precursor Gag-Pol y a la glicoproteína Env (Affranchino & González, 2014).

La brotación de los viriones a través de la membrana plasmática al medio extracelular es mediada por la interacción entre los dominios aminoacídicos (conocidos como dominios tardíos) presentes en el péptido p6 de Gag con proteínas celulares del sistema endosomal (Bieniasz, 2006; Sundquist & Kräusslich, 2012). Durante o luego de la brotación de los viriones inmaduros, la PR viral cliva los precursores poliproteicos Gag y Gag-Pol generando las proteínas maduras que constituyen los viriones maduros infectivos (**Fig. 3**). Este procesamiento dispara una serie de reordenamientos estructurales en la partícula viral denominados maduración (Sundquist & Kräusslich, 2012).

3.3. Proteínas virales que contrarrestan la acción antiviral celular

Como se mencionó anteriormente, las proteínas accesorias de HIV-1 son Nef, Vpu, Vif y Vpr (**Fig. 2**). Resulta interesante destacar que estas proteínas cumplen funciones que le permiten al virus tanto contrarrestar los mecanismos celulares antivirales como evadir al sistema inmune.

La proteína accesoria Nef es fundamental para que el virus pueda escapar eficientemente del sistema inmune, ya que ésta modula negativamente algunos receptores presentes en la membrana plasmática de la célula infectada. Una de estas proteínas es el receptor primario CD4. La regulación negativa de CD4 asegura la interrupción de las vías inmunológicas que lo utilizan y, a su vez, contribuye a evitar la sobreinfección (Levesque et al., 2004). También se ha demostrado que Nef regula negativamente a los correceptores CCR5 y CXCR4, con los que también interactúa HIV-1 para entrar a sus células blanco (Michel et al., 2006). Otra molécula afectada es el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (CMH I), el responsable de presentar los antígenos en la superficie de las células infectadas. La modulación negativa

del CMH I mediada por Nef contribuye a evitar que los linfocitos T citotóxicos reconozcan a las células infectadas y, por lo tanto, permite al virus escapar a la respuesta del sistema inmune (Landi et al., 2011).

Vpu es una proteína exclusiva de HIV-1 si bien se han encontrado homólogos estructurales en los SIVcpz. Esta proteína viral cumple dos funciones importantes. Por un lado, Vpu, siendo una proteína integral de membrana interactúa con CD4 en el retículo endoplasmático promoviendo su degradación en proteasomas (Bour & Strebel, 2003). Por otro lado, Vpu facilita la liberación del virus desde la membrana plasmática de la célula infectada contrarrestando la acción inhibitoria que ejerce el factor de restricción inducible por interferón- α BST-2 (conocido también como CD317 o HM1.24) (Ruiz et al., 2010).

La proteína viral Vif es la responsable de contrarrestar la actividad de restricción que ejerce la proteína celular APOBEC3G sobre la replicación viral (Sheehy et al., 2002). La actividad de citidina desaminasa de las proteínas de la familia APOBEC cataliza la desaminación de la base citosina del ADN o ARN viral, resultando en la mutación de citidina a uridina, y, en consecuencia, en mutaciones G \rightarrow A en la cadena sentido positivo del genoma retroviral (Wolf & Goff, 2008; Zhang et al., 2003).

Finalmente, la proteína Vpr es una proteína accesoria multifuncional crítica para la eficiencia de la infección viral, la cual es empaquetada en los viriones por interacción con Gag (Lavallée et al., 1994). La función principal de Vpr es transportar y localizar el complejo de preintegración en el núcleo, lo que permite que HIV-1 infecte células quiescentes, que no se dividen como es el caso de los macrófagos (Miller et al., 1997). Otras funciones importantes de Vpr incluyen la coactivación del promotor LTR de HIV-1, el arresto del ciclo celular en la fase G2 y contribuciones directas e indirectas a la disfunción de los linfocitos T y de los macrófagos infectados (Kogan & Rappaport, 2011). Las funciones de Vpr en el ciclo de replicación viral así como el efecto que ejerce sobre las células del sistema inmune reflejan el rol importante de Vpr en la patología del SIDA (Kogan & Rappaport, 2011).

4. Estructura y funciones de la glicoproteína Env

Como ya se mencionó la glicoproteína viral Env media la entrada viral a través de su interacción con el receptor y correceptor presentes en la superficie de la célula blanco. La estructura cuaternaria y funcional de Env consiste de trímeros del heterodímero gp120-gp41 (Affranchino & González, 2014; Zhu et al., 2003, 2006).

4.1. Síntesis y transporte de Env

La glicoproteína Env de HIV-1 se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso como un precursor altamente glicosilado (gp160) (Checkley et al., 2011). En el retículo endoplasmático, los monómeros de gp160 oligomerizan formando trímeros (Earl et al., 1990; Pinter et al., 1989), lo que facilita su transporte al aparato de Golgi. Un vez en el trans-Golgi, el precursor gp160 es procesado por furinas celulares, dando como resultado las subunidades gp120 y gp41 (**Fig. 4**). El procesamiento de gp160 es clave para la activación de la actividad fusogénica de Env y, por lo tanto, es esencial para la infectividad viral. Luego del procesamiento, gp120 y gp41 permanecen asociadas por interacciones no covalentes formando complejos triméricos (Affranchino & González, 2014; Checkley et al., 2011).

4.2. La subunidad gp120

El análisis bioinformático de las secuencias de los genes env de distintos aislamientos de HIV-1, ha permitido identificar los siguientes segmentos en la subunidad gp120: cinco dominios variables (V1, V2, V3, V4 y V5), y cinco dominios constantes (C1, C2, C3, C4 y C5) (**Fig. 4**; Starcich et al., 1986; Willey et al., 1986). Tanto gp120 como el ectodominio de gp41 contienen residuos de cisteína altamente conservados, involucrados en puentes disulfuro intramoleculares que son cruciales para la formación de la estructura terciaria de Env (Leonard et al., 1990). Es interesante destacar que variaciones en el número y distribución de estos residuos de cisteína provocan cambios en la estructura y antigenicidad de Env (Gao et al., 1996; Jobes et al., 2006).

La glicoproteína gp120 no sólo está modificada por N-glicosilación (aproximadamente la mitad de su masa molecular corresponde a N-oligosacáridos), sino también por O-glicosilación (Allan et al., 1985; Bernstein et al., 1994). Esta subunidad de Env presenta aproximadamente entre 20 y 35 sitios de N-

glicosilación, los cuales cumplen diversas funciones, tales como enmascarar los epitopes de la proteína Env que son blanco de la respuesta inmune, contribuir al plegamiento correcto de Env, y facilitar la unión de los viriones a los receptores de la célula hospedadora (Checkley et al., 2011).

La variabilidad presente en la secuencia de los dominios V se debe a recombinaciones, mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. El dominio V1/V2 (**Fig. 4**) es el más variable tanto en longitud (su extensión oscila entre 50 y 90 aminoácidos) como en el número de sitios de N-glicosilación (Palmer et al., 1996). Cabe destacar que se ha observado una correlación entre la progresión de la enfermedad y el aumento tanto en la longitud como en el número de sitios de glicosilación en V1/V2, lo que sugiere que las modificaciones en estos dominios de la proteína gp120 podrían promover el escape viral a la respuesta inmune (Masciotra et al., 2002). En cambio, los dominios V3, C2, C3 y C4 de gp120 muestran poca variación en su longitud (Checkley et al., 2011).

4.3. La subunidad gp41

La glicoproteína gp41 está compuesta por aproximadamente 345 aminoácidos organizados en tres dominios principales (**Fig. 4**): (i) el dominio extracelular o ectodominio (ED), (ii) el dominio transmembrana (DTM), responsable de la inserción de la glicoproteína Env en la membrana, y (iii) el dominio citoplasmático (DC) carboxilo-terminal.

El ED contiene los determinantes que median la fusión entre la envoltura lipídica del virión y la membrana celular: una región hidrofóbica N-terminal denominada péptido de fusión, dos regiones hidrofóbicas de hepta-repeticiones (HR1 y HR2) que se pliegan en estructuras helicoidales, y una zona rica en residuos de triptófano conocida como región externa proximal a la membrana (MPER, *membrane-proximal external region*) que abarca los últimos 24 aminoácidos del dominio extracelular de gp41 (Affranchino & González, 2014; Checkley et al., 2011). El dominio MPER de la subunidad gp41 de HIV-1 es blanco de los anticuerpos monoclonales (MAbs) de amplia capacidad neutralizante 2F5, 4E10 y Z13 (Cao et al., 1993; Zwick et al., 2001).

Todas las glicoproteínas Env lentivirales, con excepción de la del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV), contienen DCs inusualmente largos de 100-200 residuos, lo que contrasta con la longitud de los DCs (menos de 50 aminoácidos) de las proteínas Env de otros retrovirus (Affranchino & González, 2014; Celma et al., 2007). El DC de la glicoproteína gp41 de HIV-1, que consta de aproximadamente 150 aminoácidos, está involucrado en la infectividad viral, regulando la expresión de Env en la superficie celular, la liberación espontánea de gp120 del complejo gp120-gp41, y la fusión de la membrana viral con la celular (Affranchino & González, 2014; Checkley et al., 2011). Estudios realizados por nuestro laboratorio en SIV y por otros investigadores en HIV-1 han establecido que el DC de la proteína gp41 media la incorporación de la glicoproteína Env a los viriones (ver la siguiente sección 4.4.).

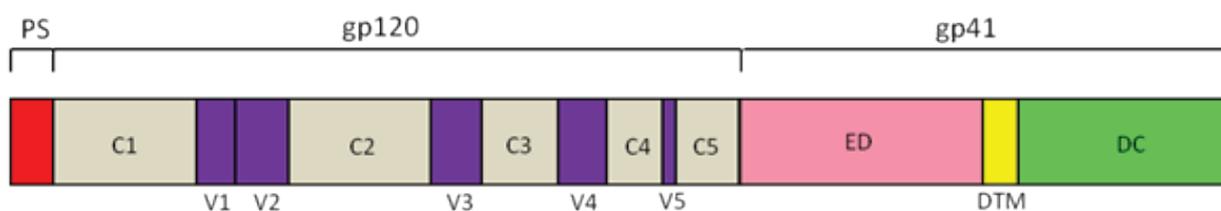


Figura 4.

Representación esquemática de la organización de la glicoproteína Env de HIV-1.

PS, péptido señal. Subunidad gp120: C1, C2, C3, C4 y C5, dominios constantes; V1, V2, V3, V4 y V5, dominios variables.

Subunidad gp41: ED, ectodominio; DTM, dominio transmembrana; DC, dominio citoplasmático.

4.4. Incorporación de la glicoproteína Env a los viriones

El proceso de incorporación de la glicoproteína Env a los viriones que resultan del ensamblado de la poliproteína Gag es una etapa clave en el ciclo de replicación lentiviral, ya que la proteína Env media la entrada de los virus recién formados a las nuevas células blanco. Nuestro laboratorio ha estudiado en detalle este proceso en SIV. Mediante experimentos de mutagénesis dirigida y ensayos de interacción proteína-proteína in vitro, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la incorporación de Env a

los viriones resulta de la interacción entre el dominio MA de Gag y el DC de gp41 (Affranchino & González, 2014; Celma et al., 2001, 2004; Manrique et al., 2001, 2003, 2008). Es interesante destacar que los estudios realizados en HIV-1 también apoyan el concepto que la interacción MA-gp41 es una etapa esencial en el proceso de incorporación de la glicoproteína Env a los viriones (Freed & Martin, 1995, 1996; Murakami & Freed, 2000; Wyma et al., 2000).

5. Bases moleculares de la entrada de HIV-1 a las células blanco

Como se discutió en los puntos anteriores, los componentes involucrados en la entrada de HIV son, por un lado, la glicoproteína Env y, por el otro, el receptor CD4 junto con el correceptor correspondiente (CCR5 o CXCR4) presentes en la membrana plasmática de la célula hospedadora. En este punto se explicará cómo interaccionan estas proteínas durante la entrada del virus a las células blanco.

La entrada viral se inicia con la unión de la subunidad gp120 del complejo gp120-gp41, presente como trímeros en la superficie del virión, al receptor CD4 de los linfocitos T (**Fig. 5**). El sitio de unión de la proteína gp120 al receptor CD4 está formado por 26 residuos conservados en segmentos discontinuos, los cuales forman un único dominio como resultado del plegamiento de Env (Kwong et al., 1998). Estos residuos se encuentran en los dominios C1, C3 y C4 (Kowalski et al., 1987; Lasky et al., 1987; Olshevsky et al., 1990). Una vez unida a CD4, la subunidad gp120 sufre cambios conformacionales que resultan en la exposición de las regiones que formarán el sitio de unión al correceptor (Ckeckley et al., 2011). El dominio de unión se conoce como bridging sheet, y está formado por el tallo de las regiones variables V1 y V2 y por aminoácidos de la región constante C4 (Rizzuto et al., 1998). Por otro lado, la región variable V3 determina la utilización de CCR5 o CXCR4 (Nolan et al., 2008). Se ha demostrado que el cambio en el uso de CCR5 a CXCR4 como correceptor de HIV-1 se debe a mutaciones en V3 que incrementan la carga positiva de este dominio, posibilitando así su interacción con la superficie cargada negativamente de CXCR4 (Fouchier et al., 1992; Pollakis et al., 2004; Shioda et al., 1994).

Consecuentemente, la unión de gp120 al correceptor expone el péptido de fusión de gp41, que se inserta en la membrana de la célula blanco. En esta etapa, las hepta-repeticiones (HR) del ectodominio de los trímeros de gp41 forman una estructura helicoidal estable en la que las tres HR N-terminales HR1 son rodeadas de manera antiparalela por las tres HR C-terminales HR2 (Lu et al., 1995). Este intermediario del complejo Env genera y estabiliza el poro de fusión de las membranas, lo que finalmente conduce a la liberación del core viral en el citoplasma de la célula hospedadora (Fig. 5).

En base al correceptor al que se une la glicoproteína Env, los HIV-1 pueden clasificarse en: (i) virus R5, que utilizan solamente el receptor CCR5; (ii) virus X4, que utilizan CXCR4; y, (iii) virus R5X4, que presentan un tropismo dual; es decir, que pueden utilizar ambos correceptores (Berger et al., 1998). En este sentido, la regla "11/24/25" que analiza el carácter de los aminoácidos presentes en las posiciones 11, 24 y 25 de la región V3 de Env, se utiliza como criterio para predecir la utilización de correceptor por HIV-1. Si una o más de estas posiciones se halla ocupada por un aminoácido de carácter básico, se puede predecir que el tropismo viral es X4, mientras que cualquier otro residuo en estas posiciones sugiere que se trata de un virus R5. Esta regla ha exhibido un 94% de exactitud al predecir el correceptor utilizado por 217 aislamientos virales. (Cardozo et al., 2007).

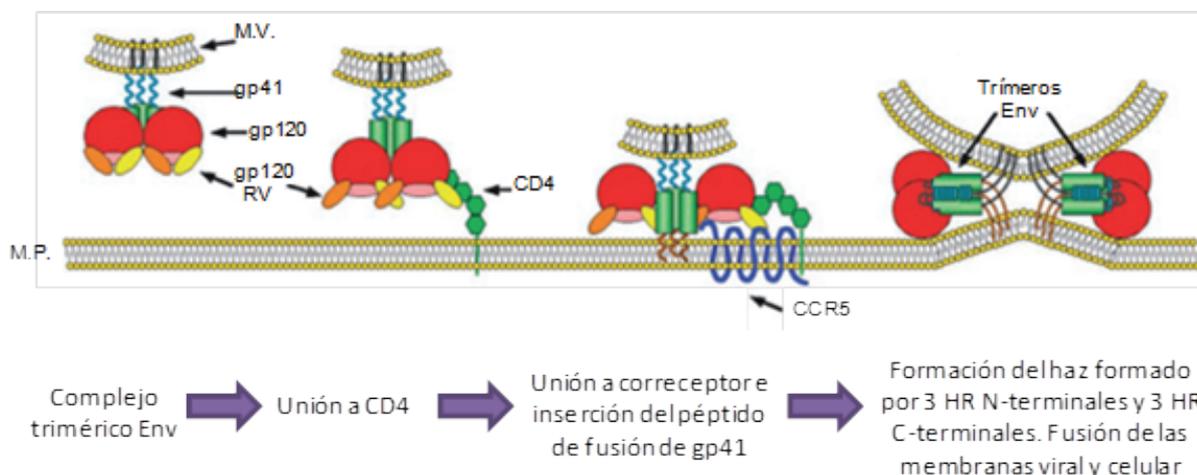


Figura 5.
Entrada de HIV-1 a sus células blanco.

M.V., membrana viral; M.P., membrana plasmática; gp120 RV, regiones variables de gp120. Adaptado de Klasse (2012).

Se ha investigado la acción inhibitoria de algunas moléculas pequeñas sobre la unión de la glicoproteína gp120 de HIV-1 a los correceptores celulares. En este sentido, el maraviroc (un compuesto sintético derivado de una imidazopiridina), demostró ser un antagonista eficaz de la unión de Env a CCR5, por lo que fue aprobado para uso clínico (Dorr et al., 2005). Un compuesto inhibidor de la unión de HIV-1 a CXCR4 es el AMD3100 (biciclamo JM-29879, pero éste no ha sido aprobado para uso terapéutico debido a su toxicidad. Por lo tanto, desde la perspectiva del tratamiento clínico del SIDA, resulta relevante determinar el fenotipo de utilización de correceptor de los virus que circulan en un paciente, ya que esto permite establecer si se puede incluir maraviroc en la terapia antirretroviral.

OBJETIVOS

Objetivos generales

HIV-1, agente causal del SIDA, se ha convertido en los últimos treinta años en uno de los patógenos que más afectan a la salud humana a nivel mundial. HIV-1, como el resto de los retrovirus, posee una única glicoproteína Env, la cual se halla bajo la forma de un complejo no covalente de las subunidades gp120 y gp41. Una de las propiedades más relevantes de la glicoproteína Env es que esta proteína viral es la responsable del proceso de entrada de los virus a sus células blanco (linfocitos T CD4+, macrófagos y células dendríticas), ya que esta proteína media la unión específica de los viriones al receptor y correceptor celulares, lo cual determina el tropismo de HIV-1 e influencia la patogénesis viral.

Dado que el estudio de las propiedades biológicas y funcionales de la glicoproteína Env de HIV-1 es fundamental no sólo para comprender el proceso de entrada viral sino también para diseñar moléculas inhibitorias de la infección, el objetivo del presente trabajo de Tesina fue comenzar con la construcción de un panel de referencia con información funcional de las proteínas Env de pacientes infectados con HIV-1. Esto permitirá que la Argentina cuente con un panel de clones de genes env, el cual podrá ser utilizado para evaluar cómo inhibidores de la entrada viral y anticuerpos neutralizantes afectan a las poblaciones virales que circulan en el país.

Objetivos específicos

Recientemente, nuestro grupo de investigación recibió del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan una serie de genes env obtenidos a partir de muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1.

Para este trabajo de Tesina, se seleccionaron tres genes env: C88, derivado de la muestra correspondiente a los 12 años de edad del paciente; y C5 y C6, derivados de la muestra de 19 años de edad del paciente. Con estos tres clones env nos propusimos realizar los siguientes estudios:

- 1- Análisis del perfil de expresión, procesamiento, y transporte a la superficie celular de las glicoproteínas gp160 C5, C6 y C88, y su comparación con el de la glicoproteína Env de una cepa de HIV-1 de referencia.
- 2- Identificación del correceptor celular (CCR5 o CXCR4) utilizado por las glicoproteínas C5, C6 y C88 para la entrada viral. Para ello, se decidió analizar cómo la fusión célula-célula mediada por las glicoproteínas Env obtenidas del paciente es afectada por inhibidores específicos de la interacción de Env con CCR5 o CXCR4.
- 3- Estudio de la capacidad infectiva de las glicoproteínas gp160 C5, C6 y C88 mediante ensayos de infectividad de ciclo único complementando in trans un virus HIV-1 que no expresa Env con los genes env de los virus del paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Amplificación de los genes *env* a partir de muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1

Las muestras longitudinales del paciente pediátrico infectado verticalmente con HIV-1, a partir de las cuales se amplificaron los genes *env* utilizados en este trabajo de Tesina, forman parte de la colección de especímenes y muestras del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” - CONICET dirigido por la Dra. Luisa Sen.

En el laboratorio de investigación del Hospital Garrahan, se recuperaron las poblaciones virales correspondientes a las muestras del paciente obtenidas a los 12, 16, y 19 años de edad por cocultivo con células mononucleares totales (Rossi et al., 2011). Los genes *env* de cada una de estas poblaciones virales fueron amplificados por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos iniciadores sentido y antisentido que hibridan en una secuencia 24 nt antes que codón de iniciación ATG de *env*, y en la secuencia comprendida entre la región de polipurinas y el comienzo de la LTR 3' del genoma viral, respectivamente (Rossi et al., 2011). Los productos de PCR (aproximadamente 2,9 kb) correspondientes a las tres poblaciones virales fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (Rossi et al., 2011). Se seleccionaron entre 11 y 14 clones *env* de cada una de las poblaciones virales, los cuales se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación del Hospital Garrahan (Rossi et al., 2011). Para este trabajo de Tesina, se seleccionaron tres clones moleculares *env*: C88, correspondiente a los 12 años de edad del paciente, y C5 y C6, correspondientes a la muestra de 19 años del paciente.

2. Clonado de los genes *env* en el vector de expresión pcDNA 3.1 (+)

Para expresar los productos de los genes *env* en células eucariotas, los clones C5, C6 y C88 en pCR2.1-TOPO fueron subclonados en el vector pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen) que lleva las secuencias promotoras del citomegalovirus humano (Fig. 6B). Para ello, los clones en pCR2.1-TOPO se digirieron con las endonucleasas de restricción EcoRV y HindIII, correspondientes a los extremos 5'y 3' de los genes *env*, respectivamente, (Fig. 6A) y los fragmentos de ADN (de aproximadamente 2,9 kb) se purificaron usando el sistema *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Por último, los genes *env* purificados se ligaron a los sitios NheI (convertido en extremo romo por tratamiento con T4 ADN polimerasa) y HindIII del vector pcDNA utilizando la ADN ligasa del fago T4 (sistema *Quick Ligation Kit*, New England Biolabs).

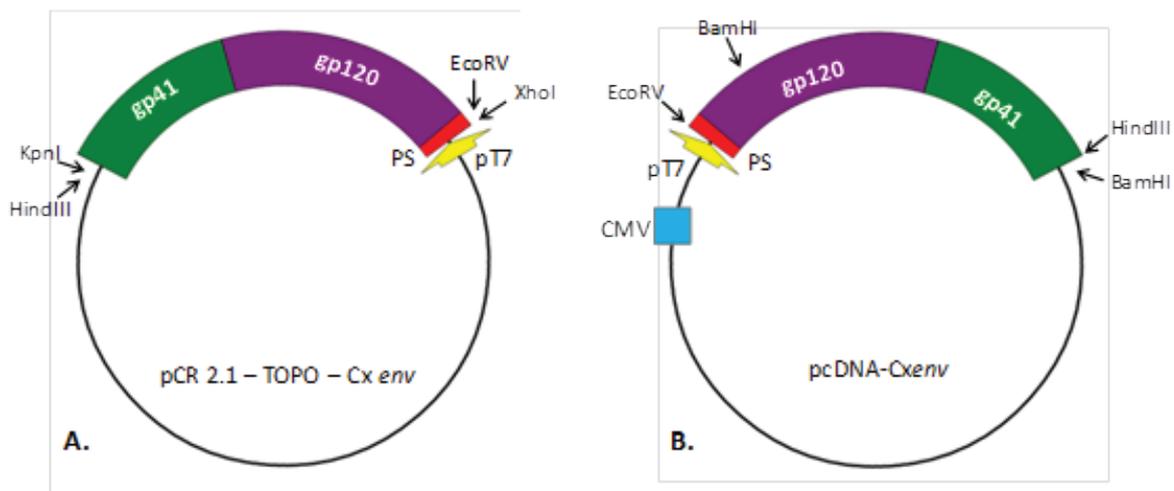


Figura 6.
Estrategia utilizada para el clonado de los genes *env* C5, C6 y C88 en el vector pcDNA.

A. Clones Cx *env* (C5, C6, y C88) en el vector pCR 2.1-TOPO.

B. Clones Cx *env* (C5, C6, y C88) en el vector pcDNA 3.1 (+).

pT7, secuencia del promotor de la ARN polimerasa del fago T7; PS, secuencia que codifica para el péptido señal de Env; CMV, secuencia del promotor y *enhancer* del citomegalovirus humano.

La reacción de ligación de los genes *env* en pcDNA se transformó en la cepa Stb12 de *Escherichia coli* (INVITROGEN). Para llevar a cabo la transformación, se agregaron 50 µl de bacterias competentes a cada mezcla de ligación y luego de incubar en hielo durante 45 minutos, la mezcla se sometió a un shock térmico (90 segundos a 42 °C). Posteriormente, se agregaron 400 µl de medio Luria Bertani ([LB] 1% triptona; 0,5% extracto de levadura; 1% NaCl) y las bacterias se incubaron a 37 °C durante 90 minutos con agitación continua. Finalmente, las bacterias se plaquearon en LB-1,5% agar conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, y se incubaron a 37 °C durante toda la noche para seleccionar las bacterias recombinantes.

La selección e identificación de los clones recombinantes se realizó purificando el ADN plasmídico a partir de colonias individuales mediante el método de lisis por calor (Holmes & Quigley, 1981) y posterior digestión con la endonucleasa de restricción BamHI (**Fig. 6B**). Los clones recombinantes fueron identificados por la formación de dos fragmentos de ADN de 6000 pb y 2300 pb por análisis por electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

3. Purificación de ADN plasmídico

Para realizar los experimentos de transfección, las construcciones plasmídicas en el vector pcDNAse purificaron utilizando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) que se basa en el método de la lisis alcalina de bacterias (Birnboim & Doly, 1979) seguida de la unión del ADN a una columna de sílica en presencia de una alta concentración salina (Vogelstein & Gillespie, 1979).

4. Células y virus

Las líneas celulares COS-7L de riñón de mono (Invitrogen), 293T de riñón embrionario humano, y TZM-bl (HeLa-CD4-CCR5/LTR-*lacZ*/LTR-*luciferasa*) se crecieron y mantuvieron en el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO-BRL) suplementado con 10% suero fetal bovino (HyClone). El virus vaccinia recombinante vTF7-3 que expresa la T7 ARN polimerasa fue provisto por el Dr. Bernard Moss (EE.UU.).

5. Expresión de los genes *env* en células de mamífero

El análisis de la expresión tanto de los clones pcDNA-C5*env*, pcDNA-C6*env* y pcDNA-C88*env*, como del clon pc-NL4-3*env* que codifica para una glicoproteína Env con tropismo X4 (Celma et al., 2001; Manrique et al., 2001), se llevó a cabo utilizando el sistema del virus vaccinia T7 (Fuerst et al., 1987) dado que el plásmido pcDNA 3.1 cuenta con el promotor para la T7 ARN polimerasa (**Fig. 6**). Para ello, se infectaron las células COS-7L (4 x 10⁵ células/placa) con el virus vaccinia recombinante vTF7-3 a una multiplicidad de infección de 10 durante 1 hora a 37 °C. Luego de la etapa de adsorción viral, las células se lavaron dos veces con medio DMEM y se transfectaron con las construcciones plasmídicas utilizando el reactivo de transfección *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). A las 30 horas postransfección, las células se lavaron con solución salina de fosfato (PBS), se lisaron a 4 °C con buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,1% dodecilsulfato de sodio [SDS]; 0,5% desoxicolato de sodio) conteniendo inhibidores de proteasas (1 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonilo y 10 µg/µL aprotinina). Los sobrenadantes de los medios de cultivo se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm de poro.

Las proteínas presentes en los lisados celulares y en los sobrenadantes de los cultivos se resolvieron en geles 7,5% poliacrilamida – 0,1% SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por Western Blot acoplado a reacción de quimioluminiscencia como ya ha descrito en detalle nuestro laboratorio (González et al., 2012; Raudí et al., 2011). Para la detección de las proteínas Env se utilizaron un anticuerpo policlonal producido en conejo dirigido contra la proteína Env recombinante rgp140 (dilución 1:500) y el MAb recombinante humano 2F5 específico de la subunidad gp41 de HIV-1 (Purtscher et al., 1994).

6. Generación de pseudovirus llevando diferentes glicoproteínas Env en su superficie por complementación en *trans*

La complementación del provirus HIV-1_{NL4-3} *env*, defectivo en el gen *env*, con las glicoproteínas Env C5, C6 o C88 se realizó de acuerdo al protocolo descrito por nuestro laboratorio (Celma et al., 2001; Manrique et al., 2001). Brevemente, cultivos de células 293T crecidas en placas de 35 mm de diámetro se cotransfectaron con el ADN proviral pNL4-3 *env* y cada uno de los plásmidos que dirigen la expresión de las glicoproteínas Env del paciente (pcDNA-C5*env*, pcDNA-C6*env* y pcDNA-C88*env*) en una proporción 1:1 utilizando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Como control, se realizaron dos cotransfecciones: una con el plásmido que codifica para la proteína Env de la cepa X4-trópica HIV-1_{NL4-3}, el clon pc-NL4-3*env* generado en nuestro laboratorio (Celma et al., 2001); y la otra, con el plásmido BaL.01, que codifica para la proteína Env del virus R5-trópico HIV-1 BaL obtenido del repositorio de los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. (*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*).

A las 48 horas postransfección, se recogieron los sobrenadantes de cada transfección conteniendo los viriones formados y se filtraron a través de una membrana con poro de 0,45 µm. Los niveles relativos de viriones se cuantificaron determinando la cantidad de la proteína p24 por Western Blot usando el MAb AG3.0 así como midiendo la actividad de TR con el sistema de *Reverse Transcriptase Assay* (Roche Applied Science) como ya ha descrito en detalle previamente nuestro laboratorio (Affranchino & González, 2006; Celma et al., 2004; Manrique et al., 2003).

Por un lado, los sobrenadantes clarificados se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de infectividad de ciclo único (sección 7 de Materiales y Métodos), y por otro, para evaluar la capacidad fusogénica y el tropismo de las glicoproteínas Env (secciones 8 y 9 de Materiales y Métodos, respectivamente).

7. Ensayo de infectividad de ciclo único

La capacidad infectiva de los pseudovirus llevando las glicoproteínas Env C5, C6 o C88 se determinó mediante el ensayo de infectividad de ciclo único utilizando las células indicadoras TZM-bl como ya ha descrito previamente nuestro laboratorio (Celma et al., 2001; Celma et al., 2004; Manrique et al., 2001). Las células TZM-bl, derivadas de la línea celular HeLa, expresan altos niveles del receptor CD4 y de los correceptores CCR5 y CXCR4, además de tener integrado en su genoma el gen *lacZ* bajo el control de la región promotora LTR de HIV-1 (Wei et al., 2002).

Para los ensayos de infectividad se utilizaron volúmenes de las muestras de pseudovirus conteniendo cantidades equivalentes de TR y de p24 para infectar las células TZM-bl crecidas en placas de 24 pocillos (4×10^4 células por pocillo). Luego de la etapa de adsorción (2-3 horas a 37 °C), se removió el inóculo viral, y se agregó 1 ml de DMEM-10% suero fetal bovino. A las 48 horas posinfección, las células se fijaron con una solución de PBS conteniendo 1% formaldehído y 0,2% glutaraldehído a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, las células fijadas se incubaron a 37 °C por 1 hora con una solución conteniendo el sustrato para la β-galactosidasa (4 mM K₄Fe(CN)₆; 2 mM MgCl₂; 0,4 mg/ml X-Gal [5-Br-4-Cl-3-Indolil β-D-galactopiranosido] en PBS). La capacidad infectiva de los pseudovirus se determinó contando al microscopio el número total de células azules en cada pocillo y refiriendo el resultado al número de células azules obtenido para los viriones llevando la proteína Env de HIV-1_{NL4-3}.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado a partir de por lo menos dos experimentos de transfección independientes.

8. Ensayo de capacidad fusogénica de las glicoproteínas Env

La capacidad fusogénica de las distintas proteínas Env se evaluó aplicando el ensayo de fusión célula-célula descrito previamente en detalle por nuestro laboratorio (Affranchino & González, 2006; Celma et al., 2004). Las células 293T cotransfectadas con cada uno de los clones *env* y el plásmido pNL4-3 *env* (ver sección 6 de Materiales y Métodos) se recogieron a las 48 horas postransfección, se disociaron en PBS y se agregaron en una proporción 1:5 a 4×10^4 células TZM-bl. Luego de incubar los cocultivos durante 48 horas a 37 °C, las células se fijaron y se tiñeron como se describe en la sección 7 de Materiales y Métodos.

La capacidad fusogénica de cada glicoproteína Env se cuantificó contando el número de sincicios (conteniendo 5 núcleos o más) en 20 campos no superpuestos. Se calculó luego el promedio y se multiplicó por el total de campos comprendidos en un pocillo. Los datos obtenidos para cada proteína Env se refirieron al número de sincicios obtenido para la glicoproteína Env de HIV-1_{NL4-3} utilizada como control.

9. Ensayos de utilización de correceptor celular

Para determinar si las glicoproteínas Env de HIV-1 utilizan CXCR4 o CCR5 como correceptor para mediar la entrada viral, se realizaron los ensayos descritos en la sección 8 de Materiales y Métodos, pero, previo al agregado de las células 293T transfectadas, que expresan cada una de las proteínas Env, las células indicadoras TZM-bl fueron incubadas con un inhibidor específico de correceptor de entrada viral durante 30 minutos a 37°C.

Para evaluar el tropismo X4, se utilizó 13 µM AMD3100 (Sigma-Aldrich), mientras que para identificar el tropismo R5 de las proteínas Env se utilizó 10 nM maraviroc (gentilmente cedido por la Dra. Aulicino).

10. Análisis de las secuencias de los genes *env*

Las secuencias nucleotídicas de los genes *env* fueron traducidas a las correspondientes secuencias aminoacídicas utilizando la herramienta de traducción de ExPASy (*ExPASy - Translate tool* <http://web.expasy.org/translate/>). Asimismo, tanto las secuencias nucleotídicas como aminoacídicas se alinearon con el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Además, se realizó un análisis de los posibles sitios de N-glicosilación (motivos Asp-X-Thr/Ser, en donde X puede ser cualquier aminoácido menos prolina), mediante el programa NetNGlyc.1 (*Center for Biological Sequence Analysis (CBS) - Technical University of Denmark* <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). También se utilizó el programa geno2pheno (*Max Planck Institut Informatik (MPII)* <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>) para predecir la utilización de correceptor celular de cada glicoproteína Env.

RESULTADOS

1. Obtención de los genes *env* a partir de muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1

Los genes *env* derivados de muestras longitudinales de un paciente pediátrico infectado verticalmente con HIV-1 fueron cedidos por la Dra. Aulicino del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”-CONICET dirigido por la Dra. Luisa Sen. A partir de células mononucleares totales de las muestras longitudinales de un paciente infectado verticalmente con HIV-1 correspondiente a los 12, 16, y 19 años de edad, se obtuvieron las poblaciones virales que fueron primeramente fenotipificadas en la línea celular MT-2 (Rossi et al., 2011). A su vez, utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos (ver Materiales y Métodos), Rossi y colaboradores amplificaron los genes *env* de dichas poblaciones virales, los cuales fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (Rossi et al., 2011). A partir de la secuencia de los clones moleculares *env* seleccionados de cada población viral (entre 11 y 14 clones), el grupo de investigación del Hospital Garrahan realizó un análisis filogenético (Rossi et al., 2011).

Para este trabajo de Tesina, se seleccionaron tres clones moleculares *env*: C88, correspondiente a los 12 años de edad del paciente, y C5 y C6, correspondientes a la muestra de 19 años del paciente. Estos clones moleculares *env* fueron caracterizados en lo que respecta a las funciones virales mediadas por la glicoproteína Env; esto es, utilización de correceptor celular, actividad fusogénica, y la capacidad infectiva que las glicoproteínas gp160 confieren a los viriones. En la **Figura 7** se resumen las etapas del estudio realizado.

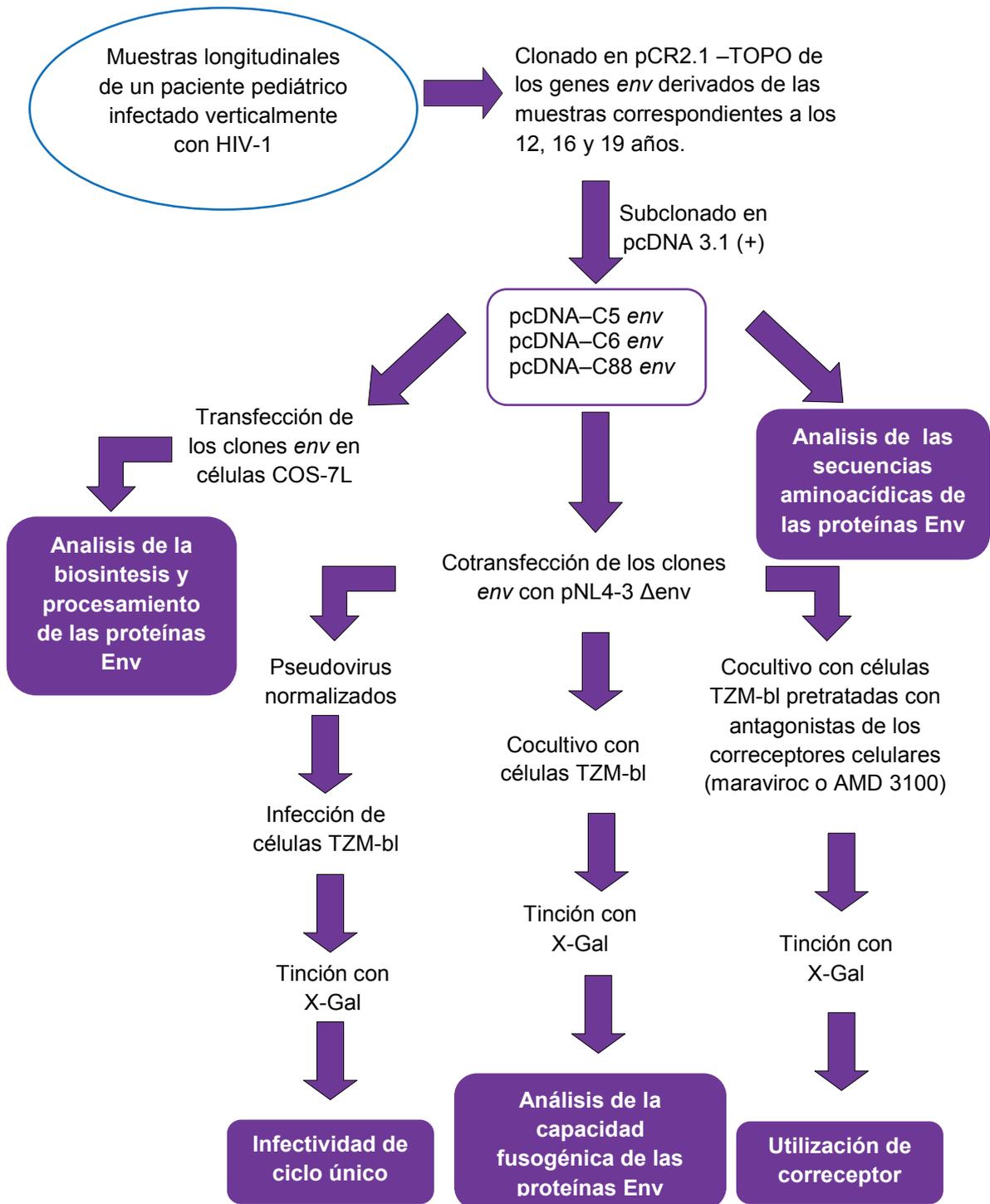


Figura 7. Resumen de los experimentos realizados para la caracterización funcional de las glicoproteínas Env C5, C6, y C88.

2. Comparación de las secuencias aminoacídicas de cada glicoproteína Env

Como primer paso, se analizaron las secuencias aminoacídicas de los dominios variables y constantes de la subunidad gp120 de las glicoproteínas Env C5, C6 y C88. Como se muestra en la **Tabla 1**, las proteínas gp120 C5, C6, y C88 presentan la misma longitud en los dominios C1, C2, C4, C5, V2, V3, y V4, mientras que la región V1 es la que exhibe mayor variación en el número de residuos al comparar las secuencias.

Como segundo paso, se alinearon las regiones V1, V2, V3, y C4 de las gp120 C5, C6, y C88 con los dominios equivalentes de las cepas de referencia NL4-3 (X4-trópica) y BaL (R5-trópica), ya que estas regiones son las que intervienen en la unión de la gp120 al correceptor celular. Esta comparación mostró que los dominios V2, V3, y C4 exhiben un alto grado de homología, mientras que la región V1 presenta mayor diversidad (**Fig. 8**).

Nº de aminoácidos	C5	C6	C88	NL4-3	BaL.01
Péptido Señal	28	28	30	29	29
gp120	478	487	496	481	479
C1	101	101	101	101	100
V1	27	33	40	27	32
V2	40	40	40	37	38
C2	99	99	99	99	99
V3	35	35	35	36	35
C3	51	52	53	53	52
V4	30	30	30	34	30
C4	40	40	40	40	42
V5	10	12	13	9	11
C5	45	45	45	45	40

Tabla 1.
Cantidad de residuos aminoacídicos en cada dominio de las proteínas Env.C5, C6, y C88
 C1, C2, C3, C4 y C5, dominios constantes de gp120; V1, V2, V3, V4 y V5, dominios variables de gp120.

Por otro lado, teniendo en cuenta el fenotipo de las proteínas Env C5, C6, y C88 respecto de la utilización de correceptor celular, determinado experimentalmente (ver punto 4 de Resultados), se alineó la región V3 de C5 con la de BaL, y las de C6 y C88 con la de NL4-3 (**Fig. 9**). Los dominios V3 de C5 y BaL muestran un 89% de similitud (**Fig. 9 A**), mientras que los de C6 y C88 con el de NL4-3 exhiben similitudes del 67% y 73%, respectivamente (**Fig. 9 B y C**). Cabe destacar que es el dominio V3 de la Env C6 el que mejor se ajusta a la regla “11/24/25” (Cardozo et al., 2007). Resulta interesante señalar que, a pesar que las cepas NL4-3 y BaL utilizan diferentes correceptores, sus dominios V3 exhiben un 85% de similitud (**Fig. 9 D**). En conjunto, estos resultados apoyan el concepto de que es necesario determinar experimentalmente el correceptor que la glicoproteína Env utiliza, y no basarse exclusivamente en la homología de secuencia aminoacídica entre la región V3 de la gp120 de un nuevo aislamiento y la de cepas de referencia con tropismo conocido.

```

V1NL4-3      CTDLK-----NDTNTNSSSSGRMIMEKGEIKNC
V1BaL        CTDLRNA-----TSRNVTNTTSSSRGMVGG-GEMKNC
V1C5         CTNA-----GIQNSNDTQSSILKEDP--GAIQNC
V1C6         CTPILN-----NATNNTQTSSTTQSSILKEDP--GAIQNC
V1C88        CTNATPILNATHTNATNGTQNSNDTQSSILKEDP--GAIQNC
              **                . . * **                * ::**

V2NL4-3      SFNISTSIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDN-DTTSYSLTSC
V2BaL        SFNITTGIRGKVQKEYALFYELDIVPIDN-KIDRYRLISC
V2C5         TFNMTTVVVKDKQKKVQALFYRLDLVPLNNSNETYRLIHC
V2C6         TFNVTTAVRDKQEKHEHALFYKLDLVPLSRGSNETFILIHC
V2C88        SFNMTTVVADKQQKVHALFYRLDIVPLNKGSNETYRLIHC
              :**::* : . * : * * : ** . ** : * : . . : * *

V3NL4-3      CTRPNNNTRKRIRIQRGPGR--FVTIGKIGNMRQAHC
V3BaL        CTRPNNNTRKS--INIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC
V3C5         CTRPNNNTRKG--IHIGPGRAFYATDGIIGDIRKAHC
V3C6         CTRP--NNRRQRR--IHIGPGRSFYTTKSIQDIRKAYC
V3C88        CTRPSNNRRLQR--IHIGPGRAFYTTGSIG--DIRKAYC
              **** * * * * : : **** : . * : : * : * : *

C4NL4-3      RIKQIINMWQKVKGAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGG
C4BaL        RIKQIINMWQEVGRAMYAPPIRGQIRCSSNITGLLLTRDGG
C4C5         KIKQIINMWQEVGRAMYAPPIEGNITCNLTITGLLLTRDGG
C4C6         KIKQIVNMWQEVGRAMYAPPIEGNITCNSNITGLLLTRDGG
C4C88        KIKQIVNMWQEVGRAMYAPPIEGNITCNSNITGLLLTRDGG
              :****:****:***:***** *:* * . *****
    
```

Figura 8. Alineamiento de las secuencias V1, V2, V3 y C4 de las proteínas Env C5, C6 y C88 con las regiones equivalentes de las cepas NL4-3 (X4-trópica) BaL (R5-trópica). El símbolo (*) denota las posiciones que poseen un único aminoácido altamente conservado, mientras que el símbolo (:) indica la conservación de grupos aminoácidos con propiedades muy similares. El símbolo (.) indica la conservación de grupos de aminoácidos con baja similitud entre sí.

A.

V3BaL CTRPNNNTRKSIINIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC
 V3C5 CTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYATDGIIGDIRKAHC
 *****:* *****:* ***** **

Identidad: 83%
 Similitud: 89%

B.

V3NL4-3 CTRPNNNTRKRIRIQRGPR-FVTIGKIG-NMRQAHC
 V3C6 CTRPNN--RRQRRIHIGPGRSFYTTKSIQGDIRKAYC
 ***** *: ** ***** * * * ::* * *

Identidad: 58%
 Similitud: 67%

C.

V3NL4-3 CTRPNNNTRKRIRIQRGPR-FVTIGKIGNMRQAHC
 V3C88 CTRPSNN-RRLQRIHIGPGRAFYTTGSIGDIRKAYC
 **** * * *: ** ***** * * * **::* * *

Identidad: 64%
 Similitud: 73%

D.

V3BaL CTRPNNNTRKSINI--GPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC
 V3NL4-3 CTRPNNNTRKRIRIQRGPR-FVTIG-KIGNMRQAHC
 ***** * * ***** * * * **::******

Identidad: 79%
 Similitud: 85%

Figura 9.

- A. Alineamiento de la región V3 de la glicoproteína Env C5 con la de la cepa BaL (R5-trópica)
- B. Alineamiento de la región V3 de la glicoproteína Env C6 con la de la cepa NL4-3 (X4-trópica)
- C. Alineamiento de la región V3 de la glicoproteína Env C88 con la de la cepa NL4-3 (X4-trópica)
- D. Alineamiento de la región V3 de las glicoproteínas Env de las dos cepas de referencia que exhiben diferente tropismo: BaL (R5) y NL4-3 (X4).

El símbolo (*) indica aminoácidos idénticos en ambas secuencias, mientras que el símbolo (:) denota aminoácidos similares en esa posición.

En rojo, se indican los residuos de carácter básico que se hallan en una o más de las posiciones que se ajustan a la regla "11/24/25". En azul, se indica el residuo de arginina en el dominio V3 de C88 que, en base al alineamiento, podría ajustarse a la regla "11/24/25"

Al establecer en las gp120 C5, C6, y C88 el número de sitios potenciales de N-glicosilación de (**Tabla 2**), se observó que solamente la gp120 de C6 presenta dos sitios menos que el resto de las glicoproteínas Env, incluyendo las de referencia.

Glicoproteína Env	Número de sitios potenciales de N-glicosilación en la subunidad gp120
C5	23
C6	21
C88	23
NL4-3	23
BaL.01	23

Tabla 2.
Determinación del número de sitios potenciales de N-glicosilación de las subunidades gp120 de las glicoproteínas Env C5, C6, y C88.

La secuencia consenso para un sitio de N-glicosilación es NXS/TX, donde N es asparagina, X es cualquier aminoácido excepto prolina, y la tercer posición, debe corresponder a una serina o a un residuo de treonina.

3. Análisis de la expresión y procesamiento de las glicoproteínas Env C5, C6 y C88

Para analizar la biosíntesis, el procesamiento y el transporte a la membrana plasmática de las glicoproteínas Env derivadas de las muestras del paciente, los genes *env* C5, C6, y C88 fueron clonados en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1 como se describe en Materiales y Métodos, ya que este plásmido lleva tanto las secuencias del promotor del citomegalovirus humano como las del promotor para la ARN polimerasa del fago T7 (**Fig. 6**). Los plásmidos generados, pcDNA-C5*env*, pcDNA-C6*env*, y pcDNA-C88*env*, fueron utilizados para transfectar células COS-7L, previamente infectadas con el virus vaccinia expresando la ARN polimerasa del fago T7. El plásmido codificando para la glicoproteína Env de HIV-1_{NL4-3} (construido en nuestro laboratorio) fue utilizado como control (Celma et al., 2001; Manrique et al., 2001).

A las 30 horas postransfección, las células se lisaron y los sobrenadantes de los cultivos se clarificaron por filtración a través de membranas con poro de 0,45 µm. En primer lugar, la presencia de Env en los lisados celulares se analizó por Western blot utilizando el MA b 2F5 dirigido contra el ectodominio de gp41. Como se muestra en la **Figura 10 A (panel superior)**, el precursor gp160 de las glicoproteínas Env C5, C6, y C88 se expresaron en niveles comparables a los del precursor Env de HIV-1_{NL4-3}. La detección de la subunidad gp41 demostró que los precursores gp160 C5, C6, y C88 se procesan eficientemente (**Fig. 10 A, panel inferior**).

Asimismo, se investigó la presencia de la subunidad gp120 en los sobrenadantes de los cultivos como medida no solo del transporte de las proteínas Env a la membrana plasmática sino también de la estabilidad de los complejos gp120-gp41 en la superficie celular. La utilidad de este tipo de análisis ya ha sido reportado por nuestro laboratorio (Affranchino & González, 2006; Celma et al., 2001; Manrique et al., 2001). Los niveles de las subunidades gp120 de los clones C5, C6, y C88 en los sobrenadantes fueron similares a los de NL4-3 (**Fig. 10 B**), lo que sugiere que las subunidades gp120 de las glicoproteínas Env

estudiadas se disocian del complejo gp120-gp41 en un grado comparable al de la proteína Env de NL4-3. Dado que los niveles de la subunidad gp41 de la glicoproteína Env C88 son inferiores a los esperados teniendo en cuenta los detectados para el precursor gp160 (Fig. 10 A) y para la subunidad gp120 (Fig. 10 B), se puede especular que la gp41 de este clon molecular exhibe cierto grado de inestabilidad.

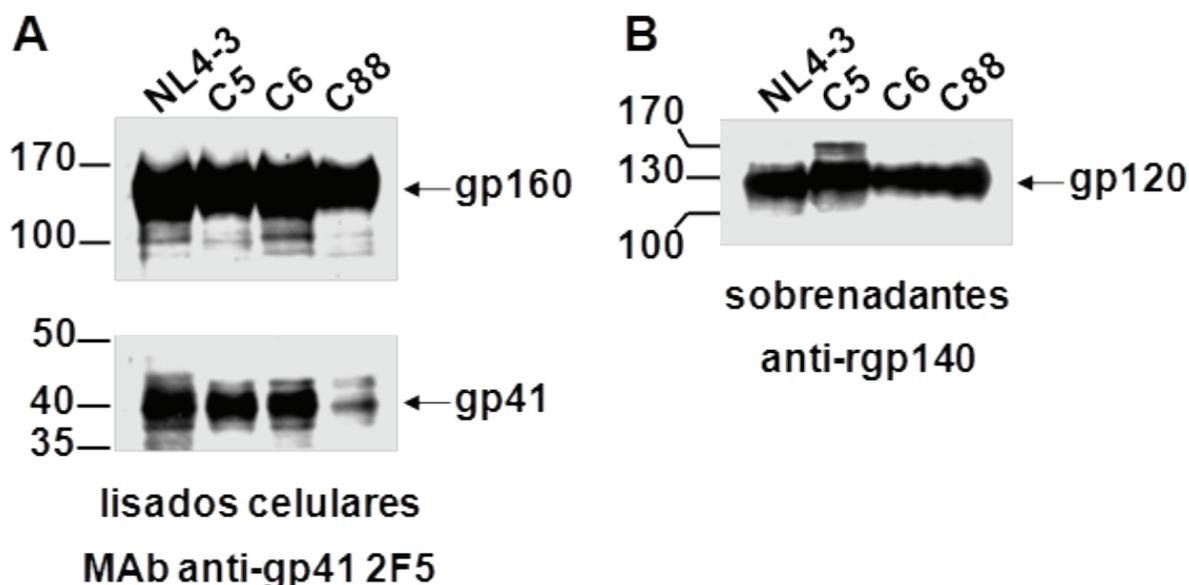


Figura 10.

Análisis de la biosíntesis y procesamiento de las glicoproteínas Env.

Células COS-7L, previamente infectadas con el virus vaccinia expresando la ARN polimerasa del fago T7, fueron transfectadas con los plásmidos pcDNA llevando los genes *env* de HIV-1_{NL4-3}, C5, C6, o C88 como se describe en Materiales y Métodos. A las 30 h postransfección, las células se lisaron y los niveles de expresión y procesamiento de las proteínas Env se determinaron por Western blot utilizando el MAb 2F5 dirigido contra el ectodominio de gp41 (A). La presencia de la subunidad gp120 en los medios de cultivo de las células transfectadas se analizó por Western blot con un anticuerpo policlonal específico de Env (B). Se indican las movilidades electroforéticas relativas del precursor Env gp160, de las subunidades gp120 y gp41, así como las de los marcadores de peso molecular.

4. Determinación de la utilización de correceptor celular

La interacción de la glicoproteína Env con el correceptor celular CCR5 o CXCR4 define el tropismo de HIV-1. En base al criterio de utilización de correceptor, los virus que se unen a CCR5 para entrar a sus células blanco son denominados R5, mientras que aquellos que utilizan el correceptor CXCR4 son clasificados como virus X4. Se han reportado también virus R5X4 duales, que son capaces de utilizar ambos correceptores (Berger, 1998)..

Para determinar el tropismo de las proteínas Env C5, C6, y C88, se evaluó la capacidad de los antagonistas de los correceptores CXCR4 y CCR5 (AMD3100 y maraviroc, respectivamente) de inhibir la actividad fusogénica de dichas glicoproteínas. Para ello, nos basamos en los ensayos de fusión célula-célula que utilizamos de manera rutinaria en el laboratorio para evaluar la capacidad fusogénica de diferentes glicoproteínas Env de SIV (Affranchino & González, 2006; Celma et al., 2004) y de FIV (Celma et al., 2007; González et al., 2012). Como primer paso, la glicoproteína Env cuya actividad biológica se desea analizar es coexpresada junto con la proteína Tat de HIV-1 en células 293T, y luego, una fracción de dichas células se agrega a cultivos de células TZM-bl. Las células indicadoras TZM-bl derivan de la línea celular HeLa, y, además de expresar altos niveles de CD4, CXCR4 y CCR5, llevan en su genoma el gen *lacZ* bajo el control del promotor LTR de HIV-1 (Wei et al., 2002). Si la glicoproteína Env presente en la superficie de las células 293T es capaz de unirse al complejo receptor-correceptor de las células TZM-bl y mediar la fusión de las membranas celulares, se generarán sincicios que resultarán de la fusión de las células 293T con las TZM-bl. La proteína Tat originalmente presente en las células 293T se unirá a la región LTR de HIV-1 de las células indicadoras, lo que resultará en la expresión de la β-galactosidasa, cuya actividad es luego detectada por tinción con el sustrato cromogénico X-Gal (Affranchino & González, 2006; Celma et al., 2004).

En los experimentos realizados, las células 293T coexpresando el ADN proviral HIV-1_{NL4-3} *env*- y las glicoproteínas Env C5, C6, C88, o las de referencia NL4-3 y BaL, se agregaron a las células indicadoras TZM-bl previamente tratadas con AMD3100 o maraviroc. Como control positivo y para evaluar la capacidad fusogénica de las glicoproteínas Env estudiadas, se realizaron en paralelo los mismos ensayos pero en ausencia de los antagonistas. A las 48 horas, los cocultivos se fijaron y se tiñeron con el sustrato cromogénico X-Gal. Finalmente, se contó el número total de sincicios azules obtenido en presencia de AMD3100 o de maraviroc refiriéndolo al número total obtenido en ausencia de los antagonistas. La **Figura 11** muestra un ejemplo de los sincicios que se visualizaron al realizar los ensayos, los cuales permiten evaluar de manera inequívoca la actividad fusogénica de las glicoproteínas Env de los aislamientos de HIV-1. La **Tabla 3** resume los resultados obtenidos al evaluar la utilización de correceptor celular: la fusión célula-célula mediada por las glicoproteínas Env C6 y C88 fue inhibida por AMD3100; en cambio, el compuesto maraviroc bloqueó la capacidad de la proteína Env C5 de formar sincicios. Esos datos permitieron concluir que las proteínas C6 y C88 son X4-trópicas, mientras que la proteína Env C5 es R5-trópica.

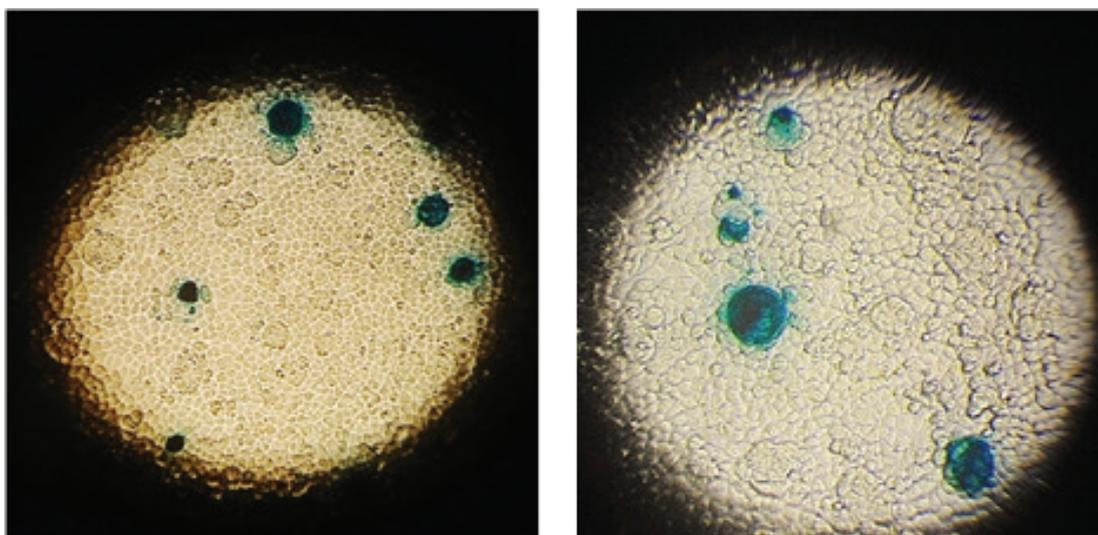


Figura 11. Visualización al microscopio óptico de los sincicios resultantes de los ensayos de infectividad de ciclo único y de capacidad fusogénica de las glicoproteínas Env.

Se muestran ejemplos de los sincicios que se observaron al microscopio óptico (400 x) al realizar los ensayos de infectividad de ciclo único y de capacidad fusogénica. Estos estudios permitieron evaluar la actividad biológica de las glicoproteínas Env de los aislamientos de HIV-1.

Glicoproteína Env	Inhibición de la fusión célula-célula en presencia de los antagonistas		Tropismo
	AMD3100	Maraviroc	
NL4-3	+	-	X4
C5	-	+	R5
C6	+	-	X4
C88	+	-	X4
BaL	-	+	R5

Tabla 3. Determinación *in vitro* de la utilización de correceptor celular. El tropismo de cada una de las glicoproteínas Env se estableció en base a la capacidad de los antagonistas de inhibir la actividad fusogénica de las mismas como se describe en Materiales y Métodos.

+, el agregado del antagonista (AMD3100 o maraviroc) inhibió >90% el número de sincicios con respecto a los ensayos realizados en ausencia del mismo.

-, el número de sincicios obtenido en presencia del antagonista (AMD3100 o maraviroc) fue similar al obtenido en ausencia del mismo.

Resulta interesante comparar los resultados obtenidos a partir de los ensayos funcionales (**Tabla 3**) para la identificación del correceptor celular que utiliza la gp120 de los aislamientos de HIV-1 con la información que proveen los programas informáticos que se utilizan para predecir el correceptor utilizado. Para ello se aplicó el programa *geno2pheno* (ver Materiales y Métodos) el cual, en base a la secuencia aminoacídica del dominio V3 de Env, proporciona la probabilidad de exhibir fenotipo X4. Se fija un valor de 1% para el parámetro *False Positive Rate* (FPR), de manera que si el FPR calculado por el programa para una dada secuencia V3 se aparta significativamente del 1%, el *geno2pheno* predice que es poco probable que esa glicoproteína Env exhiba fenotipo X4. Utilizando esta herramienta informática, observamos que tanto la glicoproteína Env C6 (**Fig. 12**) como la de la cepa patrón NL4-3 (**Fig. 13**), exhiben un FPR menor al 1%, lo que sugiere que ambas proteínas son X4-trópicas. En cambio, el dominio V3 de C88 presenta un FPR de 1,7%, el cual no es muy superior al valor de 1% fijado (**Fig. 14**). En este caso, si bien el programa *geno2pheno* predice que C88 utilizaría CCR5 como correceptor, el FPR obtenido no es lo suficientemente elevado como para aseverar inequívocamente el tropismo de esta glicoproteína. De hecho, experimentalmente, la unión de la gp120 C88 a las células TZM-bl fue inhibida por AMD3100 y no por maraviroc, indicando que la proteína Env C88 es X4-trópica (**Tabla 3**). En el caso de la glicoproteína C5, el FPR obtenido es del 10% (**Fig. 15**), lo que predice que esta proteína utilizaría a CCR5 como correceptor. Este dato concuerda con nuestros resultados experimentales (**Tabla 3**). Resulta interesante destacar que al aplicar el programa *geno2pheno* al dominio V3 de la gp120 de la cepa de referencia BaL, el FPR obtenido fue del 44,4% (**Fig. 16**). Este valor de FPR, que es muy superior al valor fijado de 1%, indica que la probabilidad de que BaL utilice a CCR5 es muy elevada. En conjunto, estos resultados muestran que si bien programas tales como el *geno2pheno* son de utilidad para predecir inicialmente el correceptor celular utilizado, son los ensayos funcionales los que identifican inequívocamente el tropismo viral.

geno2pheno®



Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.5)

I. General information

Patient:	Study Id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample IDs: V3C6	Predicted V3-subtype: B
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

Consensus CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTEIGDIRQAHC
 s B:
 Query: CTRPNNRRQRRIHIGPGRSFYTTKSIQGDIRKAYC

IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	The CXCR4-coreceptor can be used.	0.5%	The 11/25 rule would predict this sequence as an X4-virus.

The significance level was set to: 1% false positive rate

Figura 12. Predicción del coreceptor celular utilizado por la glicoproteína Env C6 utilizando el programa *geno2pheno*. FPR, False Positive Rate.

geno2pheno®



Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.5)

I. General information

Patient:	Study Id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample IDs: V3NL4-3	Predicted V3-subtype: B
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

Consensus CTRPNNTRKSIHI - - GPGRFYTTGEIIGDIRQAHC
 s B:
 Query: CTRPNNTRKRIRIQRGPGR - FVTIGKI - GNMRQAHC

IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	The CXCR4-coreceptor can be used.	0%	The 11/25 rule would predict this sequence as an X4-virus.

The significance level was set to: 1% false positive rate

Figura 13. Predicción del coreceptor celular utilizado por la glicoproteína Env NL-43 (cepa control X4) utilizando el programa *geno2pheno*.

geno2pheno®



Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.5)

I. General information

Patient:	Study Id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample IDs: V3C88	Predicted V3-subtype: B
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

Consensus CTRPNNNT - R K S I H I G P G R A F Y T T G E I I G D I R Q A H C
 s B:
 Query: CTRPSNNRRLQ **R** I H I G P G R A F Y T T G **S** I - G D I R K A Y C

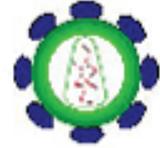
IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	Only the CCR5-coreceptor can be used.	1.7%	The 11/25 rule would predict this sequence as an X4-virus.

The significance level was set to: 1% false positive rate

Figura 14. Predicción del coreceptor celular utilizado por la glicoproteína Env C88 utilizando el programa *geno2pheno*.

geno2pheno®



Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.5)

I. General information

Patient:		Study Id:	
Birth date:		Viral load:	
Sample received:		Sample collected:	
Sample IDs:	V3C5	Predicted V3-subtype:	B
Sample type:		Report date:	
Physician:		Reported by:	

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

Consensus CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTGEIIGDIRQAHC
 s B:
 Query: CTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYATDGIIGDIRKAHC

IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	Only the CCR5-coreceptor can be used.	10.1%	

The significance level was set to: 1% false positive rate

Figura 15. Predicción del coreceptor celular utilizado por la glicoproteína Env C5 utilizando el programa *geno2pheno*.

geno2pheno®



Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.5)

I. General information

Patient:	Study Id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample IDs: V3BaL	Predicted V3-subtype: B
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

Consensus CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEEIIGDIRQAHC
 s B:
 Query: CTRPNNNTRKSIINIGPGRAFYTTGEEIIGDIRQAHC

IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	Only the CCR5-coreceptor can be used.	44.4%	

The significance level was set to: 1% false positive rate

Figura 16. Predicción del coreceptor celular utilizado por la glicoproteína Env BaL (cepa control R5) el programa *geno2pheno*.

5. Capacidad infectiva de pseudovirus llevando las glicoproteínas Env

Para analizar y comparar la capacidad infectiva que cada glicoproteína Env confiere a las partículas de HIV-1 se realizaron ensayos de infectividad de ciclo único como ya hemos descrito (Celma et al., 2001; Manrique et al., 2001). Para ello, se generaron pseudovirus llevando en su superficie las proteínas Env C5, C6 o C88 cotransfectando células 293T con el ADN proviral de HIV-1 defectivo en el gen *env* (pNL4-3*env*) y con cada uno de los plásmidos que expresan los clones *env* de los aislamientos del paciente. En paralelo, se realizó una cotransfección con el vector que dirige la síntesis de la proteína Env de HIV-1_{NL4-3}. A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes de los cultivos conteniendo los pseudovirus, normalizados tanto por actividad de TR como por concentración de la proteína p24, fueron utilizados para infectar las células indicadoras TZM-bl que luego se fijaron y tiñeron con X-Gal, como se

describe en Materiales y Métodos. La infectividad de los pseudovirus se determinó contando el número total de células azules al microscopio óptico y refiriendo estos valores a los obtenidos con el pseudovirus llevando la proteína Env de HIV-1_{NL4-3} (Fig. 17). En estas condiciones se obtuvieron 5.012 ± 323 células azules/ml de sobrenadante conteniendo pseudovirus llevando la proteína Env de HIV-1_{NL4-3}.

Los resultados obtenidos indican que la glicoproteína Env C5 es la que confiere a los viriones el mayor grado de infectividad. En efecto, los virus llevando la proteína Env C5 exhiben una infectividad que representa un $67,2 \pm 5,4\%$ respecto de la infectividad conferida por la proteína Env de HIV-1_{NL4-3} considerada como 100% (Fig. 17). En cambio, las capacidades infectivas de las proteínas Env C88 y C6 son $16,9 \pm 3,2\%$ y $13 \pm 0,5\%$, respectivamente, al compararlas con la de la glicoproteína Env de NL4-3 (Fig. 17).

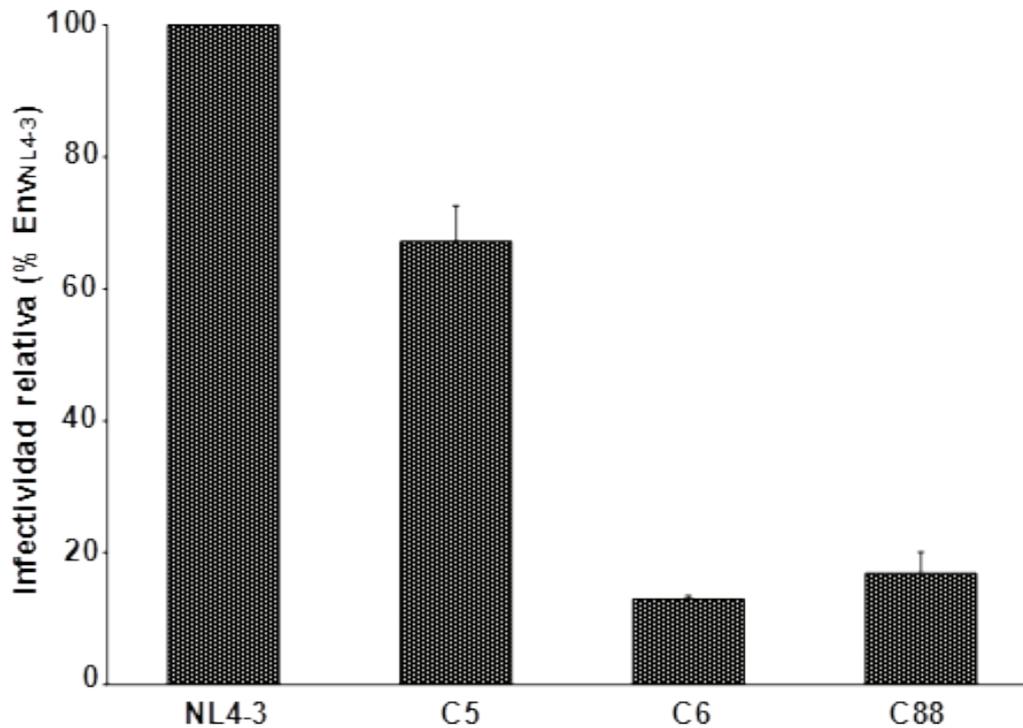


Figura 17. Análisis de la capacidad de las glicoproteínas Env C5, C6 y C88 de mediar la entrada viral utilizando ensayos de infectividad de ciclo único.

Células 293T fueron transfectadas con el ADN proviral defectivo pNL4-3env- junto con el plásmido que codifica para la glicoproteína Env_{NL4-3}, o con cada uno de los vectores que dirigen la expresión de las tres glicoproteínas Env del paciente (pcDNA-C5env; pcDNA-C6env; o pcDNA-C88env). A las 48 horas postransfección, los sobrenadantes de los cultivos conteniendo los pseudovirus, normalizados tanto por actividad de TR como por niveles de la proteína p24, fueron utilizados para infectar las células indicadoras TZM-bl como se explica en Materiales y Métodos. A los dos días posinfección, las células se fijaron y se tiñeron con el sustrato cromogénico X-Gal para luego contar el número total de células azules al microscopio óptico. La infectividad de los pseudovirus fue determinada contando el número total de células azules obtenido con cada gen env estudiado, y refiriéndolo al obtenido con los pseudovirus llevando la glicoproteína Env_{NL4-3} (considerado como 100%). Los datos representan el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

La transmisión de HIV-1 de madre a hijo es la vía primaria de infección pediátrica (WHO, 2012a, 2012b). A nivel global, más del 50% de los individuos infectados con HIV-1 son mujeres en edad fértil (WHO, 2012a). En ausencia de intervención terapéutica, HIV-1 es transmitido a más de un tercio de los niños que nacen de madres infectadas. El curso de la infección por HIV-1 en niños es diferente al de los adultos, no sólo en lo que respecta a los síntomas y signos clínicos, sino particularmente en lo que se refiere al tiempo de latencia hasta la progresión al SIDA (Chakraborty, 2005). Sin embargo, tal como ocurre en la infección por HIV-1 en adultos, la aparición de variantes X4 en niños infectados está asociada con la progresión de la enfermedad, pero es probable que esto no sea un factor causal dado que la mayoría de los niños infectados con HIV-1 que progresan rápidamente hacia la enfermedad presentan virus con fenotipo R5 (Chakraborty, 2005; Tiemessen & Kuhn, 2006).

El alto grado de variabilidad genética que exhibe el gen *env* de HIV-1 tiene un impacto directo sobre la estructura, las funciones biológicas, y la inmunogenicidad de gp160, lo cual representa un gran desafío en el campo del desarrollo de agentes antirretrovirales dirigidos a bloquear la entrada viral y en el del diseño de vacunas.

La Organización Mundial de la Salud y los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. (NIH) recomiendan actualmente que la evaluación no solo de vacunas sino también de compuestos inhibidores de la entrada viral se realice sobre un panel de referencia de pseudoviriones llevando en su superficie las glicoproteínas Env correspondientes a poblaciones de HIV-1 genética y geográficamente diversas. De esta forma, se contará con un panel de genes *env* que representen diferentes subtipos y genotipos (Seaman et al., 2010).

Recientemente, nuestro grupo recibió del Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan una serie de genes *env* obtenidos de muestras de un paciente infectado con HIV-1 por transmisión vertical (Rossi et al., 2011).

Para este trabajo de Tesina se seleccionaron tres genes *env* correspondientes a los 12 años (gen C88) y a los 19 años (genes C5 y C6) de edad del paciente con el objeto de investigar las propiedades biológicas de las glicoproteínas Env codificadas por estos genes. Para ello, se aprovechó la amplia experiencia de nuestro laboratorio en el estudio de las glicoproteínas retrovirales (para una revisión de los aportes de nuestro laboratorio a este tema, ver Affranchino & González, 2014). Cabe señalar que no se han estudiado aún funcionalmente las proteínas Env de las variantes virales que prevalecen en los niños infectados por HIV-1 en la Argentina. Habitualmente, se trabaja con muestras del paciente que consisten en una mezcla heterogénea de poblaciones virales en lugar de generar clones virales moleculares que representen a cada una de esas poblaciones o de clonar los diferentes genes *env* característicos de cada población viral. En este sentido, la caracterización detallada realizada en esta Tesina de las propiedades biológicas de las glicoproteínas Env codificadas por los genes *env* clonados a partir de muestras de un paciente representa un primer paso para la construcción en la Argentina de un panel funcional de genes *env* de HIV-1. Este panel será de gran utilidad para la evaluación de la eficacia de compuestos inhibidores de la entrada viral y de anticuerpos monoclonales específicos de Env con amplia capacidad neutralizante que se están desarrollando actualmente.

En primer lugar, establecimos que en cultivos celulares las glicoproteínas gp160 C5, C6 y C88 se expresan y procesan eficientemente en las subunidades gp120 y gp41. Además, encontramos que los complejos gp120-gp41 de C5, C6 y C88 presentes en la superficie celular muestran una estabilidad similar a la de la cepa NL4-3. Observamos, sin embargo, menores niveles intracelulares de la gp41 de C88, lo cual sugiere que esta subunidad exhibe un mayor grado de inestabilidad que el resto de las gp41 estudiadas.

Dado que la glicoproteína Env determina el tropismo de HIV-1 e influencia la patogénesis viral, identificamos luego el correceptor utilizado por cada una de las glicoproteínas Env derivadas de las muestras del paciente. Utilizando ensayos de fusión célula-célula en presencia de inhibidores específicos de la unión de la gp120 de HIV-1 a CCR5 o a CXCR4 pudimos establecer que mientras que la proteína C5 es R5-trópica, las glicoproteínas C6 y C88 emplean a CXCR4 como correceptor.

La importancia de los ensayos funcionales realizados para identificar el correceptor celular utilizado por las glicoproteínas de los virus del paciente se pone de manifiesto por el hecho de que uno de los programas informáticos más empleado para predecir el correceptor celular dio un resultado ambiguo para C88. En efecto, por un lado, sugería que la glicoproteína C88 exhibe una mayor probabilidad de utilizar CCR5 (aunque muy inferior a la de la cepa de referencia R5 BaL), pero por otro lado, indicaba que su región V3 se ajustaría a la regla "11/24/25" la cual es indicativa de fenotipo X4. Esta divergencia entre lo inequívocamente demostrado por métodos experimentales y lo sugerido por programas informáticos puede deberse a que estos últimos sólo tienen en cuenta la secuencia aminoacídica del dominio V3 de

gp120 y no la contribución de otras regiones de la proteína que pueden ejercer influencia sobre el proceso de entrada viral tales como V1, V2 y C4.

Finalmente, determinamos la capacidad de las glicoproteínas Env C5, C6 y C88 de conferir capacidad infectiva a viriones de HIV-1 defectivos en el gen *env*. Estos experimentos de infectividad de ciclo único demostraron que mientras que la glicoproteína C5 media la entrada viral con una eficiencia cercana al 70% respecto de la proteína Env de la cepa de referencia NL4-3, las proteínas C6 y C88 confieren a las partículas virales una infectividad menor al 20%. Estas diferencias pueden deberse a que la glicoproteína C5 se incorpora a la partícula viral con mayor eficiencia que la C6 o C88, lo que resulta en viriones que presentan en su superficie un mayor número de moléculas de Env, facilitándose así el proceso de entrada viral. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que la incorporación de la glicoproteína Env a los viriones resulta de una interacción específica entre el dominio MA de Gag y la región citoplasmática de gp41 (Affranchino & González, 2014; Celma et al., 2001; Manrique et al., 2001, 2003, 2008). Por lo tanto, se puede especular que el dominio citoplasmático de la gp41 de C5 podría contener motivos aminoácidos que facilitan la asociación de Env con las partículas virales que resultan del ensamblado de Gag. Alternativamente, la gp120 de C5 podría exhibir mayor afinidad o estabilidad de unión a CCR5 que la que presentan C6 y C88 por CXCR4.

En síntesis, hemos realizado la caracterización de las propiedades biológicas de tres glicoproteínas Env derivadas de muestras de un paciente infectado con HIV-1 por transmisión vertical. Esta es la primera vez que se describe en la Argentina un estudio de estas características utilizando genes *env* provenientes de poblaciones de HIV-1 de un paciente que fueron clonados en un plásmido que permitió la expresión y el análisis fenotípico de las diferentes glicoproteínas virales. Por otro lado, demostramos que mediante ensayos de fusión célula-célula y de infectividad de ciclo único se logra identificar el correceptor utilizado por el virus y determinar su capacidad infectiva.

Si bien resta todavía analizar varios genes *env* de HIV-1 obtenidos de muestras del paciente, nuestra intención es promover que este tipo de estudio se extienda a los laboratorios que realizan investigación sobre HIV-1 en la Argentina de manera que se concrete la creación de un panel de referencia de las glicoproteínas Env de las poblaciones de HIV-1 que circulan en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- Affranchino, J. L., González, S. A. (2006). *Mutations at the C-terminus of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein affect gp120-gp41 stability on virions*. *Virology* 347, 217-225.
- Affranchino, J. L., González, S. A. (2014). *Understanding the process of envelope glycoprotein incorporation into virions in simian and feline immunodeficiency viruses*. *Viruses* 6, 264-283.
- Allan, J. S., Coligan, J. E., Barin, F., McLane, M. F., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Lee, T. H., Essex, M. (1985). *Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III*. *Science* 228, 1091-1094.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science* 220, 868-871.
- Berger, E. A. (1998). *HIV entry and tropism. When one receptor is not enough*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 452, 151-157.
- Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., Weiss, R. A. (1998). *A new classification for HIV-1*. *Nature* 391, 240.
- Bernstein, H. B., Tucker, S. P., Hunter, E., Schutzbach, J. S., Compans, R. W. (1994). *Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is modified by O-linked oligosaccharides*. *Journal of Virology* 68, 463-468.
- Bieniasz, P. D. (2006). *Late budding domains and host proteins in enveloped virus release*. *Virology* 344, 55-63.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Bour, S., Strebel, K. (2003). *The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release*. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* 5, 1029-1039.
- Cao, J., Bergeron, L., Helseth, E., Thali, M., Repke, H., Sodroski, J. (1993). *Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein*. *Journal of Virology* 67, 2747-2755.
- Cardozo, T., Kimura, T., Philpott, S., Weiser, B., Burger, H., Zolla-Pazner, S. (2007). *Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop*. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23, 415-426.
- Celma, C. C. P., Manrique, J. M., Affranchino, J. L., Hunter, E., González, S. A. (2001). *Domains in the simian immunodeficiency virus gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into particles*. *Virology* 283, 253-261.
- Celma, C. C. P., Manrique, J. M., Hunter, E., Affranchino, J. L., González, S. A. (2004). *Second-site revertants of a simian immunodeficiency virus gp41 mutant defective in envelope glycoprotein incorporation*. *AIDS Research and Human Retroviruses* 20, 733-741.
- Celma, C. C. P., Paladino, M. G., González, S. A., Affranchino, J.L. (2007). *Importance of the short cytoplasmic domain of feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein for fusion Activity and envelope glycoprotein incorporation into virions*. *Virology* 366, 405-414.
- Checkley, M. A., Luttge, B. G., Freed, E. O. (2011). *HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation*. *Journal of Molecular Biology* 410, 582-608.

Coffin, J. M. (1992). *Genetic diversity and evolution of retroviruses*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 176, 143-164.

Connor, E. , McSherry, G. (1994). *Treatment of HIV infection in infancy*. *Clinics in Perinatology* 21, 163-177.

Cooper, E. R., Charurat, M., Mofenson, L., Hanson, I. C., Pitt, J., Diaz, C., Hayani, K., Handelsman, E., Smeriglio, V., Hoff, R., et al. (2002). *Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission*. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 29, 484-494.

Chakraborty, R. (2005). *HIV-1 infection in children: a clinical and immunologic overview*. *Current HIV Research* 3, 31-41.

Checkley, M. A., Luttgé, B. G., Freed, E. O. (2011). *HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation*. *Journal of Molecular Biology* 410, 582-608.

de Vincenzi, I. (1994). *A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners*. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV. *The New England Journal of Medicine* 331, 341-346.

Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., et al. (2005). *Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4721-4732.

Durán, A., Adaszko, A., Vila, M., Carrizo, E. (2011). *Situación de los niños, niñas y adolescentes con VIH en Argentina*, S.A.d.P. Ministerio de Salud de la Nación, OPS/OMS, ONUSIDA y UNICEF, ed. (Argentina).

Earl, P. L., Doms, R. W., Moss, B. (1990). *Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 648-652.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., Berger, E. A. (1996). *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science* 272, 872-877.

Foley B., Brian Foley, Leitner, T., Apetrei, C., Hahn, B., Mizrahi, I., Mullins, J., Rambaut, A., Wolinsky, S., Korber, B. (eds.) (2013). *HIV Sequence Compendium 2013*. Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics (Los Alamos, Nuevo México, E.E.U.U.).

Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F., Schuitemaker, H. (1992). *Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule*. *Journal of Virology* 66, 3183-3187.

Freed, E. O., Martin, M. A. (1995). *Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix*. *Journal of Virology* 69, 1984-1989.

Freed, E. O., Martin, M. A. (1996). *Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions*. *Journal of Virology* 70, 341-351.

Freed, E. O., Martin, M. A. (2007). *HIVs and Their Replication*. En "Virology", B.N. Fields, D.M. Knipe, P. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).

Fuerst, T. R., Earl, P. L., Moss, B. (1987). *Use of a hybrid vaccinia virus-T7 RNA polymerase system for expression of target genes*. *Molecular and Cellular Biology* 7, 2538-2544.

Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., et al. (1983). *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science* 220, 865-867.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., et al. (1999). *Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes**. *Nature* 397, 436-441.

Gao, F., Morrison, S. G., Robertson, D. L., Thornton, C. L., Craig, S., Karlsson, G., Sodroski, J., Morgado, M., Galvao-Castro, B., von Briesen, H., et al. (1996). *Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. The WHO and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization*. *Journal of Virology* 70, 1651-1667.

Goff, S. P. (2007). *Retroviridae: the retroviruses and their replication*. En "Virology", B. N. Fields, D. M. Knipe, P. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 1999–2069.

Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., Nibbs, R. J., Freedman, B. I., Quinones, M. P., Bamshad, M. J., et al. (2005). *The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility*. *Science* 307, 1434-1440.

González, S. A., Paladino, M. G., Affranchino, J. L. (2012). *Palmitoylation of the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein and its effect on fusion activity and envelope incorporation into virions*. *Virology* 428, 1-10.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., Saxon, A. (1981). *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. *The New England Journal of Medicine* 305, 1425-1431.

Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M., Kaptue, L. (1994). *A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon*. *Journal of Virology* 68, 1581-1585.

Holmes, D. S., Quigley, M. (1981). *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids*. *Analytical Biochemistry* 114, 193-197.

Jobes, D. V., Daoust, M., Nguyen, V., Padua, A., Michele, S., Lock, M. D., Chen, A., Sinangil, F., Berman, P. W. (2006). *High incidence of unusual cysteine variants in gp120 envelope proteins from early HIV type 1 infections from a Phase 3 vaccine efficacy trial*. *AIDS Research and Human Retroviruses* 22, 1014-1021.

Klasse, P. J. (2012). *The molecular basis of HIV entry*. *Cellular Microbiology* 14, 1183-1192.

Kogan, M., Rappaport, J. (2011). *HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention*. *Retrovirology* 8, 25.

Korber, B. (2000). *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains*. *Science* 288, 1789-1796.

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

Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., Hendrickson, W. A. (1998). *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. *Nature* 393, 648-659.

Landi, A., Iannucci, V., Nuffel, A. V., Meuwissen, P., Verhasselt, B. (2011). *One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef*. *Current HIV Research* 9, 496-504.

Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., Capon, D. J. (1987). *Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor*. *Cell* 50, 975-985.

Lavallée, C., Yao, X. J., Ladha, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. A., Cohen, E.A. (1994). *Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles*. *Journal of Virology* 68, 1926-1934.

Lee, K., Ambrose, Z., Martin, T. D., Oztop, I., Mulky, A., Julias, J. G., Vandegraaff, N., Baumann, J. G., Wang, R., Yuen, W., et al. (2010). *Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1*. *Cell Host & Microbe* 7, 221-233.

Lemey, P., Pybus, O. G., Rambaut, A., Drummond, A. J., Robertson, D. L., Roques, P., Worobey, M., Vandamme, A. M. (2004). *The molecular population genetics of HIV-1 group O*. *Genetics* 167, 1059-1068.

Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., Gregory, T. J. (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*. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 10373-10382.

Levesque, K., Finzi, A., Binette, J., Cohen, E. A. (2004). *Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection*. *Current HIV Research* 2, 51-59.

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

Leynaert, B., Downs, A. M., de Vincenzi, I. (1998). *Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: variability of infectivity throughout the course of infection*. *European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV*. *American Journal of Epidemiology* 148, 88-96.

Lu, M., Blacklow, S. C., Kim, P. S. (1995). *A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein*. *Nature Structural Biology* 2, 1075-1082.

Manrique, J. M., Celma, C. C., Affranchino, J. L., Hunter, E., González, S. A. (2001). *Small variations in the length of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein drastically affect envelope incorporation and virus entry*. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 1615-1624.

Manrique, J. M., Celma, C. C., Hunter, E., Affranchino, J. L., González, S. A. (2003). *Positive and negative modulation of virus infectivity and envelope glycoprotein incorporation into virions by amino acid substitutions at the N terminus of the simian immunodeficiency virus matrix protein*. *Journal of Virology* 77, 10881-10888.

Manrique, J. M., Affranchino, J. L., González, S. A. (2008). *In vitro binding of the simian immunodeficiency virus matrix protein to the cytoplasmic domain of the envelope glycoprotein*. *Virology* 373, 273-279.

Masciotra, S., Owen, S. M., Rudolph, D., Yang, C., Wang, B., Saksena, N., Spira, T., Dhawan, S., Lal, R. B. (2002). *Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression*. *AIDS* 16, 1887-1898.

Menten, P., Wuyts, A., Van Damme, J. (2002). *Macrophage inflammatory protein-1*. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, 455-481.

Michel, N., Ganter, K., Venzke, S., Bitzegeio, J., Fackler, O. T., Keppler, O. T. (2006). *The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galphai signaling*. *Molecular Biology of the Cell* 17, 3578-3590.

- Miller, M. D., Farnet, C. M., Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology* 71, 5382-5390.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W., Klenk, H. D. (1999). *Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface*. *Virus Research* 60, 55-65.
- Murakami, T., Freed, E. O. (2000). *Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail*. *Journal of Virology* 74, 3548-3554.
- Ngemu, E. K., Khayeka-Wandabwa, C., Kweka, E. J., Choge, J. K., Anino, E., Oyoo-Okoth, E. (2014). *Effectiveness of option B highly active antiretroviral therapy (HAART) prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) in pregnant HIV women*. *BMC Research Notes*.7:52.
- Nolan, K. M., Jordan, A. ., Hoxie, J. A. (2008). *Effects of partial deletions within the human immunodeficiency virus type 1 V3 loop on coreceptor tropism and sensitivity to entry inhibitors*. *Journal of Virology* 82, 664-673.
- Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W., Sodroski, J. (1990). *Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding*. *Journal of Virology* 64, 5701-5707.
- Palmer, C., Balfe, P., Fox, D., May, J. C., Frederiksson, R., Fenyo, E. M., McKeating, J. A. (1996). *Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1*. *Virology* 220, 436-449.
- Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koulagna, D., et al. (2002). *Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat*. *Emerging Infectious Diseases* 8, 451-457.
- Pinter, A., Honnen, W. J., Tilley, S. A., Bona, C., Zaghouni, H., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. (1989). *Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1*. *Journal of Virology* 63, 2674-2679.
- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Leme, V., Damond, F., Robertson, D. L., Simon, F. (2009). *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. *Nature Medicine* 15, 871-872.
- Pollakis, G., Abebe, A., Kliphuis, A., Chalaby, M. I., Bakker, M., Mengistu, Y., Brouwer, M., Goudsmit, J., Schuitemaker, H., Paxton, W. A. (2004). *Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals*. *Journal of Virology* 78, 2841-2852.
- Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A., et al. (1994). *A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1*. *AIDS Research and Human Retroviruses* 10, 1651-1658.
- Raуди, M. L., Mac Donald, C. L., Affranchino, J. L., González, S. A. (2011). *Mapping of the self-interaction domains in the simian immunodeficiency virus Gag polyprotein*. *AIDS Research and Human Retroviruses* 27, 303-316.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. (1998). *A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding*. *Science* 280, 1949-1953.
- Rossi, A. H., Crudeli, C., Rocco, C., Mangano, A., Sen, L., Aulicino, P. (2011). *Estudio longitudinal del gen env de HIV-1 en subpoblaciones virales con diferente tropismo*. *Revista Argentina de Microbiología* 43 (Supl. 1), 43.
- Ruiz, A., Guatelli, J. C., Stephens, E. B. (2010). *The Vpu protein: new concepts in virus release and CD4 down-modulation*. *Current HIV Research* 8, 240-252.

Seaman, M. S., Janes, H., Hawkins, N., Grandpre, L. E., Devoy, C., Giri, A., Coffey, R. T., Harris, L., Wood, B., Daniels, M. G., Bhattacharya, T., Lapedes, A., Polonis, V. R., McCutchan, F. E., Gilbert, P. B., Self, S. G., Korber, B. T., Montefiori, D. C., Mascola, J. R.. (2010). *Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 Env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies*. Journal of Virology 84, 1439-1452.

Shalekoff, S., Gray, G. E., Tiemessen, C. T. (2004). *Age-related changes in expression of CXCR4 and CCR5 on peripheral blood leukocytes from uninfected infants born to human immunodeficiency virus type 1-infected mothers*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 11, 229-234.

Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., Malim, M. H. (2002). *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature 418, 646-650.

Shetty, A. K. (2013). *Epidemiology of HIV infection in women and children: a global perspective*. Current HIV Research 11, 81-92.

Shioda, T., Oka, S., Ida, S., Nokihara, K., Toriyoshi, H., Mori, S., Takebe, Y., Kimura, S., Shimada, K., Nagai, Y., et al. (1994). *A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of the human immunodeficiency virus type 1 env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus*. Journal of Virology 68, 7689-7696.

Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., et al. (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.

Sundquist, W. I., Kräusslich, H. G. (2012). *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2, a006924.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research 22, 4673-4680.

Tiemessen, C. T., Kuhn, L. (2006). *Immune pathogenesis of pediatric HIV-1 infection*. Current HIV/AIDS Reports 3, 13-19.

UNAIDS (2012). *UNAIDS Report on the global AIDS epidemic* (Suiza).

Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptue, L., Gurtler, L. G., McArthur, C. P., Devare, S. G., et al. (2010). *Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low*. AIDS Research and Human Retroviruses 26, 109-115.

Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptue, L., Ndembi, N., Gurtler, L., et al. (2011). *Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon*. Journal of Virology 85, 1403-1407.

Vermund, S. H., Leigh-Brown, A. J. (2012).. *The HIV Epidemic: High-Income Countries*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2:a007195.

Vittinghoff, E., Douglas, J., Judson, F., McKirnan, D., MacQueen, K., Buchbinder, S.P. (1999). *Per-contact risk of human immunodeficiency virus transmission between male sexual partners*. American Journal of Epidemiology 150, 306-311.

Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979). *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 615-619.

Wei, X., Decker, J. M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R. B., Kilby, J. M., Saag, M. S., Wu, X., Shaw, G. M., Kappes, J. C. (2002). *Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46, 1896-1905.

WHO (2002). *Strategic approaches to the prevention of HIV infection in infants: report of a WHO meeting* (Suiza), pp. 20-22.

WHO (2012a). *Global monitoring framework and strategy for the global plan towards the elimination of new HIV infections among children by 2015 and keeping their mothers alive*. (Ginebra: WHO).

WHO (2012b). *Use of antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants* (Ginebra: WHO).

WHO & UNAIDS (2004). *National guide to monitoring and evaluating programmes for the prevention of HIV in infants and young children* (Francia).

Wiley, R. L., Rutledge, R. A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C. E., Martin, M. A. (1986). *Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5038-5042.

Wolf, D., Goff, S. P. (2008). *Host restriction factors blocking retroviral replication*. *Annual Review of Genetics* 42, 143-163.

Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J. J., Kabongo, J. M., Kalengayi, R. M., Van Marck, E., *et al.* (2008). *Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960*. *Nature* 455, 661-664.

Wyma, D. J., Kotov, A., Aiken, C. (2000). *Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles*. *Journal of Virology* 74, 9381–9387.

Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C., Gao, L. (2003). *The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA*. *Nature* 424, 94-98.

Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A., Roux, K. H. (2003). *Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 15812–15817.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., Roux, K. H. (2006). *Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes*. *Nature* 441, 847-852.

Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R., *et al.* (2001). *Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41*. *Journal of Virology* 75, 10892-10905.