

*Rev Biomed 2000; 11:61-71.*

## ***La importancia de la Secuencia Terminal Repetida Larga (LTR) en la patogenia del virus de la inmunodeficiencia humana.***

**Revisión**

Raúl Gómez-Román, Carmen Soler-Claudín.

Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

### **RESUMEN.**

La región terminal repetida larga (LTR) del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana funciona como un sitio de control y regulación de la transcripción viral. Pese a que el LTR no codifica proteínas estructurales o accesorias, su función está íntimamente ligada a la replicación viral en respuesta a mitógenos, citocinas e incluso a estímulos generados por agentes infecciosos oportunistas. En esta revisión, se describe la función del LTR en la replicación viral *in vitro* y su importancia en la patogenia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. (*Rev Biomed 2000; 11:61-71*)

**Palabras Clave:** Secuencia Terminal Repetida Larga, SIDA, virus de la inmunodeficiencia humana, retrovirus, patogenesis.

### **ABSTRACT.**

**The importance of the long repeated terminal sequence (LTR) in the pathogeny of the human**

### **immunodeficiency virus.**

The Long Terminal Repeat (LTR) of the human immunodeficiency virus genome functions as an essential site for the control of viral transcription. Although the LTR does not codify either structural or accessory proteins, its function is intimately linked to viral replication in response to mitogens, cytokines and even other stimuli generated by opportunistic infectious agents. This revision attempts to describe the *in vitro* function of the LTR in viral replication and its importance in the pathogenesis of the acquired immunodeficiency syndrome. (*Rev Biomed 2000; 11:61-71*)

**Key Words:** Long Terminal Repeat, AIDS, human immunodeficiency virus, retroviruses, pathogenesis.

### **Introducción.**

El agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es el virus de la

Solicitud de sobretiros: M.C. Raúl Gómez-Román. Unidad de Investigación en Retrovirus Humanos, Prol. Carpio 470, Edif. Anexo, 2° Piso, Col. Casco de Sto. Tomás, C.P. 11340, México, D.F. Tel. (5) 396-9932 Fax: (5) 341-9629 E-mail: vraulgom@hotmail.com  
Recibido el 1/Marzo/1999. Aceptado para publicación el 8/Julio/1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb001117.pdf>

**Vol. 11/No. 1/Enero-Marzo, 2000**

inmunodeficiencia humana (HIV), un lentivirus que pertenece a la familia *Retroviridae*. Tanto la morfología como el ciclo de replicación del HIV-1 han sido estudiados y descritos ampliamente (1-3). El virus mide aproximadamente 120 nM de diámetro y como superficie tiene una envoltura bilipídica que contiene las glicoproteínas virales gp41 y gp120. Dos hebras idénticas de RNA le sirven al virus de genoma; éstas se encuentran recluidas en la cápside viral junto con la transcriptasa reversa y la proteasa viral. Al infectar una célula susceptible, posterior a los eventos de fusión y penetración (4), el virus se desnuda eliminando su envoltura y deposita su genoma viral de RNA en el citoplasma de la célula huésped. La transcriptasa reversa viral, codificada por el gen *pol*, se activa y produce DNA viral de doble cadena utilizando el RNA como molde. De tal forma, se genera un complejo de pre-integración, compuesto por el DNA viral de doble cadena asociado a tres proteínas virales: p17 (matriz viral), vpr (una proteína accesoria) y p32 (la integrasa viral). Por medio de un proceso que requiere adenintrifosfato (ATP), el complejo de pre-integración se transloca al núcleo de la célula huésped, en donde p32 cataliza la integración del DNA viral al genoma cromosomal de la célula en sitios aleatorios. Se produce, entonces, lo que se define como un provirus del HIV-1 (figura 1).

Una de las propiedades del provirus del HIV-1 es que la secuencia terminal repetida larga (LTR,

*Long Terminal Repeat*) es redundante, repitiéndose en los extremos 5' y 3'. Los LTR funcionan como un punto focal en donde se controla la replicación viral. Aunque ambos LTR son idénticos en secuencia, el 5' LTR está involucrado en los procesos de inicio y regulación de la transcripción viral, mientras que el 3' LTR funciona en procesos post-transcripcionales, tales como la poliadenilación y la edición de transcritos virales. Es importante destacar que el 3' LTR traslapa con el gen *nef*, comparando una secuencia que se denomina *nef*-LTR.

La presente revisión se enfoca en cuatro áreas principales de investigación en torno a la función del LTR: organización y función *in vitro* del LTR, el efecto de las citocinas y mitógenos sobre la actividad del LTR, el efecto de los patógenos oportunistas en la transcripción viral vía el LTR y el efecto de mutaciones del LTR en la replicación viral *in vivo*.

#### Organización y función *in vitro* del HIV-1 LTR.

Experimentos basados en mutagénesis de clonas del HIV-1 han resultado en la definición de tres componentes principales del LTR (5). Estos son las regiones U3, R, y U5, tal como se muestran en la figura 2. El inicio de la transcripción y el proceso de encapuchamiento (*capping*) ocurren en el borde entre la región U3 y la región R; a este sitio se le llama el "sitio +1". Generalmente, la región entera de R-U5 se transcribe y se incorpora como una secuencia líder de RNA en todos los transcritos virales.

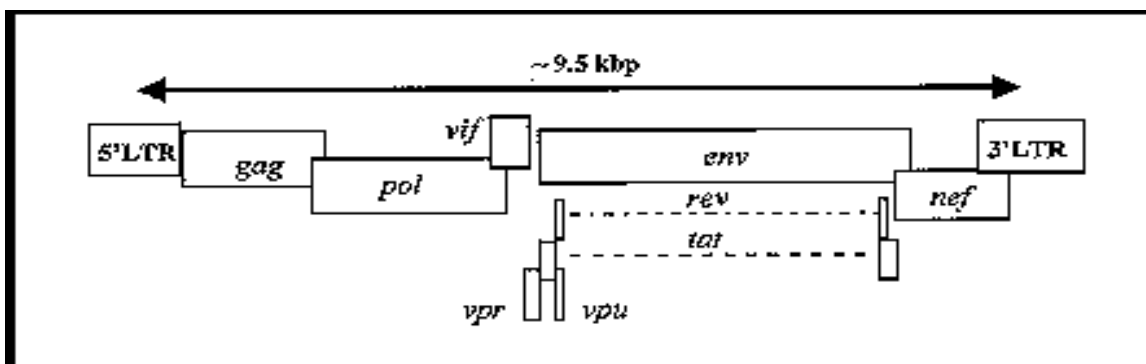
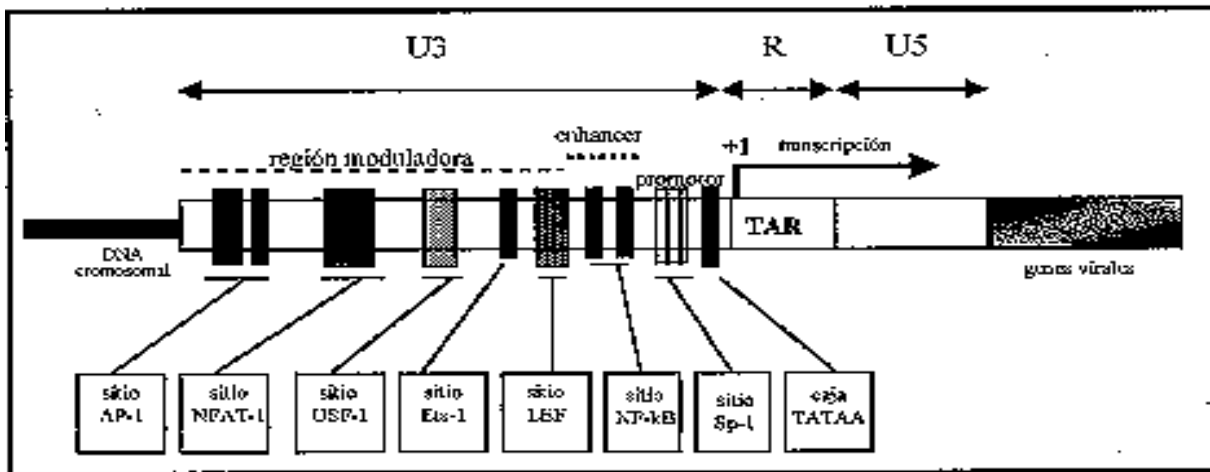


Figura 1.- Representación esquemática del provirus del HIV-1. Los genes estructurales y regulatorios se encuentran entre dos secuencias idénticas del LTR. El 3' LTR traslapa con el gen *nef*.

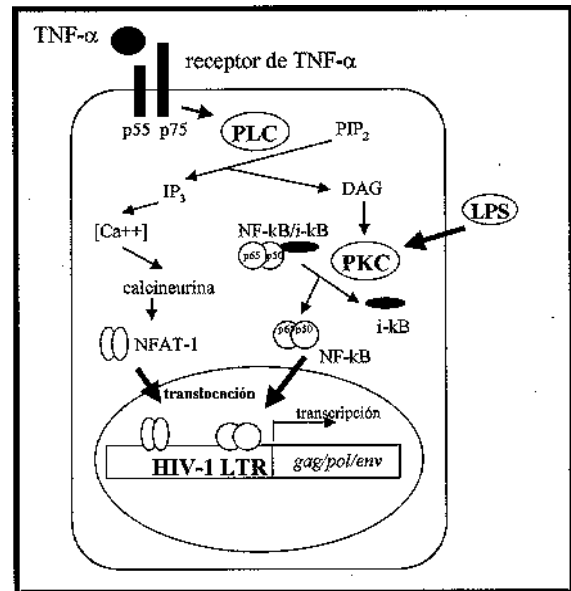
*Secuencia Terminal Repetida Larga (LRT) del VIH.*



**Figura 2.- Organización genómica del HIV-1 LTR.** Se observan las regiones U3, R y U5. Dentro de U3, existen secuencias conservadas que sirven como sitios de unión a factores de transcripción.

Esta secuencia líder de RNA contiene el elemento de respuesta a la *trans*-activación (TAR), cuya estructura secundaria estabiliza los complejos de iniciación y elongación transcripcional (1).

La región U3 es la más extensa dentro del HIV-1 LTR. U3 se subdivide en otras tres regiones: (i) el promotor, (ii) la región aumentadora (*enhancer*) y (iii) la región moduladora. La región promotora dirige a la RNA-polimerasa celular en el proceso de la transcripción basal de los genes virales; el promotor contiene la caja TATA y los sitios de unión a Sp-1, el factor celular ubicuo de transcripción. Adyacente a la región promotora, se encuentra la región de elementos aumentadores, la cual se encarga de la transcripción inducible de los genes virales. Esta región contiene una duplicación de 10 pares de bases (GGACTTTC), comúnmente llamada "el sitio NF-kB" (*nuclear factor kappa B*) y participa en la transcripción viral en respuesta a mitógenos, citocinas, señales de activación y otros estímulos inmunológicos. Finalmente, la región moduladora se encarga de la transcripción regulada. Esta región contiene múltiples secuencias en *cis* que sirven como sitios de unión a diversos factores celulares tales como AP-1, NFAT-1, USF-1, LEF-1 y Ets-1, entre otros. Normalmente, tanto en macrófagos como en linfocitos T no infectados, todos estos factores de transcripción se unen a promotores cromosomales que regulan el desarrollo



**Figura 3.- El TNF- $\alpha$  induce la activación de la transcripción del HIV-1 en macrófagos y monocitos infectados.** Al unirse a su ligando, el receptor del TNF- $\alpha$  activa la fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la formación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacil-glicerol (DAG) [16]. El IP<sub>3</sub> induce un incremento en la concentración total de calcio intracelular, lo cual activa la calcineurina, una fosfatasa que a su vez desfosforila a NFAT-1. Por otro lado, el DAG activa la protein-quinasa C (PKC), la cual libera al NF-kB de su inhibidor (i-kB) [17]. Finalmente, tanto el factor NF-kB así como el NFAT-1 se translocan al núcleo de la célula infectada y se unen al HIV-1 LTR, activando así la transcripción de genes virales o reporteros [18]. Efectos similares se han observado en respuesta al lipopolisacárido (LPS) ó a mitógenos que activan el HIV-1 LTR en células monocíticas [19].

**Cuadro 1**  
**Diversos factores celulares de transcripción se unen a varias secuencias en *cis* dentro de la región U3 del HIV-1 LTR.**

Factor celular de transcripción	Secuencia a la que se une*	Función normal en linfocitos T ó macrófagos no infectados	Función <i>in vitro</i> relacionada a la transcripción del HIV-1	Ref.
AP-1 (Activator Protein-1)	TGACTCA	Indispensable para la diferenciación de linfocitos T y macrófagos.	Incrementa la transcripción viral en respuesta a la IL-10 y al TNF- $\alpha$ en células linfocíticas infectadas.	[6]
NFAT-1 (Nuclear Factor of Activated T cells)	GGAGAA	Incrementa la transcripción de IL-2 en el linfocito T como respuesta a los mitógenos y al anticuerpo anti-CD3.	Los linfocitos T CD8+ inhiben la transcripción viral mediante mecanismos que involucran los sitios NFAT-1.	[7]
USF (Upstream Stimulatory Factor)	CACGTG	Dobla el DNA, compite con la cromatina y expone regiones promotoras esenciales para la transcripción.	¿Incrementa la transcripción viral? : USF dobla la región LTR al pegarse.	[8]
		Facilita la transcripción del gen Fc $\gamma$ RIII en macrófagos.	¿Inhibe la transcripción viral? : deleciones en la región USF incrementan la transcripción a partir del LTR.	[9]
ETS (Erythroblastoma Twenty Six)	GGAA	Esencial en la diferenciación de timocitos. Regula la transcripción de IL-3, GM-CSF y la cadena alfa del receptor de la IL-2	ETS1 y ETS2 activan e incrementan la transcripción a partir del HIV-LTR.	[10]
LEF-1 ó TCF-1 $\alpha$ (Lymphoid Enhancer-binding Factor ó T-Cell Factor-1 $\alpha$ )	AACAAAG	Indispensable para la transcripción de los genes que codifican el TCR.	La cromatina reprime la transcripción a partir del LTR, pero este efecto se inhibe al añadir LEF-1.	[11, 12]

\* Secuencia a la que se une el factor de transcripción: Las secuencias son un ejemplo de evolución *convergente*, ya que se encuentran tanto en promotores de genes humanos como en el LTR del virus.

celular, la expresión de receptores y diversas funciones efectoras inmunes. En el cuadro 1, se identifican los factores de transcripción que se unen a la región U3. Se señala su función en células no infectadas del sistema inmune y su papel en la transcripción del HIV-1 en células infectadas.

### Efectos de las citocinas y mitógenos en la actividad del LTR.

Cuando se aisló el HIV-1 por vez primera, se observó que la interleucina-2 (IL-2) incrementaba la replicación del virus en linfocitos T (13). Esta fue la primera observación en indicar que las citocinas influían en la replicación del HIV-1 *in*

*vitro*. De hecho, se ha demostrado que la IL-2 ejerce efectos mitogénicos que no solo provocan la linfoproliferación sino que también incrementan la transcripción del HIV-1 mediante NFAT-1 y TCF-1 $\alpha$  vía el LTR (14). Estudios aún más recientes señalan que otras citocinas también son capaces de modular la replicación del HIV-1 a partir del LTR. Estas incluyen: (i) las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- $\alpha$  (15) (ii) las citocinas tipo Th1 como la IL-2 y el IFN- $\gamma$ , (iii) las citocinas tipo Th2 como la IL-4 y la IL-10 y (iv) las citocinas que inducen diferenciación, como el GM-CSF (ver revisiones en 14 y 15). Los mecanismos precisos de regulación transcripcional aún se desconocen, pero

*Secuencia Terminal Repetida Larga (LRT) del VIH.*

**Cuadro 2**

**Diversos agentes infecciosos oportunistas modulan la transcripción del HIV-1 a partir del LTR.**

Clasificación	Patógeno oportunista	Mecanismo de modulación del HIV-1 LTR	Referencias
BACTERIAS	<i>Mycobacterium tuberculosis (Mtb)</i>	La fagocitosis activa la transcripción viral a partir del sitio NF-kB mediante un mecanismo <i>independiente</i> de TNF $\alpha$ .	[29]
		El PPD, así como micobacterias muertas por calor, también activa la transcripción viral a partir del sitio NF-kB, pero mediante un mecanismo TNF $\alpha$ - <i>dependiente</i> .	[30]
VIRUS	Citomegalovirus (CMV)	Las proteínas IE-1 e IE-2 del CMV activan la región promotora del HIV-1 en fibroblastos, en linfocitos T y en células gliales.	[31-33]
		Sin embargo, al coinfectar fibroblastos o células gliales con CMV y HIV-1, se inhibe la replicación del HIV.	[34]
	Virus Epstein Barr, (EBV)	El antígeno nuclear-2 del EBV activa la transcripción del HIV-1 a partir del sitio NF-kB en linfocitos B.	[35]
	Virus del Herpes- 6, (HHV-6)	La proteína Orf-1 del HHV-6 activa la transcripción del HIV-1 directamente a partir de la caja TATAA e independientemente de los sitios Sp-1.	[36]
HONGOS	<i>C. albicans</i> <i>C. neoformans</i>	<i>SE DESCONOCE</i>	
PROTOZOA	<i>T. gondii</i> <i>P. carinii</i>	<i>SE DESCONOCE</i>	

hay datos suficientes que sugieren que estas citocinas regulan la replicación del HIV-1 mediante la transducción de señales que desembocan en la activación del LTR. Uno de los modelos mejor definidos a la fecha es el de la regulación de la transcripción viral mediante TNF- $\alpha$  (16-19)]. Este modelo se describe en la figura 3. El TNF- dispara la activación de la fosfolipasa C, resultando en una serie de eventos que culminan en la translocación de factores celulares al núcleo. La unión de NFAT-1 y NF-kB al "enhancer" del HIV-1 LTR induce la transcripción de genes virales (o genes reporteros) (16).

La observación de que algunas citocinas estimulan la transcripción viral mediante el LTR ha resultado en la hipótesis de que algunas otras citocinas pudiesen reprimir la replicación del HIV-1 también utilizando el LTR. En efecto, se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ liberan un factor soluble y no citotóxico que inhibe la transcripción del virus en linfocitos T CD4+ sin lisar las células infectadas (20, 21). A tal factor (o conjun-

to de factores) se le conoce como CAF (*CD8+ Antiviral Factor*), y a pesar de que no se le ha podido identificar ni aislar, se sabe que actúa mediante el LTR (7, 20). En un principio, se postuló que CAF no era mas que el conjunto de tres beta-quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES) (22); sin embargo, los datos actuales sugieren que CAF es diferente a tales quimiocinas (23), sobretodo porque CAF actúa a partir del LTR y las quimiocinas no. Por ello, se cree que se trata de una citocina aún desconocida cuyos beneficios terapéuticos serían importantes.

Algunos proponen que la interleucina-16 (IL-16) podría ser CAF (24); no obstante, anticuerpos específicos contra IL-16 no bloquean el efecto supresor que ejercen los linfocitos T CD8+ sobre la transcripción viral (21). En otros estudios, se demostró que los mismos sobrenadantes de linfocitos T CD8+ que inhibían la transcripción del HIV-1 en linfocitos T ejercían un efecto inverso en macrófagos infectados, ya que incrementaban la transcripción viral a partir del LTR (25). Obviamente,

esta área de investigación en torno a CAF aún requiere experimentación sustancial, pero es evidente que la región LTR juega un papel importante en su función.

### **Efecto de los patógenos oportunistas en la transcripción viral vía el LTR.**

Frecuentemente, en los pacientes que portan el HIV-1, se manifiestan infecciones oportunistas cuando el paciente infectado cuenta con niveles bajos de linfocitos T CD4+ (< 200 células/μL de sangre). Por razones desconocidas, tales infecciones oportunistas incrementan la carga viral del HIV-1 en el paciente infectado (26-28), deteriorando así su cuadro clínico y culminando en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. El LTR del HIV-1 pudiese estar involucrado en este proceso de patogenia, ya que varios agentes infecciosos oportunistas activan la transcripción de genes virales por medio del LTR *in vitro* (29-36). Tal como se muestra en el cuadro 2, estos agentes infecciosos, de suma importancia epidemiológica en pacientes con SIDA, incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y el Citomegalovirus, entre otros. Lamentablemente, esta área de investigación de cofactores oportunistas que activan el LTR se ha enfocado en infecciones bacterianas y virales, aún cuando las infecciones sistémicas por hongos y por parásitos también representan un riesgo importante de muerte en pacientes infectados con el HIV-1.

Existen tres posibles mecanismos mediante los cuales estos agentes infecciosos oportunistas pueden modular la replicación del HIV-1 mediante el LTR:

**1-. *In situ*.** Si a una misma célula la coinfectan tanto el HIV-1 como el patógeno oportunista, es posible que este último active o reprima la transcripción viral directamente. Como ejemplos, se pueden considerar la activación del LTR en macrófagos coinfectados con HIV-1 y *Mycobacterium tuberculosis* (29), así como la inhibición de la transcripción viral en fibroblastos coinfectados con HIV-1 y el Citomegalovirus (34).

**2-. Vía secreciones.** Los patógenos oportunistas

excretan diversas sustancias tóxicas en el medio extracelular. Estas sustancias, a su vez, pueden activar o reprimir la transcripción viral. Tal es el caso de los lipopolisacáridos (LPS) excretados por bacterias Gram-negativas (19), así como factores que se encuentran en el derivado proteico purificado de las micobacterias (PPD, protein purified derivative) (30). En este rubro, es muy importante señalar que, previo a cualquier experimento donde se pretenda examinar la función de un factor sobre el LTR, debe primero demostrarse que tal factor es puro y no contiene LPS u otras sustancias contaminantes que interfieran en la interpretación de los resultados.

**3-. Vía modulación del microambiente celular.** Por último, al interactuar con diversas células del sistema inmune, los patógenos oportunistas inducen la producción y secreción de citocinas en el medio extracelular. A su vez, tales citocinas, como se ha visto anteriormente (cuadro 1), pueden afectar la activación del LTR si se encuentran adyacentes a las células infectadas por el HIV-1.

A pesar de que estos tres mecanismos no son necesariamente excluyentes el uno del otro, resulta indispensable realizar experimentos que esclarezcan la participación de cada uno de ellos en la patogenia del HIV-1. El uso de filtros semipermeables podría ser útil en esta área de investigación, ya que se podrían cultivar las células infectadas con el HIV-1 de un lado del filtro y observar los efectos de los patógenos oportunistas cocultivados en el mismo medio pero del otro lado del filtro. De tal modo, por ejemplo, se definiría si las infecciones oportunistas locales y sistémicas activan directa o indirectamente la transcripción del HIV-1 mediante el LTR.

### **Efecto de las mutaciones del LTR en la replicación viral *in vivo*.**

Gran parte de la secuencia del LTR traslapa con el gen viral *nef* (ver figura 1), el cual también juega un papel importante en la patogenia del SIDA. Este gen viral codifica un polipéptido de-

### Secuencia Terminal Repetida Larga (LRT) del VIH.

nominado Nef de 25-30 kDa que se expresa como una de las proteínas tempranas en los ciclos de replicación del HIV-1 y del SIV (Virus de la Inmunodeficiencia del Simio). Nef es indispensable para establecer altos niveles de carga viral en monos Rhesus (37), lo cual sugiere que juega un papel clave en la patogenia del SIDA. *In vitro*, varios péptidos de Nef se unen a las proteínas p56<sup>lck</sup> y MAPK de las células mononucleares periféricas (38), lo cual indica que la patogenicidad de Nef radica, en parte, en su capacidad de interferir con la maquinaria de activación de los linfocitos T (39). Los ratones transgénicos que expresan el gen *nef* manifiestan una inmunodeficiencia muy severa (40) al igual que alteraciones en la activación de sus linfocitos T (41), lo cual confirma que Nef es verdaderamente inmunosupresora *in vivo*. Nef también inhibe la expresión del receptor CD4 en linfocitos T (42) y la expresión de MHC en células presentadoras de antígeno (43). Todas estas observaciones, junto con el antecedente de la vacuna oral atenuada contra el poliovirus, han apoyado la idea de diseñar una vacuna con un HIV-1 "vivo" pero atenuado (i.e. con deleciones múltiples) en la región *nef*. La fabricación de este tipo de vacunas ya se llevó a cabo por medio de ingeniería genética del SIV; actualmente se está inoculando la misma a monos Rhesus como modelo animal preliminar (44). Los datos preliminares sugieren que tal vacuna es útil en monos adultos, aunque no funciona en monos neonatos.

Es muy probable, sin embargo, que *nef* no sea el único gen que pueda atenuarse por ingeniería genética. Mutagénesis de la región LTR también puede servir para fabricar una vacuna atenuada del HIV-1 con fines terapéuticos, de prevención o simplemente de investigación. De hecho, en Australia se han detectado casos de pacientes "progresores lentos" infectados con cepas del HIV-1 atenuadas en la región *nef*-LTR. Se trata de un grupo de siete pacientes que se infectaron con el HIV-1 al transfundirles sangre contaminada de un mismo donador infectado (45). Lo sorprendente de este caso es que, tanto el donador como los

pacientes transfundidos, aún permanecen en estado asintomático, con carga viral baja y con niveles estables de linfocitos T CD4+ a más de 15 años de haberse infectado (46). Al analizar el genoma de los virus de estos pacientes, se encontraron deleciones en dos porciones del LTR, la primera de 120 pb y la segunda de 86 pb (47). Estas deleciones eliminan los sitios de unión a los factores de transcripción NFAT-1, USF-1 y TCF-1 $\alpha$ . También se observó una duplicación y unrearrreglo de los sitios de unión a NF-kB. Curiosamente, estas deleciones no solo se observaron en el 3' LTR sino que también se presentaron en el extremo 5' LTR del genoma proviral. Por ello, Deacon y col. concluyen que la atenuación de las cepas virales halladas en los pacientes australianos no solo se debe a las deleciones en *nef*, sino también a aquellas que ocurren en los LTR. Deleciones similares en la secuencia *nef*-LTR se han observado en los HIV-1 que portan algunos "progresores lentos" de Nueva York (48) y en los SIV que portan algunos monos Rhesus que no desarrollan SIDA (37, 44, 49).

Es importante señalar, sin embargo, dos observaciones particulares. En primer lugar, que tales mutaciones y deleciones en la región *nef*-LTR no se han observado en otras poblaciones de "progresores lentos" (50-52). En México, por ejemplo, aún no hemos observado deleción alguna en la región *nef*-LTR de un progresor lento estudiado a lo largo de cuatro años (53), aunque sí hemos detectado varias mutaciones puntuales en la misma región.

En segundo lugar, también debe señalarse que resulta muy difícil interpretar si las mutaciones o deleciones que se detectan en el LTR realmente son significativas o si la secuencia corresponde a un virus "atenuado". En gran parte, esto se debe a que, de por sí, el HIV-1 muta frecuentemente. Además, aún no se cuenta con una buena base de datos para comparar y analizar secuencias del LTR, ya que ésta es la región proviral que menos se ha secuenciado a la fecha, quizás porque no codifica proteínas virales. De tal modo que aún no se sabe qué tan frecuentemente podrían encontrarse

deleciones en el LTR de los virus patogénicos “silvestres” que circulan en la población infectada. En este rubro, surge entonces la necesidad de proyectos masivos de epidemiología molecular que examinen el fondo (*background*) de variabilidad genómica de la región *nef*-LTR a nivel global: para poder interpretar la secuencia de los virus que portan los progresores lentos, será un prerequisite contar con un buen número de secuencias de los virus que portan los pacientes infectados que desarrollen síntomas asociados al SIDA.

Por otro lado, existen ensayos de biología molecular que determinan si las mutaciones en *nef*-LTR afectan la transcripción viral. Tales son los típicos ensayos de transactivación: primero se fabrica un plásmido en el cual algún gen reportero ( $\beta$ -gal, por ejemplo) es clonado en el extremo 3' del LTR (el promotor del HIV-1). Al transfectar células con este plásmido, y al proporcionar los factores de transcripción necesarios, la secuencia LTR dirige la transcripción del gen reportero y la subsecuente expresión de  $\beta$ -galactosidasa, a menos de que la misma secuencia tenga deleciones o mutaciones que afecten su función biológica como promotor. Así, se ha observado que algunas mutaciones en la caja TATA, sorprendentemente, no afectan la función *in vitro* del LTR, mientras que otras mutaciones lejanas a la caja TATA impiden el proceso normal de transcripción (52). Tales mutaciones podrían tomarse en cuenta en el diseño de vacunas atenuadas mediante ingeniería genética, como se mencionó anteriormente.

Por lo pronto, la teoría actual es que, aunque existan cepas atenuadas del HIV-1, éstas no son el único factor que contribuye a la larga sobrevivencia de los progresores lentos asintomáticos. Otros posibles factores no son virales sino propios del hospedero (54-55). Estos incluyen: altos títulos de anticuerpos que neutralizan al virus, linfocitos T CD8+ que son fuertemente citotóxicos en contra de células infectadas y algunos haplotipos de HLA, entre otros.

### **Perspectivas.**

En síntesis, a lo largo de los últimos cinco años, se han estructurado tres áreas principales de investigación básica en torno a la función de la secuencia *nef*-LTR en la patogenia del HIV-1:

1. El efecto de las citocinas sobre la actividad del LTR.
2. El efecto de patógenos oportunistas en la transcripción viral vía el LTR.
3. El efecto de mutaciones y deleciones de la secuencia *nef*-LTR en la replicación viral *in vivo*.

En lo que refiere a las primeras dos áreas de investigación, se ha observado que los resultados frecuentemente varían según el sistema de estudio. Resulta interesante, por ejemplo, que el factor soluble CAF inhiba la replicación del HIV-1 en linfocitos T (20-21) y la active en monocitos (25). Por ello, será necesario tener en cuenta que los efectos de las citocinas y patógenos sobre la transcripción viral son relativos y no absolutos. Así mismo, los experimentos que se realicen en un futuro tendrán que descartar la posibilidad de que impurezas como el LPS desvíen la interpretación de los resultados. También será indispensable adoptar sistemas que se apeguen más a la patogenia real del virus y el patógeno oportunista (i.e. explorar el efecto del *Mycobacterium tuberculosis* en la replicación del HIV-1 en macrófagos alveolares coinfectados con ambos patógenos).

Por otro lado, aún cuando concluimos que las mutaciones y deleciones de la región *nef*-LTR no son el único factor que contribuye a la larga sobrevivencia, es indispensable sistematizar la clonación y la secuenciación de esta región del virus en todos los pacientes progresores lentos que se logren identificar a nivel global. En ellos se pueden encontrar peculiaridades importantes del virus. Una extensa base de datos de secuencia de los virus que portan estos pacientes puede utilizarse en un futuro para el diseño de vacunas atenuadas con fines de investigación y de profilaxis.



## *Secuencia Terminal Repetida Larga (LRT) del VIH.*

### REFERENCIAS.

1. Luciw PA. Human Immunodeficiency Viruses and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ed. *Virology*. 3a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1881-952.
2. Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. 2a ed. Washington: American Society for Microbiology Press; 1998. p. 1-14.
3. Garnier L, Bowzard JB, Wills JW. Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *AIDS* 1998; 12 (Supl A):S5-S16.
4. Wain-Hobson S. One on one meets two. *Nature* 1996; 384:117-8.
5. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willen R, Rabson A *et al.* Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986; 59:284-91.
6. Finnegan A, Roebuck KA, Nakai BE, Gu DS, Rabbi MF, Song S, *et al.* IL-10 cooperates with TNF-alpha to activate HIV-1 from latently and acutely infected cells of monocyte/macrophage lineage. *J Immunol* 1996; 156: 841-51.
7. Copeland KF, McKay PJ, KL Rosenthal. Suppression of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is dependent on the NFAT-1 element. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:143-8.
8. di-Fagagna FD, Marzio G, Gutierrez MI, Kang LY, Falaschi A, Giacca M. Molecular and functional interactions of transcription factor USF with the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1995; 69:2765-75.
9. Lu YC, Touzjian N, Stenzel M, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990; 64:5226-29.
10. Seth A, Hodge DR, Thompson DM, Robinson L, Panayiotakis A, Watson DK, *et al.* ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:1017-23.
11. Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grossheld R, Wright PE. Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature* 1995; 376:791-5.
12. Sheridan PL, Sheline CT, Cannon K, Voz ML, Pazin MJ, Kadonaga JT, *et al.* Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro. *Genes Dev* 1995; 9:2090-104.
13. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-71.
14. Poli G, AS Fauci. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:191-97.
15. Kumar S, Orsini MJ, Lee JC, McDonnell PC, Debouck C, Young PR. Activation of the HIV-1 Long Terminal Repeat by cytokines and environmental stress requires an active CSBP/p38 MAP Kinase. *J Biol Chem* 1996; 271:30864-69.
16. Kruppa G, Thoma B, Machleidt T, Wiegmann K, Kronke M. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated NF-kB activation by selective blockade of the human 55-kDa TNF receptor. *J Immunol* 1992; 148:3152-7.
17. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kB by phosphorylation of its inhibitor I-kB. *Nature* 1990; 344:678.
18. Vlach J, Pitta PM. Activation of human immunodeficiency virus type-1 provirus in T cells and macrophages is associated with induction of inducer-specific NF-kB binding proteins. *Virology* 1992; 187:63-72.
19. Pomerantz RJ, Feinberg MB, Trono D, Baltimore D. Lipopolysaccharide is a potent monocyte/macrophage-specific stimulator of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J Exp Med* 1990; 172:253-61.
20. Mackewicz CE, Blackburn DJ, Levy J. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:2308-13.
21. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 1996; 17:217-21.
22. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1, and MIP-1 as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270:1811-14.

**R Gómez-Román, C Soler-Claudín.**

23. Mackewicz CE, Barker E, Greco G, Reyes-Teran G, Levy JA. Do  $\alpha$ -chemokines have a clinical relevance in HIV infection? *J Clin Invest* 1997; 100:921-30.
24. Maciaszek JW, Parada NA, Cruikshank WW, Center DM, Kornfeld H, Vigilanti GA. IL-16 represses HIV-1 Promoter Activity. *J Immunol* 1997; 158:5-8.
25. Copeland KF, Leith JG, McKay PJ, Rosenthal KL. CD8<sup>+</sup> T cell supernatants of HIV type 1-infected individuals have opposite effects on long terminal repeat-mediated transcription in T cells and monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:71-7.
26. Webster A, Lee CA, Cook DG, Grundy JE, Emery VC, Kernoff PB, *et al.* Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1989; ii:63-6.
27. Mole L, Ripich S, Margolis D, Holodniy M. The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* 1997; 176:766-70.
28. Whalen C, Horsburgh CR, Hom D, Lahart C, Simberkoff M, Ellner J. Accelerated course of HIV infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:129-35.
29. Shattock RJ, Friedland JS, Griffin GE. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* modulates human immunodeficiency virus replication in human monocytic cells. *J Gen Virol* 1994; 75:849-56.
30. Lederman MM, Geroges DL, Kusner DJ, Mudido P, Giam CZ, Toossi Z. *Mycobacterium tuberculosis* and its Purified Protein Derivative Activate Expression of the Human Immunodeficiency Virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7:727-33.
31. Biegalka BJ, Geballe AP. Sequence requirements for activation of the HIV-1 LTR by Human Cytomegalovirus. *Virology* 1991; 381-85.
32. Ghazal P, Young J, Giulietti E, DeMattei C, Garcia J, Gaynor R *et al.* A Discrete cis Element in the Human Immunodeficiency Virus Long Terminal Repeat mediates synergistic trans activation by cytomegalovirus Immediate-Early Proteins. *J Virol* 1991; 65:6735-42.
33. Ho WZ, Song L, Douglas SD. Human Cytomegalovirus infection and trans-activation of HIV-1 LTR in human brain-derived cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4:1098-106.
34. Koval V, Clark C, Vaishnav M, Spector SA, Spector DH. Human Cytomegalovirus inhibits Human Immunodeficiency Virus replication in Cells productively infected by both viruses. *J Virol* 1991; 65:6969-78.
35. Scala G, Quinto I, Ruocco MR, Mallardo M, Ambrosino C, Squitieri B, Tassone P. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 transactivates the Long Terminal Repeat of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 1993; 67:2853-61.
36. Kashanchi F, Thompson J, Sadaie MR, Doniger J, Duvall J, Brady JN *et al.* Transcriptional activation of minimal HIV-1 promoter by ORF-1 Protein expressed from the Sal I-L Fragment of Human Herpesvirus 6. *Virology* 1994; 201:95-106.
37. Kestler HW, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD *et al.* Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991; 65:651-62.
38. Greenway A, Azaad A, McPhee D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein Inhibits Activation Pathways in Peripheral Blood Mononuclear Cells and T-Cell Lines. *J Virol* 1995; 69:1842-50.
39. Greenway A, Azaad A, Mills J, McPhee D. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Binds Directly to Lck and Mitogen-Activated Protein Kinase, Inhibiting Kinase Activity. *J Virol* 1996; 70:6701-08.
40. Lindemann D, Wilhelm R, Renard P, Althage A, Zinkemagel R, Mous J. Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus type 1 NEF/3'-long terminal repeat transgene. *J Exp Med* 1994; 179:797.
41. Skowronski J, Parks D, Mariani R. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J* 1993; 12:703-13.
42. García JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991; 350:508-11.
43. Schwartz O, Marechal V, LeGall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Med* 1996; 2:338-42.
44. Johnson RP, Glickman RL, Yang JQ, Kaur A, Dion JT, Mulligan MJ *et al.* Induction of vigorous cytotoxic T-

---

*Secuencia Terminal Repetida Larga (LRT) del VIH.*

- lymphocyte responses by live attenuated simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1997; 71:7711-8.
45. Learmont J, Tindall B, Evans L, Cunningham A, Cunningham P, Wells J *et al.* Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* 1992; 340:863-7.
46. Learmont J, Cook L, Dunckley H *et al.* Update on Long-Term Symptomless HIV Type 1 Infection in Recipients of Blood Products from a Single Donor. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:1-2.
47. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Monting M, Hooker DJ *et al.* Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients. *Science* 1995; 270:988-91.
48. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JJ, Desrosiers RC. Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with non-progressive HIV-1 infection. *N Eng J Med* 1995; 332:228-32.
49. Kirchoff F, Kestler HW III, Desrosiers RC. Upstream U3 sequences in simian immunodeficiency virus are selectively deleted in vivo in the absence of an intact nef gene. *J Virol* 1994; 68:2031-37.
50. Huang Y, Zhang L, Ho D. Characterization of nef sequences in long-term survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 1995; 69:93-100.
51. Huang Y, Zhang L, Ho D. Biological Characterization of nef in long-term survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 1995; 69:8142-6.
52. Zhang L, Huang Y, Yuan H, Chen BK, Ip J, Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of long terminal Repeat Sequences from long-term survivors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* 1997; 71:5608-13.
53. Gómez Román VR, Basualdo Sigales MC, Soler Claudin C. Diversity of HIV-1 Long-Terminal Repeat sequences derived from Mexican donors at different stages of infection. En: Abdool Karim Q, Abdullah AS, Abeyewickreme I, Abrams J, Abrams DI, Abrams EJ, editores. 12th World AIDS Conference Record; 1998 Jun 28-Jul 3; Geneva, Switzerland. Amsterdam: Marathon Multimedia, 1998.
54. Levy JA. HIV Pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 1993; 7:1401-10.
55. Westby M, Manca F, Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996; 17:120-6.