

# **Etiopatogenia y progreso de la enfermedad en la infección por VIH**

R. Nájera e I. Nájera\*

*Jefe del Área de Investigación en Retrovirus.*

*Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus.*

*Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.*

*\* Wellcome Research Laboratories. Beckenham. U.K.*

Durante los últimos meses se han producido una serie de avances, tanto en el entendimiento del propio virus en sí, como de los mecanismos etiopatogénicos, especialmente importantes para el entendimiento de la dinámica viral y las resistencias a los antirretrovirales, lo que va a condicionar el progreso de la enfermedad.

## **1. Enzimas celulares y posibilidades terapéuticas**

En 1994, Franke y cols. y Thali y cols. (1,2) describieron que la enzima celular ciclofilina se incorpora específicamente y en grandes cantidades en el virión y que la interacción entre esta proteína y las de la cápside es esencial para la formación de viriones infecciosos. En el comentario a estos trabajos, Cullen y Heitman (3) se preguntan, ¿dónde actúa la ciclofilina A, en el ciclo de replicación del VIH-1? y ¿cómo ejerce su acción?. Parece que actuaría a nivel de la morfogénesis, aunque su ausencia no impide la salida de viriones. Podría también actuar sobre las fases iniciales del ciclo de replicación viral

facilitando cambios conformacionales de la proteína de la cápside que son necesarios para el desnudamiento viral. La incorporación de la ciclofilina A necesita de un pequeño fragmento de la proteína de la cápside del VIH-1 que contiene cuatro residuos de prolina, bien conservados en los aislados de VIH-1. Uno de estos residuos, en la posición 222 es necesario tanto para la incorporación de la ciclofilina en los viriones como para la infectividad de éstos.

Con respecto al mecanismo de acción de la ciclofilina, parece que cataliza la isomerización “trans” a “cis” de un enlace peptidil-prolil, posiblemente el que precede al residuo Pro 222 de Gag, relacionado con algún aspecto de la función de la cápside. Otra posibilidad es que la ciclofilina actúe como una verdadera chaperona, independientemente de su acción como una isomerasa de prolina.

Rosenwirth y cols. (1995), (4) proponen que la interacción entre Gag y CyA se establecería a través de la inducción de un cambio conformacional de p24 por la CyA contenida en el partícula, que haría la eliminación de la p24 del complejo preintegración, permitiendo la penetración en el núcleo de este complejo. Un dato de gran interés es que la ciclofilina se incorpora, como hemos visto, de forma específica a los viriones de VIH-1, pero no a los de otros virus de la inmunodeficiencia de primates, lo que deja planteada y no respondida la pregunta, ciertamente intrigante de qué hace al VIH-1 único entre los retrovirus, para necesitar esta ayuda de la célula huésped.

Como consecuencia de este descubrimiento y dado que la ciclofilina es la diana de la acción inmunosupresora de la ciclosporina A, se ha pensado que esta sustancia, o mejor, un análogo de ella sin acción inmunosupresora, podría al inhibir la ciclofilina, ser útil como antiviral anti-VIH-1. Sin embargo, se vislumbran una serie de inconvenientes posibles, dado que la concentración para inhibir la replicación del virus, bloquea la capacidad enzimática de la ciclofilina y la inhibición mantenida de la actividad isomerasa de prolina producirá una toxicidad significativa. Por otra parte, y dado que otros virus muy relacionados, como el SIV no necesitan ciclofilina para la producción de virus infeccioso, parece probable que el VIH-1 pueda mutar a formas resistentes a ciclofilina A.

Sin embargo, Weber y Galpin (1995), (5), describen un paciente VIH+ al que se le administró ciclosporina A (CyA), debido a una artropatía psoriásica dentro de un psoriasis pustular generalizado, aún pensando en la posibilidad de que se produjera un progreso en la infección por VUH, debido a la acción inmunosupresora de la CyA. Por el contrario, experimentó una mejoría clínica extraordinaria con una reducción de la carga viral del 84%, y por el con-

trario, una caída del número de CD4+ de 960 a 530, volviendo a los parámetros iniciales cuando se discontinuó el tratamiento y volviendo a controlarse cuando fue reiniciado.

CyA inhibe la activación de la célula T, lo que en el caso referido, apoyaría la importancia *in vivo* de la activación T para permitir la replicación del VIH, explicando la acción antiviral de CyA a través de la eliminación de la célula diana.

Muy recientemente Bartz y cols. (1995), (6), describen la inhibición de la replicación del VIH por análogos de ciclosporina A, no inmunosupresores, lo que les acercaría aún más como base para una posible terapia antirretroviral.

Por otra parte, acaba también de describirse, por Takahashi y cols. (1995), (7), la incorporación en el virión de otra enzima celular, la topoisomerasa I, (topo I) ya que su actividad se ha detectado en viriones purificados e inhibidores de la misma pueden inhibir la replicación viral *in vitro*. La topo I aumenta la transcripción inversa *in vitro* y ésta puede inhibirse por el inhibidor específico de la topo I, camptotecina. Todo ello indica que la topo I celular juega un papel importante en la transcripción inversa del RNA del VIH-1 y por tanto en la replicación viral.

La idea fundamental para intentar actuar sobre enzimas celulares es que al ser su base genética DNA, su variabilidad es mucho menor y por tanto, el desarrollo de mutantes de escape, esto es, el desarrollo de resistencias frente al medicamento usado, serán considerablemente menores.

La hidroxiurea (HDU) actúa sobre otra enzima celular, la ribonucleótido reductasa inhibiendo la síntesis de ADN y por tanto el VIH-1. Es una droga bien conocida y aplicada al tratamiento de tumores humanos, especialmente a la leucemia mieloide crónica y a otros síndromes mieloproliferativos, donde se administran dosis altas, del orden de 500 mg/m<sup>2</sup> cada 4 horas.

Se ha descrito recientemente que reduciendo el contenido intracelular de los dNTP's, la HDU inhibe la síntesis del ADN del VIH-1, produciéndose menor cantidad de ADN viral así como muchas cadenas incompletas. De la misma forma se ha comprobado su acción sobre el virus de la leucemia murina de Moloney; *in vitro* retrasa la difusión del virus.

Por otra parte, la disminución de la cantidad de dNTP's celulares aumenta la utilización de los análogos de nucleósidos aumentando el efecto de estos compuestos, como en el caso del ddI de forma sinérgica.

Los efectos de la HDU los han probado en células humanas primarias y con dos virus muy distantes, lo que permite esperar que el efecto pueda observarse frente a cualquier cepa. Por otra parte lo han hecho también sobre

linfocitos de pacientes, donde han observado un efecto aún más pronunciado tanto de la HDU sola, como de la combinación con ddI. En macrófagos se ha observado también el efecto inhibitor de la HDU hasta varias semanas después de discontinuar el tratamiento. Así, 45 días después de suspender el tratamiento, se encontró menos de 1 copia de ADN viral por 1.000 células, en contraste con 1 copia al menos por célula en las no tratadas.

Las posibilidades terapéuticas ofrecen varias ventajas:

1) las propiedades de la droga son bien conocidas ya que se ha usado durante más de 30 años.

2) La droga es extremadamente difusible, penetrando en todos los tejidos, incluyendo el sistema nervioso central.

3) El daño cerebral inducido por el VIH-1 parece mediado por la replicación del virus en macrófagos, los cuales son extremadamente sensibles al efecto antiviral de la HDU, lo cual hace pensar que la HDU sería eficaz en el tratamiento de las manifestaciones neurológicas del SIDA.

4) la HDU posee una toxicidad media y no produce inmunosupresión, representando la mielotoxicidad el factor limitante de la dosis, pero es fácilmente reversible disminuyendo la dosis o suspendiendo el tratamiento, pudiendo hacer el seguimiento de los pacientes con tecnología sencilla como el recuento celular en sangre periférica. La toxicidad es grave sólo cuando se usa a dosis altas, como las empleadas en el tratamiento de las leucemias. En los experimentos realizados las dosis eran del orden de 10 a 100 veces menores, y en combinación con ddI inhibían por completo la replicación del VIH-1.

5) La HDU no inhibe el VIH-1 directamente, sino a través de su acción sobre la enzima celular ribonucleótido reductasa, por lo que dada la escasísima presencia de mutaciones en los genes que codifican por las enzimas celulares, se puede esperar que las resistencias a la HDU sean considerablemente menores que las que se presentan con los antirretrovirales conocidos. De la misma manera, es esperable que las resistencias a los antirretrovirales se reduzcan cuando estas drogas se usen en combinación con la HDU, dado el efecto sinérgico de ambas drogas y que la selección de mutantes se favorece por la replicación viral.

## 2. Nuevos datos sobre “nef”

Inicialmente se consideró a este gen como un regulador negativo, capaz de suprimir la replicación viral y la activación transcripcional de la LTR, ayudando así a mantener la latencia. Por el contrario, actualmente se ha des-

critico que ejerce un efecto positivo sobre la tasa de replicación del VIH-1 en cultivos de células mononucleares de sangre periférica así como en ciertas líneas de células T. Por otra parte, se ha comprobado que disminuye la expresión de CD4 a nivel de la superficie celular y que bloquea la inducción de interleuquina-2 (IL-2).

Goldsmith y cols. (1995), (8) han logrado disociar la función reguladora negativa de CD4+, del incremento en la infecciosidad viral, por lo que ambos procesos pueden ser independientes uno de otro en el ciclo de replicación viral.

La disminución de la expresión de CD4, produce su rápida endocitosis y degradación en endosomas tempranos, según han descrito Schwartz et al (9), pudiendo conferir resistencia a la super-infección.

No obstante, Poulin et al. (10) han descrito recientemente la capacidad del gen "nef" en un sistema experimental, para producir un efecto inhibitor sobre la síntesis de proteínas.

La proteína Nef, de 27-30 kDa se encuentra fundamentalmente en el citoplasma, aunque en parte se asocia a la membrana celular debido a su miristilación; *in vitro* se ha visto que "nef" puede codificar por tres polipéptidos distintos de 29, 27 y 25 K, de los cuales sólo uno se miristila y que la miristilación no sería necesaria para el efecto inhibitor de la traslación.

La importancia de la expresión de "nef" en la patogenia de la enfermedad fue demostrada por Kestler et al. (11) usando monos *rhesus* infectados con SIV mediante el uso de mutantes de delección. Así, comprobaron que los virus con delecciones en "nef" se replicaban sólo a niveles bajos y no inducían enfermedad clínica. Por tanto, se puede considerar "nef" como un factor de virulencia en la patogenia de la infección por virus de la inmunodeficiencia de primates, y cuya alteración produciría atenuación viral. Recientemente, Miller et al. (12) han descrito que la replicación de VIH-1 en presencia de "nef" produce partículas virales más infecciosas, manifestándose esta infectividad aumentada, después de la entrada del virus en la célula, pero antes o coincidente con la expresión de los genes. Esta capacidad infecciosa aumentada y su relación con la patogenicidad viral le transforman en una diana atractiva para el desarrollo de nuevas formas de terapia antiviral.

Todo esto ha conducido a Huang et al. (13) a estudiar posibles defectos en "nef" en los virus que afectan a los supervivientes de larga duración, tratando de demostrar posibles características de atenuación en los mismos, pero no han encontrado diferencias significativas a nivel genético ni en el estudio de las proteínas correspondientes.

Todo ello hizo que al describirse los progresores lentos (LTNP) se pensara entre otras posibilidades, en que estos pacientes hubieran sido infectados

por cepas atenuadas, de la misma forma en que al parecer, deleciones en “nef” atenuaban a SIV.

Aún cuando no se encontraron en un principio, recientemente se ha descrito un caso de progresor lento con deleciones en “nef”, por lo que dado el escaso número de pacientes estudiados, diez, hace que el tema deba ser sometido a estudios más amplios.

Sin embargo, hoy día, se cuestiona el papel que pueda jugar “nef” en la patogenicidad, al menos en neonatos, ya que en ellos las cepas atenuadas de SIV producen patogenicidad. De ahí que se piense que este gen, contribuiría a la patogenicidad, no directamente, sino a través de mantener la carga viral.

Como hemos visto, desde 1991 se conoce que mutantes de deleción en el gen “nef” del virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), muestran caracteres de atenuación en el mono *M. rhesus*, posiblemente el mejor modelo para la infección del VIH en el hombre. Así, estos mutantes, inoculados por vía intravenosa en el macaco, se replican a niveles bajos y aún cuando el animal se mantiene infectado de forma persistente mantienen niveles normales de linfocitos T, CD4+. Esto contrasta con la alta replicación que ocasiona el virus SIV cuando se inyecta a macacos adultos, en los que induce depleción de CD4+ y la subsiguiente inmunodepresión.

Los animales inoculados con las mutantes con deleciones en “nef”, han sido seguidos durante más de 3 años sin que mostraran signos de inmunodeficiencia y cuando fueron inoculados con virus salvaje, no desarrollaron enfermedad, mostrando que estaban protegidos. De ahí que este modelo se haya configurado como importante para el posible desarrollo de una vacuna. Con respecto al VIH se están estudiando en chimpancés, como paso previo a su posible aplicación en el hombre, siempre que se pudiera probar su inocuidad y falta de posibles peligros.

No obstante, recientemente, Baba y cols. (14), describen que estos virus atenuados, no funcionan de la misma forma cuando se inoculan a macacos recién nacidos. En ellos, por el contrario, se producen niveles altos de viremia persistente tras la exposición oral a una cepa vírica (cepa SIV-delta 3) que contiene una triple deleción en los genes “nef”, “vpr” y el elemento de regulación negativa “NRE”, observándose el desarrollo de anemia hemolítica grave, trombocitopenia y depleción de células T, CD4+, lo que indicaría que ni “nef” ni “vpr” son los genes determinantes de la patogenicidad en neonatos. Ello pone en duda la posibilidad de usar este tipo de mutantes para desarrollar una vacuna viva atenuada en el hombre, ya que de alguna manera, indicaría que la cepa mantiene su capacidad patógena.

Estos hallazgos indicarían que los genes “nef” y “vpr” no determinarían la patogenicidad per se sino a través de la modulación de la replicación vírica en ciertos tipos de células. Este hipótesis deriva del hecho de que en los monos recién nacidos la vía de infección es la mucosa bucal, lo que puede ser un determinante de la distinta patogenicidad observada. En efecto, en un sistema experimental con cultivos celulares se ha podido demostrar que las células de Langerhans infectadas pero no las células T, diseminan con rapidez el virus a las células T activadas, tras un breve período de contacto, lo que resulta en un gran aumento de la producción de virus.

Dado que la mucosa digestiva es muy rica en células de Langerhans, permitiría así justificar la gran replicación del virus observada en los monos infectados en período neonatal.

Es conveniente además recordar que en las infecciones por retrovirus se distingue una primera fase de replicación temprana y una segunda de progresión de la enfermedad. Los autores emiten la hipótesis de que la segunda fase depende de un nivel mínimo de virus producido en la primera, para que la enfermedad se desarrolle. Las células de Langerhans de la mucosa oral, tendrían, en este modelo, un efecto amplificador en la infección neonatal, lo que no se conseguiría en la infección de adultos con mutantes de delección, cuando se hace por vía parenteral.

En este mismo sentido se ha demostrado en el caso del clon letal agudo SIVsmnPBJ 1.9 que su alta patogenicidad estaría relacionada con la presencia de la región promotora U3 dentro de la LTR y no con la presencia de delecciones en “nef”, como ha descrito Dittmar y cols. (1995), (15). En el hombre, en el caso de los “progresores lentos” se han señalado también, cambios en la LTR más que en “nef” por Ho (1995), (16).

Todo este conjunto de factores que influirían en la patogenicidad-atenuación, se unirían a los que condicionan las características biológicas sincitiales y no sincitiales, que desde el punto de vista genético están relacionadas con secuencias de V2 y V3, así como las de tropismo y cinética de replicación. Del análisis de estas zonas, en relación con las propiedades biológicas podrá desprenderse el conocimiento que pueda llevar al desarrollo de una vacuna y aún de tratamientos más racionales, al poder controlar la carga viral y la patogenicidad.

Muy recientemente, Schwartz y cols. (1995), (17), han demostrado que “Nef” aumenta la eficiencia de la transcripción inversa en la célula infectada de 3 a 10 veces, si comparamos virus Nef+ y Nef-, en cualquier tipo de célula. Así, se produce de 5 a 10 veces menos DNA cuando los viriones se produjeron en ausencia de Nef, indicando que estas partículas llevaban a cabo la

transcripción inversa en un ambiente subóptimo. El efecto es independiente de la expresión de CD4 o en la capacidad de los viriones para unirse al CD4, lo que era consistente con la detección de cantidades similares de gp120 en los viriones.

Aún cuando no se hayan podido encontrar diferencias estructurales entre las partículas nef+ y nef-, su comportamiento difiere una vez que entran en la célula, siendo más eficiente la producción de DNA en el "wild type" que en el "nef" mutante, aún cuando este último es capaz de llevar a cabo la transcripción inversa de forma eficiente cuando se estudia en un ambiente libre de células. Ello indicaría que el ambiente intracelular en el que el mutante realiza su transcripción inversa es distinto del de el virus salvaje, lo que podría responder a un desnudamiento inapropiado de la partícula o de su internalización en un compartimento celular donde la actividad catalítica de la transcriptasa inversa se alterara o donde el DNA de nueva síntesis se degradara rápidamente.

Todos estos datos harían pensar en la posibilidad de que Nef se incorporara en el virión, lo que sería interesante reestudiar. Por otra parte, considerar que Nef pueda alterar la incorporación de componentes celulares en los viriones, haciendo que éstos se comporten de distinta manera cuando infectan la célula. Otra posibilidad es que actuara a través de modificaciones postrasacionales de uno o varios componentes de la partícula.

### **Supervivientes de larga duración**

Aunque la mayor parte de las personas infectadas desarrollan síntomas relacionados con el SIDA, diez años después de la seroconversión, existe un reducido número de pacientes (5 a 8%), denominados supervivientes de larga duración (SLD), que se mantienen clínica e inmunológicamente (niveles de células T, CD4+ estables y/o normales) bien, durante más de una década, aún en ausencia de tratamiento antirretroviral.

La progresión de la enfermedad es un fenómeno complejo, aún no bien entendido que se piensa, depende de una serie de factores del huésped, del virus y del ambiente, por lo que el resultado clínico va a depender del delicado equilibrio de esta interacción multifactorial (13).

Para explicar este fenómeno se han esgrimido propiedades intrínsecas del huésped, tales como el tipo de antígenos HLA que le conferirían distinto grado de susceptibilidad, pero los recientes estudios de Cao et al. (18) indican que las células T, CD4+ de estos pacientes no son más resistentes al VIH-1 *in vitro* que las de los progresores rápidos.

Por otra parte, los estudios de Lifson et al. (19) ya demostraron en la Cohorte Clínica de San Francisco que los SLD mostraban una respuesta inmune caracterizada por un nivel más alto de anticuerpos específicos y células T, CD8+ y los más recientes de Cao (15) encuentran niveles altos de anticuerpos neutralizantes y células T, CD8+ con capacidad supresora de virus. Todo ello sugiere que, al menos en algunos SLD, una potente respuesta inmune sea un factor importante en su lento progresar.

Por otra parte, existe datos que abogan por la influencia de la carga viral y del fenotipo en este lento progreso. Learmont et al. (20) han descrito 6 receptores de sangre que permanecían bien después de recibir hace más de 10 años una transfusión infectada, procedente de un donante que a su vez se encuentra asintomático. Esto aboga por la transmisión de una cepa atenuada en este grupo de personas infectadas. Por otra parte, el trabajo citado de Kestler (10) demostró que los monos infectados experimentalmente con una cepa de SIV con delección en “nef”, no desarrollaban signos de enfermedad y mostraban una carga viral baja, así como niveles normales de CD4+. Sin embargo, los estudios de secuenciación de “nef” y de “Nef”, no han permitido demostrar diferencias significativas entre virus procedentes de SLD y de progresores rápidos más que en un caso.

Por tanto, la investigación de los factores que condicionan el progreso de la enfermedad, continúa siendo uno de los temas fundamentales en el campo de la patogenia de la misma, como hemos analizado en el apartado anterior sobre el gen “nef”.

### **Dinámica viral. Variabilidad genética. Genotipos e inmunotipos. Resistencias naturales o primarias**

Según hemos revisado recientemente (21), el VIH, como otros virus RNA, se encuentra en el huésped como una mezcla de variantes genéticas muy relacionadas, que se denominan cuasiespecies. Los virus RNA al replicarse, debido a los errores cometidos por la transcriptasa inversa, generan una serie de variantes, algunas letales, pero muchas otras sobreviven y muestran gran heterogeneidad entre ellas. Las más homogéneas y frecuentes constituyen lo que se denomina cepa “master”, que va a caracterizar la cuasiespecie, pero existe todo un enjambre de variantes.

Como han demostrado Ho y cols. (1995), (22) y Wei y cols (1995), (23) la dinámica viral durante todo el período de incubación, asintomático es extraordinariamente alta, produciéndose cada dos o tres días una renovación de la mayor parte de los virus circulantes así como de los linfocitos infectados, demostrando que tras el tratamiento de estos pacientes con inhibidores

de la transcriptasa inversa no nucleósidos, la población viral previamente sensible se hace en dos semanas totalmente resistente.

La dinámica de renovación de del virus es del orden de  $1,1 \times 10^8$  por día y de  $2 \times 10^9$  linfocitos CD4+ por día. Esta cinética tiene importantes implicaciones biológicas y clínicas:

1) Indica un proceso dinámico que supone ciclos continuos de infección vírica de novo, replicación y renovación rápida del virus lo que probablemente representa una fuerza conductora que dirige la patogenia del VIH-1.

2) La rápida y casi completa sustitución del virus salvaje por virus resistente en plasma en sólo 14-28 días de tratamiento es un ejemplo llamativo de la capacidad del virus para experimentar cambios relevantes biologicamente. En particular implica que el VIH-1 posee un enorme potencial para evolucionar en respuesta a las fuerzas selectivas como la ejercida por el sistema inmune. En este sentido, conviene contraponer la frase de Richman (Science 1995:179, en el comentario de Cohen. High turnover of HIV-1 in blood revealed by new studies) en que comentando estos resultados afirma que “estos nuevos datos cuestionan la creencia común que la resistencia a los fármacos está producida por la alta tasa de mutación del VIH. Esto es una equivocación. El VIH no muta con mayor frecuencia que otros virus ARN; la resistencia a los fármacos es una consecuencia del alto nivel de replicación, no de una hipermutabilidad”.

Esta gran variabilidad y su continua evolución es responsable de la rápida aparición de variantes resistentes a la neutralización, a linfocitos T citotóxicos y a los antirretrovirales. Todo esto hace que del fenómeno de la variabilidad se deriven características epidemiológicas de gran trascendencia, tales como la transmisión y circulación viral, progresión de la enfermedad, especificidad celular y tisular, resistencias a los antirretrovirales y dificultades para el desarrollo de vacunas.

Uno de los problemas básicos y prácticos más importantes de la variabilidad y del concepto de cuasiespecies es la presentación de resistencias a los antirretrovirales de forma natural, recientemente descrita por Mohri y cols. (24), de forma parcial para el AZT en virus aislado por cocultivo, procedente de un paciente no tratado con esta droga, y por Nájera et al. (25) con respecto a ddC, D4T y nevirapina en muestras de pacientes procedentes de cocultivo, así como directamente del DNA de células mononucleares de sangre periférica, amplificado por PCR anidada.

Como prueba de la dependencia de la resistencia a antirretrovirales del fenómeno de la variabilidad y de la existencia de cuasiespecies, Nájera et al. (26) han calculado las tasas de mutación en codones asociados con la resis-

tencia y en otros no asociados, comprobando tasas similares de variación. Esto indica que por razones estadísticas, las mutaciones afectarán al azar, codones implicados en resistencia o no, en ausencia de fuerzas selectivas producidas por la droga. Cuando se administra una droga, la presión selectiva ejercida por ella sustituirá rápidamente la subpoblación mayoritaria sensible, por otra resistente, pero sin eliminar por completo la primera (conviene recordar los numerosos reservorios del virus), por lo que al cesar la presión por cambio de medicamento, puedan volver a predominar subpoblaciones sensibles.

La tasa de evolución que se observa en una población viral, depende de la tasa de mutación y de las fuerzas selectivas que se ejerzan sobre la población mutada. Para el gen "gag", Hahn y cols. (27) estimaron una tasa de sustitución de nucleótidos entre 0.4 y  $1.9 \times 10^{-3}$ /sitio/año; para el gen "env", entre 3.2 y  $15.8 \times 10^{-3}$ /sitio/año y para el gen "pol", el más conservado, del orden de  $1.7 \times 10^{-3}$ .

Hoy distinguimos 6 genotipos distintos en el VIH-1, denominados A, B, C, D, E y F. A parte hay que considerar el nuevo subtipo O, descrito en Camerún y posteriormente en Francia, pero que hoy tiende a clasificarse como un grupo distinto O, de "outlier", extremo, Gürtler et al. (28). Existen además otros dos subtipos "env" pendientes de clasificar. Con respecto a las secuencias de "gag", se han podido establecer siete subtipos, ya que el A podría corresponder a los subtipos de "env" A y E, según se muestra en la Tabla I, tomada de Myers et al. (29) y donde se correlacionan los subtipos de "env" y "gag" y su distribución geográfica.

**TABLA I**

**Subtipos de VIH-1, basados en "env" y "gag" y localización geográfica**

Subtipo "env"	Subtipo "gag"	Localización
A (U455,Z321)	A (U455, TN243, VI310)	Africa Central
B (MN, SF-2)	B (MN, SF-2, TB132)	USA, Europa, América del Sur, Tailandia, etc.
C (NOF, D747, ZAM20)	C (ZAM20, VI313)	Africa del Sur, India
D (ELI, NDK)	D (ELI, NDK, UG270)	Africa Central
E (TN243)	A (TN243)	Tailandia, República Centro Africana, India
F (7944)	F (BZ162, VI174, VI325, antes "gag" E)	Brasil, Rumanía, Zaire
Pendiente	G (VI191, LBV217, antes "gag" F)	Zaire, Gabón y Taiwan
Pendiente	H (VI525, VI557)	Gabón, Zaire
O (ANT70, MVP5180)	O (ANT70, MVP5180)	Camerún, Gabón

El análisis genético de las cepas se realiza por diversas técnicas, PCR, por McCutchan et al (30); desapareamientos entre ácidos nucleicos tras digestión por ribonucleasa A por López Galíndez et al (31) y secuenciación de oligonucleótidos por Myers et al. (29). Más recientemente, Delwart et al. (32) han desarrollado una nueva tecnología simple y rápida para detectar y estimar la divergencia genética entre cepas de VIH, basada en la observación de que los heteroduplex de DNA que se forman entre secuencias relacionadas tienen una movilidad disminuida cuando se analizan en geles de poliacrilamida, la cual es proporcional a su grado de divergencia. La denominaron ensayo de movilidad de los heteroduplex de DNA (HMA: Heteroduplex mobility assay) y constituye hoy una herramienta muy útil para acelerar la investigación epidemiológica, siendo muy adecuada para el cribado y caracterización de cepas.

La extrema variabilidad genética de los VIH hace que la epidemiología molecular de esta infección sea enormemente compleja, pero a pesar de todo, comienza a dar sus frutos, reforzando el concepto de cuasiespecies, hoy plenamente admitido y que hemos revisado recientemente (21).

El desarrollo en los últimos años de tecnologías más sencillas y eficientes para el análisis del material genético así como para la medida de anticuerpos específicos ha permitido avanzar en el conocimiento de los subtipos de VIH-1, haciendo posible el análisis y seguimiento de la generación de la diversidad de las secuencias de VIH-1, estimar la complejidad de las cuasiespecies y estimar la sustitución de variantes genéticas por otras, para entender las relaciones entre la evolución de las cuasiespecies virales *in vivo* y la progresión de la enfermedad.

Desde el punto de vista práctico, el trabajo de Wasi y cols. (33), representa posiblemente la primera aplicación práctica de estas metodologías y del concepto de epidemiología molecular al conocimiento de la penetración y difusión de nuevas cepas de VIH-1 en una zona del mundo; en este caso, el aumento de prevalencia del subtipo E en Tailandia en los últimos años.

Como es conocido, Tailandia es uno de los países seleccionados por la OMS para el ensayo de vacunas en gran escala (Fase III, ensayos de eficacia), dada la alta incidencia que presenta la enfermedad y donde finalmente se van a llevar a cabo los primeros ensayos de este tipo, después de la gran polémica suscitada por este tema.

La cifra total de casos en este país se ha multiplicado por 10 desde 1990 y en los reclutas la seroprevalencia general alcanza un 5%, llegando en algunas zonas como en Chiang Rai al 20% del total.

Esta situación y la amplia presencia del ejército americano en él, hicieron que fuera un país especialmente interesante para el estudio de la situa-

ción epidemiológica. De ahí que desde 1990 se haya desarrollado un sistema de vigilancia seroepidemiológica mediante unidades centinela y que desde 1992 se disponga de datos de circulación de distintos subtipos con respecto al subtipo E en este país, ha sido evaluada como que ha pasado del 2.6% en 1988-89 al 43.8% en 1992-93 del total de personas infectadas.

Los intentos de establecer serotipos o inmunotipos se han basado en inmunoensayos enzimáticos usando péptidos sintéticos de V3 muy específicos (PEIA: peptide enzyme immunoassay). Con esta metodología, Pau et al. (34) han sido capaces de establecer dos serotipos, A y B en Tailandia, permitiéndoles este método tipar entre un 80 y un 88% de los sueros analizados, siendo el resto difícilmente tipables.

## **VIH-2**

Recientemente, Marlink et al. (35) han publicado los resultados de un estudio prospectivo de mujeres infectadas con VIH-2 y VIH-1, con objeto de comparar su evolución clínica e inmunológica. Demuestran por primera vez que las mujeres infectadas por VIH-1 tienen una probabilidad menor de no haber desarrollado el SIDA a los cinco años post-infección, que las infectadas por VIH-2 (67% contra el 100%). Las infectadas por VIH-2 desarrollan menos enfermedades relacionadas con la infección por VIH que las infectadas por VIH-1. La disminución de CD4+ es considerablemente menor en la evolución de las mujeres infectadas por VIH-2 (1 a 10). Por otra parte, los datos de seroincidencia sugieren que la infectividad del VIH-2 en relación a la del VIH-1 es de 5 a 9 veces menor y que la transmisión perinatal es de 15 a 20 veces menor en el caso del VIH-2. Todo ello les permite concluir que claramente, el VIH-2 posee una virulencia menor que el VIH-1.

## **Avances en el conocimiento del Sarcoma de Kaposi**

Se pueden resumir fundamentalmente en dos:

1) la demostración del efecto sinérgico entre el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el producto del gen "tat", que induciría una mayor agresividad al SK que se observa en los pacientes VIH+, pero que el primero se observa también en el caso del SK clásico, lo que establecería la unión entre estas dos formas de presentación, como han descrito Ensoli et al. (36) y

2) el hallazgo por Chang et al. (37) de secuencias de DNA al parecer de un herpesvirus nuevo (homólogo pero distinto a los Gammaherpesvirinae, saimiri y Epstein-Barr), en muestras de lesiones de KS procedentes de

pacientes con SIDA. Es todavía muy prematuro para poder afirmar si estas secuencias representan realmente un nuevo herpes y si éste pudiera estar relacionado etiológicamente con el SK, pero el hallazgo ha suscitado un enorme interés.

Todos estos datos, no hacen más que resaltar los avances realizados en el último año, aún cuando haya referencias obligadas a trabajos anteriores. Es sorprendente, no obstante, que el enorme acumulo de conocimientos con respecto a este virus y a sus mecanismos patogénicos no nos permita, sin embargo, controlarlo. Ello no hace sino resaltar su enorme complejidad y la íntima relación que establece con la célula huésped, más parecida a un proceso tumoral que a una infección lítica por otros virus.

### **Avances en el desarrollo de vacunas**

Los avances en el desarrollo práctico de una vacuna frente al VIH-1 estaban a principios de 1994, pendientes de la realización de amplios ensayos en individuos de alto riesgo, para comprobar su eficacia. En una reunión del Grupo de Trabajo sobre Vacunas de VIH, del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) de los Institutos Nacionales de Sanidad (NIH) americanos, celebrada los días 21 y 22 de Abril de ese año se decidió, sin embargo, que se debían suprimir estos ensayos, ya que no existía suficiente base científica que los justificara. Por el contrario se recomendó que se realizaran estudios en pequeña escala que pudieran tratar de establecer esta evidencia.

Para la realización de estos nuevos estudios se recomendó elegir las dos vacunas candidatas más avanzadas entre los ensayos desarrollados con apoyo del NIAID (Tabla II), correspondientes a preparaciones de gp120 producidas por ingeniería genética por los laboratorios Biocine (Chiron y Ciba-Geigy) y Genentech, según recoge Cohen (38).

**TABLA II**  
**Ensayos clínicos de vacuna del SIDA desarrollados**  
**con apoyo del NIAID**

VACUNA	PRODUCTOR	NUMERO DE PACIENTES
gp120 producida en CHO	Genentech	279
gp120 producida en CHO	Biocine	412
p120 producida en levaduras	Biocine	62
gp160 producida en baculovirus	MicroGeneSys	145
gp160 producida en vaccinia	Immuno-Ag	124
Vaccinia viva con gp160	Bristol/Oncogén	36
+ gp120 producida en CHO	+ Biocine	56
+ p120 producida en levaduras	+ Biocine	28
+ gp120 producida en CHO	+ Genentech	28
+ gp160 producida en vaccinia	+ ImmunoAg	14
Péptido V3 octamérico	UBI	54
Poxvirus del canario con gp160	Connaught/Pasteur Merieux	108
Mezcla de péptidos V3 oral	UBI	24 **
Vaccinia viva recombinada con 3 genes de VIH	Therion	42 **

\*\* Participantes previstos. CHO: ovario de hámster chino

Los problemas derivados de la falta de datos sobre la posible eficacia, se derivan del desconocimiento de cuales son los factores que puedan ser importantes en la protección. Hasta ahora se creía que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, como en otras vacunas podría serlo, y en este sentido los candidatos desarrollados por Genentech y Biocine eran los más prometedores ya que el suero de las personas vacunadas con ellos eran capaces de neutralizar el VIH crecido en líneas celulares. Sin embargo, cuando se probaron frente a aislados recientes de personas infectadas que no habían sido cultivados en líneas celulares, no se pudieron detectar. Estos resultados produjeron gran estupor, tratando de ser contrarrestados por otros en chimpancés que parecían indicar que aún en ausencia de anticuerpos neutralizantes detectables, los animales estaban protegidos frente a la inoculación de virus salvaje.

Otras consideraciones sobre el tema, indican que unas pruebas diseñadas para evaluar el grado de protección de dos vacunas candidatos, durarían unos 3 años y comprenderían entre 8.000 y 10.000 personas, de los cuales la mitad recibirían placebo y costaría del orden de 1.000 a 2.000 dólares por persona y año, lo que elevaría el costo total a una cantidad evaluada entre 24 y 60 millones de dólares. Hay que considerar que una vacuna que se probara en un

ensayo de 3 años de duración, sobre 4.500 personas y que tuviera una eficacia de un 60%, no podría evaluarse, dada la pequeña diferencia esperable entre el grupo vacunado y el placebo. Si tuviera una eficacia del 80-90%, los resultados sí serían claramente evaluables.

Por otra parte, se han levantado otras dudas con respecto al uso de una vacuna con un nivel medio de protección. Así, Blower y McLean (39) han analizado desde el punto de vista estadístico el impacto de una vacunación en el área de San Francisco, considerando tres mecanismos de fallo de la vacuna: eficacia, considerando la proporción de vacunados en que la vacuna no induzca respuesta; grado, la reducción en susceptibilidad de aquéllos en que haya sido eficaz y duración, el tiempo que dure la protección. Por otra parte han considerado que la vacunación podría llevar consigo un cierto relajamiento de las medidas de cambio de hábitos de sexo seguro, al crear cierto grado de confianza. Todo ello combinado hace que según sus cálculos, una campaña masiva de vacunación, podría agravar la intensidad de la epidemia si sólo consiguiera un 50% de cobertura y tuviera una eficacia de un 60%, considerando que las conductas de riesgo aumentarían en un 1.4%, por lo que concluyen o que se necesitan vacunas de una eficacia mucho mayor o que sería muy poco probable que una vacuna fuera capaz de erradicar el VIH en San Francisco, a menos que se combinara a la vez con una gran reducción en las conductas de riesgo.

Por otra parte, existe el riesgo, como se ha visto con vacunas diseñadas para prevenir el dengue, que hicieran al sistema inmune más susceptible, aumentando el riesgo de propagación de la infección.

Fauci, en relación con la reunión comentada, expresó sus dudas de seguir adelante con los ensayos en gran escala ya que pensaba que existía poca probabilidad de que los candidatos a vacunas actuales tuvieran una eficacia mayor del 30%. En este mismo sentido se han pronunciado una serie de investigadores, entre ellos Bernard Fields, quien en una entrevista para *Nature* del 12 de Mayo de 1994, expresaba su postura de "volver a la investigación básica" para conocer más sobre el tema, antes de embarcarse en ensayos clínicos de gran magnitud.

### **Postura de la OMS**

A pesar de todas estas dudas, la OMS en una reunión en Ginebra, celebrada en Octubre de 1994, ha decidido seguir adelante con los ensayos en gran escala en Tailandia, con vacuna de gp120 de Biocine. Esta decisión, respaldada por una serie importante de científicos, se basa, como recoge Moore, (1994) (40) en una serie de consideraciones, especialmente el problema que supone la enfermedad en países de alta incidencia, como Tailandia, Brasil,

Uganda y Ruanda, que fueron los países previamente seleccionados para llevar a cabo ensayos de gran amplitud. Por otra parte, el hecho de que la realización de estudios de eficacia en gran escala, será la única forma de salir de dudas con respecto a la eficacia real de la vacuna. A este respecto, tenemos el ejemplo reciente de la vacuna frente al *P. falciparum*, la cual a pesar de todas las dudas expresadas, ha mostrado una eficacia en el ensayo SPf 66 en Tanzania, de un 31%.

Por supuesto, que la decisión final sobre el uso de la vacuna debe ser tomada por el gobierno del país y que debe emplearse una preparación que contenga el subtipo o subtipos prevalentes en la zona geográfica concreta. Así, hoy conocemos por los estudios de epidemiología molecular que en el norte de Tailandia circula preferentemente el subtipo E en transmisión heterosexual, y que, en el sur circulan dos subtipos, el E en transmisión heterosexual y los B y E entre usuarios de drogas por vía parenteral, como hemos visto anteriormente (33).

### **Reconsideración global sobre el tema de las vacunas**

Recientemente, Koff (41) recoge una serie de consideraciones que creemos son de gran utilidad para situar el tema en una perspectiva adecuada y que por tanto, comentamos.

Por una parte, conviene recordar que el optimismo inicial sobre el posible desarrollo de una vacuna, ha pasado y que hoy existen datos nuevos que hacen aún más difícil su desarrollo, tales como la co-circulación de diferentes subtipos del VIH en diferentes regiones del mundo; la capacidad del virus para infectar, tanto como virus libre, como asociado a la célula; la capacidad de ciertas zonas de la envoltura del virus para producir respuestas inmunosupresoras, inmunopatológicas o de aumento de la infecciosidad y la incapacidad de las vacunas de primera generación para estimular o mantener los niveles de respuesta inmune, necesarios para ser eficaces frente al VIH.

### **Criterios para una vacuna “ideal”**

En resumen (41), serían los siguientes:

- 1) Que sea eficaz.
- 2) Que sea capaz de proteger a una alta proporción de los individuos vacunados.
- 3) Que sea capaz de estimular tanto el componente humoral como el celular de la respuesta inmune, ya que la infección se transmite por diferentes rutas y de distintos modos (virus libre y asociado a la célula).

4) Que proteja frente a los distintos subtipos del virus.

5) Que induzca inmunidad de larga duración, ya que el sujeto se puede infectar a lo largo de la vida.

6) que induzca inmunidad local a nivel de la mucosa genital y del recto, para evitar la transmisión sexual.

7) Que sea práctica, en términos de administración y precio, para que sea posible su administración en todo el mundo.

Aunque estas consideraciones puede que no sean conseguibles, sin embargo exponen las necesidades de una vacuna, que por supuesto no son conseguibles con los candidatos de primera generación y por tanto, plantean a su vez puntos que se necesitarían reforzar para poder hacer su desarrollo posible y que serían:

a) Proveer incentivos para aumentar la inversión de la industria biofarmacéutica en el desarrollo de vacunas frente al SIDA. Hay que considerar que hoy, globalmente de las inversiones dedicadas a la investigación del SIDA, menos de un 10% se dedican al desarrollo de vacunas, ya que “las fuerzas del mercado cultivan poco las vacunas porque son raramente productoras de fortunas” (42).

b) Establecer unos criterios de regulación internacional para la autorización de una vacuna frente al SIDA.

c) Expandir la capacidad internacional para evaluar la eficacia de los mejores candidatos a vacunas.

d) Mejorar los mecanismos para facilitar la transferencia de información a los fabricantes de vacunas.

Como podemos apreciar todos estos puntos se refieren a medidas de política farmacéutica, especialmente de base económica y de regulación por las autoridades sanitarias, con objeto de tratar de salir de la actual situación, caracterizada por un interés auténticamente muy bajo, para el desarrollo de una vacuna (42).

### **Vacunas atenuadas**

Ante la gran cantidad de dudas existentes en relación con las vacunas de primera generación, las vacunas atenuadas aumentan su protagonismo, dados los buenos resultados encontrados en los monos, aún cuando muchos investigadores piensan que serían demasiado peligrosas para ser usadas en el hombre, ya que podrían producir la propia enfermedad que pretenden evitar.

En la "Conference on Advances in AIDS Vaccine Development", 7ª Reunión Anual de los Grupos de Cooperación Nacional para el Desarrollo de una Vacuna frente al SIDA de los NIAID, celebrada en Reston, Virginia, del 6 al 10 de Noviembre de 1994 (43), Ruprecht describió que una vacuna producida con SIV, que ha sido descrita en monos adultos como segura y eficaz, era capaz de producir SIDA en los monos recién nacidos. Ante estos resultados, se vuelve a plantear, como en todas las vacunas atenuadas, que hay que conseguir el balance correcto entre atenuación y potencia.

Por otra parte, Desrosiers en la misma reunión presentó algunos resultados en relación a la protección en la especie humana, como el caso de un hemofílico infectado al menos desde 1983, el cual mantiene una cifra estable de CD4 y se encuentra asintomático. El análisis del virus aislado del mismo, mostró que le falta una gran porción del gen "nef", con lo que "podría ser un ejemplo de una persona vacunada" y supondría "nuestro primer estudio de seguridad". Esta "vacuna" no sólo sería segura, sino que podría también mostrar eficacia, ya que la persona aludida, después de ser infectada por el aparente virus atenuado, recibió numerosas inyecciones de factores de coagulación infectados, resistiendo la infección.

En este momento, Desrosiers está llevando a cabo estudios en chimpancés con virus a los que se les han eliminado hasta cuatro genes, con lo que se podrá evaluar la atenuación de forma más extensa y su correspondiente eficacia.

### **Vacunas de DNA desnudo**

Este procedimiento está siendo explorado con gran intensidad, dada la facilidad de administración, aparente eficacia inmunológica y beneficios económicos. Wang et al. (44) han descrito la inyección intramuscular de ratones con una construcción de DNA que comprende el gen de la envoltura gp160, obteniendo una respuesta de anticuerpos neutralizantes y que eran capaces de prevenir la formación de sincitios, así como cierta respuesta de tipo celular.

Por otra parte, se conoce que este tipo de vacunas inducirían la "fase de protección" de la respuesta inmune, caracterizada por el predominio de la subpoblación linfocitaria TH1 y ligada a las interleuquinas 2, 12 e interferón gamma, en la cual, como ocurre en las personas que habiendo estado en contacto con el virus no se han infectado, existiría protección aún en ausencia de anticuerpos. Estos hallazgos abren una nueva vía de investigación muy prometedora para el desarrollo de vacunas más eficaces.

### 3. Referencias

1. Franke, E.K., Yuan, H.E.U. and Luban, J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, 1994; 372: 359-362.
2. Thali, M., Bukousky, A., Kondo, E. et al. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, 1994;372:363-365.
3. Cullen, B.R. and Heitman, J. Chaperoning a pathogen. *Nature, News and Views*. 1994;372:319-320.
4. Rosenwirth, B., Billich, A., Steinkasserer, A. et al. Cyclophilin A as a novel target in anti-HIV-1 chemotherapy. *Int.Ant.News*. 1995;3:62-63.
5. Weber, J. and Galpin, S. Cyclosporin A. *Scientific Correspondence. Science*, 1995;375:198.
6. Bartz, S.R., Hohenwarter, E., Hu, M-K., Inhibition of human immunodeficiency virus replication by nonimmunosuppressive analogs of cyclosporin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1995; 92: 5381-5385.
7. Takahashi, H., Matsuda, M., Kojima, A. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase: Enhancement of activity by interaction with cellular topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995; 92:5694-5698.
8. Goldsmith, M.A., Warmerdam, M.T., Atchison, R.E. et al. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1. *Nef. J. Virol.*, 1995; 69: 4112-4121.
9. Schwartz, O., Dautry-Varsat, A., Goud, B. et al. Human immunodeficiency virus type 1 nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J.Virol.*, 1995, 69: 528-533.
10. Poulin, L., Fauchon, M., Darveau, A. et al. Inhibition of protein synthesis by the human immunodeficiency virus type nef gene product. *J.Gen.Virol.*, 1994;75:2977-2984.
11. Kestler, H., Ringler, D.J., Mori, K. et al. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, 1991; 65: 651-662.
12. Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Page, K.A. et al. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J.Virol.*, 1995; 69: 579-584.
13. Huang, Y., Zhang, L. and Ho,D.D. Characterization of nef sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J.Virol.*, 1995; 69: 93-100.

14. Baba, T. W., Jeong, Y. S., Penninck, D. et al. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science*, 1995;267:1820-1825.
15. Dittmar, M.T., Cichutek, K., Fultz, P.N. et al. The U3 promoter region of the acutely lethal simian immunodeficiency virus clone smmPBj1.9 confers related biological activity on the apathogenic clone agm3mc. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1995; 92: 1362-1366.
16. Ho, D. Rapid turn-over of plasma HIV and CD4-lymphocytes in vivo. Sesión de Clausura. III Congreso Nacional sobre el SIDA. La Coruña, 7-10 de Marzo de 1995.
17. Schwartz, O., Maréchal, V., Danos, O. et al. Human Immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J.Virol.*, 1995;69: 4053-4059.
18. Cao, Y., Qing, L., Zhang, L. et al. Virological and immunological characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. Submitted for publication.
19. Lifson, A.R., Buchbinder, S.P., Sheppard, H.W. et al. Long term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J. Infect. Dis.*, 1991;163: 959-965.
20. Learmont, J., Tindall, B., Evans, L. Long-term symptom-less HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet*, 1992;340:863-867.
21. Nájera, R., Nájera, I., de Andrés, R. y cols. Epidemiología molecular del VIH. *Pub.Of.SEISIDA*, 1995; 6: 1-8.
22. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 1995;373:123-126.
23. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E. et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 1995;373:117-122.
24. Mohri, H., Shingh, M.K., Ching, W.T.W. et al. Quantitation of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the blood of treated and untreated patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1993;90:25-29.
25. Nájera, I., Richman, D.D., Olivares, I. et al. Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Aids Res.Hum.Retrov.*, 1994;10:1475-1484.

26. Nájera, I., Holguín, A., Quiñones-Mateu, M. et al. The "pol" gene quasi-species of human immunodeficiency virus. Mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J.Virol.*, 1995;69:23-32.
27. Hahn, B.H., Gonda, M. A., Shaw, G.M. et al. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: Different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985;82:4813-4817.
28. Gürtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J. et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J.Virol.*, 1994;68:1581-1585.
29. Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S. et al. Human retroviruses and AIDS Database. Los Alamos National Laboratory, 1994;III:2.
30. McCutchan, F.E., Sanders-Buell, E., Oster, C.W. et al. Genetic comparison of human immunodeficiency virus (HIV-1) isolates by polymerase chain reaction. *J.Acquir.Immune Defic.Synd.*, 1991;4:1241-1250.
31. López-Galíndez, C., Rojas, J.M., Nájera, R. et al. Characterization of genetic variations and 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistance mutations of human immunodeficiency virus by the RNase A mismatch cleavage method. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1991;88:4280-4284.
32. Delwart, E.L., Sheppard, H.W., Walker, B.D. et al. Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assay. *J.Virol.*, 1994;68:6672-6683.
33. Wasi, Ch., Herring, B., Vanichseni, S. et al. Determination of HIV-1 subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand, using peptide binding enzyme immunoassay and the heteroduplex mobility assay: evidence of increasing prevalence of HIV-1 subtype E. *AIDS Res. Hum. Retr.*, 1994;11.
34. Pau, C.P., Lee-Thomas, S., Auwanit, W. et al. Highly specific V3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS*, 1993;7:337-340.
35. Marlink, R., Kanki, P., Thior, I. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, 1994; 265: 1587 -1590.
36. Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P. et al. Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature*, 1994;371:674-680.

37. Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, 1994; 266:1865-1869.
38. Cohen, J. The HIV vaccine paradox. *Science, News and Comment*, 1994; 264:1072-1074.
39. Blower, S.M. and McLean, A.R. Prophylactic vaccines, risk behavior change, and the probability of eradicating HIV in San Francisco. *Science*, 1994;265:1451-1454.
40. Moore, J. The WHO and why of HIV vaccine trials. *Nature. Commentary*, 1994;372:313-314.
41. Koff, W.C. The next steps toward a global AIDS vaccine. *Science*, 1994; 266:1335-1337.
42. Cohen, J. AIDS Vaccines News. Are researchers racing toward success, or crawling? *Science*, 1994;265:1373-1374.
43. Cohen, J. AIDS Vaccines. At Conference, hope for success is further attenuated. *Science*, 1994;266:1154.
44. Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V. et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1993; 90:4156-4160.