ratones inmunizados de forma similar con los recombinantes HXB2 o MN o el de los individuos infectados de forma natural. La envoltura quimérica indujo anticuerpos con una capacidad de unión intensificada hacia el bucle natural V3 del MN; sin embargo, los lugares observados en los ratones BALB/c no fueron epítopes neutralizantes. No obstante, de forma similar a las observaciones realizadas con la utilización de sueros humanos, el virus quimérico era neutralizado más rápidamente por todos los sueros de ratones inmunes, un efecto mediado aparentemente por los epítopes fuera del bucle V3. Estos estudios demuestran que la neutralización no está solamente influenciada por la secuencia y la conformación del bucle V3 sino también por su contexto dentro de la envoltura vírica.

El bucle V3 del VIH-1 está formado por 33 aminoácidos situados entre dos residuos de cisteína en la tercera región variable de la proteína de la envuelta. El bucle V3 es un dominio importante dentro de la envuelta: 1) induce anticuerpos neutralizantes específicos de tipo; 2) induce una respuesta inmune celular tanto de linfocitos T citotóxicos como de células T ayudadoras; 3) influencia el tropismo del virus; 4) determina la fusión del virus con las células susceptibles tras la unión al receptor CD4.

Con la intención de estudiar el efecto del bucle V3 en la neutralización por suero de individuos infectados por VIH seropositivos, los autores construyeron un virus quimérico basado en el clon molecular HXB2 en el que la secuencia del bucle V3 fue sustituida por la del aislado MN (HXB2/MN). Posteriormente, compararon la capacidad de once sueros procedentes de Estados Unidos y Europa, y diez sueros procedentes de Zaire para neutralizar el virus quimérico con respecto a los dos virus parentales. Aunque se observaron diferencias en la neutralización de los aislados HXB2 y MN en función del origen del suero (los sueros de Estados Unidos y Europa neutralizaron mejor el aislado MN, mientras que los de Zaire funcionaron mejor con el aislado HXB2), en ambos casos se observó un aumento considerable (12-20 veces) en la neutralización del virus quimérico HXB2/MN. Este incremento parece deberse a un mejor reconocimiento inmunológico del virus quimérico y no a una alteración en la capacidad de replicación e infectividad del mismo, según se comprobó al estudiar distintas propiedades de este virus en comparación con los virus parentales. Por otra parte, se estudió el reconocimiento de células H9 infectadas por los virus MN y HXB2/MN por dos anticuerpos monoclonales solapantes específicos contra el bucle V3 de MN, observándose un ligero aumento en el porcentaje de células teñidas por estos anticuerpos cuando las células estaban infectadas con el virus quimérico. Este incremento no se debe a una mayor expresión de proteína en la superficie celular puesto que según se determinó con una mezcla de sueros humanos positivos para VIH las células infectadas por ambos virus presentan una cantidad similar de envuelta en la superficie. Estos resultados, unidos a una mejor neutralización por uno de estos monoclonales del virus HXB2/MN en comparación con el MN, sugieren que el bucle V3 presenta una conformación diferente y/o resulta más accesible a los anticuerpos neutralizantes en el virus quimérico.

Mediante experimentos de competición con péptidos representativos del bucle V3 de los aislados MN y HXB2 los autores comprobaron que el aumento en la neutralización del virus quimérico por los sueros de individuos infectados

se debía en algunos casos a un mejor reconocimiento de la secuencia lineal del bucle V3 y en otros casos a un mejor reconocimiento bien de epítopes fuera del bucle o bien de epítopes dependientes del bucle V3 que presentan una alteración en la conformación. Estos resultados indican que la sustitución del bucle V3 de MN dentro de la envuelta del aislado HXB2 resulta en cambios conformacionales que afectan a la accesibilidad general de la región del bucle V3 y a su interacción con los anticuerpos.

Por otra parte, el aumento en la neutralización del virus HXB2/MN por los anticuerpos de individuos seropositivos sugiere que la envuelta de este virus puede representar un buen inmunógeno capaz de inducir anticuerpos neutralizantes de alto título y afinidad contra distintos aislados. Para comprobar esta posibilidad se inmunizaron ratones con recombinantes del virus vacunal que expresan la proteína gp120 de HXB2, MN o HXB2/MN, administrándoles posteriormente una dosis de recuerdo con una mezcla de proteína gp120 de MN y HXB2. Contrariamente a lo esperado, la inmunización con la envuelta quimérica no solo no resultó en un aumento en la neutralización de alguno de estos tres virus, sino que además, se obtuvo una mejor neutralización con los sueros de los ratones inmunizados con los recombinantes que expresan la envuelta de MN y HXB2. Sin embargo, independientemente del inmunógeno utilizado, los sueros de los tres grupos de ratones neutralizaron más eficientemente el virus quimérico que cualquiera de los dos aislados parentales. Este efecto debe estar mediado por epítopes de fuera del bucle V3 o epítopes conformacionales dependientes del V3, puesto que todos estos sueros mostraron una pobre reactividad frente a un péptido correspondiente al V3 de MN. Por otra parte, aunque los anticuerpos inducidos por la envuelta quimérica no presentaron una mayor capacidad neutralizante, sin embargo sí mostraron una gran capacidad de unión al bucle V3 de MN dentro del contexto de la proteína nativa. Como resultado de la presentación del bucle V3 de MN como parte de la envuelta de HXB2 es posible que se produzca un cambio conformacional, con o sin contribución de otros epítopes, que resulte en la producción de anticuerpos conformacionales con mayor capacidad de unión aunque no neutralizantes.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran un aumento en la neutralización de un virus quimérico HXB2/MN como resultado de un cambio conformacional en la envuelta. Este cambio puede dar lugar a la modificación de epítopes pobremente inmunogénicos o a la exposición de epítopes normalmente ocultos en el virus parental. En este sentido, anteriormente había sido descrito que un epítipo neutralizante presente en la región C2 de la envuelta que resulta pobremente inmunogénico cuando forma parte de la proteína nativa muestra una mayor inmunogenicidad como péptido lineal. Todo esto sugiere que la utilización de proteínas o virus quiméricos tales como HXB2/MN puede inducir anticuerpos con una mayor afinidad por epítopes lineales o conformacionales presentes en los aislados naturales de VIH. Aunque los experimentos realizados en este trabajo para demostrar la mayor inmunogenicidad de la proteína quimérica en ratones no fueron satisfactorios, los autores sugieren la necesidad de realizar estos experimentos en primates, modelo animal en el que la respuesta inmune se asemejará más a la humana.

D. Rodríguez Aguirre

Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Cantoblanco. Madrid.

Necesidad del gen «nef» para la replicación *in vivo* y patogenicidad del VIH-1

Jamieson BD, Aldrovandi GM, Planelles V, et al. Requirement of human immunodeficiency virus type 1 *nef* for *in vivo* replication and pathogenicity. *J Virol* 1994; 68:3.478-3.485.

El papel de los genes accesorios del VIH-1 en la patogénesis ha permanecido oculto debido a la carencia de un modelo in vivo apropiado. El más controvertido de estos genes es el «nef». Se han investigado así, en dos aislados del VIH-1 (VIH-1_{JR-CSF} y VIH-1_{NL4.3}) la necesidad del «nef» para su replicación in vitro y su patogenicidad en tимо fetal humano y en implantes hepáticos en ratones con grave inmunodeficiencia combinada. El VIH-1_{JR-CSF} y el VIH-1_{NL4.3} difieren en sus fenotipos in vitro, y en que el VIH-1_{JR-CSF} no induce sincitios y es relativamente citopático, mientras que el VIH-1_{NL4.3} es altamente citopático e induce sincitios rápidamente. Los mutantes «nef» de ambos aislados crecieron con cinéticas similares a las de las cepas origen del virus en linfocitos de sangre periférica estimulados, pero in vivo mostraron unas propiedades de crecimiento atenuadas. El VIH-1_{NL4.3} indujo una depleción severa de timocitos a la seis semanas de la infección, mientras que su mutante «nef», no. Así el VIH-1 «nef» es necesario para que sea eficiente in vivo la replicación vírica y la patogenicidad.

Un modelo experimental animal que permite estudiar *in vivo* la patología del VIH es el denominado de «SCID-mice» o ratones transgénicos inmunodeprimidos, que son portadores del VIH desde la fecundación. En este trabajo se utiliza este modelo animal para estudiar *in vivo* los efectos del gen «nef» en la replicación vírica. Al gen «nef» se le atribuyen importantes funciones como la de regular negativamente la expresión del receptor CD4, y más recientemente la de servir de transporte del citoplasma al núcleo para el genoma vírico, antes de su integración en los cromosomas de la célula huésped¹.

Como se demuestra en este trabajo, se puede seguir considerando que «nef» es un gen dispensable para la replicación vírica, pero que sin él se reduce considerablemente la patogenicidad del virus. Los virus con una delección parcial o completa de este gen pueden servir en la preparación de vacunas contra el SIDA, como se ha demostrado al inmunizar diversos animales de experimentación con virus defectivos en «nef»².

Para estudiar *in vivo* los efectos del gen «nef», los autores construyen un provirus defectivo que posee una delección en los 219 nucleótidos primeros de este gen regulador y comparan su escaso poder citopático o de inducción de sincitios, con el de otros provirus mucho más patogénicos en ratones SCID. En la experimentación se introducen implantes de tejido tímico fetal humano o de hígado dentro de la cápsula renal de los ratones SCID y se analizan biopsias periódicas de estos implantes. Los efectos de la infección vírica *in vivo* se miden unas veces por citometría de flujo y otras mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizaron igualmente cinéticas de replicación vírica *in vivo* e *in vitro*, tanto para los virus fuertemente patogénicos como para los atenuados por delecciones en el gen «nef».

Los mutantes en «nef» fueron de crecimiento mucho más lento y de fenotipo menos citopático que los no mutantes. Los implantes infectados con virus atenuados por mutaciones en «nef» produjeron mucho menor carga vírica en los timocitos *in vivo*. Este tipo de investigación es extraordinariamente valiosa a la hora de evaluar los efectos de vacunas vivas o atenuadas del VIH, que son por hoy las vacunas más prometedoras.

BIBLIOGRAFÍA

- Murti KG, Brown PS, Ratner L, et al. Highly localized tracks of human immunodeficiency virus type 1 *nef* in the nucleus of cells of a human CD4+ T cell line. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:11.895-11.899.
- Daniel MD, Kirchoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science* 1992; 258:1.938-1.941.

L. Medrano

Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus (CNBCR). Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.