

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología



**EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1(VIH-1), EN PACIENTES NO PROGRESORES
CON VIRUS ANCESTRALES**

TESIS DOCTORAL

Virginia Sandonís Martín

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

**EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 (VIH-1), EN PACIENTES NO PROGRESORES
CON VIRUS ANCESTRALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Virginia Sandonís Martín

Bajo la dirección de los doctores

Cecilio López Galíndez
Concepción Casado Herrero

Madrid, 2010

A Nacho, sin cuyo apoyo constante, no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo

A mi familia, que ha estado a mi lado en todo momento. A mi madre,

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Cecilio López Galíndez, director de esta tesis, sin su amable e incesante ayuda este proyecto no hubiera sido posible, por su valiosa ayuda científica y humana a lo largo de estos años,

A Concepción Casado Herrero, codirectora y amiga, que ha colaborado activamente en la realización de este Tesis. Gracias por tu paciencia y ayuda.

Al Plan Nacional de SIDA, sin cuyo apoyo no hubiese podido empezar esta Tesis.

A Carmen Rodríguez, Soledad García y Jorge del Romero del Centro de Salud Sandoval, sin los cuáles este trabajo no hubiera podido realizarse.

A todos mis compañeros del laboratorio de Virología Molecular, a los que continúan y a los que ya no están, a Isabel, María, Rosa, Tamara, Dora, Toni, Ramón, Cata, Carol y Victor muchas gracias a todos por el excelente ambiente de trabajo y por vuestra ayuda.

Al antiguo Biopolímeros, a Pablo, Aurora y Alicia por su excelente trabajo y la ayuda prestada durante todos estos años.

Al resto de compañeros y amigos del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda, muchas gracias a todos por vuestro apoyo.

Abreviaturas

Abreviaturas

Ac	Anticuerpos
ACMR	Ancestro común más reciente
ACMR esp	Ancestro común más reciente español
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALV	Virus de la leucosis aviar
APC	Alofocianina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Acido ribonucleico de transferencia
BLV	Virus de la leucemia bovina
CFV	Virus espumoso del chimpancé
CMSP	Células mononucleares humanas de sangre periférica
cop/ml	Copias de ARN viral por mililitro de plasma
CPA	Células presentadoras de antígenos
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DMSO	Dimetil sulfóxido
dN	Proporción de mutaciones no sinónimas
dS	proporción de mutaciones sinónimas
DTT	Ditiotreitol
ES	Elite supressors
EC	Elite controlers
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
IL-2	Interleucina 2 Recombinante Humana
LTNP	Paciente no progresor a largo plazo
LTR	Región terminal repetida
LV	Virus de la leucemia murina
ml	Mililitro
M	Molar
ML	Método de reconstrucción filogenético de máxima verosimilitud
mM	Milimolar
MMTV	Virus del tumor mamario de ratón
ng	Nanogramo
NJ	Análisis filogenético por el método del vecino más próximo
ONUSIDA	Programa de las Naciones Unidas para el SIDA
PBS	Tampón fosfato sódico-potásico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
PC	Pacientes progresores crónicos
PR	Pacientes progresores rápido
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNasa H	Ribonucleasa H
RPMIc	Medio completo Roswell Park Memorial Institute
RRE	Elemento de respuesta a <i>rev</i>
RT	Transcriptasa inversa o retrotranscriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN
SCEsp	Secuencia consenso española
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Sodio dodecil sulfato

SEB	Enteroxina B del estafilococo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TAR	Región de la respuesta transactivadora
TARGA	Tratamiento antirretroviral de alta eficacia
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
T CD4⁺	Linfocitos T que expresan la molécula CD4 en su superficie
T CD8⁺	Linfocitos T que expresan la molécula CD8 en su superficie
t-test	Test de Student
UDIV	Usuario de drogas intravenosas
VC	Viremic controllers
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
VIS	Virus de la inmunodeficiencia simia
WDSV	Virus del sarcoma cutáneo de Walleye
μM	Micromolar
μl	Microlitro
°C	Grado centígrado

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)	
1.1.1 La pandemia de VIH/SIDA	4
1.1.2 Clasificación del VIH-1	5
1.1.3 Estructura del virión, organización genómica y proteínas del VIH-1	6
1.2 INFECCIÓN POR EL VIH-1	
1.2.1 Ciclo replicativo del VIH	9
1.2.2 Historia natural de la infección por el VIH-1	13
1.2.3 Patogénesis de la infección por el VIH-1	14
a) Factores virológicos implicados en no progresión	17
b) Factores genéticos del huésped implicados en no progresión	18
c) Factores inmunológicos implicados en no progresión	20
d) Factores exógenos	22
1.3 VARIABILIDAD DEL VIH-1	
1.3.1 Generación de variabilidad	23
1.3.2 Variabilidad del VIH en la población humana	24
1.4 LA CUASIESPECIE DEL VIH-1 EN EL INDIVIDUO INFECTADO	26
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Muestras de VIH-1 de pacientes infectados	32
3.2 Obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica	32
3.3 Separación de ácidos nucleicos	
3.3.1 Ácido desoxirribonucleico (ADN)	32
3.3.2 Ácido ribonucleico (ARN)	33
3.4 Amplificación y cuantificación del ADN viral asociado a CMSP	
3.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN proviral	33
3.4.2 Cuantificación del ADN viral asociado a CMSP	34
3.5 Cuantificación de ARN viral en plasma	35
3.6 Amplificación de ARN viral de sobrenadante de cultivo	
3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN (RT-PCR)	35
3.7 Purificación y secuenciación de los productos de PCR	
3.7.1 Purificación de los productos de PCR	36
3.7.2 Secuenciación automática	36

3.8 Análisis de secuencias	
3.8.1 Edición y alineamiento de las secuencias	37
3.8.2 Análisis filogenético	37
3.8.3 Cálculo de las distancias genéticas	38
3.8.4 Reconstrucción del ancestro común más reciente (ACMR)	38
3.8.5 Análisis de mutaciones	38
3.8.6 Secuencias nucleotídicas utilizadas para la construcción de la curva de datación	38
3.8.7 Análisis de sitios de los N-glicosilación	39
3.9 Amplificación y secuenciación del genoma completo del VIH-1 en pacientes LTNP ancestrales	39
3.10 Cultivos celulares	
3.10.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donante sano y separación de células T CD8 ⁺	41
3.10.2 Tratamiento de las células de donante con Mitomicina	41
3.10.3 Purificación de CMSP de paciente LTNP: purificación de células T activadas CD4 ⁺ CD45RO ⁻ y de células memoria T CD4 ⁺ CD45 RO ⁺	42
3.10.4 Marcaje, fijación y análisis de las poblaciones celulares purificadas por citometría de flujo	42
3.10.5 Co-cultivo de células purificadas de pacientes ancestrales con CMSP de donante sano	43
3.10.6 Medida del antígeno p24 del HIV-1 en sobrenadante de cultivo	43
3.11 Análisis de la concentración de β-2 Microglobulina en plasma.	44
3.12 Análisis de la respuesta inmune humoral anti-VIH-1	45
3.13 Caracterización del genotipo CCR5 Δ-32	46
3.14 Determinación de marcadores genéticos: Tipado de antígeno leucocitario humano (HLA)	46
3.15 Análisis estadísticos	46
4. RESULTADOS	
4.1 Pacientes LTNPs	
4.1.1 Definición y clasificación de los pacientes LTNPs	48
4.1.1.1 Datación de las secuencias virales	48
4.1.1.2 Clasificación de los pacientes LTNPs según la datación de las secuencias nucleotídicas	50
4.2 Estudio de los pacientes LTNP ancestrales	
4.2.1 Análisis de las características clínicas de los pacientes LTNP ancestrales: carga viral, número de células T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺	51
4.2.2 Análisis filogenético de pacientes LTNP ancestrales	58
4.2.3 Heterogeneidad y Divergencia de las cuasiespecies virales	69
4.2.3.1 Pacientes sin evolución viral: LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56	69
4.2.3.2 Pacientes con evolución viral: LTNP 1 y 5	73

4.2.4	Análisis de los valores dN y dS en las cuasiespecies virales	75
4.2.5	Análisis de los sitios de glicosilación en la región C2-V5 del gen de la envuelta	78
4.3	Aislamiento y cocultivo de virus	82
4.4	Características genéticas del hospedador	
4.4.1	Análisis de polimorfismos (SN)	83
4.4.2	Análisis del Antígeno Leucocitario Humano (<i>HLA</i>)	84
4.5	Análisis del genoma completo del VIH-1 en pacientes LTNP ancestrales	
4.5.1	Análisis de mutaciones, inserciones y deleciones	85
4.5.1.1	Pacientes sin evolución viral: LTNP 2, 3, 20 y 56	86
4.5.1.1.1	Cuantificación de las formas delecionadas a lo largo del seguimiento en pacientes sin evolución viral: LTNP 2, 3, 20 y 56	87
4.5.1.1.2	Análisis y cuantificación de genomas delecionados en pacientes LTNP modernos y progresores rápidos	88
4.5.1.2	Análisis del genoma completo en pacientes con evolución viral: LTNP 1 y 5	89
4.5.1.2.1	Análisis de mutaciones en los epítomos de pacientes LTNP ancestrales con evolución viral: LTNP 1 y LTNP 5.	90
4.5.1.2.2	Análisis de hipermutación en pacientes ancestrales con evolución viral: LTNP1, y LTNP5.	91
4.5.2	Análisis de mutaciones en el genoma completo de LTNP ancestrales	92
5.	DISCUSIÓN	96
5.1	Mecanismos de control de la replicación viral en la infección por VIH-1	97
5.2	Análisis del genoma completo	
5.2.1	Pacientes sin evolución viral: LTNPs 2, 3, 17, 20 21 y 56	99
5.2.2	Pacientes con limitada evolución viral: LTNP 1 y LTNP 5	100
5.3	Análisis de mutaciones en los pacientes LTNP ancestrales	101
5.4	Factores genéticos del huésped	102
5.5	Nomenclatura en pacientes LTNP ancestrales	104
6.	CONCLUSIONES	106
7.	BIBLIOGRAFÍA	109
8.	ANEXO	125

The main goal of the project was to study the evolution of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a group of long term non progressor patients (LTNPs), particularly in a sub-group classified as ancestral. Based on the analysis of the nucleotide sequence in *env* gen of the viruses of different isolates collected in different geographical areas of Spain, we established a correlation between the genetic distance and the date of the specimen collection.

Based on this study, we were able to determine the existence of two distinct groups within LTNPs. First we defined a group of ancestral LTNP patients showing only ancestral nucleotide sequences close in dating to the time of seroconversion; and second group of LTNPs, referred to as modern patients, displaying modern viral dating, with the estimation time of the sequence close to the sampling date.

Viral evolution was analyzed using the viral DNA extracted from the PBMCs of eight HIV-1 ancestral LTNPs with an extreme control of their viral replication. Plasma viral load in these patients except for independent blips below 2000 copies/ml, was below the detection limit (<50copies/ml). DNA copies per million of cells were estimated close to 1-55 in these ancestral patients.

The Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees showed extremely short branch length and, consequently, an extremely low viral evolution from their most recent common ancestor (MRCA). In spite of, we were able to define two groups within the ancestral patients, with different viral evolution: first a group of patients without viral evolution, in which the lack of evolution correlated with the maintenance of a good clinical stage over the time, and a second group of patients characterized by the existence of limited viral evolution that corresponds to clinical deterioration and is mainly caused by the loss of CD4⁺ T cells over time.

The analysis of the complete genome sequencing of viral DNA from these patients showed a large number of genome deletions as a dominant form in the first group of ancestral LTNPs. The presence of these deleted viruses and their contribution to the pathology of the infection are still not clear. However, the existence of fewer deletions in regular progressor patients could indicate their importance in HIV pathogenesis.

Furthermore, we detected a high number of hypermutated sequences or escape mutations in the second group of ancestral LTNPs. Analysis of the mutations in these ancestral LTNPs showed a large number of common mutations present in all the patient's viruses indicating a common origin.

In addition, many host factors have been associated with patients having a non progressive HIV-1 infection. The strongest association was found with certain HLA alleles and different Single nucleotide polymorphisms (SNP). Analysis of the host characteristics in the ancestral patients showed at least one, and possibly two, host markers related with non progression.

In summary, control of viral replication in ancestral LTNPs was achieved by different combinations of virological and host protective factors.

INTRODUCCIÓN

1.1 EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1.1.1 La pandemia de VIH/SIDA.

En el año 1981, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), fue reconocido como una nueva entidad clínica (Gottlieb, 1981) que se caracterizaba por la presencia de anomalías inmunológicas generalmente acompañadas por infecciones oportunistas, desórdenes neurológicos y formas inusuales de cáncer.

Los primeros estudios epidemiológicos demostraron que esta enfermedad estaba causada por un nuevo agente infeccioso que podía ser transmitido a través de la sangre o derivados de la misma, a través de los fluidos genitales y verticalmente de madres a hijos. La muestra conocida más antigua de VIH tipo 1 (VIH-1) proviene de una muestra de plasma del año 1959, y varios estudios sobre el origen de la epidemia postulan que ésta se inició en el siglo XX (Zhu et al., 1998).

Globalmente, la pandemia de VIH y SIDA constituye un problema de salud pública de primera magnitud en el mundo, con grandes repercusiones demográficas, sociales y económicas en muchos países. Hasta el momento es el causante de 25 millones de muertes en el mundo. El programa Conjunto de Naciones Unidas sobre VIH/SIDA (ONUSIDA) estimaba que durante el año 2008 el VIH infectó a 2,7 millones de personas, y el número total de personas infectadas por el VIH era de 33,4 millones de personas (http://data.unaids.org/pub/Report/2009/2009_epidemic_update_es).

Resumen de la epidemia mundial de SIDA		
<i>Diciembre 2008</i>		
Personas que vivían con el VIH en 2008		
Total	33.4 million	[31.1 – 35.8 million]
Adultos	31.3 million	[29.2 – 33.7 million]
Mujeres	15.7 million	[14.2 – 17.2 million]
Niños menores de 15 años	2.1 million	[1.2 – 2.9 million]
Nuevas infecciones con el VIH en 2008		
Total	2.7 million	[2.4 – 3.0 million]
Adultos	2.3 million	[2.0 – 2.5 million]
Niños menores de 15 años	430 000	[240 000 – 610 000]
Muertes relacionadas con el SIDA 2008		
Total	2.0 million	[1.7 – 2.4 million]
Adultos	1.7 million	[1.4 – 2.1 million]
Niños menores de 15 años	280 000	[150 000 – 410 000]

Tabla 1.1: Resumen numérico de la epidemia del VIH/SIDA. Los intervalos de las estimaciones presentadas en este cuadro, definen los márgenes dentro de los cuales se encuentran los datos reales proporcionados. ONUSIDA 2009.

1.2. Clasificación del VIH

Según las características genéticas, morfológicas y biológicas, el VIH es un retrovirus perteneciente a la familia *Retroviridae*, y el género *Lentivirus* cuyos miembros se diferencian del resto de retrovirus por presentar un marcado poder citolítico y se caracterizan por la capacidad de infectar células del sistema inmunitario y de producir infecciones lentas. La familia *Retroviridae* agrupa agentes virales que poseen una enzima, la transcriptasa en reverso (RT), capaz de copiar el ácido ribonucleico (ARN) a ácido desoxirribonucleico (ADN). La familia *Retroviridae* incluye varios géneros de virus (Tabla 1.2) que tienen las siguientes características comunes: virus con envoltura, cápside en forma de cono truncado, tiene como genoma dos copias de ARN de cadena positiva, posee varias enzimas, entre ellas la RT y una proteasa.

Como todos los retrovirus, el genoma del VIH está codificado por ARN de polaridad positiva constituido por dos hebras idénticas, el cuál es retrotranscrito a ADN de doble cadena por la enzima RT, se integra en el genoma de la célula que infecta formando el provirus y desde el genoma celular se transcribe utilizando la maquinaria celular y originando una nueva progenie vírica. Estos virus presentan en su genoma varias proteínas reguladoras que condicionan la complejidad de la interacción virus-célula y, por tanto, la patogenia de la enfermedad (David et al., 2001; Griffiths, 2005; Murphy, Fauquet, and Bishop, 1995).

Familia	Género	Virus
<i>Retroviridae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	Virus de la Leucosis Aviar (ALV)
	<i>Betaretrovirus</i>	Virus del Tumor mamario de ratón (MMTV)
	<i>Gammaretrovirus</i>	Virus de la Leucemia Murina (MLV)
	<i>Deltaretrovirus</i>	Virus de la Leucemia Bovina (BLV)
	<i>Lentivirus</i>	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y 2 (VIH-1, VIH-2)
	<i>Spumavirus</i>	Virus espumoso del chimpancé (CFV)
	<i>Epsilonretrovirus</i>	Virus del sarcoma cutáneo de Walleye (WDSV)

Tabla 1.2. Clasificación de los retrovirus

1.3. Estructura del virión, organización genómica y proteínas del VIH-1.

El examen por microscopía electrónica revela que los viriones del VIH-1 son partículas esféricas de entre 80 y 130 nanómetros, cuya envuelta externa es una bicapa lipídica en la que se insertan unas espículas formadas por las glicoproteínas virales, gp 120 y gp 41, las cuáles están asociadas no covalentemente en la superficie del virión.

Por debajo, se encuentra la proteína miristilada p17 que forma la matriz, y más en el interior un nucleoide, formado por una cápside denominada core, constituida por la proteína p24, que a su vez contiene el material genómico, enzimas virales, (RT, RNasa H, proteasa) y las proteínas de la nucleocápside p6 y p7 (Fig 1.1).

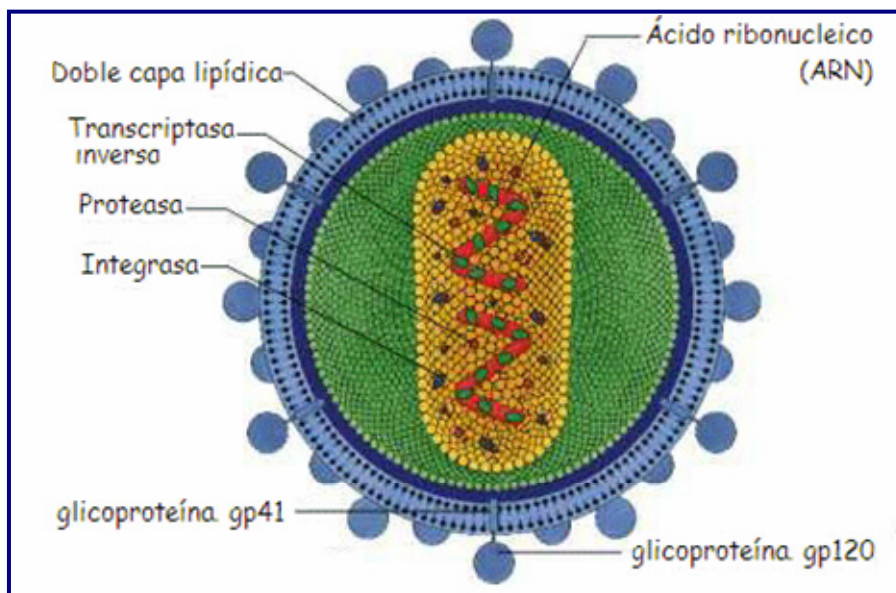


Figura 1.1 Diagrama esquemático del virión del VIH-1

El virión del VIH contiene dos copias de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 9800 pares de bases (pb) y polaridad positiva. En los primeros estadios de la infección, el ARN genómico por medio de la RT se convierte en ADN lineal de cadena doble. La molécula de ADN sintetizada es colineal al molde de ARN. En el estado de provirus el genoma está flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR, *long terminal repeats*) (Murphy, Fauquet, and Bishop, 1995) que participan en la integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped y que contienen los elementos reguladores de la transcripción viral y de la poliadenilación (Mellors et al., 1996).

Los genes *gag*, *pol* y *env* codifican las proteínas estructurales y enzimas virales, componentes esenciales de la partícula viral. El producto de la traducción del gen *gag* es la poliproteína precursora Gag. Durante la traducción, el extremo amino terminal de esta proteína es miristilado, lo que desencadena su asociación con la membrana de la célula infectada. Durante la maduración vírica esta proteína es procesada por una proteasa codificada por el gen *pol* dando lugar a la proteína de la matriz p17, la proteína de la cápside p24 y las proteínas de la nucleocápside p6 y p7. El producto del gen *pol* es la poliproteína Pol cuyo procesamiento da lugar a las tres enzimas víricas: la proteasa (p11), la RT (p66/p51) y la integrasa (p32). El gen *pol*, constituye la segunda estructura abierta de lectura del genoma y se superpone al gen *gag* en 241 bases. El gen *env* se encuentra situado en el extremo 3' del genoma y se expresa como una glicoproteína precursora Gp160, que es procesada por proteasas celulares dando lugar a las proteínas de la envuelta Gp120 (de superficie) y Gp41 (transmembrana). Los genes *tat* y *rev* por su parte codifican las proteínas reguladoras, encargadas de activar la transcripción y promover el transporte al citoplasma de los ARN mensajeros (ARNm) respectivamente. Por último, los genes *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* codifican las proteínas accesorias, que si bien en general no son necesarias para la propagación del virus en cultivo, su papel *in vivo* es muy importante ya que participan activamente en los procesos de localización nuclear del complejo de preintegración, así como en la maduración y liberación extracelular de los viriones (Fig1.2, Tabla 1.3), (Frankel and Young, 1998).

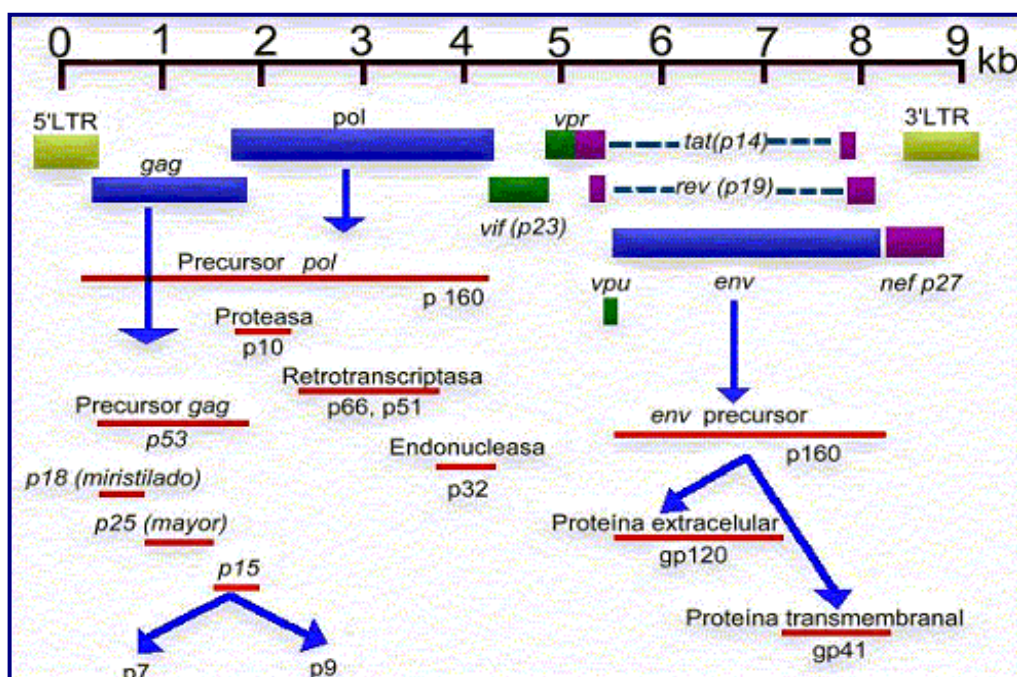


Figura 1.2: Organización genómica del VIH-1. Estructura codificante del genoma del VIH, flanqueada en los dos extremos por las LTR y maduración de las proteínas víricas.

Gen	Función
	Proteínas estructurales
<i>gag</i>	P55: precursora de p17, p24, p15, todas ellas estructurales
	P17: Proteína miristilada de la matriz (MA). Favorece el anclaje en la membrana y dirige al complejo de preintegración hacia el núcleo. Interacciona con Env
	P24: Proteína de la cápsida (CA)
	P15: Proteína precursora de otras menores de la nudeocápsida (NC): p7, p6 y p1.
	P7: Proteína de la nudeocápsida. Se une al ARN viral
	P6: Proteína rica en prolinas. que se une a Vpr. Favorece la maduración del virus
	P1 y p2: Fragmentos muy cortos de función desconocida que separan p7 y p6.
<i>pol</i>	P90: Proteína precursora de las enzimas proteasa (p10) transcriptasa inversa (p66, p51), ribonucleasa H (p15) e integrasa (p31).
	P10: Proteasa (PR). Procesa la postraducción de proteínas
	P66, p51: Dos subunidades de la transcriptasa inversa (RT). Retrotranscriben el ARN viral.
	P15: RNasa H. Presente en la subunidad p66 y no en la p51
	P31: Integrasa. Cataliza la transferencia de hebras y la integración del ADNc.
	Gp 160: glicoproteínas precursora de gp 120 y gp 41.
<i>env</i>	Gp120: glicoproteína de superficie
	Gp41: glicoproteína de transmembrana
	Proteínas reguladoras
<i>tat</i>	P14: Transactiva la transcripción de todos los ARNm del VIH
<i>rev</i>	P19: Transporta selectivamente el ARNm completo o procesado parcialmente hacia el citoplasma
	Proteínas accesorias
<i>nef</i>	P27: Aumenta la infectividad del virión y tiene función pleiotrópica, con múltiples interacciones intracelulares. Regula a la baja el receptor CD4 y los antígenos de histocompatibilidad MHC-I y MHC-II.
<i>vif</i>	P23: Proteína asociada a la maduración e infecciosidad del virión
<i>vpr</i>	P15: Detiene el ciclo celular en G2. Facilita la entrada al núcleo del complejo de preintegración
<i>vpu</i>	P16: Presente sólo en VIH-1 y en VIS de chimpancé. Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada. Interviene en la degradación del CD4.

Tabla 1.3. Resumen de las proteínas estructurales, reguladoras y accesorias del VIH.

1.2. INFECCIÓN POR EL VIH-1

1.2.1 Ciclo replicativo del VIH

El ciclo de replicación de los lentivirus se divide en dos fases: fase temprana y fase tardía. La fase temprana comienza con la unión del virus a la célula y continúa con la retrotranscripción del genoma viral y formación del provirus integrado en el genoma celular. La fase tardía comienza después de un período de latencia con la transcripción del ARN viral a partir del ADN proviral y finaliza con la liberación de los viriones de la célula.

Las células T CD4⁺ no infectadas salen del timo como células “naive” y circulan hasta encontrarse con su antígeno específico. En ese momento se produce el proceso de activación y la célula comienza a proliferar. Una vez eliminado el antígeno, la mayor parte de las células activadas mueren por apoptosis, las que sobreviven retornan a un estado de reposo G₀ en el cual persisten como células de memoria capaces de responder frente a subsecuentes encuentros con el mismo antígeno. El VIH-1 es capaz de infectar células T CD4⁺ en todos los estadios, sin embargo, la infección productiva solo se produce si hay una activación de la célula T infectada (Finzi and Silliciano, 1998).

La infección productiva por el VIH se inicia mediante la interacción específica entre la glicoproteína Gp120 de la envuelta viral y el dominio amino-terminal del receptor CD4 (Rinaldo et al., 1998) (Fig. 1.3). Esta unión provoca un cambio conformacional en la envuelta viral que favorece la interacción de la Gp120 con el co-receptor celular CCR5 o CXCR4 (receptor de quimioquinas) (Kedzierska et al., 2003) y la exposición de dominios de la proteína Gp 41 que llevan a la fusión de la membrana viral y celular (Koshiba and Chan, 2003). Después de la fusión, la nucleocápsida del virus se libera al citoplasma y se inicia el proceso de transcripción inversa. Durante este proceso, la enzima RT se une al ARN viral y a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) específico del aminoácido Lisina, que se une a una secuencia complementaria en el ARN viral y es usado como cebador por la RT. Primero se sintetiza una hebra de ADN de polaridad negativa y después la hebra positiva, para formar la molécula de ADN lineal de doble cadena. Este ADN es transportado al interior del núcleo de la célula, mediante un proceso activo que depende de la presencia de señales de localización celular en algunas proteínas virales que forman parte del complejo de preintegración. Una vez en el núcleo el ADN lineal

se integra de forma estable en el genoma de la célula huésped mediante la integrasa viral, y se forma el provirus (Fig 1.3).

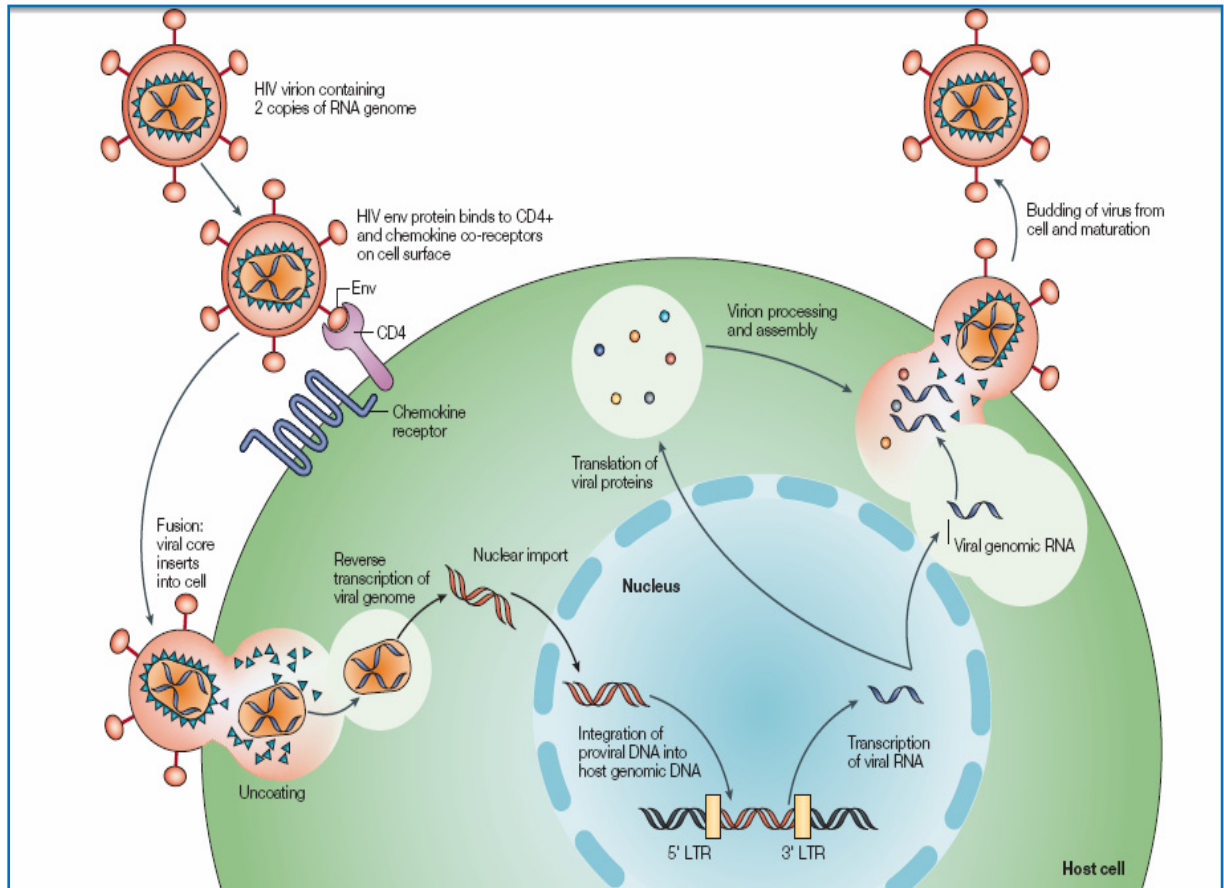


Figura 1.3: Ciclo de vida del VIH-1. Tomado de (Rambaut et al., 2004)

La iniciación de la transcripción del provirus, depende de factores celulares y virales que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en la región U3 de la LTR. Estos elementos celulares se unen al promotor viral y aumentan la expresión genética del VIH-1 en respuesta a la estimulación celular por diferentes mecanismos, como citoquinas exógenas, y permiten la formación y activación del complejo transcripcional primario con la ARN polimerasa II celular. El ARN generado es procesado en el núcleo y transportado al citoplasma con ayuda de la proteína viral Rev, donde se traduce dando las distintas proteínas virales, que viajan hasta los centros de ensamblaje para formar los nuevos viriones, que son liberados mediante un proceso de gemación a través de la membrana plasmática (Frankel and Young, 1998).

Posteriormente se produce la maduración del virión con ayuda de la proteasa viral. Estas partículas maduras son capaces de infectar nuevos linfocitos T CD4⁺.

La mayor parte del virus ($\geq 99\%$) que se detecta en el plasma en cualquier momento de la infección procede de células T CD4⁺ activadas, infectadas recientemente (Perelson et al., 1997; Perelson et al., 1996). La vida media de estas células productivamente infectadas es muy corta (1 a 2 días) y se estima que cada día se destruyen entre 10^7 y 10^8 de estas células (Perelson et al., 1996).

Infección latente: A diferencia de lo que ocurre en una célula activada, la infección de una célula en reposo, ya sea “naive” o de memoria, no conduce a una infección productiva inmediata debido a un bloqueo del ciclo biológico previo a la integración del genoma viral en la célula huésped (Bukrinsky et al., 1991; Zack et al., 1990). A pesar de ello, la retrotranscripción si puede llegar a completarse (Pierson et al., 2002). Las células T CD4⁺ “naive” o de memoria con ADN viral no integrado representan un reservorio latente del virus (*latencia preintegración*). Si estas células son activadas antes de que se degrade el complejo de preintegración se pueden producir los pasos que conducen a una infección productiva (Bukrinsky et al., 1991; Spina, Guatelli, and Richman, 1995; Zack et al., 1990) (Fig. 1.4.) Aunque la vida media de las células de este reservorio es muy corta (1 a 10 días aproximadamente) (Pierson et al., 2002; Spina, Guatelli, and Richman, 1995) se calcula que la cantidad de ADN viral no integrado, es uno a dos órdenes de magnitud mayor a la de ADN proviral (Bukrinsky et al., 1991; Chun et al., 1997a; Gelderblom et al., 2008).

Por otra parte, aunque la mayoría de las células activadas infectadas productivamente mueren por el efecto citopático directo del virus, una pequeña fracción de estas células sobrevive lo suficiente como para volverse una célula de memoria que portará un genoma integrado del virus (Chun et al., 1995). Las células T CD4⁺ de memoria con ADN viral integrado representan el otro reservorio latente (*latencia postintegración*). En el caso de que estas células vuelvan a activarse por un nuevo encuentro con el mismo antígeno se producirían nuevos viriones (Chun et al., 1998; Folks et al., 1989; Moriuchi, Moriuchi, and Fauci, 1999; Moriuchi et al., 2000; Pomerantz et al., 1990) (Fig. 1.4). La importancia de esta forma de latencia radica en la elevada vida media de las células memoria y por tanto del reservorio. Estudios con pacientes en terapia antirretroviral han demostrado que virus competentes para la replicación pueden ser aislados a partir de células T CD4⁺ “naive” y de memoria de

pacientes tratados que han permanecidos avirémicos hasta 3 años (Chun et al., 1997b; Finzi et al., 1997; Lambotte et al., 2002; Persaud et al., 2000).

Las estimaciones sobre la vida media de este reservorio son muy diversas y oscilan entre 6 y 44 meses (Finzi et al., 1999), lo que imposibilita la erradicación del virus a pesar del tratamiento antirretroviral.

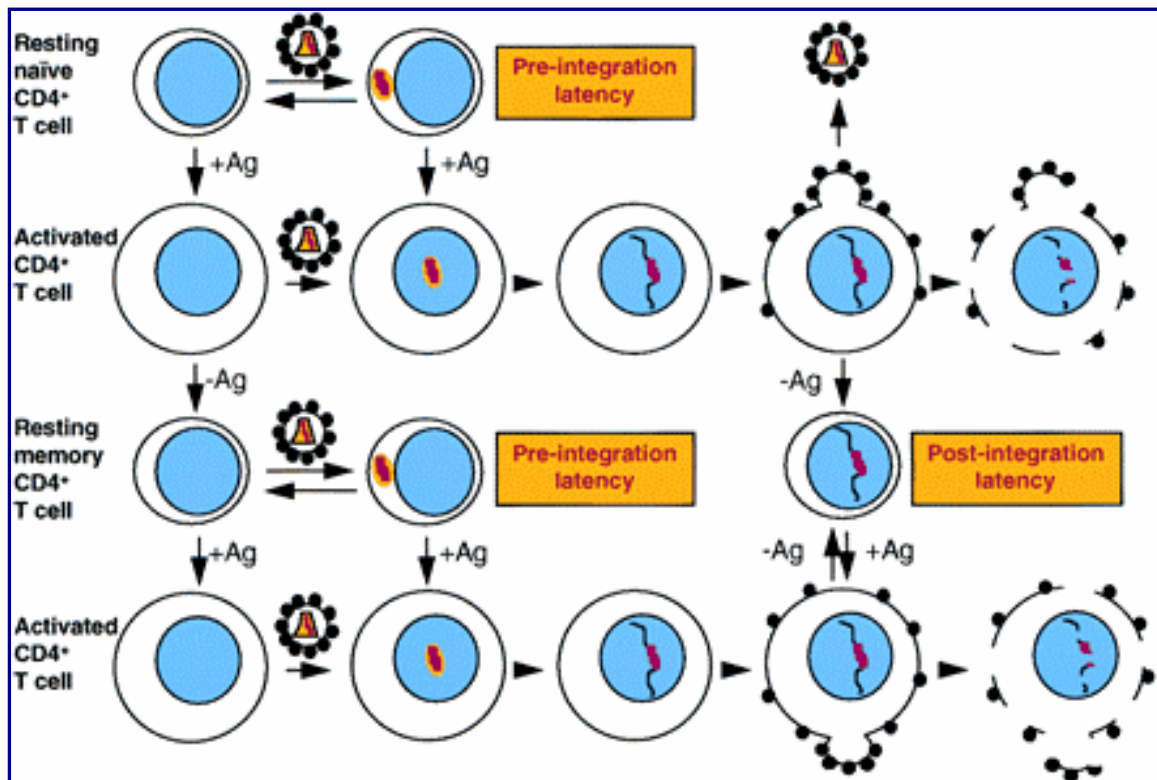


Figura 1.4. Dinámica celular de la infección de células T CD4⁺ por el VIH-1. El virus es capaz de infectar células activadas (grandes) y células en reposo tanto “naive” como de memoria (pequeñas); pero la replicación no ocurre en células en reposo debido a un bloqueo en el transporte al núcleo del complejo de preintegración. Células en reposo con ADN viral no integrado representan un reservorio viral relativamente lábil (latencia preintegración). La infección productiva requiere la activación mediada por antígeno de la célula en reposo recientemente infectada, o más comúnmente, la infección directa de una célula T CD4⁺ activada. Las células productivamente infectadas generalmente mueren al cabo de 1-2 días, pero algunas sobreviven el tiempo suficiente como para revertir a un estado de reposo, estableciendo así un reservorio más estable de células T CD4⁺ de memoria con una molécula de ADN de VIH.1 integrado (latencia postintegración). Tomado de (Finzi and Silliciano, 1998).

1.2.2 Historia natural de la infección por el VIH-1.

Después de la infección primaria, la alta replicación viral inicial conduce a una rápida diseminación del virus en órganos linfoides y otros tejidos del paciente infectado (Grossman et al., 2006). Entre 2 ó 3 semanas post-infección y asociado con el desarrollo de una fuerte respuesta celular T citotóxica, que precede a la aparición de anticuerpos específicos (Borrow et al., 1997; Jones et al., 2004), se produce una drástica caída en los niveles de ARN vírico en plasma y un restablecimiento del número de células T CD4⁺ (Pilgrim et al., 1997).

Este nivel basal de replicación viral se denomina **set point** y varía de un individuo a otro constituyendo un importante marcador virológico de progresión de la enfermedad (Mellors et al., 1995; Mellors et al., 1996). Después de la primoinfección, se inicia la fase clínicamente asintomática, de duración variable, entre la infección primaria y el desarrollo del SIDA. Durante el período asintomático de la infección, la replicación del virus es continua (Embretson et al., 1993; Pantaleo et al., 1993; Piatak et al., 1993), pero el individuo mantiene una fuerte respuesta inmune frente al virus, estableciéndose un estado de equilibrio, en el cual la producción y eliminación del virus alcanza valores semejantes (Ho et al., 1995a; Perelson et al., 1996; Silvestri and Feinberg, 2003; Wei et al., 1995). Como resultado, los niveles de ARN vírico en plasma permanecen estables (Gange et al., 2001; Hubert et al., 2000; Lyles et al., 1999; O'Brien et al., 1998). Pero el número de células T CD4⁺ disminuye lentamente con una tasa media estimada de 25-60 células/ μ l/año (Lang et al., 1989) y el virus invariablemente escapa al control inmune. La última etapa de la enfermedad, en ausencia de tratamiento antirretroviral, se caracteriza por un aumento de la replicación del VIH-1 y coincide clínicamente con una marcada disminución en el número de células T CD4⁺ (< 300 células/ μ l) (Goudsmit et al., 2002; Lefrere et al., 1997; Rodes et al., 2004) y una profunda alteración del estado general del paciente, caracterizada por la aparición de infecciones oportunistas graves, ciertas neoplasias y alteraciones neurológicas (Fig 1.5).

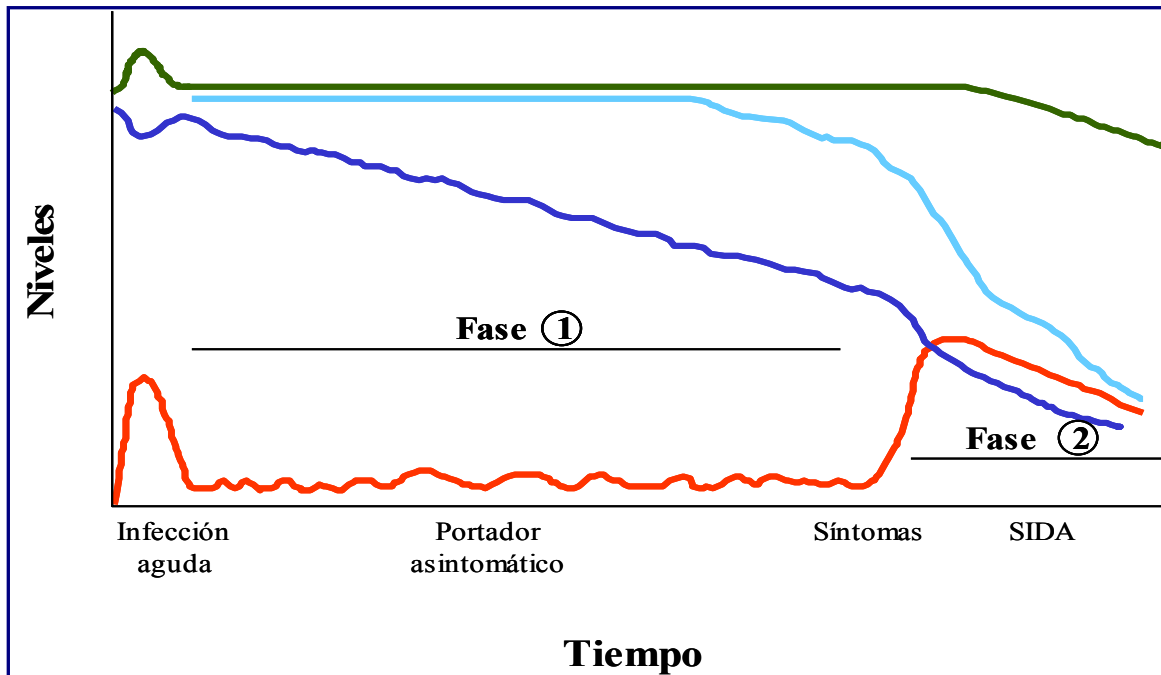


Figura 1.5 Curso clínico de la infección natural por VIH-1. La infección primaria se caracteriza por la presencia de altos niveles de virus en sangre (—), que disminuyen hasta alcanzar un valor estacionario en la fase asintomática (Fase 1). La aparición de síntomas clínicos se ve acompañada de un nuevo aumento en los niveles de viremia en sangre que permanecen elevados durante todo el periodo terminal (Fase 2). El nivel de linfocitos $CD4^+$ (—) disminuye durante la infección aguda aunque posteriormente se recuperan alcanzando niveles ligeramente inferiores a los iniciales. Durante la Fase 1 su nivel va disminuyendo paulatinamente, en muchos individuos el inicio de la Fase 2 se acompaña de un marcado descenso en el número de linfocitos $CD4^+$. El número de linfocitos $CD8^+$ (—) se eleva durante la infección primaria retornando a la normalidad durante toda la Fase 1, solo durante la Fase 2 se produce una disminución clara en los niveles de linfocitos $CD8^+$. Por último, el número de linfocitos $CD8^+$ específicos frente al VIH-1 (—) que se ha mantenido constante durante la Fase 1, comienza a disminuir con anterioridad a la aparición de síntomas y a partir de este momento desciende rápidamente a medida que la enfermedad progresa. Tomado de (Levy, 1998).

1.2.3. Patogénesis de la infección por el VIH-1

El curso de la enfermedad es muy variable entre pacientes infectados por el VIH-1 (Haynes, Pantaleo, and Fauci, 1996). La mayoría de los pacientes (80-85%), denominados progresores crónicos (PC), presentan una evolución caracterizada por una progresiva caída del número de linfocitos T $CD4^+$ durante un periodo de 8 a 10 años, hasta presentar finalmente las enfermedades definitorias de SIDA en ausencia de tratamiento antirretroviral (Bacchetti and Moss, 1989; Hendriks et al., 1993; Muñoz et al., 1989).

Después de la primoinfección presentan una disminución muy marcada de la carga viral con una importante respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos de virus (CTL) que disminuirá progresivamente a lo largo del tiempo.

En una pequeña proporción de pacientes infectados (10%), denominados progresores rápidos (PR), el descenso en el número de células T CD4⁺ se produce a una mayor velocidad, entre 2 a 5 años después de la infección, acompañado de altos niveles de ARN vírico en plasma que no disminuyen sustancialmente después de la infección primaria (Casado et al., 2001; Khanlou, Salmon-Ceron, and Sicard, 1997).

Por último, existe un pequeño grupo de pacientes infectados (5-10%), denominados progresores lentos o no progresores a largo plazo (PL o LTNP), en los que el número de células T CD4⁺ se mantiene a niveles normales incluso después de 10 años de infección y suelen presentar un nivel de ARN vírico en plasma siempre bajo (Bello et al., 2005; Buchbinder et al., 1994; Keet et al., 1994; Lefrere et al., 1997; Sheppard et al., 1993), aunque se ha descrito que un porcentaje de estos pacientes acaban evolucionando finalmente a SIDA (Goudsmit et al., 2002; Rodes et al., 2004).

En los últimos años, se ha descrito un nuevo subgrupo de pacientes dentro del grupo de LTNP, denominados “Elite Suppressors”, “VIH controllers”, o “Elite non-progressors”. Se han definido como pacientes no tratados que mantienen la carga viral por debajo de 50 copias/ml (Deeks and Walker, 2007; Dyer et al., 2008; Hunt, 2009; Okulicz et al., 2009). Otros autores, definen a este nuevo grupo como aquellos pacientes infectados durante más de 10 años, que presentan más de un 90% de determinaciones de carga viral plasmática por debajo de 400 copias/ml sin terapia antirretroviral (Lamine et al., 2007), o por debajo de 500 copias/ml (Grabar et al., 2009). La prevalencia de este tipo de pacientes entre la población infectada por VIH-1, es difícil de determinar. Estudios en distintas cohortes han mostrado, que estos supresores de élite, son pacientes raros y representan alrededor del 1% de los pacientes infectados (Hubert et al., 2000; Lambotte et al., 2005; Madec et al., 2005). Aunque hay una gran variedad de definiciones en torno a este grupo de pacientes (Fig.1.6 y Fig.1.7), hay un consenso en cuanto que este grupo de pacientes controla la replicación viral de forma espontánea (Baker et al., 2009; Deeks and Walker, 2007; Mikhail, Wang, and Saksena, 2003; Saez-Cirion et al., 2007b; Saksena et al., 2007).

Estos pacientes, por sus características representan un modelo natural de control de la infección por el VIH. Por lo tanto, es crucial comprender los factores virológicos, genéticos e inmunológicos, que puedan estar contribuyendo a la supresión de la replicación viral que presentan este grupo de individuos.

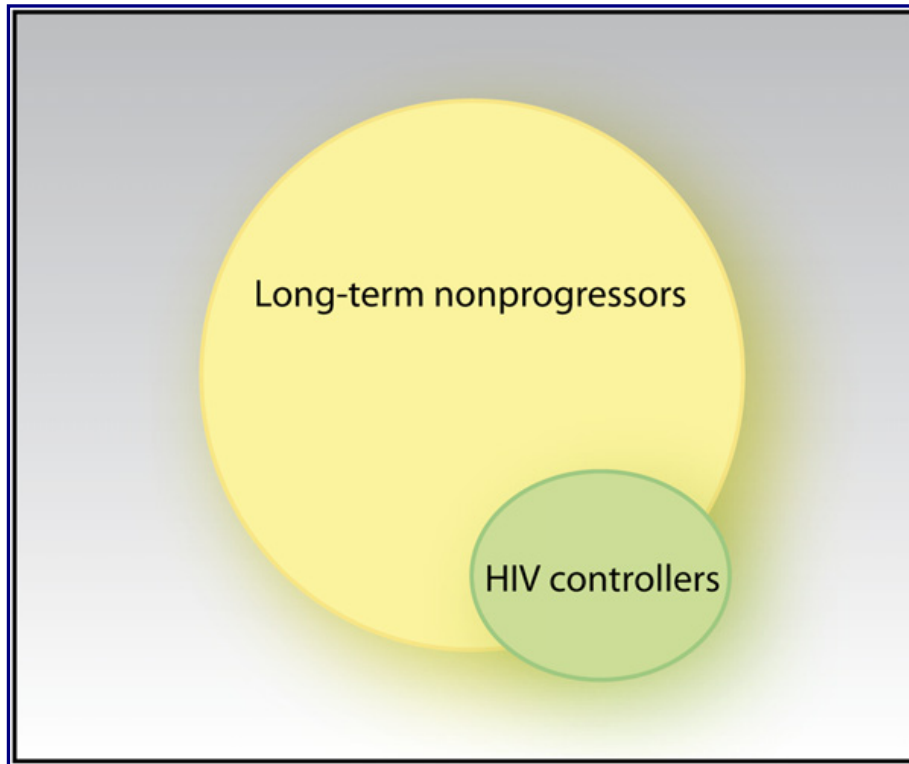


Figura 1.6: Distribucion LTNP y controladores de elite. Tomado de (Deeks and Walker, 2007)

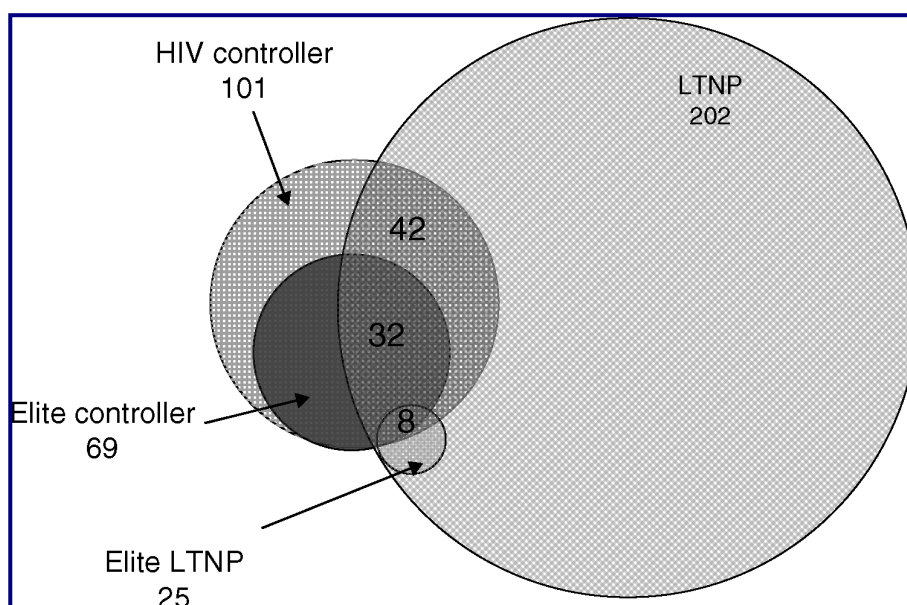


Figura 1.7: Distribución del grupo de pacientes LTNP de la cohorte francesa. Los números indican el número de pacientes en cada grupo. Tomado de (Grabar et al., 2009).

La historia natural de la infección por el VIH-1 varía ampliamente entre los pacientes infectados. Los factores responsables de esta diversidad están por determinar, pero se cree que hay una compleja interacción de factores virales, ambientales y del huésped, muchos de los cuáles están comenzando a conocerse y que están implicados en el curso de la infección (Casado et al.)

a) Factores virológicos implicados en no progresión.

Atenuación viral

Aunque los mecanismos de control de la viremia dentro del grupo de LTNPs y supresores de élite no están claros, estudios recientes han sugerido que estos grupos de pacientes pueden estar infectados con virus defectivos o atenuados que facilitarían el control de la replicación viral (Alexander et al., 2000a; Calugi et al., 2006; Deacon et al., 1995; Huang, Zhang, and Ho, 1998; Iversen et al., 1995; Kirchhoff et al., 1995; Mariani et al., 1996; Michael et al., 1995; Salvi et al., 1998; Sandonis et al., 2009; Wang et al., 2003; Yamada and Iwamoto, 2000). Hay evidencias claras de que la patogenicidad de un aislado viral puede diferir en diferentes pacientes. Esto se muestra en el estudio de un grupo de individuos infectados a través de una transfusión sanguínea desde un donador común. Todos ellos presentaron virus que contenían una delección en el gen *nef* y todos mantuvieron una viremia baja durante más de 10 años (Deacon et al., 1995). Sin embargo, algunas de estas personas han progresado a SIDA (Churchill et al., 2006) sugiriendo por lo tanto, que la atenuación viral a través del gen *nef* no permite un control permanente del VIH *in vivo*. Algunos estudios han descrito que mutaciones o delecciones en genes accesorios (*rev*, *tat*, *vif*, *vpr* y *vpu*), pueden permitir un control viral y/o inmunológico de la progresión (Alexander et al., 2000; Hassaine et al., 2000; Kirchhof et al., 1995; Lum et al., 2003; Wang et al., 1996; Yamada and Iwamoto, 2000). Sin embargo, otros estudios sugieren que algunos supresores de élite están infectados con virus patogénicos (Bailey et al., 2007; Blankson et al., 2007; Miura et al., 2008). En otro estudio se documentó la superinfección de un supresor de élite con otro aislado de VIH-1 y se demostró que mientras este paciente mantenía un control relativo de la carga viral plasmática, otros dos pacientes infectados con el mismo aislado, presentaban altas cargas virales (Rachinger et al., 2008).

b) Factores genéticos del huésped implicados en la no progresión

Los factores genéticos que influyen en la respuesta inmune específica de VIH, así como los polimorfismos genéticos que afectan a la capacidad de entrada del VIH en el interior celular parecen tener importantes efectos en la modulación del control viral.

Antígenos leucocitarios humanos (HLA)

La respuesta inmune celular específica está condicionada por los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del individuo. Varios estudios han sugerido que alelos específicos en los loci HLA, estarían asociados con diferentes tasas de progresión de la enfermedad. Esto podría explicarse por la diferente habilidad de los distintos alelos para presentar de forma eficiente los epítomos virales inmunodominantes. Los alelos HLA-B57, HLA-B58 y HLA-B27, están sobrerrepresentados en pacientes supresores de élite y se han asociado con el control de la replicación viral. Esto es probablemente debido a la naturaleza de los péptidos presentados por estas moléculas, al efecto de las mutaciones de escape en estos epítomos sobre la eficacia viral y potencialmente a la fuerza y naturaleza de la respuesta CTL específica contra estos péptidos (Bailey et al., 2006b; Emu et al., 2008; Han et al., 2008; Lambotte et al., 2005; Migueles et al., 2008; Migueles et al., 2000; Pereyra et al., 2008b; Sajadi et al., 2009). Mientras, los alelos HLA-B*5802, HLA-B18 y HLA-B*3502/03 se han asociado con una pérdida de control y una rápida progresión a SIDA (Carrington et al., 1999b; Gao et al., 2001; Kiepiela et al., 2004). Además la heterocigosis en los HLA de clase I parece tener un papel protector por mantener la extraordinaria diversidad alélica de estos genes (Carrington et al., 1999b).

Pese a que se han descrito otros genes humanos que podrían estar implicados en el control de la replicación viral, estudios recientes de asociación de marcadores en genomas completos reafirman el papel central del HLA en el control del VIH, confirmando sólo dos grupos de polimorfismos genéticos asociados con los locus HLA-B y C (Fellay et al., 2009; Fellay et al., 2007). El primero de ellos está localizado en el gen HCP5 y la variante asociada presenta un alto desequilibrio de unión con el alelo HLA*B5701. El segundo polimorfismo identificado se localiza en la región 5' del gen HLA-C, y está asociado con los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) y proteína HLA-C.

Receptores de quimioquinas

Los receptores de quimioquinas, principalmente CCR5 y CXCR4, son utilizados por el VIH como co-receptores para su entrada en la célula hospedadora (Alkhatib et al., 1996; Feng et al., 1996). Existen determinadas mutaciones en dichos receptores que afectan la susceptibilidad de linfocitos y macrófagos a la infección por el VIH y pueden afectar la velocidad de progresión de la infección (Dean et al., 1996; Huang et al., 1996; Ioannidis et al., 2001; Martin et al., 1998; O'Brien and Moore, 2000; O'Brien et al., 1997; Smith et al., 1997b; Winkler et al., 1998). La mejor caracterizada es una delección de 32 pb en el gen que codifica para el co-receptor CCR5 (CCR5- Δ 32), (Dean et al., 1996; Liu et al., 1996). Esta mutación fue identificada en 1996 y se asoció a la resistencia a la infección cuando estaba presente en homocigosis (Ho et al., 1995b; Liu et al., 1996; Markowitz et al., 2003) y a una reducción en la velocidad de progresión cuando se hallaba presente en heterocigosis, (Fellay et al., 2009; Ioannidis et al., 2001). Estudios posteriores han confirmado estos resultados sugiriendo que la heterocigosis para la mutación en CCR5 disminuye el número de co-receptores en la superficie celular disponibles para la entrada del VIH (Dean et al., 1996; Huang et al., 1996; Katzenstein et al., 1997; Liu et al., 1996; Stewart et al., 1997). Además, se han descrito diferentes polimorfismos en la región promotora de CCR5, que conducen a una menor expresión de este correceptor en la superficie de los macrófagos y se ha asociado con una progresión más lenta de la enfermedad (Carrington et al., 1999a; Gonzalez et al., 1999). Aunque el efecto del polimorfismo CCR2-64I, el cuál sustituye una Valina por una Isoleucina en el primer dominio transmembrana del correceptor CCR2, ha sido controvertido, se ha asociado también con un retraso en la progresión de la enfermedad (Kostrikis et al., 1998; Smith et al., 1997a).

En los últimos años, se han descrito una serie de factores intracelulares del huésped que reducen la replicación viral. Entre estos factores destaca la enzima APOBEC3G, que restringe la replicación viral. Esta citidina deaminasa, en ausencia de la proteína viral Vif (proteína que acelera la degradación de APOBEC3G), es capaz de inducir una hipermutación en el ADN producido durante la transcripción inversa, mediante la cuál la replicación viral se ve atenuada (Bishop et al., 2004; Harris and Liddament, 2004).

c) Factores inmunológicos implicados en la no progresión

La observación de que individuos infectados a partir de un mismo virus pueden experimentar cursos clínicos muy variables, pone en evidencia la importancia de los factores del huésped en la modulación de la velocidad de progresión a SIDA (Bailey et al., 2008; Liu et al., 1997).

Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular, desempeña un papel importante en el control de la infección por VIH-1 (Borrow et al., 1997; Koup et al., 1994; Phillips et al., 1991; Price et al., 1997). Los péptidos de patógenos intracelulares son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I) sobre la superficie de las células hospedadoras. Estos péptidos son reconocidos como extraños, y las células infectadas son atacadas por los CTLs para limitar la extensión de la infección. Aunque no se ha observado una correlación entre la frecuencia de células T CD8⁺ específicas de VIH-1 y el control de la replicación viral entre pacientes supresores de élite y pacientes progresores sometidos a terapia antirretroviral, el comportamiento de las células T CD8⁺ en estos dos tipos de pacientes es claramente diferente (Addo et al., 2003; Dinoso et al., 2008; Hatano et al., 2009; Migueles et al., 2008). En un análisis comparativo de la función de células T entre pacientes supresores de élite que presentaban el alelo HLA-B57, y pacientes sometidos a terapia, se observó que la proliferación de células T CD8⁺ específicas de VIH-1 solamente se producía en pacientes supresores de élite (Migueles et al., 2002). Otros estudios han mostrado, que esta proliferación es dependiente de la secreción de interleucina 2 (IL-2) (Zimmerli et al., 2005) y está asociada con altos niveles de actividad telomerasa (Lichterfeld et al., 2008).

Se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ de pacientes supresores de élite son capaces de suprimir la replicación viral en células T CD4⁺ autólogas (Saez-Cirion et al., 2007a). Esta supresión es dependiente de contacto, y por lo tanto, no puede ser únicamente debida a la secreción de citoquinas. Además la pérdida de células T CD8⁺ específicas de Gag, anula esta actividad (Migueles et al., 2008; Saez-Cirion et al., 2009). Estudios de pacientes en terapia antirretroviral, han mostrado que sus células T CD8⁺ no tienen una respuesta proliferativa efectiva, polifuncional o de inhibición de la replicación viral (Migueles et al., 2009).

Estos estudios han sugerido que esta respuesta cualitativamente superior en pacientes supresores de élite es la causa, más que el efecto, del control de la replicación viral (Emu et al., 2005; Emu et al., 2008; Pereyra et al., 2008a), aunque la respuesta de CTL no es suficiente para explicar el control de replicación viral en este grupo de individuos.

Escape viral

La aparición de mutantes de escape capaces de evadir la respuesta inmune celular y humoral del huésped también ha sido implicada en la inmunopatogénesis de la infección por el VIH-1. Diversos estudios sostienen que los CTL específicos del virus, juegan un papel importante en el control de la replicación del VIH-1 (Allen et al., 2000; Kaslow et al., 1996; Kent, Woodward, and Zhao, 1997; Koup, 1994; Mothe et al., 2003; Pereyra et al., 2008b; Yant et al., 2006; Zuñiga et al., 2006), y una amplia respuesta de CTL específica de Gag se ha asociado con una baja carga viral y un mejor curso clínico de la infección (Geldmacher et al., 2007; Kiepiela et al., 2007; Pereyra et al., 2008b; Zuñiga et al., 2006). Sin embargo, la aparición de mutantes de escape está comúnmente asociada con fases avanzadas de la enfermedad (Allen et al., 2000; Draenert et al., 2004; Leslie et al., 2004). Estudios recientes han demostrado una disminución de la capacidad de replicación de virus quiméricos que codifican para la región génica *gag-proteasa* derivados de pacientes supresores de élite, y asociados con distintos HLA de clase I (Miura et al., 2009b). Las mutaciones de escape frente a HLA en estos pacientes disminuyen la capacidad replicativa viral (Martínez-Picado et al., 2006; Miura et al., 2009b). El alto coste de eficacia biológica o fitness de los mutantes de escape se sugiere como la causa de la supresión viral en estos pacientes. Aunque se han descrito mutaciones compensatorias, que restauran la eficacia viral tanto en pacientes con progresión de la enfermedad y HLA B57 como en pacientes supresores de élite (Miura et al., 2009a).

Respuesta inmune humoral.

El papel de la respuesta inmune humoral en la velocidad de progresión de la infección por VIH no está completamente aclarado. Los anticuerpos neutralizantes se unen a las proteínas de la envuelta viral para prevenir la interacción con los receptores celulares que permiten la entrada del virus en el interior celular.

En la infección por VIH-1, este paso es particularmente importante. Es interesante determinar si los anticuerpos neutralizantes están jugando un papel en el control de la replicación viral en pacientes supresores de élite. Múltiples estudios han demostrado que los pacientes supresores de élite tienen un menor título de anticuerpos que pacientes con progresión (Laeyendecker et al., 2008).

En un estudio reciente, donde se compararon supresores de élite, progresores y pacientes sometidos a terapia antirretroviral (TARGA), se demostró que los supresores de élite presentan menor título de anticuerpos autólogos (Bailey et al., 2006d; Li et al., 2007; Pereyra et al., 2008a), sugiriendo que los anticuerpos neutralizantes no tienen un papel protector en fases tempranas o crónicas de la infección en supresores de élite.

d) Factores exógenos

Activación inmune.

La activación inmune celular es un proceso fundamental para la entrada del virus en la célula T CD4⁺ y la posterior infección productiva. Por tanto, aquellos factores que interfieran con la activación del sistema inmune pueden afectar de manera importante la replicación viral y la progresión de la enfermedad, revisión en (Lawn, Butera, and Folks, 2001). El papel *in vivo* de la activación inmune en la estimulación de la replicación viral se pone de manifiesto cuando un individuo es transitoria o permanentemente expuesto a un estímulo inmune exógeno. La coinfección con patógenos oportunistas tales como *Mycobacterium tuberculosis*, (Goletti et al., 1996; Shattock, Friedland, and Griffin, 1994; Zhang et al., 1995), *Herpes simple* (Mole et al., 1997), o *Plasmodium falciparum* (Xiao et al., 1998), entre otros, se ha descrito que producen un drástico aumento en el nivel de la carga viral plasmática. Por su parte, la inmunización de individuos infectados por VIH con antígenos de la toxina tetánica también conduce a un aumento transitorio pero sustancial de la viremia plasmática (O'Brien et al., 1995; Stanley et al., 1996). Se ha postulado, que la activación inmune debida a infecciones parasitarias crónicas aceleraría de igual forma la progresión de la enfermedad, y ello podría explicar la elevada carga viral y la rápida progresión a SIDA observada en África.

1.3 VARIABILIDAD DEL VIH-1

1.3.1 Generación de variabilidad

Una de las características más importante de los retrovirus, y en especial del VIH es su extraordinaria variabilidad genética, debido a que tiene un sistema de replicación que comete un gran número de errores durante la polimerización y a que no existen mecanismos de corrección. Esta variación es debida al menos a dos mecanismos diferentes, la introducción de mutaciones y la recombinación, que tienen lugar durante el proceso de retrotranscripción.

Tasa de mutación de la RT del VIH-1

En el proceso de replicación del VIH-1, al igual que en el resto de los retrovirus, intervienen tres sistemas enzimáticos, cada uno con su propio potencial para introducir errores. Mientras la tasa de mutación es baja para la ADN polimerasa celular, las mutaciones incorporadas por la RT viral incluyen sustituciones de nucleótidos, inserciones y deleciones que producen cambios en la pauta de lectura (mutaciones frameshift) (Quan et al., 2008). La tasa de mutación ha sido estimada en 2.4×10^{-5} sustituciones/base/ciclo (Mansky, 1996; Mansky and Temin, 1995), lo que significa que tras una ronda de replicación por cada 10 copias del genoma progenitor, entre 3 y 4 copias de media, llevarán una mutación puntual.

Recombinación

La recombinación entre variantes virales constituye otro importante mecanismo de generación de variabilidad genética (Jetzt et al., 2000). La tasa de recombinación homóloga para el VIH-1 ha sido estimada en 2 ó 3 saltos de cadena por genoma/ciclo de replicación (Jetzt et al., 2000; Zhuang et al., 2002). La alta frecuencia de recombinación homóloga observada en los retrovirus, es consecuencia de la naturaleza diploide del genoma vírico. Para que la recombinación homóloga ocurra, se requiere la co-infección o re-infección de una célula por dos virus distintos y el empaquetamiento de dos genomas víricos distintos en una misma partícula viral (heterocigoto), (Piantadosi et al., 2007; Robertson, Hahn, and Sharp, 1995). El proceso de transcripción inversa de estas partículas heterocigotas puede producir moléculas recombinantes que contengan fragmentos de ambas secuencias genómicas progenitoras.

La recombinación entre virus de distintos grupos y subtipos del VIH-1 ha sido ampliamente descrita (Fang et al., 2004; McCutchan et al., 2005; Piantadosi et al., 2007; Robertson, Hahn, and Sharp, 1995). Aunque más difícil de detectar por análisis filogenéticos, la recombinación entre virus pertenecientes al mismo subtipo genético también se ha descrito (Pernas et al., 2006; Piantadosi et al., 2007; Rousseau et al., 2007; Streeck et al., 2008; Taylor and Korber, 2005).

Tasa de evolución del VIH-1

La velocidad de evolución del VIH-1 (número de cambios fijados por unidad de tiempo) *in vivo* es unas 10^6 veces mayor que la de los genomas ADN de organismos superiores (Gojobori, Moriyama, and Kimura, 1990) y se encuentra fundamentalmente determinada por la elevada tasa de mutación por generación, resultante tanto de los errores cometidos por la RT, del proceso de recombinación y por el alto recambio poblacional. Se estima que cada día se generan del orden de 10^{10} a 10^{12} partículas víricas (Perelson et al., 1996; Ramratnam et al., 1999), a la vez que se destruyen entre 10^7 y 10^8 células T CD4⁺ (Ho et al., 1995b; Wei et al., 1995). La estimación de la tasa de evolución por año para los genes *env* y *gag* del VIH-1 es aproximadamente de un 0.28% y un 0.19% respectivamente (Korber et al., 2000). Esta velocidad de evolución, sin embargo, puede variar de una región genómica a otra, siendo el gen *pol* el más conservado (Kessler et al., 2001; Pasquier et al., 2001; Shriner et al., 2006; Yahy et al., 2001) y el gen *env* el que muestra mayor grado de variabilidad (Bonhoeffer, Holmes, and Nowak, 1995; Shriner et al., 2006; Williamson, 2003; Yamaguchi-Kabata and Gojobori, 2000).

1.3.2 Variabilidad del VIH-1 en la población humana

El rango de variabilidad genética descrito para el VIH en la población humana es muy amplio (Korber et al., 2000; Myers et al., 1996). Mientras que los aislados del VIH-1 y VIH-2 difieren un 50% en su secuencia nucleotídica, esta divergencia se reduce hasta un 35% entre aislados de distintos grupos del VIH-1. Para aislados de distintos subtipos del grupo M la divergencia oscila entre el 20% y el 35%, y dentro de un mismo subtipo alcanza valores entre el 5% y el 20%. Por último dentro de un mismo individuo, se han descrito valores de divergencia entre los miembros de la cuasiespecie que oscilan entre el 1%-10%.

Diversificación del VIH-1

La secuenciación del genoma de diferentes VIH aislados, procedentes de diversas regiones han demostrado una gran divergencia entre ellos (Butler et al., 2007). El VIH-1 se ha dividido en tres grupos principales denominados M (“main”), O (“outlier”) y N (“non-M, non-N”), (Butler et al., 2007). El grupo M es el más importante desde un punto de vista epidemiológico, ya que incluye la mayoría de los VIH-1 aislados en todo el mundo. Se pueden distinguir 9 subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K. La clasificación en subtipos dentro del VIH-1 se realizó sobre la base de los datos de secuencias nucleotídicas disponibles de los genes *gag* y *env* (McCutchan et al., 1996). El análisis filogenético de un amplio número de aislados del VIH-1, ha puesto de manifiesto la existencia de genomas “mosaicos” originados por recombinación entre diferentes subtipos que se han denominado “formas recombinantes circulantes” (CRFs). Por su parte, el grupo O, incluye aislados altamente divergentes del M, obtenidos a partir de pacientes procedentes de Camerún, Gabón y Guinea Ecuatorial. Aunque originalmente este grupo no se dividió en subtipos, los datos actuales sugieren que el grupo O presenta una diversidad genética comparable a la del grupo M, y se observan agrupamientos filogenéticos similares a los que se establecen entre los diferentes subtipos dentro del grupo M (Yamaguchi et al., 2002), (Fig 1.8).

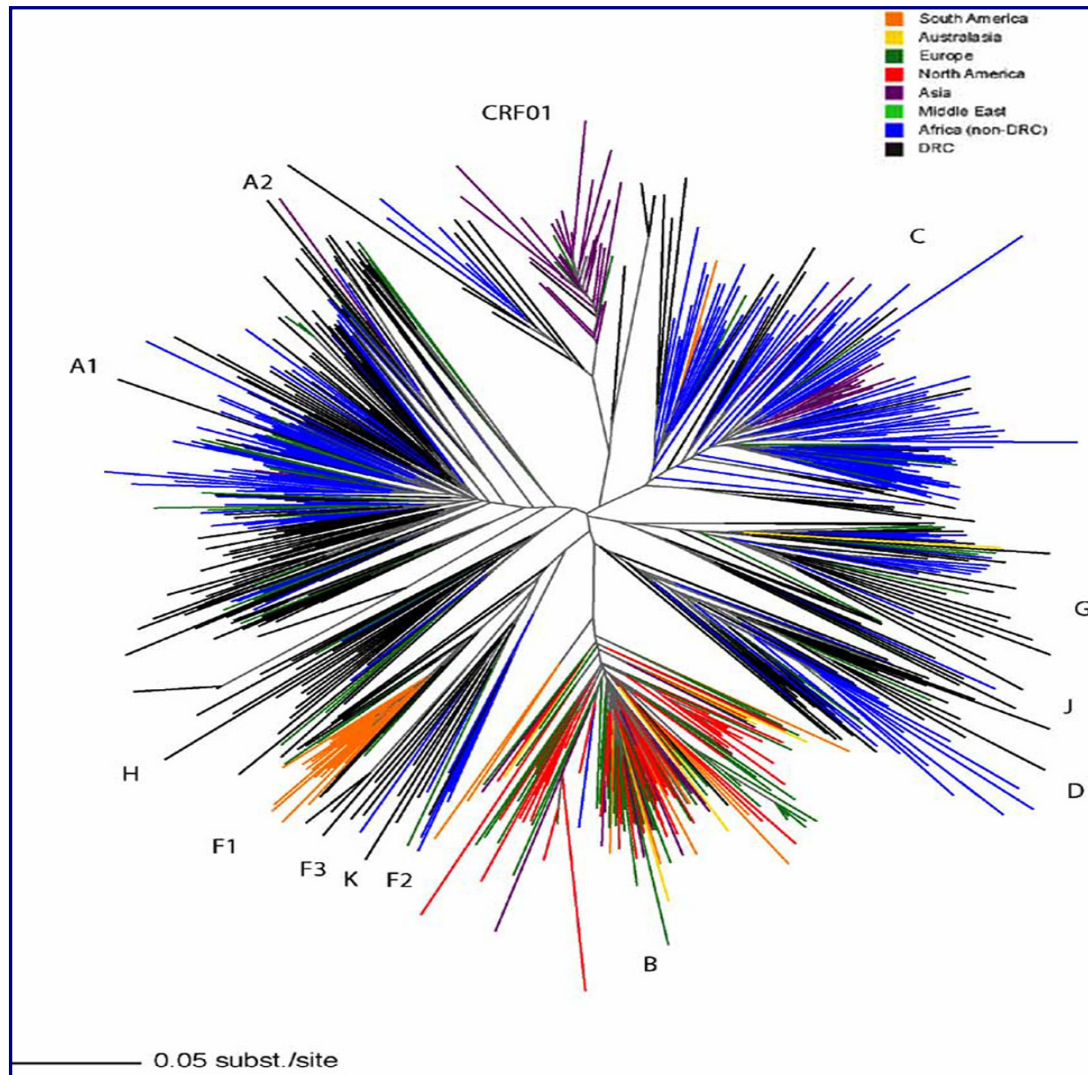


Figura 1.8: Diversidad del VIH-1 grupo M. Relaciones filogenéticas entre subtipos y formas recombinantes circulantes (CRFs) basadas en las secuencias del gen *env* (V2-V5) de aislados de distintas regiones geográficas. El color de las cepas hace referencia al área geográfica donde se han aislado. Tomada de (Butler et al., 2007).

1.4 LA CUASIESPECIE DEL VIH-1 EN EL INDIVIDUO INFECTADO

Los primeros análisis de aislados virales de un mismo individuo (intra-paciente) han revelado una extensa variación biológica (Fisher et al., 1988) y genética (Balfé et al., 1990; Delassus, Cheynier, and Wain-Hobson, 1991; Meyerhans et al., 1989; Simmonds et al., 1990; Simmonds et al., 1991; Wolfs et al., 1990), que en algunos casos podía superar incluso la distancia genética entre aislados virales de distintos individuos (Pedroza Martins, Chenciner, and Wain-Hobson, 1992).

A nivel poblacional un aislado viral se puede definir mediante una secuencia consenso o promedio formada por una mezcla compleja de mutantes relacionados que se diferencian entre sí en uno o más nucleótidos y que se denomina espectro de mutantes. Esta distribución de mutantes recibe el nombre de **cuasiespecie viral** por analogía con el modelo descrito por Eigen (Eigen, 1971). Su aplicación a los virus ha sido un factor fundamental para entender la dinámica de las poblaciones víricas (Domingo, 1997; Domingo et al., 1996; Holland and Domingo, 1998; Holland, De La Torre, and Steinhauer, 1992; Wain-Hobson, 1992).

El VIH presenta estructura en cuasiespecies, en la que coexisten distintas variantes con características genotípicas y fenotípicas distintas (Barker et al., 1998; Sguanci, Bagnoli, and Lio, 2007). De todas las variantes que coexisten en un mismo individuo en un momento dado, dominarán aquellas con una mayor adaptación a ese entorno. Sin embargo, ante la presencia de determinados factores ambientales, como la respuesta inmunitaria o fármacos antivíricos, se pueden seleccionar variantes que en condiciones normales se hallarían en minoría y que pasarán a ser predominantes

La dinámica de cuasiespecies del VIH tiene relevancia para entender el comportamiento del virus en individuos infectados y para el control de la enfermedad (Bello et al., 2005; Canducci et al., 2009; Quinones-Mateu and Arts, 2006). El estudio de la heterogeneidad genética de los virus es importante, ya que se ha demostrado la relación de estas variaciones con la mejor o peor evolución de la enfermedad (Ganeshan et al., 1997a; Wolinsky et al., 1996).

Esta diversidad viral se ve favorecida por los siguientes factores:

1. Por los largos períodos de replicación (Butto et al., 1997; Craigo et al., 2004; Delassus, Cheynier, and Wain-Hobson, 1992; Finzi et al., 1999).
2. El virus tiene un mecanismo de replicación que comete un gran número de errores.
3. Existen grandes tamaños de población viral en los pacientes infectados.
4. Hay un gran recambio de población (1-2 días) viral en los pacientes infectados.

Aspectos de la variabilidad genética del VIH pueden influir en su poder patógeno y virulencia y ser responsables de la aparición de cepas con una mayor actividad replicativa, diferente tropismo celular y diferentes rasgos biológicos, como

puede ser el fenotipo inductor de sincitios y la utilización de co-receptores, o bien cepas con capacidad para evadir la respuesta inmunitaria específica humoral y celular.

Diversas propiedades de los virus que se aíslan de sangre o plasma de individuos infectados en un momento determinado pueden ayudar a predecir si la progresión hacia la enfermedad va a ser rápida o lenta. Así, la aparición de variantes sincitiales, que utilizan el co-receptor CXCR4, se suele asociar con el progreso de la enfermedad, y precede a un descenso acusado de los linfocitos T CD4⁺ y a un aumento de la carga viral (Ganeshan et al., 1997b; Shankarappa et al., 1999; Wolinsky et al., 1996).

Se ha estudiado la evolución del VIH-1 en pacientes infectados y el grado de variación genética en relación con la progresión de la enfermedad, estudiando parámetros como la heterogeneidad (la variación existente dentro de una población) y la divergencia (la variación con respecto a la población viral que inició la infección) y se ha establecido que estos dos marcadores virales aumentan con el tiempo de infección, (Bello et al., 2007a; Shankarappa et al., 1999). Se ha sugerido la existencia de tres fases dentro del intervalo asintomático, que representan un patrón de evolución viral durante el curso de la infección en PC: una fase temprana de duración variable, en la cuál hay un incremento lineal de divergencia y heterogeneidad (1% año), una fase intermedia de una duración aproximada de 1.8 años, caracterizada por un continuo incremento de la divergencia, pero con una estabilización de la heterogeneidad, y una última fase caracterizada por una estabilización de la divergencia y una continua estabilidad o disminución de la heterogeneidad (Bello et al., 2007a; Shankarappa et al., 1999).

OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- 1 Estudio de la Evolución del virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) en un grupo de pacientes LTNP ancestrales.**

- 2 Analizar los mecanismos virológicos, genéticos e inmunológicos que están asociados a la no progresión en este grupo de pacientes.**

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras de VIH-1 de pacientes infectados.

Los estudios de evolución genética del VIH-1, se realizaron en muestras de pacientes recogidas en el Centro Sanitario Sandoval IMSALUD, perteneciente a la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

Los pacientes analizados en este estudio presentan un periodo asintomático superior a 10 años y son clasificados como pacientes no progresores o Long term non-progressors (LTNP). Los pacientes analizados pertenecían todos a un único grupo de riesgo, usuarios de drogas parenterales, y nunca habían recibido terapia antiretroviral.

3.2 Obtención de plasma y células mononucleares de sangre periférica.

Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron en presencia de anticoagulante (Heparina o EDTA), a partir de la cuál se separaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por centrifugación a 400g durante 45 minutos en gradiente de Ficoll-Hypaque. Tras la centrifugación se recogieron las CMSP, se resuspendieron en suero bovino fetal suplementado con 10% dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma), y se almacenaron en N₂ líquido (-120°C). El plasma fue también recogido y almacenado a -70°C.

3.3 Separación de ácidos nucleicos

3.3.1 Acido desoxirribonucleico (ADN)

La obtención de ADN de las CMSP se realizó a partir de aproximadamente 10⁷ células obtenidas por centrifugación a 453g durante 5 minutos, para eliminar el medio de congelación (DMSO), y lavadas con NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, K₂HPO₄ 1.47mM pH 7.4 (PBS). Las células se resuspendieron en 1 volumen de solución Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, NaCl 0.15 mM, con proteinasa K (200 µg/ml) y SDS 0.4 %. Tras una incubación de 1 hora a 65°C y toda la noche a 37°C, se añadió 1 volumen de Tris HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, NaCl 0.65 M. Después se realizaron tres extracciones con 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y a continuación una extracción con 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con etanol absoluto y se resuspendió en Tris-HCl 10 mM-EDTA 1mM (TE 10:1) a una concentración de 0.3µg/µl equivalente a 5x10⁴ células/µl.

3.3.2 Ácido ribonucleico (ARN)

La obtención del ARN desde sobrenadante de cultivo, se realizó mediante el método descrito por Boom y cols (Boom et al., 1990).

Las soluciones utilizadas son las siguientes:

Solución de lisis: 120 g de isotiocianato de guanidina (Fluka).

100 ml de Tris -HCl 0.1 M pH6.4.

22 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0

2.6 g de Tritón X 100.

Solución de lavado: 120 g de isotiocianato de guanidina

100 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4.

Solución de sílica: preparada según (Boom et al., 1990).

Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente una mezcla de 200 µl de plasma, 900 µl de solución de lisis y 40 µl de solución de sílica. Se centrifugó la mezcla a 14.000 r.p.m durante 15 segundos y se obtuvo un sedimento de partículas de sílica que se lavó 2 veces con 1 ml de solución de lavado, dos veces con 1 ml de etanol al 70% y una vez con 1 ml de acetona. Tras el último lavado se incubó la preparación durante 10 minutos a 56°C para secar la sílica, y se eluyó el ARN en 50 µl de H₂O, se incubó a 56°C durante 10 minutos. Por último, se centrifugó la mezcla a 14.000 r.p.m durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante.

3.4 Amplificación y cuantificación del ADN viral asociado a CMSP.

3.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN proviral.

Para amplificar el ADN, se realizaron dos PCR consecutivas a dilución límite, de un fragmento de 614 pb desde la región constante C2 hasta la región variable V5 (C2-V5), en la gp120 del gen *env* del VIH-1 (nucleótidos 7068-7682 en el clón HXB2). Para la primera PCR se utilizaron los iniciadores

169U (5'-AATGTCAGCACAGTACAATGTACAC-3') y

96 ED (5'- GCGTCTAGACAATAATTGTCTGGCCTGTACCGT-3').

Para la segunda PCR fueron utilizados los iniciadores

27 ECU (5'-ATAAGCTTGCAGTCTAGCAGAAGAAGA- 3') y

167 ED (5'-TTCTCCAATTGTCCCTCATACTCCTCCTC-3').

La concentración de desoxinucleótidos (dNTPs) (Pharmacia) fue de 0.125 mM, empleándose 100 ng de cada iniciador y 3.5 unidades de enzima Expand High Fidelity (Roche) por ensayo.

El volumen de reacción fue de 50 μ l. Para la PCR externa (fragmento de unas 900 pb) se realizaron 35 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C/5 minutos, 94°C/30 segundos, hibridación de los primers al ADN molde durante 30 segundos a 58°C y elongación de las cadenas de ADN durante 2 minutos a 72°C. Para la segunda PCR (fragmento interno de la primera PCR de unos 630 pb), la elongación de las cadenas de ADN se llevó a cabo durante 1 minuto a 72°C, en ambos casos las amplificaciones se finalizaron con una elongación de 10 minutos a 72°C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-200. Los productos obtenidos fueron posteriormente analizados en gel de agarosa 1% en tampón Tris-acetato 45 mM, EDTA 10 mM (TAE). Los iniciadores utilizados fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis de Biopolímeros del ISCIII.

3.4.2 Cuantificación del ADN viral asociado a CMPS.

La carga de ADN viral asociada a CMSP fue cuidadosamente cuantificada en cada muestra como lo describe (Rodrigo et al., 1997). Para ello se utilizó el programa QUALITY (<ftp://ubik.microbiol.washintong.edu/download/cbu/quality/>) que está basado en el método de dilución límite de la PCR. Con este método, réplicas de diluciones seriadas de la muestra son amplificadas por PCR y sobre la base de la frecuencia relativa de amplificaciones positivas en cada dilución, se hace una estimación del número de copias de molde en una unidad de volumen de la muestra original. En nuestro estudio se amplificaron por triplicado un mínimo de cuatro diluciones seriadas de cada una de las muestras. Para la cuantificación se utilizaron los mismos iniciadores que luego se emplearon en la amplificación del ADN viral total. Con este método se cuantifica la carga de ADN viral total, tanto integrado como no integrado, que está asociado a CMSP

Una vez cuantificada la carga de ADN viral asociado a las CMSP, y para evitar errores de muestreo, las cuasiespecies virales se realizaron por PCR a dilución límite a partir de ADN total, utilizando la dilución de ADN en la cuál el número de PCRs positivas fue inferior al 30%, para obtener las máximas secuencias individuales presentes en la población viral. Estas amplificaciones son posteriormente purificadas y secuenciadas.

3.5 Cuantificación de ARN viral en plasma.

La viremia o carga viral plasmática fue determinada en el Centro de Salud Sandoval utilizando el equipo comercial Amplicor HIV-1 MonitorTM Test (Roche Diagnostics System, Somerville, NJ), y Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. El límite de detección de este equipo es de 50 copias/ml. Con este método se cuantifica la carga viral libre, no asociada a células, en el plasma.

3.6 Amplificación del ARN viral de sobrenadante de cultivo.

3.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN (RT-PCR).

El ARN viral del sobrenadante de cultivo, se amplificó mediante una RT-PCR. Para la RT-PCR se utilizó el equipo comercial QiagenStep RT-PCR system (Qiagen) que permite que la transcripción reversa y la PCR tenga lugar en un solo paso. Para ello, se añadieron 2 µl del ARN, obtenido según el apartado 3.3.2, a una solución que contenía una mezcla de las enzimas Omniscript transcritasa reversa, Sensiscript Transcriptasa reversa (ambas son enzimas heterodiméricas expresadas en *E.coli*) y HotStarTaq DNA polimerasa, la mezcla de enzimas contenía 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreiol (DTT), 0.1 mM EDTA, 0.5 % (v/v) Nonidet[®] P-40, 0.5 % (v/v) Tween 20[®], 50 % glycerol (v/v), estabilizador a pH 9.0 (20° C), buffer 5X que contenía Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂ SO₄, 12.5 mM MgCl₂, DTT; pH 8.7, 200 ng de cada uno de los iniciadores y 10 mM de dNTPs. Esta mezcla se llevó a un volumen final de 50 µl con agua destilada estéril libre de RNasa. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo mediante.

- | | |
|--|-------|
| 1) RT: 1X (50 °C 30 min). | } PCR |
| 2) 1X (95 °C 15 min). | |
| 3) 35X (94 °C 0.30 min, 55 °C 0.30 min, 72 °C 1 min) | |
| 4) 72°C 10 min). | |

Mientras que la segunda PCR se realizó siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el apartado 3.4.1. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MJ Research modelo PTC-100. Los productos obtenidos se analizaron en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-acetato 45 mM, EDTA 10 mM (TAE).

Los iniciadores empleados fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis de Biopolímeros del ISCIII y Pharmacia.

3.7 Purificación y secuenciación de los productos de la PCR.

3.7.1 Purificación de los productos de PCR.

Antes de ser secuenciados, los productos de la PCR fueron purificados para eliminar los restos de los iniciadores, sales, nucleótidos no incorporados y restos del enzima, que podrían afectar a la siguiente reacción de secuenciación. Para la purificación de los fragmentos amplificados se utilizó el equipo comercial “High pure PCR Product Purification Kit” (Roche Diagnostic), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. El método consiste en la adhesión del ADN por puentes de hidrógeno a una columna de sílica, el ADN retenido en la columna es lavado y esto permite eliminar distintas sustancias, como sales, proteínas, y otros contaminantes celulares. Por último el ADN retenido en la columna es eluido por la adición de un tampón estéril de baja concentración en sales.

3.7.2 Secuenciación automática.

Después de purificados, los productos de PCR son secuenciados directamente con el iniciador 27ECU empleando el equipo comercial “Big Dye™ terminator Cycle Sequencing v2.0” (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Norwalk, Conn.), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. La secuenciación se realiza mediante la amplificación por PCR asimétrica en presencia de los cuatro dNTPs, marcados cada uno con un colorante fluorescente distinto. La PCR asimétrica consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos seguido de 25 ciclos de amplificación según el siguiente perfil: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación de los iniciadores al ADN molde a 55°C durante 15 segundos y una etapa de elongación de las cadenas de 4 minutos a 60°C.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research modelo PTC-200. Los productos obtenidos fueron analizados en un secuenciador automático ABI PRISM™ modelo 377 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Norwalk, Conn.) por la unidad de Genómica del ISCIII.

3.8 Análisis de las secuencias.

3.8.1 Edición y alineamiento de las secuencias.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas se utilizó un fragmento de 614 pb, de las regiones C2-V5 de la gp 120 de la envuelta viral. Se intentó conseguir al menos 20 PCR individuales en dilución límite de la región C2-V5 del gen *env*, sin embargo, no pudimos conseguir 20 PCRs positivas en muchas de las muestras analizadas, debido al bajo número de copias de ADN viral asociado a CMSP presente en la cuasiespecie. Las secuencias nucleotídicas obtenidas por dilución límite fueron inicialmente editadas utilizando el programa SeqMan versión 3.61 (Dnastar Inc, Madison, Wis) y alineadas con el programa CLUSTAL X versión 1.8. Los alineamientos fueron posteriormente editados y corregidos a mano para asegurar un marco correcto de lectura. Toda posición en la que no existe información completa para el conjunto de secuencias que forman el alineamiento, “gaps”, fue excluida en posteriores estudios. Todas las secuencias defectivas que presentaban codones de parada producidos por hipermutación o pérdida de fase, fueron también eliminadas.

3.8.2 Análisis filogenéticos

Para realizar los primeros análisis y a modo de screening, los árboles filogenéticos se reconstruyeron por el método del vecino más proximo (Neighbor-Joining, NJ), utilizando el programa MEGA 3.0 (Kumar et al., 2001). Las matrices de distancia se calcularon mediante el modelo Kimura-2 parámetros, y la robustez estadística de los árboles generados se probó mediante un remuestreo de 1000 réplicas (“bootstrap”). Una vez analizadas todas las secuencias y excluidas las posibles contaminaciones, los árboles filogenéticos se reconstruyeron por el método de máxima verosimilitud (“Maximun-Likelihood”, ML), utilizando el programa Phym1 v 2.4.1 (Guindon et al., 2005). Los parámetros utilizados para la reconstrucción filogenética representan la media ponderada, según los pesos asignados por “Akaike information criterion” (AIC), de todos los valores obtenidos en los posibles modelos de sustitución (Akaike, 1974) en Modeltest 3.6 (Posada and Buckley, 2004; Posada and Crandall, 1998).

La robustez estadística de los árboles generados se probó mediante un remuestreo de 1000 réplicas (“bootstrap”). Para enraizar los árboles, se utilizaron como grupos externos las cepas de referencia HXB2-LAI y el aislado de referencia del laboratorio, S61 (89ES061) del VIH-1 (<http://www.hiv.lanl.gov>).

3.8.3 Cálculo de las distancias genéticas

Las distancias nucleotídicas fueron estimadas mediante el método de máxima verosimilitud (ML) en el programa PAUP4.0b10, utilizando la media ponderada de los parámetros obtenidos por Modeltest 3.6 (Posada and Crandall, 1998). La heterogeneidad de una cuasiespecie viral, se definió como la distancia genética media entre todas las posibles comparaciones de pares de secuencias obtenidas de una misma muestra. La divergencia de la cuasiespecie se definió como la distancia genética media entre todas las secuencias obtenidas de una misma muestra y el ancestro común más reciente del paciente (ACMR). La divergencia anual, se definió como el incremento medio por año de la distancia genética de las secuencias de la cuasiespecie al ACMR de cada paciente.

3.8.4 Reconstrucción del ancestro común más reciente (ACMR).

El ACMR para todas las secuencias nucleotídicas pertenecientes a un mismo paciente, fue inferido utilizando el programa PAUP4.0b10, a partir del árbol filogenético reconstruido por el método de ML en el programa PhyML, utilizando los modelos de sustitución seleccionados por el programa Modeltest. Este ACMR representa el nodo a partir del cual se originan todas las secuencias nucleotídicas de cada paciente.

3.8.5 Análisis de mutaciones

La proporción de mutaciones sinónimas por sitio sinónimo (dS) y no sinónimas por sitio no sinónimo (dN), así como la diferencia entre dN y dS en secuencias de una misma muestra o de muestras distintas dentro de cada individuo, se calcularon por el método “p-distance” (1000 réplicas) modificado de Nei y Gojobori (Nei and Gojobori, 1986) utilizando el programa MEGA versión 3.0 (Kumar et al., 2001).

3.8.6 Secuencias nucleotídicas utilizadas para la construcción de la curva de datación.

Las secuencias nucleotídicas de la región variable V3 del gen *env* de 171 muestras españolas del subtipo B del VIH-1 fueron obtenidas en nuestro laboratorio desde 1989 hasta 2003. Las muestras provenían de pacientes homosexuales y usuarios de drogas intravenosas (UDIV) del Centro Sanitario Sandoval, (CAM, Madrid), del Hospital Ramón y Cajal (Madrid) y del Hospital General de Navarra.

A partir del alineamiento de dichas secuencias, se generó una secuencia consenso española (SCEsp) que incluía el nucleótido más frecuente en cada posición como se describió anteriormente (Casado et al., 2000). Al mismo tiempo fue inferido el ACMR de las secuencias españolas analizadas (ACMREsp) como se describe en el apartado 3.8.4.

Las muestras fueron luego agrupadas por su año de aislamiento y las distancias genéticas de cada secuencia a la SCEsp o al ACMREsp fueron estimadas por el método de 2-parámetros de Kimura (apartado 3.8.2) y por el método de máxima verosimilitud (ML). Para estos cálculos de distancia genética se utilizó el programa MEGA 3.0 (Kumar et al., 2001). Por último se representó la distancia genética de cada secuencia nucleotídica (eje de ordenadas), con respecto al año de obtención de la muestra (eje abscisas) (Fig. 4.1). De esta forma se obtuvieron dos ecuaciones de la recta, una respecto a la SCEsp y otra respecto al ACMREsp, con las cuales podíamos estimar el año de una secuencia española conociendo su distancia a la SCEsp o al ACMREsp. Para la datación de las muestras de cada paciente se utilizó la secuencia nucleotídica global.

3.8.7. Análisis de los sitios de N-Glicosilación.

El análisis del número de sitios de N-glicosilación, se realizó en un fragmento de 614 pb de la región C2-V5 del gen *env* de las secuencias nucleotídicas obtenidas a dilución límite, así como en la proteína gp 160 completa de la envuelta viral, utilizando el programa N- Glycosite (<http://www.hiv.lanl.gov>) (Zhang et al., 2004).

3.9 AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL VIH-1 EN PACIENTES LTNP ANCESTRALES.

El ADN proviral fue extraído según el apartado 3.3.1, para amplificar y secuenciar el genoma completo (9250 pb) de los virus presentes en los pacientes LTNP ancestrales (1, 2, 3, 5, 20 y 56) mediante la siguiente estrategia de amplificación. El genoma fue dividido en tres fragmentos y, cada fragmento fue amplificado entre 3 y 9 veces por nested-PCR a dilución límite, con la enzima Expand Hi Fidelity (Roche). La primera PCR amplificó un fragmento de 1807 pb, desde la región 5'LTR hasta el gen *gag*.

Como iniciadores externos se utilizaron los cebadores: 187U (5'-CACACACAAGGCTACTTCCCT-3'), desde los nucleótidos 57 a 77 y 147D (5'-TCTTCTGTCAATGGCCATTGTTTAAAC-3'), nucleótidos 2610-2635. Como iniciadores internos se utilizaron los cebadores: 554U (5'-GTCTCTCTTGTAGACCAGATCTGAGCCTG-3'), nucleótidos 456-485, y 352CsRTD (5'-CAGTTCCTTGTCGCTCAGCTCCTGCTTC-3'), nucleótidos 2211-2238. Con la segunda PCR se amplificó un fragmento de 3545 pb en la región comprendida entre los genes *pol* y *vif*. Como iniciadores externos se utilizaron los cebadores: 136PU (5'-AAGAGAGCTTCAGGTTTGGGG-3'), desde el nucleótido 2168 hasta el 2188, y 33TD (5'-CAAGAAATGGAGCCAGTAGA-3'), nucleótidos 5825-5844 y como iniciadores internos se utilizaron los cebadores: 351CsRTU (5'-GAAGCAGGAGCTGAGCGACAAGGAACTG-3'), nucleótidos 2211-2238, 552VD (5'-GCAGTTGTTGCAGAATTCTTATTATGGCTTCC-3'), nucleótidos 5729-5760. Por último, con la tercera PCR se amplificó un fragmento de 3906 pb, que comprendía desde el gen *vif* hasta la U5 en el extremo 3' del genoma del VIH-1. Los iniciadores externos utilizados fueron los siguientes: 294TU (5'-ATGGCTTAGGGCAACATATCTATG-3'), nucleótidos 5677-5700, 163U5D (5'-CTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAG-3'), nucleótidos 9664-9687. Como iniciadores internos se utilizaron los cebadores: 551VU (5'-GGAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACACTGC-3'), nucleótidos 5729-5760 y, 555U5 (5'-CCAGAGTCACACAACCGCGGGGCACACACTACT-3'), nucleótidos 9637-9669. Todas las posiciones de los iniciadores están referidas al clón HXB2.

El perfil de temperaturas para las distintas PCRs fueron las siguientes:

Para la amplificación del primer fragmento: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos, 10 ciclos a 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos y, 72°C/2 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundo y 72°C/2 minutos, con una extensión de 5 segundos por ciclo, y un paso final de 72°C/10 minutos. Para el segundo fragmento las condiciones fueron inicialmente las mismas, excepto que la temperatura de hibridación de los iniciadores fue a 60°C con un tiempo de elongación de 4 minutos. Por último, para el tercer fragmento, las condiciones fueron iguales que las condiciones descritas para el primer fragmento con un tiempo de elongación de 4 minutos.

3.10 CULTIVOS CELULARES

3.10.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donante sano y separación de células T CD8⁺.

La separación de CMSP se realizó según se describe en el apartado 3.2. Tras la centrifugación se recogieron las CMSP, se resuspendieron en medio completo, RPMI 1640 (Bio-Whittaker) suplementado con suero bovino fetal 10%, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomicina (100 mg/ml) (Bio-Whittaker) (RPMIc), a una densidad de 10⁶ células/ml, y se incubaron toda la noche en la estufa a 37°C, con un 90% de humedad relativa y 5% de CO₂. Al día siguiente, se realizó un lavado de las CMSP con un buffer fosfato salino pH 7.5 PBS1X/ albúmina sérica bovina (BSA) 0.5% /EDTA 2mM, previamente filtrado y desgasificado (tampón de separación). Posteriormente se procedió a la eliminación de células T CD8⁺, (Magnetic Cell Sorting of Human Leukocytes, CD8 Microbeads) (Miltenyi Biotec), por selección positiva de células T CD8⁺. Para la separación, las células fueron marcadas magnéticamente con anticuerpos monoclonales frente a CD8 (CD8 Microbeads) y pasadas a través de una columna de separación magnética. Las células marcadas CD8⁺ se quedaron retenidas en la columna, mientras que las células no marcadas (CD8⁻) pasaron a su través. Las células T CD8⁻ se resuspendieron en un medio RPMI 1640 completo con (IL-2) (2.5 ng/ml) y se estimularon con fitohemaglutinina (PHA-Lectin) (2 µg/ml) durante tres días, al cabo de este tiempo, las células fueron directamente utilizadas para los cocultivos celulares, o congeladas en N₂ líquido a -70°C para su posterior utilización.

3.10.2 Tratamiento de las células de donante con Mitomicina.

En los casos donde las células presentadoras de antígeno (CPA) se utilizaron para inducir el crecimiento y la expansión de las células T, fue necesario parar su proliferación. Esto se realizó incubando las CMSP totales durante 30 minutos con mitomicina C a una concentración final de 50µg/ml, seguido de dos o tres lavados en 50 ml de NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 1.47 mM pH 7.4 (PBS 1X), por centrifugación a 450g durante 10 minutos para eliminar el exceso de mitomicina. Finalmente se resuspendieron las células en medio RPMI a una densidad de 10⁷ células/ml, directamente para su utilización en los cocultivos celulares, o bien se

congelaron a -70°C en SFB suplementado con 10% DMSO para su posterior utilización.

3.10.3 Purificación de CMSP de paciente LTNP: purificación de células T activadas $\text{CD4}^+\text{CD45RO}^-$ y de células memoria T $\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+$.

La separación e incubación de CMSP se realizó según se describe en el apartado 3.2 y 3.10.1. Posteriormente, la purificación de células T CD4^+ totales se realizó por selección negativa (Magnetic Cell Sorting $\text{CD4}^+\text{T}$ Cell Isolation Kit II human, (Miltenyi Biotec). Las células T no- CD4^+ , T- CD8^+ , T γ/δ , células B, NK, células dendríticas, monocitos y eritrocitos, fueron indirectamente marcadas con un cocktail de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, $\text{TCR}\lambda/\delta$ y glicoporina A), utilizado como reactivo primario, y Microbeads conjugadas con anticuerpos anti-biotina como reactivo secundario. Las células T CD4^- quedaron retenidas en la columna magnética del separador, mientras que las células T CD4^+ no marcadas pasaron a su través.

Posteriormente se realizó una purificación de las células T $\text{CD4}^+\text{CD45RO}^+$ y $\text{CD4}^+\text{CD45RO}^-$ mediante selección positiva de las células memoria (Magnetic Cell Sorting of Human Leukocytes CD45RO Microbeads, Miltenyi Biotec). Las células memoria, fueron marcadas magnéticamente con CD45RO Microbeads y quedaron retenidas en la columna magnética, mientras que las células T $\text{CD4}^+\text{CD45RO}^-$ pasaron a su través. La eficiencia del marcaje, es dependiente del nivel de expresión del antígeno CD45RO . La pureza de las poblaciones celulares enriquecidas fue analizada mediante citometría de flujo.

3.10.4 Marcaje, fijación y análisis de las poblaciones celulares purificadas por citometría de flujo.

Las alícuotas recogidas después de cada purificación fueron lavadas en tampón de separación, centrifugadas a 453g durante 3 minutos, e incubadas con 20 μl de los siguientes anticuerpos (Ac) específicos: anti- CD4 conjugado con ficoeritrina (PE), anti- CD8 conjugado con fluoresceína de isotiocianato (FITC) y, anti- CD45 conjugado con aloficocianina (AFC). En todos los casos se realizaron en paralelo incubaciones de las células con Ac del mismo isotipo como control negativo de especificidad.

La mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), tras la incubación se lavó el exceso de Ac con tampón de separación. Las células fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 1% en PBS. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su análisis.

La adquisición y el análisis de los resultados se realizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, California, EEUU), utilizando el programa de inmunocitometría CellQuest (Becton Dickinson).

El número mínimo de eventos adquiridos para validar el ensayo fue de 20.000 células por muestra.

3.10.5 Co-cultivo de células purificadas de pacientes ancestrales con CMSP de donante sano.

Las células purificadas T CD4⁺CD45RO⁻ y T CD4⁺CD45RO⁺ de los pacientes fueron puestas en RPMI con IL-2 (2.5 ng/ml), y cocultivadas con 10x10⁶ CMSP de donante sano previamente tratadas con Mitomicina C (apartado 3.10.2). El cultivo fue estimulado con PHA-Lectin (2 µg/ml) e incubado a 37° C toda la noche. A las 24 horas, se centrifugó el cultivo a 300g 10 minutos a 4°C para eliminar la PHA-lectin y se añadió 1x10⁶ de CMSP CD8⁻ estimulados con PHA-lectin durante tres días. El medio de cultivo fue cambiado dos veces por semana y alimentado con 1x10⁶ de CMSP CD8⁻ pre-estimulados. Cada tres días se analizó la presencia de antígeno p24 en el sobrenadante de los cultivos mediante un ELISA.

3.10.6 Medida del antígeno p24 del VIH-1 en sobrenadante de cultivo por ELISA

La medida del antígeno (Ag) p24 se realizó mediante un test inmunológico *in vitro* para su determinación cualitativa en suero o plasma humanos, así como en sobrenadantes de cultivo celular. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia “ECLIA” está concebido para su empleo en los analizadores automáticos Roche Elecsys 2010 y en el módulo Elecsys Modular Analytics E170 (Roche Diagnostics).

El procedimiento de ensayo incluye los siguientes pasos:

- 1) Incubación del Ag p24 del VIH presente en 50 µl de muestra, con un anticuerpo monoclonal biotilnado específico contra el Ag p24 del VIH, dicho Ab está marcado con quelato de rutenio formando un complejo tipo “sándwich”.

- 2) Después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina.
- 3) La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura, donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador.
- 4) El software Elecsys procesa automáticamente los resultados comparando la señal electroquimioluminiscente obtenida de la muestra con el valor umbral obtenido previamente en la fase de calibración del AgVIH.

3.11 Análisis de la concentración de β -2 Microglobulina en plasma.

La concentración de β -2 Microglobulina en el plasma de los pacientes, fue determinada mediante el ELISA comercial “ β -2 Microglobulina EIA” (DRG Internacional, Inc., USA), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Es una prueba de enzimo-inmunoensayo indirecto para la detección de β -2 Microglobulina. El procedimiento del ensayo consta de los siguientes pasos:

- 1) Las muestras de suero y una serie de controles estándar se distribuyen en los pocillos de la microplaca recubierta de Ac anti Beta-2-Microglobulina humana. La Beta-2-Microglobulina presente en el plasma se fija al Ac inmovilizado en la fase sólida.
- 2) Después de 30 minutos de incubación a TA, se lavan los pocillos y se añaden Ac anti-Beta-2-Microglobulina humanas conjugados con peroxidasa.
- 3) A los 15 minutos de incubación a TA se detecta la presencia de la enzima inmovilizada en la fase sólida mediante la reacción producida por la adición del sustrato correspondiente.
- 4) Al cabo de otros 15 minutos de incubación a TA, la reacción enzimática se para mediante adición de ácido clorhídrico 1M. La lectura se realiza en un espectrofotómetro a 450/620 nm.

Con las absorbancias obtenidas de la lectura de los estándar de concentración conocida, construimos una curva patrón e interpolamos las concentraciones de Beta-2-Microglobulina presente en las muestras de los pacientes. Para determinar el aumento o disminución de los niveles de Beta-2-Microglobulina en los pacientes, utilizamos el valor medio de 1.02 $\mu\text{g/ml}$ obtenido usando este kit en un set de 37 muestras de pacientes no infectados por VIH-1 (Bello et al., 2005).

3.12 Análisis de la respuesta inmune humoral anti-VIH-1

La presencia de Ac anti VIH-1 en el plasma de los pacientes, fue medida con el equipo comercial “Genscreen HIV ½ Versión 2”, (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Es una prueba de enzimo-inmunoensayo indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos purificados del VIH (proteína gp-160/p25 recombinante y péptidos de los epítotos inmunodominantes de las glicoproteínas de la envuelta).

El ensayo incluye los siguientes pasos:

- 1) Las muestras de suero y una serie de sueros control se distribuyeron en los pocillos de la microplaca recubierta de antígenos. Si existe en el suero Ac anti VIH-1 se fijaran al Ag inmovilizado en la fase sólida.
- 2) Después de 30 minutos de incubación a 40°C, se lavaron los pocillos y se añadió Ac anti-IgG e IgM humanos conjugados con peroxidasa.
- 3) Al cabo de otros 30 minutos de incubación a 40°C, se detectó la presencia de la enzima inmovilizada en la fase sólida, mediante la adición del sustrato correspondiente.
- 4) Después de una incubación de 30 minutos a TA, la reacción enzimática se paró por adición de ácido sulfúrico 4N y, se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 492/620 nm.

Con las absorbancias obtenidas en la lectura de una muestra a distintas diluciones, construimos una curva patrón e interpolamos el título de Ac, el cuál fue definido como el inverso de la dilución más alta del suero que da un resultado positivo. En nuestros análisis hicimos una dilución inicial de 1/64 de suero y, a partir de ésta se hicieron siete diluciones seriadas 1/4.

3.13 Caracterización del genotipo CCR5 Δ -32.

El análisis del genotipo CCR5 Δ -32 se realizó mediante PCR en el ADN obtenido a partir de CMSP (Michael et al., 1997). La reacción de amplificación produjo un fragmento génico de 225 nucleótidos para el alelo salvaje, y uno de 193 nucleótidos para el alelo CCR5 Δ -32, los cuáles fueron separados sobre un gel de poliacrilamida al 8% en Tris borato 45 mM, EDTA 10mM (TBE).

3.14 Determinación de marcadores genéticos. Tipado de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA).

El tipado de los HLA que presentan los pacientes LTNP ancestrales, se realizó por secuenciación y el análisis de Polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) se realizó mediante hibridación con sondas TaqMan a lo largo del genoma. Las variantes genéticas del huésped, fueron elegidas a partir de los análisis realizados en estudios previos (Fellay et al., 2009; Fellay et al., 2007). Se analizaron las asociaciones descritas de los alelos *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* con la progresión o la protección de la enfermedad, la asociación del alelo *HCP5* rs2395029, la variante el alelo *HLA-C* (rs9264942), así como los polimorfismos *CCR5* Δ 32 (rs333), *CCR2* V64I (rs1799864), *CCR5* A29G (rs285675), *CCR5* G208T (rs2734648), *CCR5* G303A (rs1799987), *CCR5* C627T (rs1799988), *CCR5* C927T (rs1800024) que definen los haplotipos humanos (HH), así como el número de copias de *CCL3L1*. (Tabla 4.5). El tipado se realizó en el Instituto de Microbiología del Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (Lausanne-Suiza), en colaboración con el laboratorio del Dr. Amalio Telenti.

3.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los cálculos estadísticos sobre los datos obtenidos se realizaron con el programa Graph Pad PRISM versión 2.01 (Graph Pad Software Incorporated), excepto el Z-test, utilizado para comparar las diferencias entre dN y dS, para el cual se utilizó el programa MEGA versión 2.4 (Tamura et al., 2007). La prueba estadística utilizada se indica en cada caso.

RESULTADOS

4.1 PACIENTES LTNPs

4.1.1 Definición y Clasificación de los pacientes LTNPs

El estudio que presentamos se va a centrar en el análisis de la evolución viral de un grupo de pacientes LTNPs. La evolución viral fue analizada a partir del ADN proviral obtenido de CMSP, en un fragmento de 614 nucleótidos de la región C2-V5 del gen de la envuelta (ver apartado 3.4.1). Los LTNPs se definen como pacientes infectados por VIH-1 que se caracterizan por presentar una infección documentada de más de 10 años de evolución, son asintomáticos a pesar de no haber recibido nunca terapia antirretroviral. Estos pacientes representan entre el 1-5% de los individuos infectados (Paroli et al., 2001).

Debido a que estudios previos ya demostraban que este grupo de pacientes presentaba individuos con distintas características clínicas y distinta evolución de sus cuasiespecies virales, lo primero que nos propusimos fue intentar clasificar el grupo de pacientes LTNPs (Bello et al., 2004)

4.1.1.1 Datación de las secuencias virales:

La datación de las secuencias virales, es una herramienta de análisis descrita previamente por nuestro grupo de investigación (Bello et al., 2004), que nos permite datar las secuencias nucleotídicas presentes en las cuasiespecies de los pacientes infectados, como medida de la evolución viral transcurrida desde la seroconversión. Este método de datación, se basa en la existencia de un reloj molecular en la evolución del VIH-1. Esta aproximación se ha utilizado para datar el origen de la pandemia (Korber, Sharp, and Ho, 1999), el origen de epidemias locales (Casado et al., 2000; Robbins et al., 2003), o el momento de transmisión entre pacientes (Casado et al., 2007; Leitner and Albert, 1999). Este análisis se realizó con las secuencias nucleotídicas de muestras obtenidas desde el año 1989 hasta el año 2003. En esta aproximación, calculamos no solo la distancia genética de las muestras a la secuencia consenso española (SCesp) sino también al ancestro común más reciente español (ACMREsp) como se describe en el apartado 3.8.6. A partir del alineamiento de estas secuencias, se generó una SCesp que incluye el nucleótido más frecuente en cada posición (Casado et al., 2000). Nuestro grupo, utilizando un análisis de regresión lineal, detectó una correlación positiva entre el año de obtención de la secuencia viral y la distancia genética a la secuencia consenso española (SCesp) o al ACMREsp.

Como se observa en la figura 4.1, aunque existe una gran dispersión de los valores, se confirma una correlación positiva entre el año de obtención de la muestra y la distancia genética tanto a la SCEsp ($r^2=0.1933$ pendiente= 0.005473 ; $P<0.0001$) como al ACMREsp ($r^2=0.1912$; pendiente= 0.005766 ; $P<0.0001$). En ambas regresiones, la pendiente de la curva representa la tasa media de divergencia anual de las secuencias nucleotídicas españolas para la región V3 del gen *env*. La intersección con el eje de abscisas identificaría el inicio de la epidemia en España y se corresponde con el año 1976. Este dato sería compatible con el primer caso de SIDA descrito en España en el año 1981 (<http://www.msc.es/sida>).

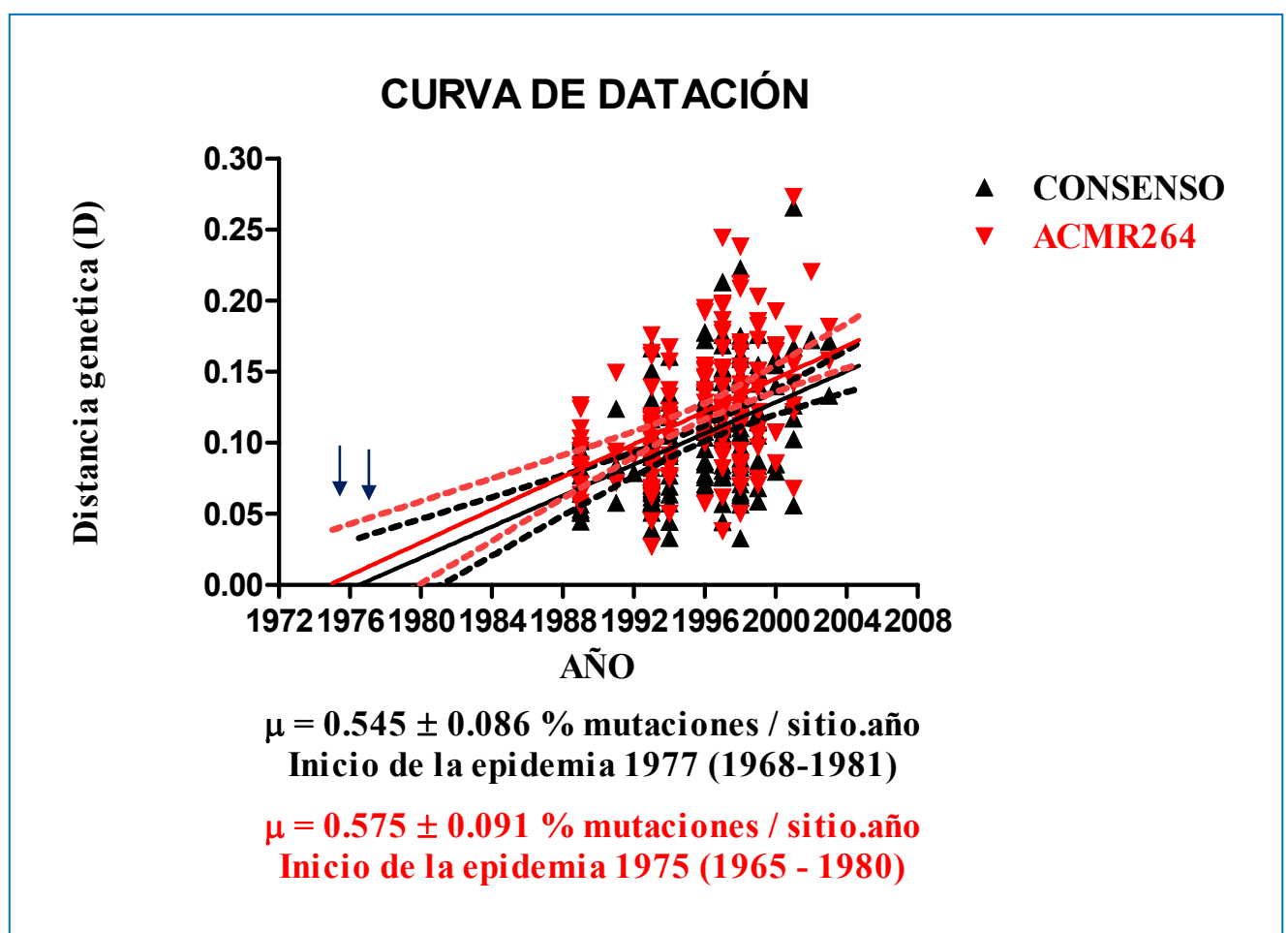


Figura 4.1: Divergencia genética en la región V3 del gen *env* en función del año de aislamiento de la muestra. Este estudio se realizó para un conjunto de 171 secuencias españolas del subtipo B de pacientes con distintas prácticas de riesgo y origen geográfico. La distancia nucleotídica (D) a la SCEsp y la distancia al ACMREsp fue calculado por el método de ML. Las muestras fueron tomadas entre los años 1989 y 2003, y cada punto en la regresión representa la secuencia nucleotídica obtenida de un paciente. Las flechas señalan la intersección con el eje de abscisas que indican el año de origen de la epidemia en España, 1977 para la SCEsp y 1975 para el ACMR esp

Basándonos en los análisis de las distancias genéticas a la SCEsp o al ACMREsp, pudimos datar las secuencias globales de los pacientes LTNP como se describe en el apartado 3.8.6 y pudimos establecer la existencia de dos grupos diferenciados de pacientes dentro de los LTNPs.

4.1.1.2 Clasificación de los pacientes LTNPs según la datación de las secuencias nucleotídicas.

Teniendo en cuenta la datación de las secuencias virales presentes en la cuasiespecie, descrita en el apartado anterior, hemos podido clasificar nuestros pacientes LTNPs en ancestrales y modernos (ver tablas 4.1 A y 4.1.B). Hemos definido los pacientes LTNP ancestrales, como aquellos pacientes donde solo se detectaron secuencias de ADN proviral que se encontraban próximas a la fecha de seroconversión del paciente. El grupo de pacientes LTNP modernos es aquel donde la fecha de datación de las secuencias nucleotídicas coincidía o se encontraba cercana a la fecha de obtención de la muestra (Bello et al., 2005).

PACIENTES LTNP ANCESTRALES

<i>Pacientes</i>	<i>Año de Aislamiento^a</i>	<i>Año Seroconversión^b</i>	<i>Datación^c</i>	<i>VIH-ARN (copias/ml)^d</i>
<i>LTNP 1</i>	2001-2005	<1990	1981	248
<i>LTNP 2</i>	2001-2003	1987	1984	118
<i>LTNP 3</i>	2002-2007	1988	1982	<50
<i>LTNP 5</i>	2002-2006	1986	1983	241
<i>LTNP 17</i>	2004-2006	1997	1998	<50
<i>LTNP 20</i>	2004-2005	1988	1984	69
<i>LTNP 21</i>	2005-2006	1992	1987	<50
<i>LTNP 56</i>	1998-2006	1989	1982	621

Tablas 4.1.A Clasificación de los pacientes LTNPs en función de la datación. a) Año de obtención de la muestra, b) Año de seroconversión documentada o estimada del paciente, c) Año de datación de las secuencias nucleotídicas globales mediante el cálculo de la distancia a la SCEsp descrita en el apartado anterior, d) Carga viral media a lo largo del seguimiento calculada a partir de las determinaciones de carga viral positiva según el límite de detección del equipo comercial disponible Amplificador HIV-1 Monitor TM Test (Roche Diagnostic Systems, Somerville, NJ) y, Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, (<500 copias y < 50 copias/ml) respectivamente.

PACIENTES LTNP MODERNOS

<i>Pacientes</i>	<i>Año de Aislamiento^a</i>	<i>Año Seroconversión^b</i>	<i>Datación^c</i>	<i>VIH-ARN (copias/ml)^d</i>
<i>LTNP 4</i>	2003	1992	2002	1218
<i>LTNP 7</i>	2001	1987	2001	704
<i>LTNP 10</i>	2003	1991	2003	4704
<i>LTNP 12</i>	2003	1986	2000	2898
<i>LTNP 14</i>	2003	1999	2003	28256
<i>LTNP 19</i>	2004	1988	2004	9886
<i>LTNP 30</i>	2000	1988	1999	14179
<i>LTNP 45</i>	1998	1987	2000	628
<i>LTNP 64</i>	2002	1985	1999	17105

Tablas 4.1.B Clasificación de los pacientes LTNPs en función de la datación. a) Año de obtención de la muestra, b) Año de seroconversión de cada paciente, c) Año de datación de las secuencias nucleotídicas globales mediante el cálculo de la distancia a la SCesp descrita en el apartado anterior, d) Carga viral media a lo largo del seguimiento calculada a partir de las determinaciones de carga viral positiva según el límite de detección del equipo comercial disponible Amplicor HIV-1 Monitor™ Test (Roche Diagnostic Systems, Somerville, NJ) y, Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA), Siemens, (<500 copias y < 50 copias/ml) respectivamente.

4.2 ESTUDIO DE PACIENTES LTNP ANCESTRALES

Esta Tesis se va a centrar en analizar la evolución del VIH-1, en el grupo de 8 pacientes LTNP ancestrales descrito en el apartado anterior. Las muestras fueron obtenidas en el Centro de Salud Sandoval, perteneciente a la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Todos los pacientes analizados en el presente trabajo son o fueron UDIV. Analizaremos las características virológicas, inmunológicas y genéticas que los diferencian del resto de pacientes LTNPs, así como, la posible correlación de estas características con su status clínico.

4.2.1 Análisis de las características clínicas de los pacientes LTNP ancestrales: carga viral, número de células T CD4⁺ y T CD8⁺.

La carga viral plasmática, así como el número de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ se analizó a lo largo de todo el seguimiento de los pacientes ancestrales (Anexo, Tabla 1).

Exceptuando algunos brotes de viremia, la carga viral plasmática, presente en los pacientes es inferior a 1000 copias/ml de plasma (Tabla 4.2 y Fig 4.2), y en los pacientes LTNP 3 y LTNP 21 se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica (<50 copias/ml). El análisis estadístico de la carga viral plasmática entre los pacientes LTNP ancestrales, demostró que no existían diferencias significativas, utilizando un análisis de varianzas (ANOVA; *p*-valor 0.5833). Esta baja carga viral (Tabla 4.2 y Fig 4.2), hace suponer que los virus de los pacientes LTNP ancestrales no está replicando o lo está haciendo a muy bajo nivel.

Pacientes	Nº Muestras en el seguimiento	Determinaciones de Carga Viral Positivas ^a	Media carga viral (copias/ml) ^b	VIH-1 ADN (copias/10 ⁶) CMSP ^c
LTNP 1	15	11 (73%)	248±100	4
LTNP 2	8	3 (37%)	118±45	3
LTNP 3	15	0	NA	2.0
LTNP 5	14	5 (35%)	241±111	2
LTNP 17	8	0	NA	1
LTNP 20	9	4 (44%)	69.5±7.9	55
LTNP 21	8	0	NA	8.5
LTNP 56	28	7 (25%)	621±254	2

Tabla 4.2: Características virológicas de los pacientes. Se indica el número de muestras analizadas en cada paciente a lo largo de todo el seguimiento, a) número de determinaciones con carga viral superior al límite de detección del momento, b) media de la carga viral por paciente en las determinaciones positivas ± error standar, c) Carga media de ADN viral asociado a CMSP. NA: No aplicable.

Esta baja carga viral detectada en los pacientes LTNP ancestrales se correlaciona con una reducción significativa de diversos marcadores de activación del sistema inmune, como el número de células T CD8⁺, la concentración de β -2 microglobulina en plasma, o el título de Ac específicos frente a VIH-1. (Anexo, Tabla 1). El número medio de copias de ADN viral asociado a CMSP, que representa una cuantificación del reservorio viral, es muy bajo y se encuentra entre 1 y 4 copias/10⁶ CMSP para todos los pacientes con excepción de los pacientes LTNP 20 y LTNP 21 que presentan 55 y 8.5 copias/10⁶ respectivamente (Tabla 4.2).

Analizando el número de células T a lo largo del seguimiento en estos pacientes, podemos observar, que todos los pacientes LTNP ancestrales presentaban un número medio de células T CD4⁺ superior a 500 células/μl, exceptuando dos determinaciones del paciente LTNP 21 (Fig 4.2).

El cociente CD4⁺/CD8⁺ es superior a 1 en todos los pacientes excepto en los pacientes LTNP 1 y 5 que presentaban un cociente CD4⁺/CD8⁺ menor que 1 como se observa en la figura donde todas las determinaciones del número de linfocitos T CD8⁺ son superiores siempre al número de linfocitos T CD4⁺.

EVOLUCIÓN DE LA CARGA VIRAL PLASMÁTICA Y NÚMERO DE CÉLULAS T CD4⁺ Y T CD8⁺ A LO LARGO DEL SEGUIMIENTO

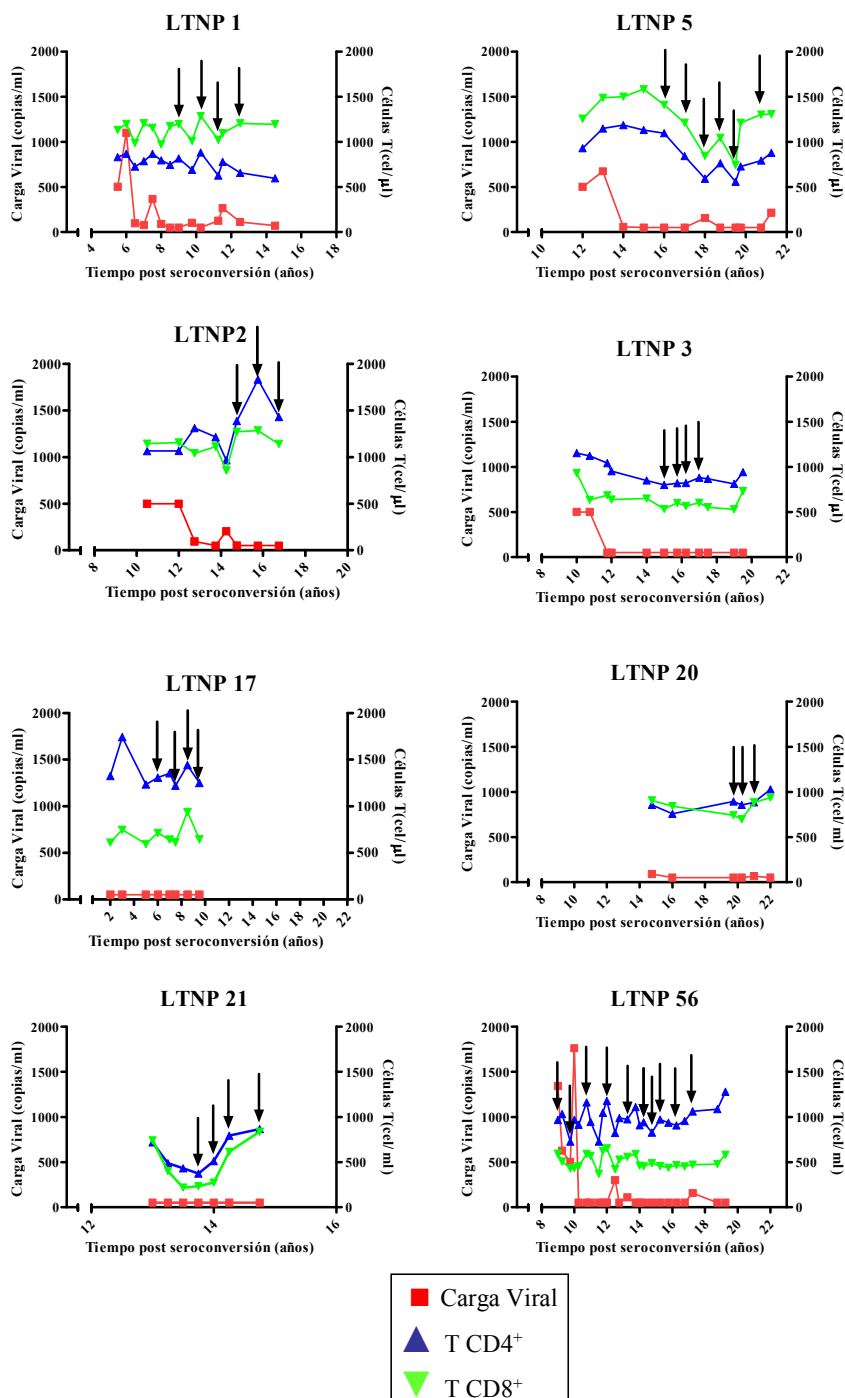


Figura 4.2: Niveles de la carga viral y número de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en pacientes LTNP ancestrales. La carga viral plasmática (copias ARN/ml) se representa en el eje izquierdo, y el número de linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺ (células/ μ l) en el eje derecho de cada gráfico. Las representaciones se refieren al tiempo post seroconversión representado en el eje de abscisas. Las flechas representan las muestras que han sido utilizadas para el análisis de la evolución viral en cada paciente. Los símbolos vacíos representan medidas de carga viral con un límite de detección de la técnica de 500 copias/ μ l. Los números de identificación de cada paciente se sitúan en la parte superior izquierda de cada gráfico.

La dinámica de células T CD4⁺ y TCD8⁺ a lo largo del seguimiento de los pacientes se analizó mediante un análisis por regresión lineal del porcentaje de células T para determinar si había un aumento o disminución significativa en el número de células. Los resultados se muestran en las Figuras 4.2.1 y 4.2.2. El análisis estadístico del número de células T CD4⁺ no fue significativo en la mayoría de los pacientes, y no se detectó disminución o aumento de este tipo celular a lo largo del seguimiento. En el LTNP 56 detectamos un aumento significativo de células T CD4⁺ a lo largo del seguimiento ($p=0.0341$) que se corresponde con una ganancia de un 0.3% de células T CD4⁺ al año (Fig 4.2.1). Por el contrario, en los pacientes LTNP 1 y LTNP 5 detectamos una pérdida de células T CD4⁺ (0.98 y 0.66% al año respectivamente), que fue significativa a lo largo del seguimiento ($p<0.001$ y $p<0.004$ respectivamente).

De la misma manera, el análisis por regresión lineal del porcentaje de células T CD8⁺, mostró un aumento significativo en el número de células en el paciente LTNP 1 ($p=0.0088$), y una ganancia anual de células T CD8⁺ del 0.6%. Sin embargo, detectamos una pérdida significativa en el número de células en los pacientes LTNP 5 y LTNP 56 ($p=0.0004$ y $p<0.0001$) que se corresponde con una pérdida de células T CD8⁺ anual del 0.32 y 0.35% respectivamente (Fig 4.2.2). Estos resultados ya sugieren que los pacientes ancestrales no son un grupo homogéneo y que mientras un grupo de pacientes mantiene un equilibrio entre ganancia y pérdida de células T (LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56), el otro grupo de pacientes (LTNP 1 y 5), ha perdido dicho equilibrio, y sigue la dinámica de los pacientes con progresión crónica. Así el paciente LTNP 1 va perdiendo células T CD4⁺ y gana células T CD8⁺ a lo largo del seguimiento, mientras que el paciente LTNP 5 pierde ambos tipos celulares.

DINÁMICA DE CÉLULAS T CD4⁺ A LO LARGO DEL TIEMPO

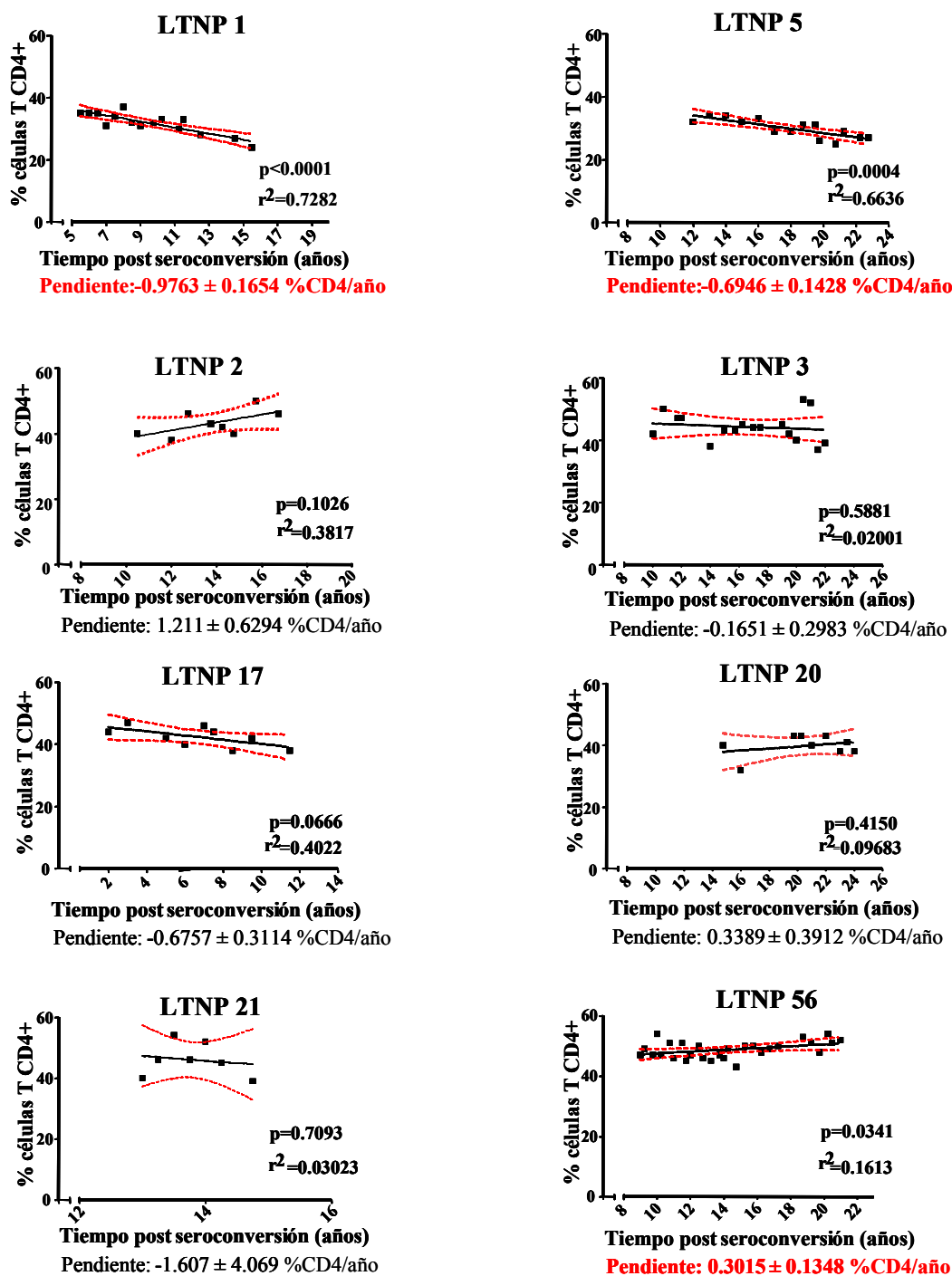


Figura 4.2.1: Análisis por regresión lineal del número de células T CD4⁺ en pacientes ancestrales a lo largo del seguimiento. En el eje de ordenadas de cada gráfico se representa el % de células T CD4⁺. El número de identificación de los pacientes se encuentra en la parte superior de cada gráfico. En rojo, se muestra el valor de la pendiente en los pacientes donde es estadísticamente significativa.

DINÁMICA DE CÉLULAS T CD8⁺ A LO LARGO DEL TIEMPO

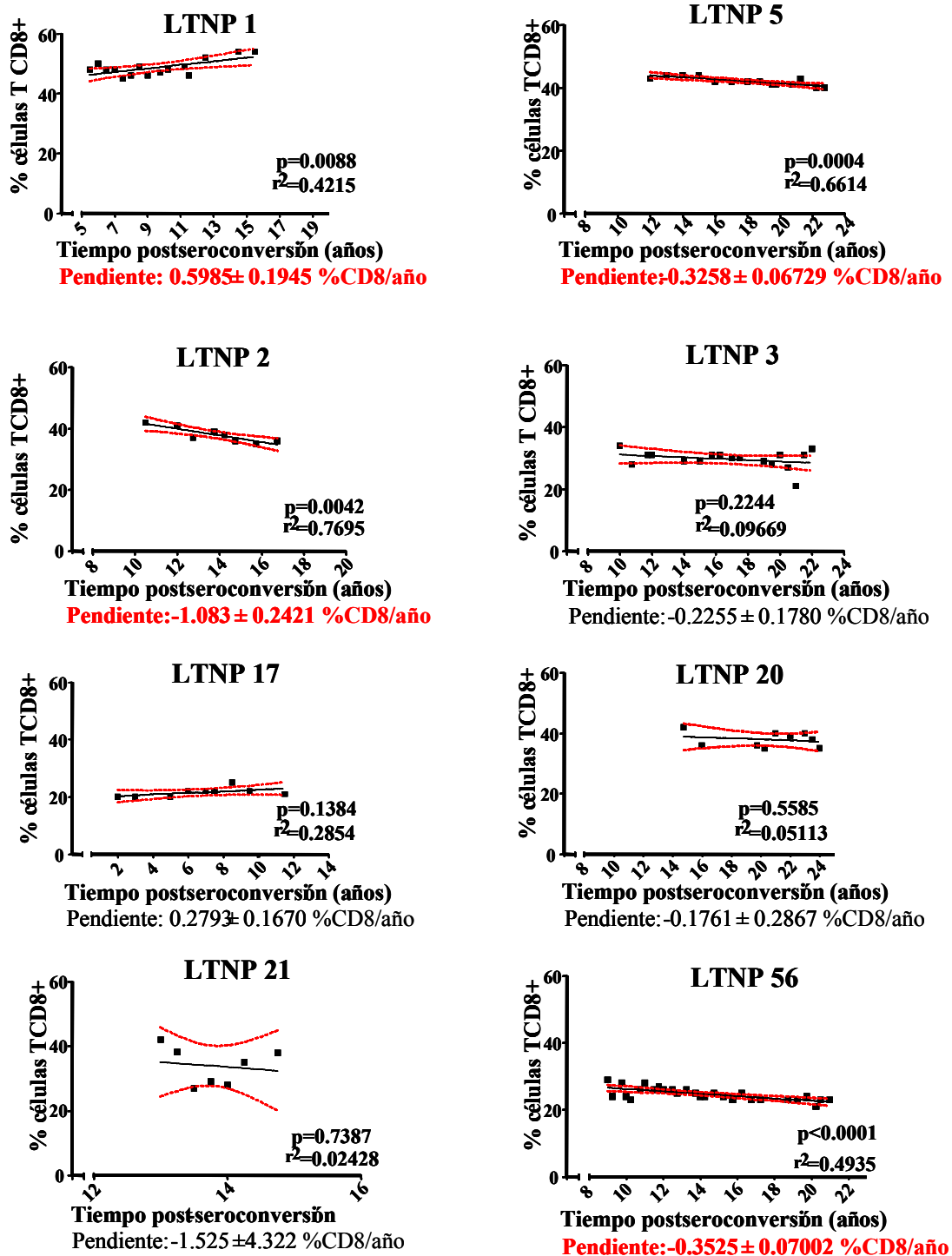


Figura 4.2.2: Análisis por regresión lineal del número de células T CD8⁺ en pacientes ancestrales a lo largo del seguimiento. En el eje de ordenadas de cada gráfico se representa el % de células T CD8⁺. El número de identificación de los pacientes se encuentra en la parte superior de cada gráfico. En rojo, se muestra el valor de la pendiente en los pacientes donde es estadísticamente significativa.

4.2.2 Análisis filogenético de pacientes LTNP ancestrales

Para estudiar la evolución viral en los pacientes LTNP ancestrales, se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas obtenidas a dilución límite (ver apartado 3.4.2), mediante la amplificación de un fragmento de 614 nucleótidos de la región C2-V5 del gen *env* (nucleótidos 7068 a 7682 del HXB2). Se intentó obtener al menos 20 PCR individuales en cada muestra, como se describe en el apartado 3.4.2, sin embargo, esto no fue posible en muchas de las muestras analizadas, debido al bajo número de copias de ADN viral asociado a CMSP (Tabla 4.4). Las secuencias fueron editadas y alineadas según se describió en el apartado 3.9.1. Se emplearon distintos métodos filogenéticos para la reconstrucción con resultados concordantes (ver apartado 3.8.1).

A continuación, se presentan los árboles filogenéticos reconstruidos por el método de ML. Los modelos de sustitución nucleotídica fueron seleccionados de acuerdo con la aproximación estadística obtenida por el “Akaike information criterion” (AIC) (Akaike 1974) implementado en Modeltest (versión 3.6; David Posada <http://www.darwin.uvigo.es>) (ver apartado 3.8.2). Los árboles filogenéticos fueron inferidos usando el programa Phym1 v.2.4.1. La robustez estadística de los árboles generados se probó mediante un remuestreo de 1000 réplicas por el método de “bootstrap”. Todos los árboles fueron generados sin raíz, por lo que se utilizaron como grupos externos las cepas de referencia HXB2-LAI (IIB) y S61 (89ES061) del VIH-1, (<http://www.hiv.lanl.gov>), con excepción del paciente LTNP 5, en el que dada la complejidad de la reconstrucción, fue necesario incluir como grupos externos cepas de referencia de otros subtipos, A y D (Fig 4.2.10B).

Los árboles filogenéticos de los pacientes LTNP ancestrales se presentan en las figuras 4.2.3 a 4.2.10. El análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada paciente forman grupos monofiléticos con altos valores de remuestreo (>90%) con excepción del paciente LTNP 5 donde el valor de bootstrap, al utilizar como grupo externo la cepa de referencia del subtipo B es del 52% (Fig 4.2.10A).

A partir del análisis filogenético hemos podido detectar dos topologías de árboles claramente diferenciadas. En la primera topología incluimos los pacientes **LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56** (Fig 4.2.3-4.2.8), que se caracteriza por presentar unos árboles filogenéticos con ramas muy cortas y muy cercanas a su ACMR, indicando que eran poblaciones virales muy homogéneas, que no progresaban con el tiempo, independientemente del año de obtención de la muestra.

LTNP 2

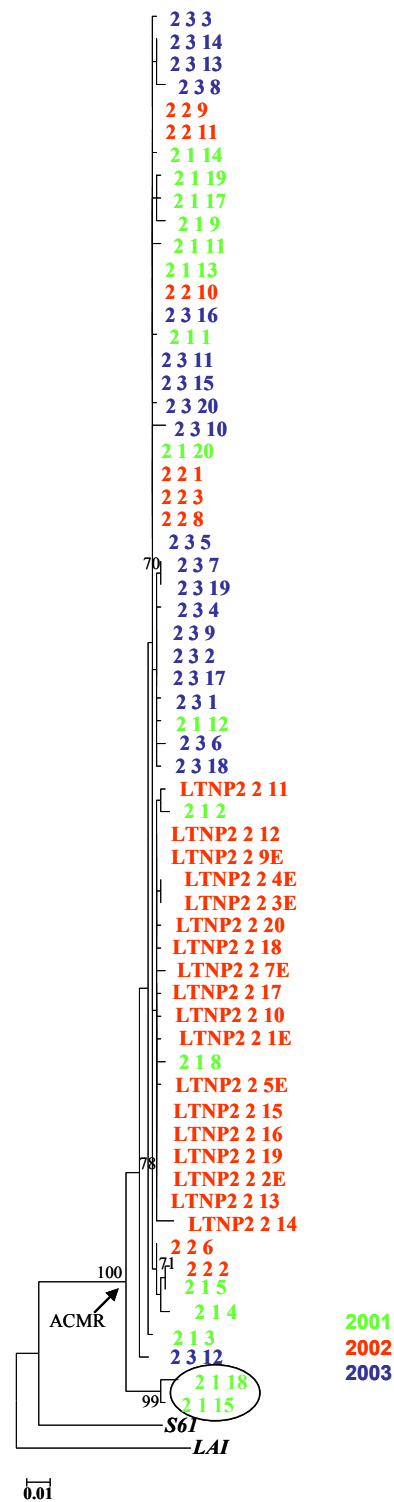


Fig.4.2.3: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 2 entre los años 2001 y 2003. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. Las secuencias en los círculos señalan las secuencias con más evolución. La barra representa un 1% de distancia genética.

LTNP 3

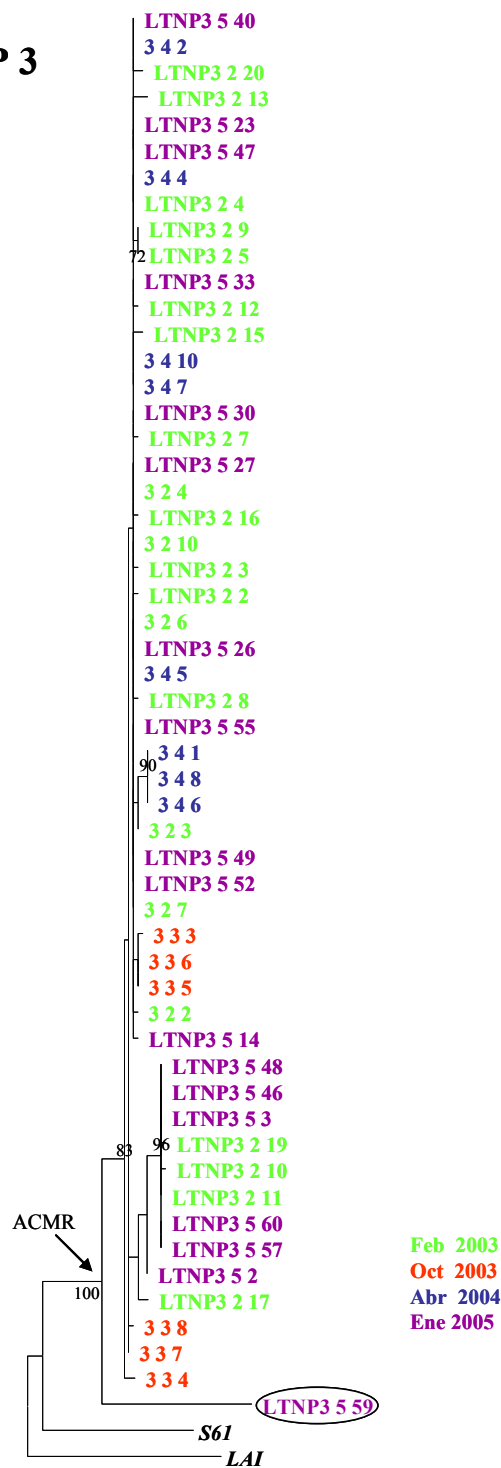


Fig.4.2.4: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 3 entre los años 2003 y 2005. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. Las secuencias en los círculos señalan las secuencias con más evolución. La barra representa un 1% de distancia genética.

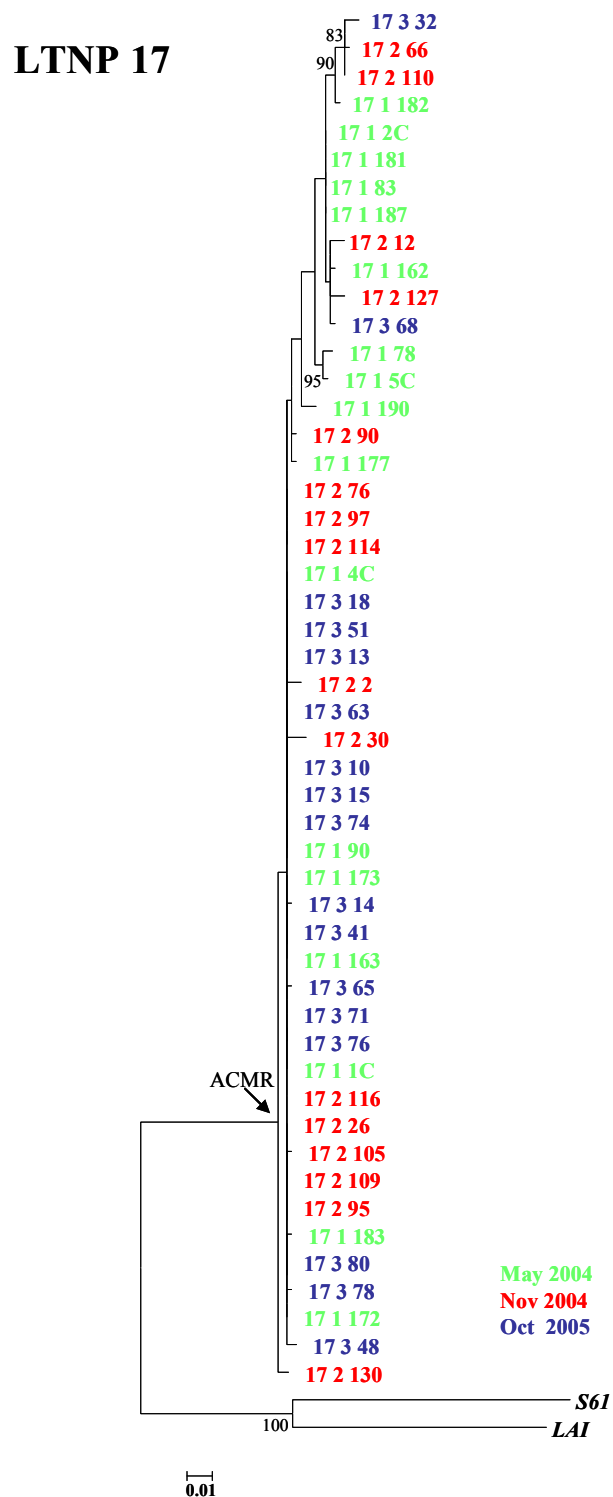


Fig.4.2.5: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 17 entre los años 2004 y 2005. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. La barra representa un 1% de distancia genética.

LTNP 20

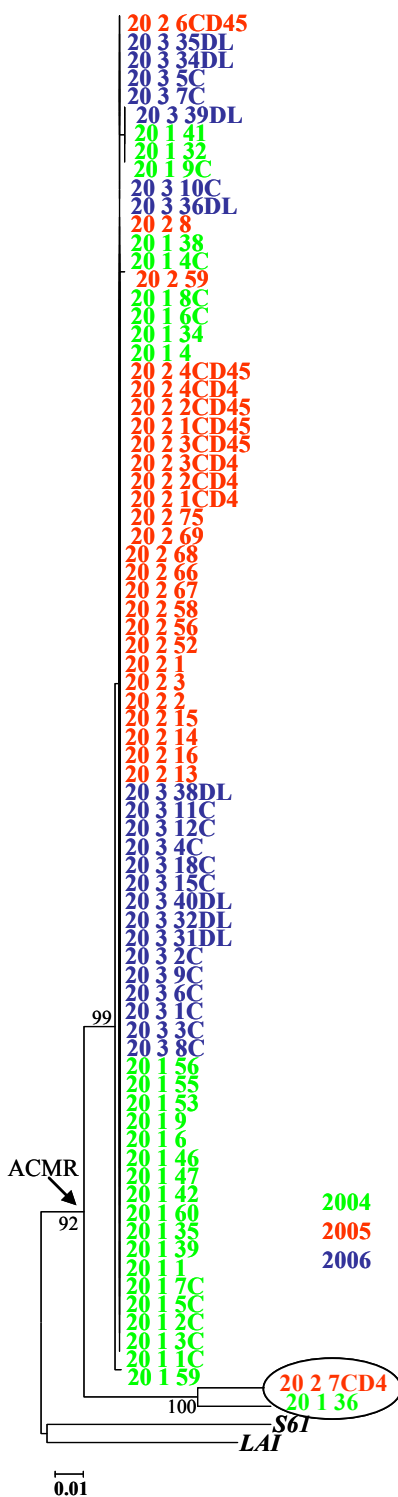


Fig.4.2.6: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 20 entre los años 2004 y 2005. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia S61 y LAI como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. Las secuencias en los círculos señalan las secuencias con más evolución. La barra representa un 1% de distancia genética.

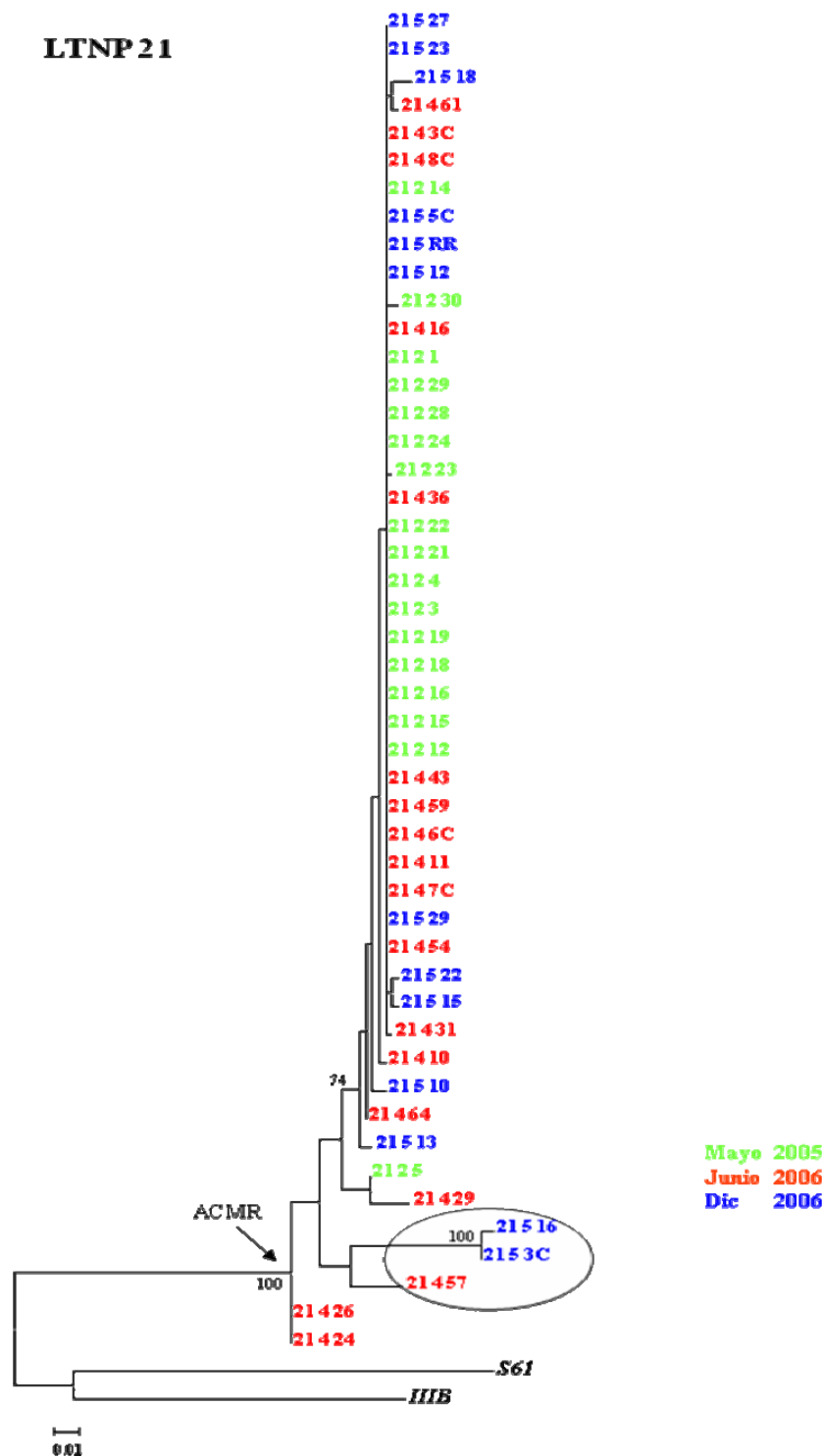


Fig.4.2.7: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 21 entre los años 2005 y 2006. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. Las secuencias en los círculos señalan las secuencias con más evolución. La barra representa un 1% de distancia genética.

LTNP 56

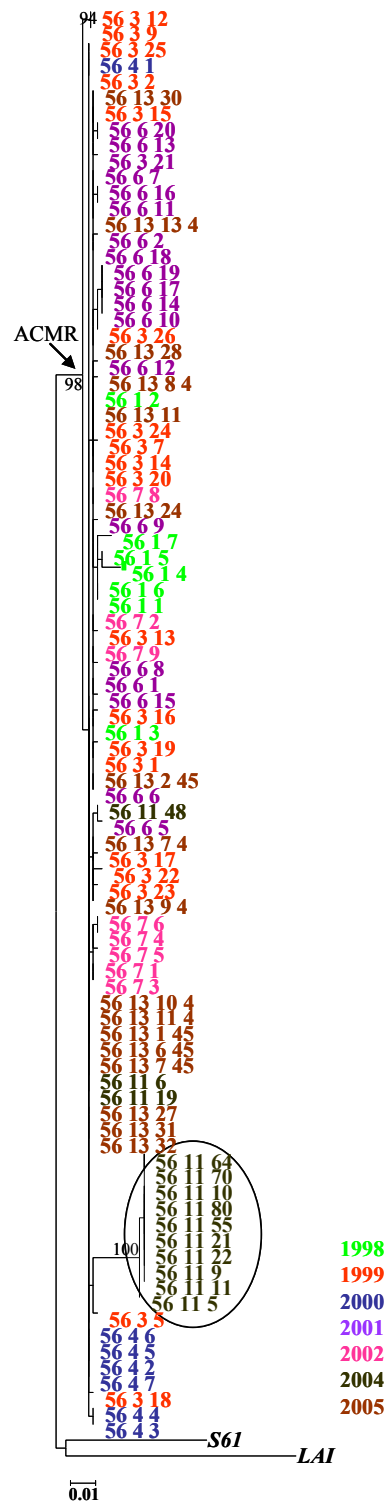


Fig.4.2.8: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 56 entre los años 1998 y 2005. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. Las secuencias en los círculos señalan las secuencias con más evolución. La barra representa un 1% de distancia genética.

La segunda topología encontrada en el análisis filogenético, pertenece a los pacientes **LTNP 1** y **LTNP 5** (Fig 4.2.9-4.2.10). La característica común es la presencia de ramas de mayor longitud y más alejadas del ACMR, así como la identificación de grupos o “clusters” de secuencias que se agrupan con altos valores de remuestreo dentro del árbol. Este tipo de topología es característico de virus con más evolución, aunque no se observa una continuidad en la evolución viral, ya que las variantes virales que están circulando en un momento dado no son el origen de las variantes detectadas en momentos inmediatamente posteriores (Fig 4.2.9, 4.2.10A y 4.2.10.B), y se distribuyen a lo largo de todo el árbol. Esta topología de árboles es compatible con el modelo de evolución atemporal de las cuasiespecies virales descrito por (Bello et al., 2007a).

El análisis filogenético inicial que se llevó a cabo en el paciente LTNP 5, (Fig 4.2.10A) muestra que los valores de remuestreo que agrupan todas las secuencias nucleotídicas dentro de este paciente son los más bajos que hemos encontrado dentro de los pacientes LTNP ancestrales descritos en esta Tesis (52%), lo que podría estar indicando que este paciente posiblemente se infectó con dos virus.

Debido a la complejidad de la topología del árbol filogenético y para intentar clarificar si el paciente LTNP 5 estaba infectado por más de un virus, fue necesario volver a reconstruir el árbol filogenético incluyendo en el análisis cepas de referencia de los subtipos A y D. Como se puede observar en la Fig 4.2.10 B, aunque en esta reconstrucción el valor de remuestreo para todas las secuencias obtenidas del paciente ha aumentado a un 71%, este valor sigue siendo excesivamente bajo y se encuentra lejos de los valores obtenidos para el resto de los pacientes, lo que no nos permite descartar una doble infección en este individuo.

Este árbol se caracteriza por la presencia de dos poblaciones virales claramente diferenciadas, donde una población se encuentra más alejada del ACMR (población A), indicando mayor evolución, y otra población más próxima al ACMR (población B) y por lo tanto menos evolucionada (Fig 4.2.10B). Las secuencias 5.6.46 y 5.6.27, no pueden ser incluidas en ninguno de los dos grupos anteriores, y constituirían una tercera población que ha sido excluida de los posteriores análisis por el bajo número de secuencias que la integran. El bajo número de secuencias utilizadas en la reconstrucción filogenética, se debe a la presencia de un alto número de secuencias no funcionales, debido a paradas prematuras, que representan el 60 % de la cuasiespecie, originadas por mutaciones G→A en el aminoácido triptófano, probablemente ocasionadas por hipermutación.

LTNP 1

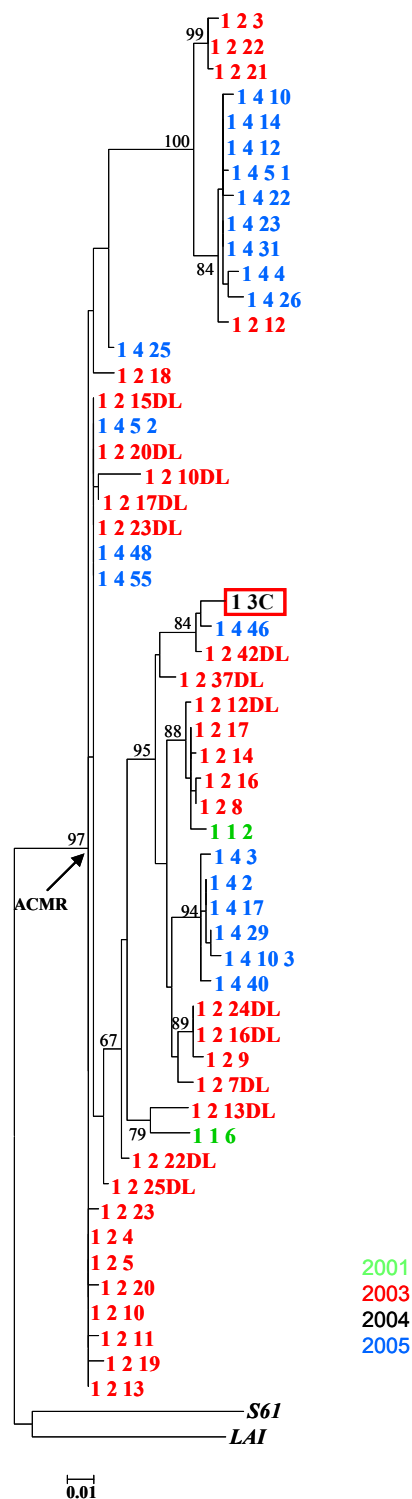


Fig.4.2.9: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 1 entre los años 2001 y 2005. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. La secuencia encuadrada representa la secuencia única obtenida a partir de una extracción de ARN viral de sobrenadante de cultivo. La barra representa un 1% de distancia genética.

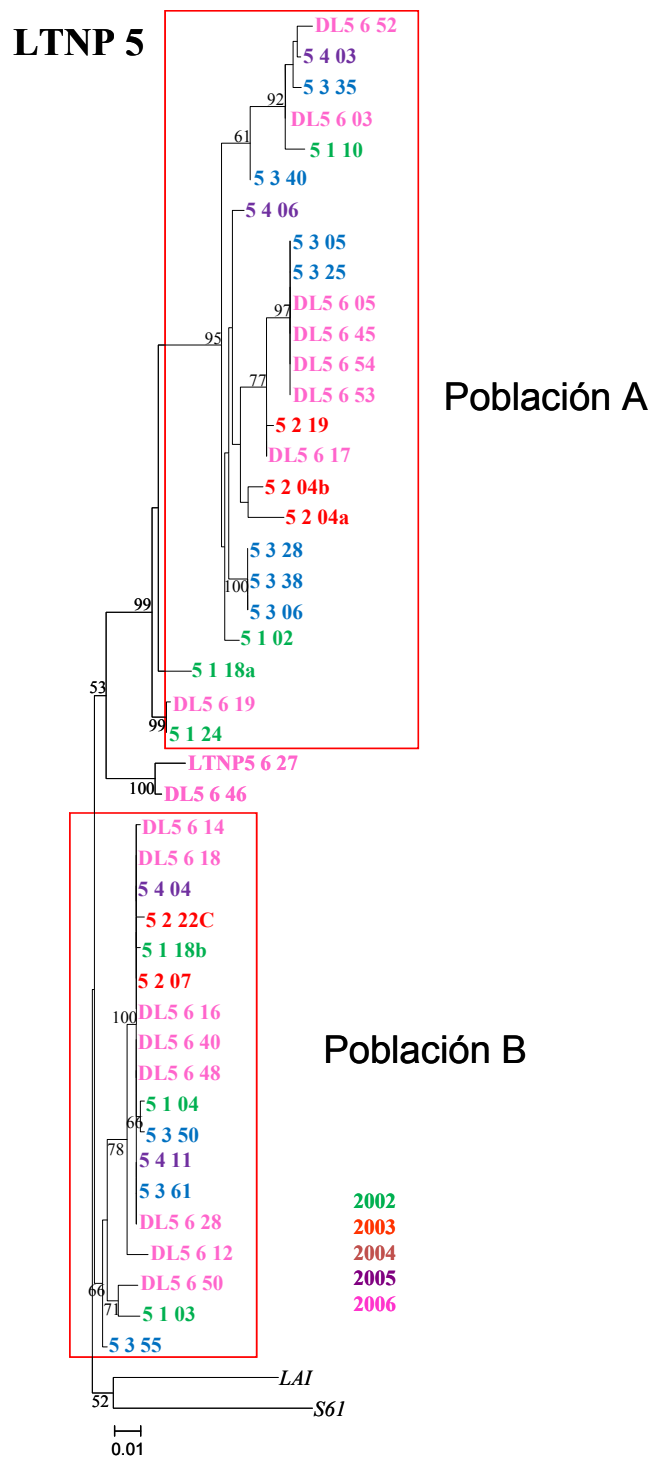


Fig.4.2.10 A: Evolución de la cuasiespecie viral del paciente LTNP 5 entre los años 2002 y 2006.

El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP. Se incluyen las cepas de referencia *S61* y *LAI* como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La barra representa un 1% de distancia genética.

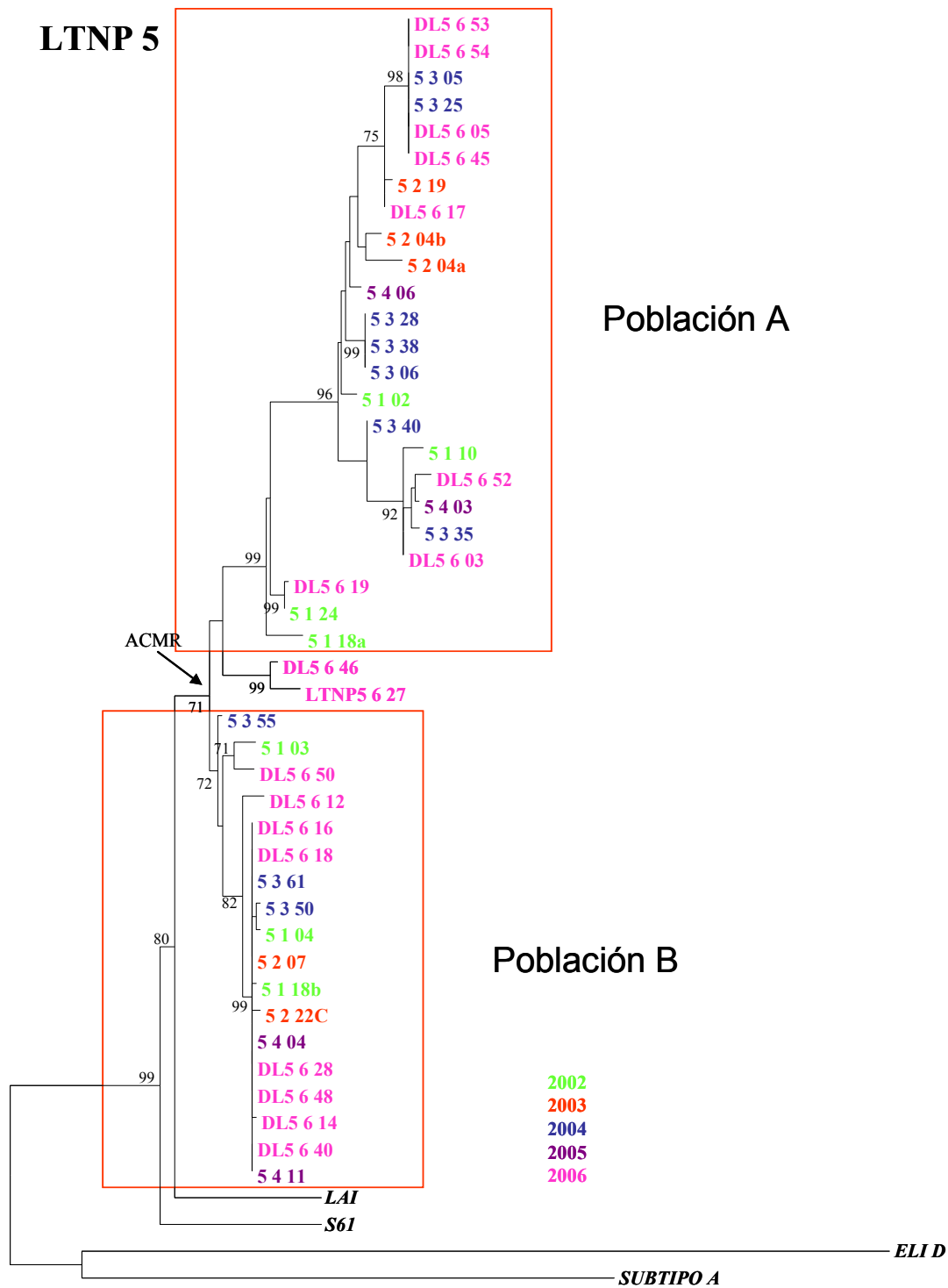


Fig.4.2.10 B: Evolución de la cuasispecie viral del paciente LTNP 5 entre los años 2002 y 2006. El árbol filogenético fue reconstruido por ML, como se describe en apartado 3.9.2, en la región C2-V5 del gen *env* con las secuencias nucleotídicas obtenidas de CMSP, junto con las cepas de referencia *S61*, *LAI* y *ELI D* y una cepa de subtipo A como grupos externos. Los números en los nodos indican los valores de remuestreo obtenidos en el análisis de bootstrap con 1000 réplicas y sólo se representan valores mayores del 70%. El color de cada secuencia hace referencia al año de obtención de la muestra. La flecha indica el ACMR para todas las secuencias obtenidas del paciente. La barra representa un 1% de distancia genética.

4.2.3 Heterogeneidad y Divergencia de las cuasiespecies virales.

Ante los resultados obtenidos en la reconstrucción filogenética, decidimos analizar los parámetros de heterogeneidad y divergencia virales, para determinar si estos parámetros podían diferenciar los dos modelos de evolución que reflejan dichos árboles.

La heterogeneidad de la cuasiespecie viral, se definió como la distancia genética media entre todas las posibles comparaciones de pares de secuencias dentro de una misma muestra. Esta heterogeneidad fue analizada en el ADN viral proveniente de CMSP según se describe en el apartado 3.8.3.

La divergencia de una cuasiespecie viral, se definió como la distancia genética media entre todas las secuencias obtenidas de una muestra al ACMR según se describe en los apartados 3.8.3 y 3.8.4.

4.2.3.1 Pacientes sin evolución viral: LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56

Como se puede observar en la tabla 4.4, los pacientes LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56 presentan una heterogeneidad cercana o inferior al 1% en todas las muestras analizadas. Sin embargo, en los pacientes LTNP 3 y LTNP 21, a pesar de detectarse estos bajos valores de heterogeneidad viral, observamos un incremento en la heterogeneidad de las cuasiespecies virales entre la primera y la última muestra analizadas, que fue estadísticamente significativo, utilizando el test estadístico de Bonferroni con ($p < 0.0001$). Este incremento de heterogeneidad coincidió con un aumento de la divergencia viral en el paciente LTNP 21 que no fue estadísticamente significativo, utilizando el test anterior. En el resto de los pacientes, mediante el análisis de la distancia genética al ACMR de cada paciente (divergencia) pudimos observar que esta distancia era muy baja (Tabla 4.4 y Fig 4.3.A), manteniéndose constante y alrededor del 1% en todos los pacientes, con la excepción del paciente LTNP 21 que presentaba una divergencia media de un 2.5 %. En los pacientes LTNP 2, 3, 17, 20 y 56 no se observaron cambios apreciables en los valores de divergencia media de las cuasiespecies virales entre el inicio y el final del período de seguimiento ($p > 0.05$). Este resultado es consistente con la hipótesis de que los virus de este grupo de pacientes LTNP ancestrales no están evolucionando y probablemente no lo hayan hecho desde la primoinfección.

A pesar de esto, pudimos detectar también una minoría de ramas de mayor longitud en los pacientes LTNP 2, 3, 20, 21 y 56 que presentan una mayor distancia al ACMR, y que podrían indicar evolución viral con respecto al inóculo que causó la primoinfección, o infección con más de una variante vírica (Abrahams et al., 2009); estas secuencias están representadas en los árboles filogenéticos de cada paciente contenidas en los círculos.

En el paciente LTNP 2, las secuencias que evolucionan son la 2.1.15 y 2.1.18 y presentan una divergencia media al ACMR de 1.9%. En el paciente LTNP 3, la secuencia que evoluciona es la 3.5.59, con una distancia media al ACMR de 5.6%. En el paciente LTNP 20, las secuencias que evolucionan son la 20.1.36 y la 20.2.7, con una distancia media al ACMR de 5.8%. En el paciente LTNP 21 las secuencias evolucionadas son la 21.5.16, 21.5.3 y 21.4.57 con una divergencia al ACMR de 5.4, 4.8 y 2.8% respectivamente y por último en el LTNP 56, hemos encontrado 10 secuencias idénticas, identificadas únicamente en la muestra 56.11, que presentan una divergencia al ACMR de 2.4 % y cuya aparición podría ser el resultado de una expansión clonal.

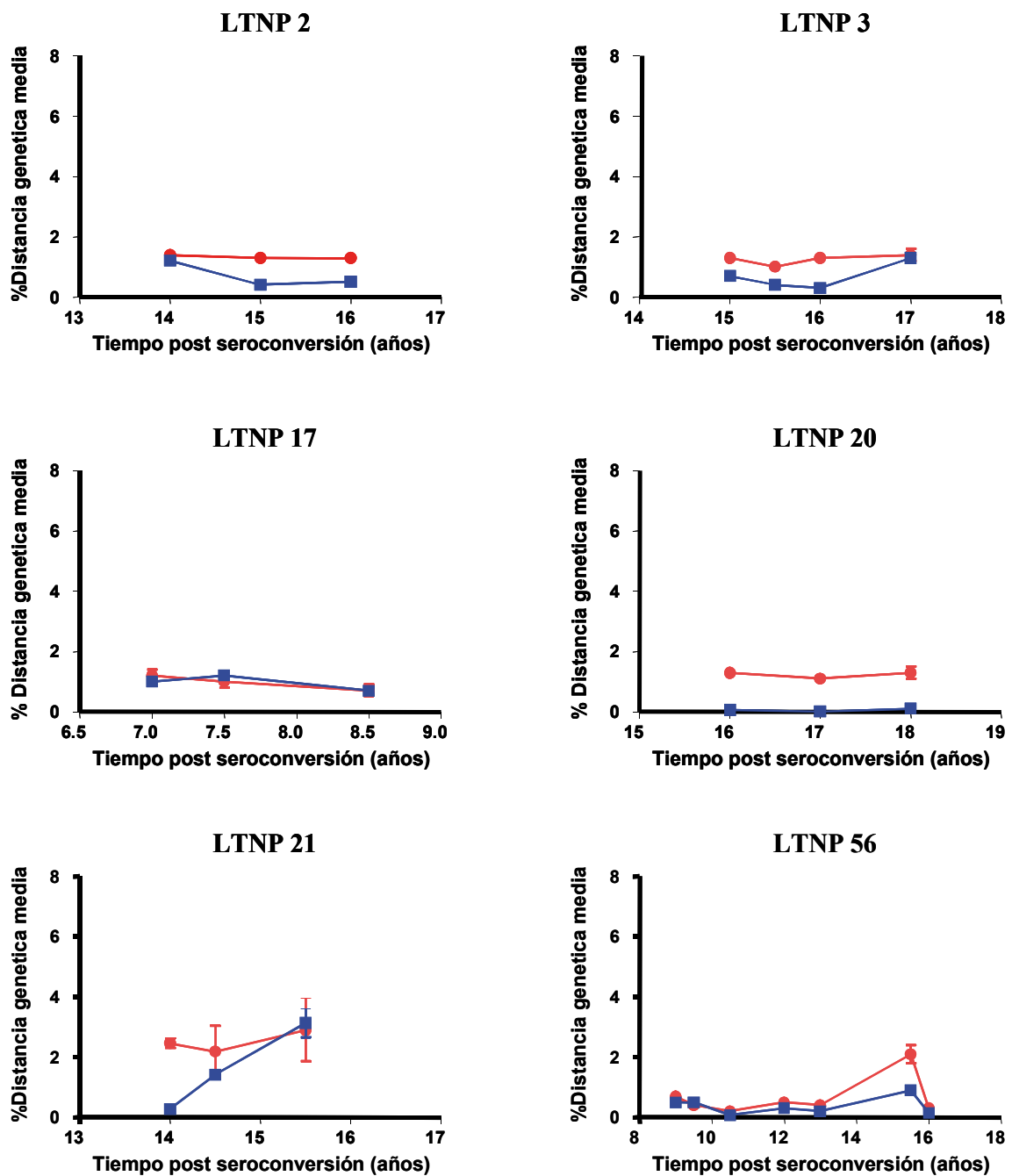
Estos pacientes presentarían un modelo de evolución viral caracterizado por la existencia de una estasis evolutiva de la cuasiespecie viral, donde el virus no acumula mutaciones a lo largo del tiempo, lo que se traduce en cuasiespecies virales muy homogéneas y con pequeñas tasas de divergencia a pesar de los largos períodos de evolución (Tabla 4.4). A pesar de todo, los valores máximos de divergencia encontrados en todos los pacientes LTNP ancestrales, están lejos de los valores que cabría esperar para virus que han estado evolucionando en periodos superiores a 10 ó 20 años.

CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS DE LOS PACIENTES LTNP ANCESTRALES

Pacientes	Muestra	Año muestra	Año Seroconversión ^a	Datación ^b	VIH-RNA copias/ml ^c	VIH DNA (copias/10 ⁶) ^d	Heterogeneidad ^e	Divergencia ^e
LTNP 1	1.2	Feb-03	<1990	1981	<50	3	3.4±0.1	2.2±0.3
	1.3	Mar-04					NA	NA
	1.4	Sep-05			112	4.6	4.8±0.2	4.1±0.4
Media						3.8	4.1	3.1
LTNP 2	2.1	Nov-01	1987	1984	53	2.75	1.2±0.1	1.4±0.07
	2.2	Oct-02		1984	<50	2.3	0.4±0.01	1.3±0.04
	2.3	Nov-03		1984	<50	3.2	0.5±0.02	1.3±0.04
Media						2.75	0.7	1.3
LTNP 3	3.2	Feb-03	1988	1982	<50	1.0	0.7±0.03	1.3±0.03
	3.3	Oct-03		1980	<50	1.61	0.4±0.05	1.0±0.04
	3.4	Abr-04		1980	<50	1.2	0.3±0.05	1.3±0.1
	3.5	Ene-05		1980	<50	4.3	1.3±0.1	1.4±0.2
Media						2.0	0.6	1.2
LTNP 5	5.1	Jun-02	1986	1980	<50	2.55	5.8±0.5	4.0±0.9
	5.2	Abr-03		1994	<50	1.0	5.3±1.0	5.5±1.0
	5.3	May-04		1991	<50	1.6	5.3±0.4	5.2±0.8
	5.4	Dic-05		1985	<50	1.6	5.7±1.0	4.1±1.0
	5.6	Oct-06		1982	<50	2.6	5.4±0.2	4.0±0.5
Media						1.87	5.5	4.5
LTNP 17	17.1	May-04	1997	1998	<50	1.3	1.0±0.05	1.2±0.2
	17.2	Nov-04		1998	<50	1.0	1.2±0.09	1.0±0.2
	17.3	Oct-05		1998	<50	0.6	0.7±0.03	0.6±0.2
Media						0.9	0.9	0.9
LTNP 20	20.1	Oct-04	1988	1983	51	75.6	0.06±0.0	1.3±0.1
	20.2	Jun-05		1983	<50	29.8	0.01±0.0	1.1±0.07
	20.3	Nov-05		1983	<50	59.6	0.1±0.0	1.3±0.20
Media						55	0.05	1.2
LTNP 21	21.2	May-05	1992	1995	<50	7.2	0.3±0.04	2.4±0.16
	21.4	Jun-06		1995	<50	12.8	1.4±0.1	2.1±0.83
	21.5	Dic-06		1995	<50	5.6	3.0±0.4	2.9±0.10
Media						8.5	1.5	2.5
LTNP 56	56.1	Jun-98	1989	1980	1343	1.2	0.5±0.08	0.7±0.1
	56.3	Feb-99		1980	<500		0.5±0.02	0.4±0.03
	56.4	Feb-00		1980	<50	2.2	0.08±0.02	0.2±0.03
	56.6	Jul-01		1980	<50		0.3±0.014	0.5±0.03
	56.7	Abr-02		1980	<50	1.3	0.2±0.03	0.4±0.03
	56.11	Nov-04		1984	<50	2.69	0.9±0.12	2.1±0.3
	56.13	Jun-05		1980	<50	1.2	0.15±0.01	0.3±0.03
Media						1.7	0.4	0.6

Tabla 4.4: Características clínicas de los pacientes LTNP ancestrales. Se presentan únicamente los datos de las muestras analizadas. a) Año de seroconversión, b) Año de datación de las secuencias virales, c) carga viral (copias/ml), d) carga de ADN asociado a CMSP (copias/ 10⁶ células), e) % Heterogeneidad media de la cuasiespecie viral, d) %Divergencia media de la cuasiespecie viral con respecto al ACMR.

**EVOLUCIÓN DE LA HETEROGENEIDAD Y DIVERGENCIA EN LOS
PACIENTES ANCESTRALES SIN EVOLUCIÓN VIRAL**



Divergencia •
Heterogeneidad ■

Fig 4.3 Evolución de la heterogeneidad y la divergencia viral (respecto al ACMR) durante el período de seguimiento de los pacientes sin evolución viral. En el eje de ordenadas se representa la distancia genética media, y en el eje de abscisas se representa el tiempo de seroconversión en años.

4.2.3.2 Pacientes con evolución viral: LTNP 1 y 5

El análisis de la heterogeneidad de la cuasiespecie viral en el paciente LTNP 1 es de 3.4% y 4.8% en las dos muestras analizadas (las muestras 1.1 y 1.3C, no se incluyeron en este análisis debido a que solo disponíamos de 2 y 1 secuencia de ADN viral respectivamente Fig 4.2.9). En el paciente LTNP 5, a pesar de presentar los valores más altos de heterogeneidad y divergencia, éstos se mantuvieron constantes durante el seguimiento entre los años 2002 a 2006. Si analizamos la heterogeneidad (Tabla 4.4 y Fig 4.4.A) de las cuasiespecies virales en conjunto (Fig 4.2.10 A), ésta va oscilando entre el 5.8% en la primera muestra analizada hasta un 5.4% en la última muestra. Por el contrario, si analizamos las dos poblaciones virales presentes en el paciente LTNP 5 individualmente, podemos observar (Tabla 4.3 A y B, Fig 4.2.10 B, y Fig 4.4.B), que en la población A tanto la heterogeneidad como la divergencia fluctúan al azar, aumentando y disminuyendo con el tiempo, típico de un modelo de evolución atemporal de las cuasiespecies virales, mientras que en la población B, los valores de heterogeneidad fluctúa entre 1-2%, mientras que los valores de divergencia se mantienen constantes a lo largo de todo el seguimiento, (Fig 4.2.10 B y 4.4.B), característico de virus que carecen de evolución viral.

A) Población A

Muestras	Heterogeneidad	Divergencia
2002	5.0±0.6	6.5±0.9
2003	2.9±0.3	8.9±0.7
2004	3.3±0.4	8.8±0.2
2005	4.6±0.0	7.2±0.6
2006	5.0±0.4	6.8±0.5
Media	4.1	7.6

B) Población B

Muestras	Heterogeneidad	Divergencia
2002	2.2±0.8	2.9±0.1
2003	0.3±0.0	2.9±0.2
2004	1.3±0.5	2.4±0.4
2005	0.0±0.0	2.7±0.0
2006	0.9±0.1	2.7±0.0
Media	0.9	2.7

Tabla 4.3 A y B: Heterogeneidad media de la cuasiespecie viral y divergencia media de la cuasiespecie viral con respecto al ACMR en las dos poblaciones descritas en el paciente LTNP 5.

Los valores de divergencia media de las cuasiespecies virales en el paciente LTNP 1, fue de 3.1% (Tabla 4.4). En este paciente se detectó un incremento en la heterogeneidad de sus cuasiespecies virales (3.4-4.8%), entre la primera y la última muestra analizadas, que fue estadísticamente significativo, utilizando el test estadístico de Bonferroni ($p < 0.0001$), que coincidió con un aumento significativo de la divergencia al ACMR (2.2-4.1%), ($p = 0.0032$).

Este aumento de divergencia es claramente inferior a la tasa de divergencia descrita para el VIH en la epidemia española, que se encuentra alrededor del 0.5% anual (Casado et al., 2000).

EVOLUCIÓN DE LA HETEROGENEIDAD Y DIVERGENCIA EN LOS PACIENTES ANCESTRALES MÁS EVOLUCIONADOS

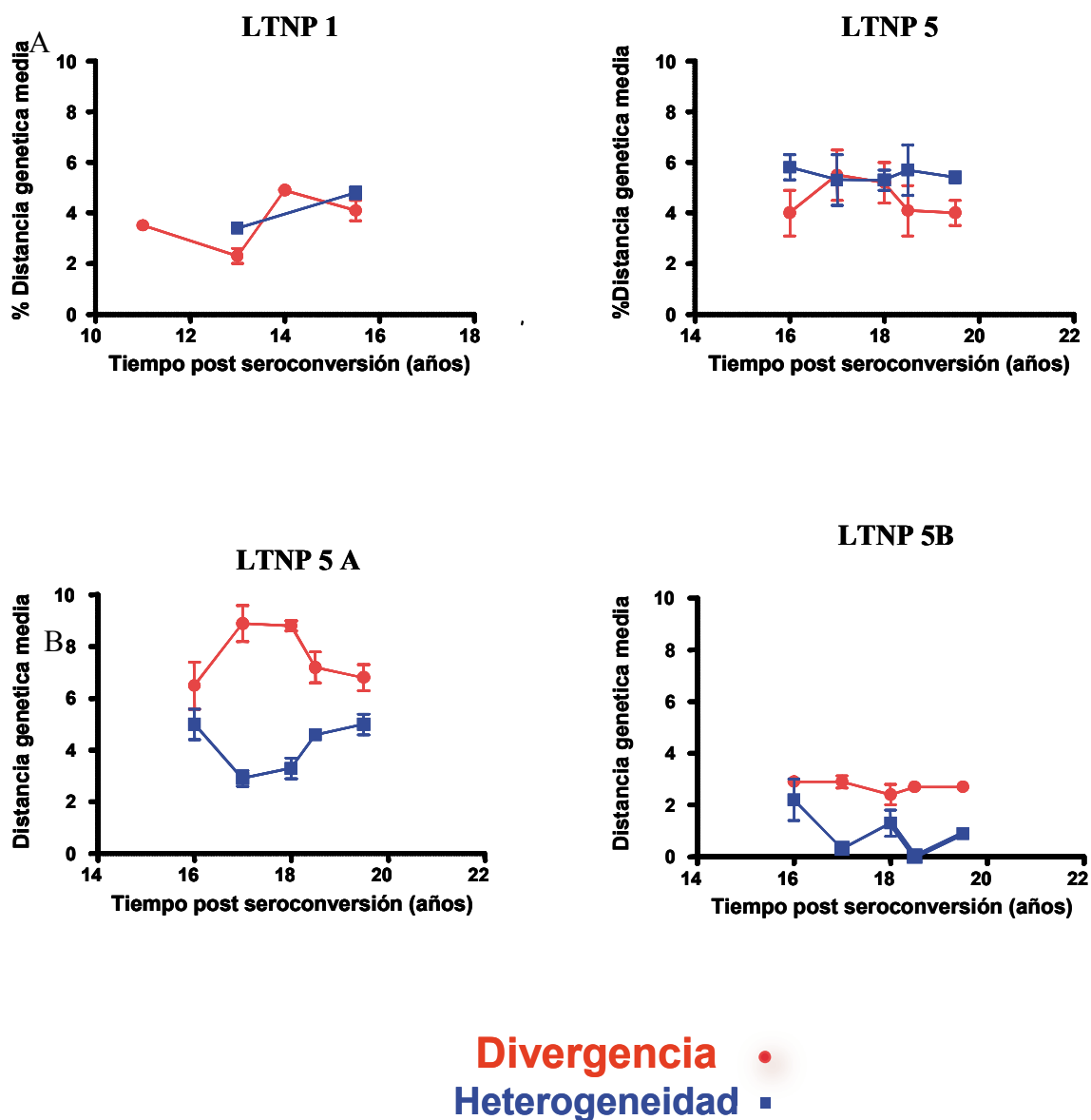


Figura 4.4 Evolución de la heterogeneidad y la divergencia viral (respecto al ACMR) durante el período de seguimiento de los pacientes que presentan “evolución” de la cuasiespecie viral. En el eje de ordenadas se representa la distancia genética media, y en el eje de abscisas se representa el tiempo de seroconversión en años. A) Evolución de la heterogeneidad y la divergencia viral de los pacientes LTNP 1 y LTNP 5. B) Evolución de la heterogeneidad y la divergencia viral de las dos poblaciones virales presentes en el paciente LTNP5 se representan como LTNP5A y LTNP5B.

4.2.4 Análisis de los valores dN y dS en las cuasiespecies virales.

Para evaluar si los distintos modelos de evolución que presentan los pacientes ancestrales reflejan también una diferencia en el tipo de mutaciones que se acumulaban en las poblaciones virales, decidimos analizar los valores medios de acumulación de mutaciones dN y dS a lo largo del tiempo (apartado 3.8.4). En cada paciente, se utilizó la secuencia reconstruida del ACMR como base para la comparación del resto de las secuencias nucleotídicas pertenecientes a un mismo individuo. El análisis de regresión lineal de los valores de dN y dS, para las cuasiespecies de cada uno de los pacientes estudiados a lo largo del seguimiento se representa en la figura 4.5. Este análisis no mostró diferencias significativas de los valores de dN y dS a lo largo del tiempo en ninguno de los pacientes analizados, con excepción del número de mutaciones dN en el paciente LTNP2, que mostró una pendiente significativamente negativa, ($p=0.0119$). De la misma manera, observamos una disminución marginalmente significativa (p valor= 0.099 , $r^2=0.9757$) en las mutaciones dN en el paciente LTNP 17.

Aunque no existe una acumulación de mutaciones dN y dS a lo largo del seguimiento con respecto al ACMR, el análisis conjunto de todas las secuencias nucleotídicas obtenidas de un mismo individuo pone de manifiesto una mayor acumulación de mutaciones dN. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.6, y podemos observar que todos los pacientes, con excepción del paciente LTNP 17, presentan un mayor número de mutaciones no sinónimas que sinónimas, y esta diferencia entre los valores de dN y dS es significativa en todos los pacientes, excepto en el paciente LTNP 1.

Estos resultados indican que la mínima divergencia observada con respecto al ACMR en estos pacientes, se debe fundamentalmente a la acumulación de mutaciones no sinónimas, y que esta acumulación se ha producido con anterioridad al inicio del estudio.

Número medio de mutaciones presentes en las cuasiespecies virales de pacientes LTNP ancestrales a lo largo del seguimiento

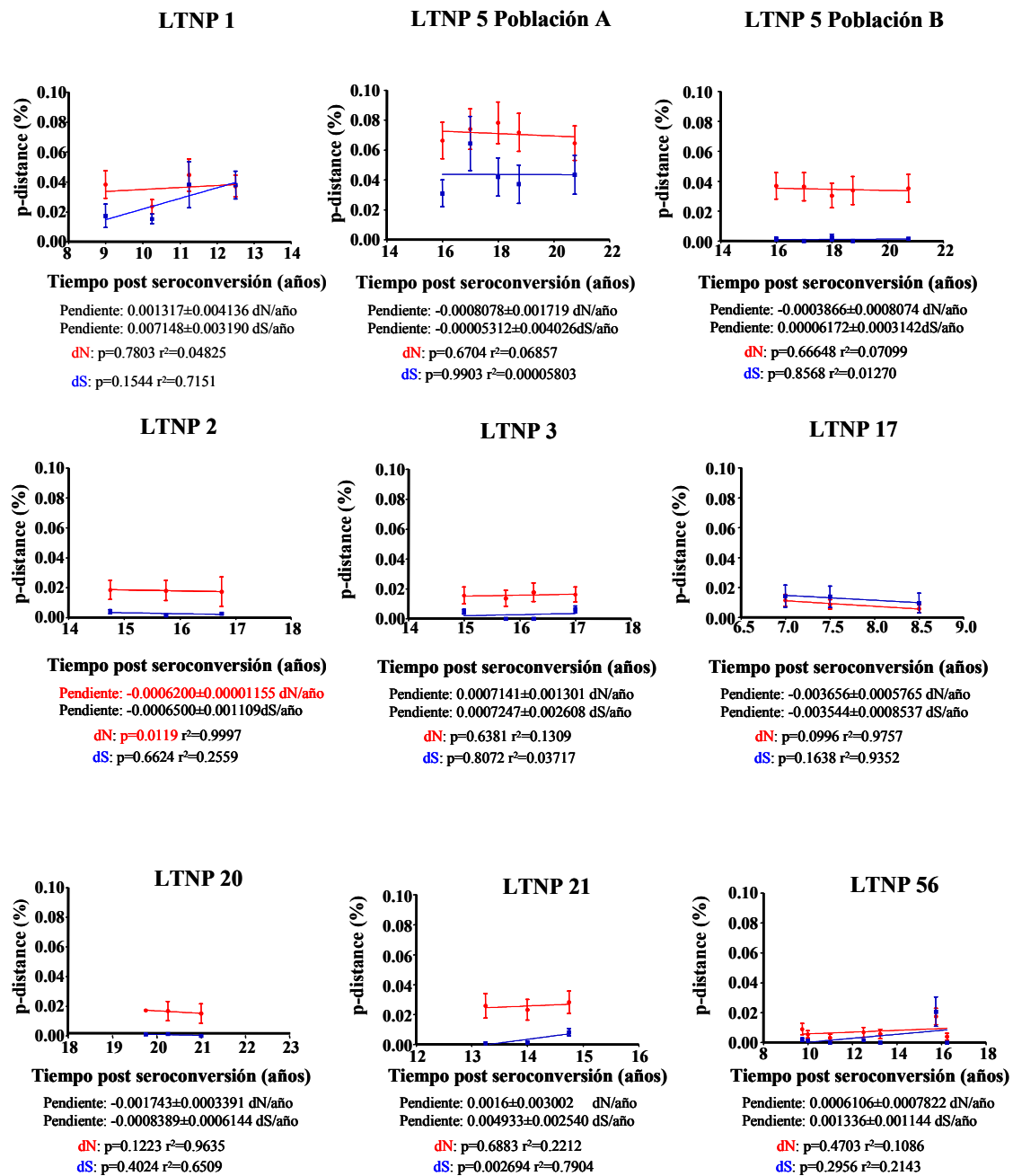


Figura 4.5. Análisis de regresión lineal del número medio de mutaciones con respecto al tiempo. Se representa el porcentaje del número de mutaciones dN (en rojo) y dS (en azul) por sitios sinónimos y no sinónimos (p-distance) a lo largo del período de seguimiento de cada paciente.

Análisis de los valores medios de mutaciones sinónimas y no sinónimas en los pacientes estudiados

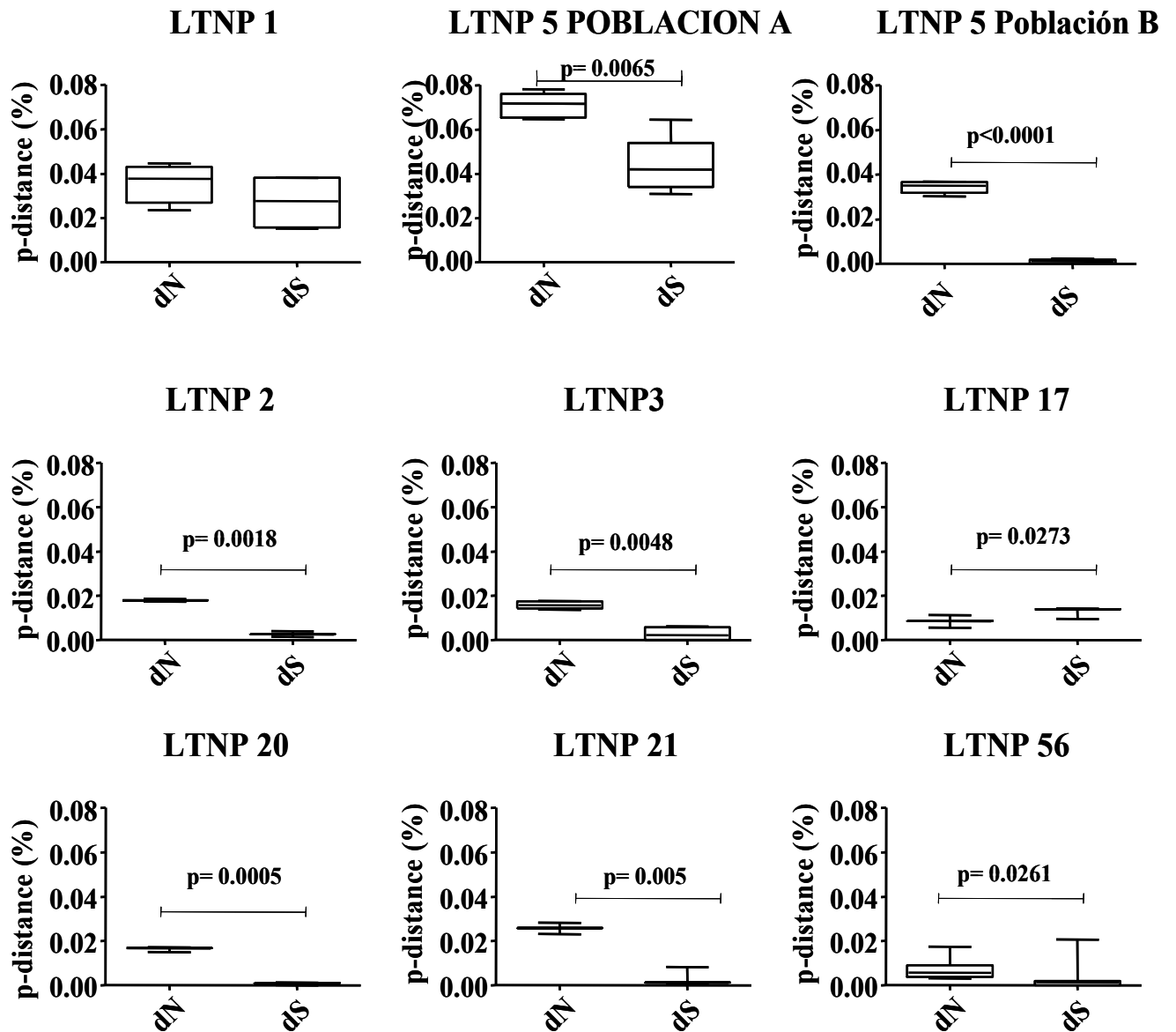


Figura 4.6 Número medio de mutaciones sinónimas y no sinónimas. Se representa el porcentaje del número de mutaciones dN y dS por sitios sinónimos y no sinónimos (p-distance) para el conjunto de las cuasiespecies de cada paciente

4.2.5 Análisis de Sitios de Glicosilación en la región C2-V5 del gen de la envuelta

Como la mayoría de los sitios de glicosilación (17-25), están concentrados en la región C2-V5 del gen de la envuelta, y debido a la importancia funcional de los glicanos en la patogénesis del VIH-1, elegimos esta región para estudiar los patrones de glicosilación presentes en los virus de los LTNP ancestrales que se presentan en esta Tesis. Analizamos los sitios de glicosilación presentes en ADN viral de los 8 pacientes LTNP ancestrales a lo largo de tiempo, usando el programa N-Glycosite (Los Alamos HIV Database). Así pudimos identificar entre 9 (LTNP 3) y 14 (LTNP 56) sitios de glicosilación en las envoltas de los virus en los distintos pacientes (Fig 4.7). Para analizar la evolución de los sitios de glicosilación a lo largo del tiempo, analizamos el número de sitios presentes en cada una de las muestras obtenidas de los pacientes LTNP ancestrales (Fig 4.7).

Como se observa en la figura 4.7, los sitios de glicosilación, se mantuvieron constantes en el tiempo en los pacientes LTNP 5, 17, 20 y 21, encontrándose pequeñas variaciones en el resto de los pacientes. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis entre las cuasiespecies de cada uno de nuestros pacientes demostró que existían diferencias significativas en el número de sitios de glicosilación en los pacientes LTNP 1, LTNP 2, LTNP 3 y LTNP 56, aunque entre la primera la y última muestra analizada los valores se mantuvieron constantes.

Evolución de los sitios de N-glicosilación a lo largo del tiempo en LTNP
ancestrales

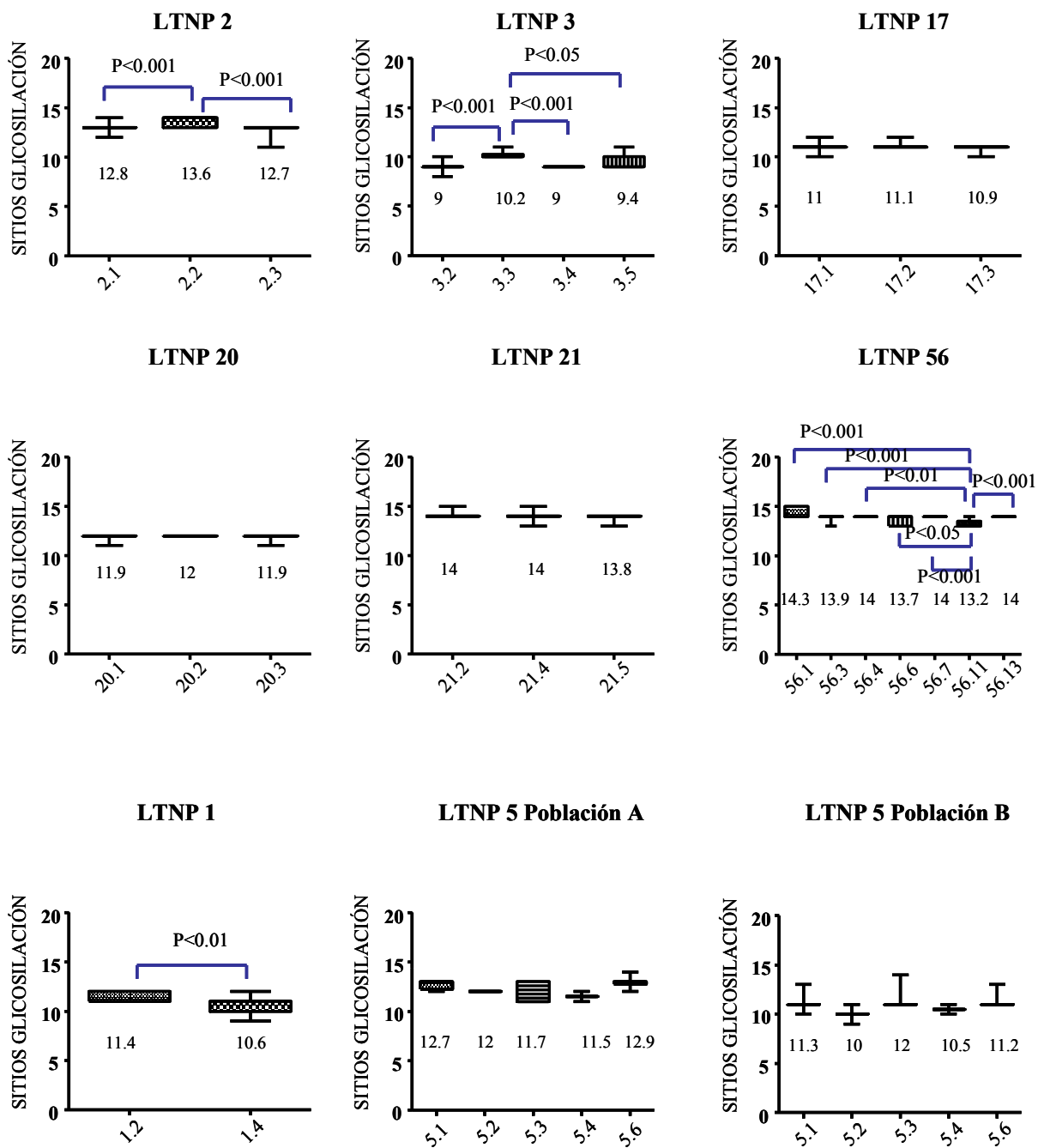


Figura 4.7 Análisis de sitios de N-Glicosilación de la región C2-V5 del gen de la envuelta en los pacientes LTNP ancestrales. Los números debajo de las cajas, representan la media de los sitios de glicosilación presentes en cada cuasiespecie.

Como el bajo número de sitios de N-glicosilación, así como la menor longitud de las envueltas se han con virus antiguos, decidimos analizar ambos factores en los virus de los pacientes LTNP ancestrales. Para analizar si los pacientes ancestrales presentaban menos sitios de glicosilación que pacientes con distinta evolución viral, incluimos en el análisis 308 secuencias de pacientes LTNP modernos, 205 secuencias de Progresores Rápidos (PR), y 456 secuencias de VIH-1 subtipo B como grupo control obtenidas de pacientes de la Base de Datos de los Álamos entre los años 1983 y 2005. Como nuestros datos no se ajustaban a una distribución normal, aplicamos el test estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis, y observamos, que existían diferencias significativas entre el grupo de LTNP ancestrales y los grupos, PR y Control, ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$ respectivamente) (Fig 4.8), y no observamos diferencias con los pacientes LTNP modernos.

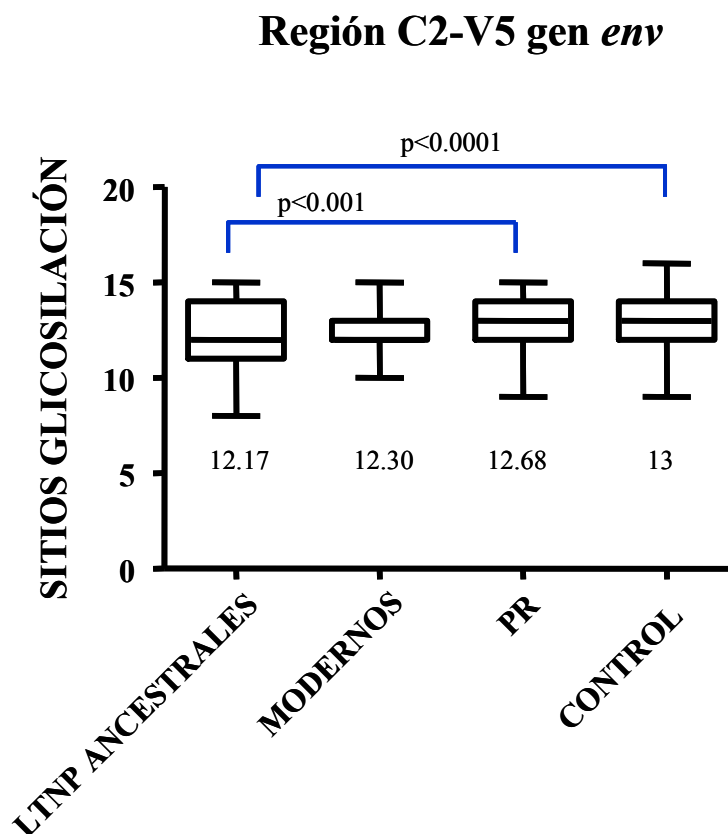


Figura 4.8: Comparación de número de sitios de glicosilación presentes en la región C2-V5 del gen *env*: se representan pacientes LTNP ancestrales, modernos, progresores rápidos (PR) y grupo control, que corresponde a secuencias de subtipo B obtenidas de la Base de Datos de los Álamos. Los números debajo de las cajas, representan la media de los sitios de glicosilación presentes en cada grupo.

Cuando analizamos la longitud del gen de la envuelta en la región C2-V5, en número de aminoácidos (Fig 4.9), de los pacientes ancestrales y un grupo control de 456 secuencias de subtipo B, obtenidas de la Base de datos de los Álamos entre los años 1983 y 2005, pudimos observar que, los pacientes ancestrales presentaban envueltas más cortas con un número medio de 180 aminoácidos frente al grupo control (183 aminoácidos). El análisis estadístico de los datos, aplicando el test no paramétrico de Mann-Withney demostró que estas diferencias eran significativas ($p < 0.0001$)

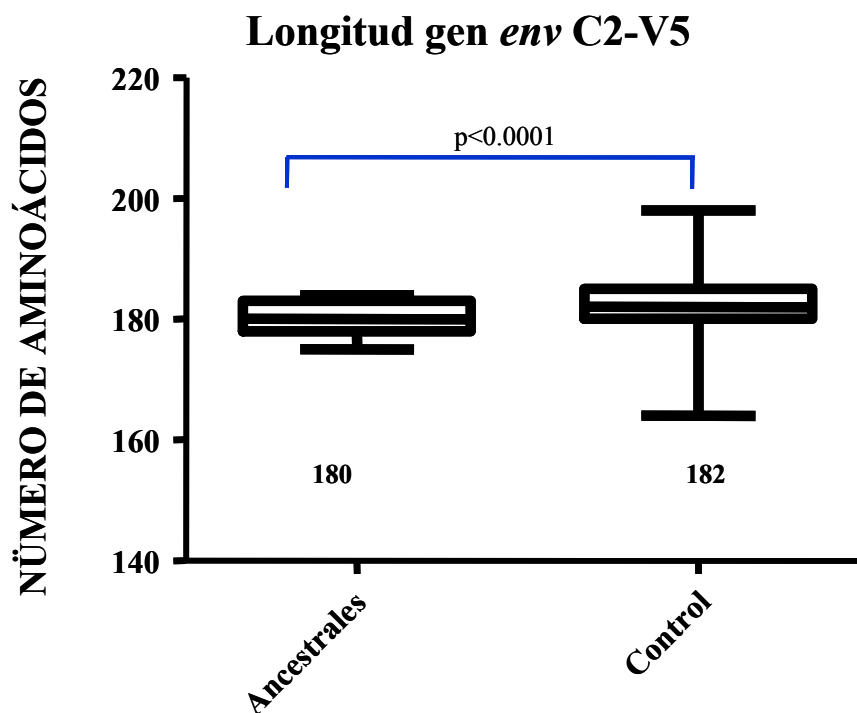


Figura 4.9: Número de aminoácidos en ADN proviral en la proteína gp120 del gen *env*. La línea horizontal representa la mediana de la longitud de la envuelta en cada uno de los grupos. Los números debajo de las cajas, representan la media de los sitios de glicosilación presentes en cada grupo.

El análisis de las características virológicas y filogenéticas de este grupo de pacientes LTNP ancestrales, demostró que es un grupo heterogéneo, donde podemos distinguir dos grupos de pacientes con distintos modelos de evolución viral: pacientes “con evolución viral limitada” LTNP 1 y 5, y pacientes “sin evolución viral” LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56. De estos análisis podemos deducir que dada la elevada tasa de mutación de la retrotranscriptasa viral, el virus acumula cambios en cada ciclo de replicación, la hipótesis más sencilla para explicar la falta de evolución característica de estos pacientes LTNP ancestrales es suponer que los virus no están replicando (LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56); o lo hacen a niveles muy bajos (LTNP 1 y 5).

Esta hipótesis se ve apoyada por la carga viral plasmática baja o indetectable a lo largo del seguimiento de nuestros pacientes, por la baja carga de ADN proviral asociado a CMSP, por los bajos valores de heterogeneidad y divergencia de las cuasiespecies virales analizadas y porque no se están acumulando mutaciones a lo largo del seguimiento. El grado de diversidad encontrada en la envuelta, la corta longitud de las envueltas virales (Derdeyn et al., 2004), los bajos niveles de glicosilación que presentan los pacientes ancestrales, y la datación ancestral de los virus, podrían sugerir que los virus de estos pacientes son muy parecidos a los virus transmitidos, y podrían estar cercanos al virus que causó la infección.

4.3 AISLAMIENTO Y CO CULTIVO DE VIRUS

Para intentar determinar los factores que estaban implicados en la falta de evolución de los virus que están infectando al grupo de pacientes ancestrales, decidimos aislar y co-cultivar los virus de estos pacientes (ver apartado 3.10.5). El co-cultivo se realizó como mínimo en dos muestras diferentes en el tiempo de cada paciente, a partir de células purificadas T CD4⁺ totales y células memoria CD4⁺45⁺RO (apartados 3.10.1 y 3.10.3). En ningún paciente fuimos capaces de obtener el virus, excepto en la muestra 3 del paciente LTNP 1 (Fig 4.2.9) a partir de las células purificadas de memoria (CD4⁺45⁺RO), con las que obtuvimos altos valores de p24, después de 21 días de co-cultivo.

El ARN viral fue extraído del sobrenadante de cultivo (ver apartado 3.3.2). El fragmento, amplificado mediante RT-PCR de la región C2-V5 del gen *env* (ver apartado 3.6), se correspondía con una de las subpoblaciones detectadas en el paciente LTNP 1. La secuencia de ARN viral está representada en el árbol filogenético del LTNP 1 (secuencia 1.3C) (Fig 4.2.9). Ya que habíamos sido capaces de obtener el virus, el siguiente paso que nos propusimos, fue intentar infectar CMSP con el sobrenadante positivo obtenido en el co-cultivo, pero no fuimos capaces de producir una nueva infección en ninguna de las réplicas realizadas.

4.4 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DEL HOSPEDADOR

Diferentes características genéticas del huésped se han asociado con distintos patrones de progresión de la enfermedad, como el genotipo $\Delta 32$ -CCR5 o algunos tipos de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA). Las quimioquinas y sus receptores celulares son, en general, moléculas polimórficas. Variaciones puntuales (SNP o single nucleotide polymorphism) en los genes que codifican para las quimioquinas y sus receptores pueden condicionar la expresión y actividad funcional de estas moléculas y tener una influencia significativa en la patogenia y progresión de la infección por el VIH.

Para determinar si la ausencia de progresión clínica detectada en los pacientes ancestrales, podría estar determinada por alguno de estos factores, analizamos los polimorfismos más frecuentes presentes en el gen CCR5 y CCR2, (*CCR5-Δ32*, haplotipo CCR5 y *CCR2-64I*), a la vez que determinamos los haplotipos HLA del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) y otros SNPs ya descritos en la literatura.

4.4.1 Análisis de SNP

Del análisis de los diferentes polimorfismos presentes en el correceptor CCR5, (tabla 4.5) podemos destacar la presencia de la delección de 32 nucleótidos, asociado al retardo en la progresión clínica (rs333, asociado al haplotipo HHG*2) en los pacientes ancestrales LTNP 2, 5 y 20. Además, los pacientes LTNP 2, 5 y 21, también presentan la mutación *CCR2-64I* (rs1799864 asociado al haplotipo CCR5 HHF*2) relacionada con un retraso en la progresión de la enfermedad, (Ioannidis et al., 2001; Stafford et al., 2000; Tang et al., 2002).

El paciente LTNP 56 presenta la mutación en el gen HCP5 (rs2395029) que está en desequilibrio de ligamiento con el haplotipo HLA B5701, el cual está también fuertemente asociado con el control de la replicación viral y progresión de la enfermedad (Limou et al., 2009) y se ha hipotetizado que puede actuar como ARN antisentido, interfiriendo así en la replicación viral.

Cabe destacar, que todos los pacientes presentan el SNP rs9264942 asociado al HLA-C. La presencia de este SNP se ha asociado fuertemente con una baja carga viral en el set point (Fellay et al., 2007). No hemos encontrado ninguna asociación en la cohorte estudiada con ZNRD1 (rs 3869068).

4.4.2 Análisis del Antígeno Leucocitario Humano (HLA)

La respuesta inmune específica del huésped, está condicionada por los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad del individuo. Estos alelos específicos de clase I (HLA), se han asociado con la progresión de la enfermedad causada por el VIH-1, lo que podría explicarse por la diferente capacidad de los distintos alelos, para presentar eficientemente epítomos virales inmunodominantes.

Los alelos B27 y B57/B58, se han asociado previamente con la protección de progresión a SIDA (Bailey et al., 2006d; Migueles et al., 2000) y se ha visto que se encuentran sobre-representados en LTNP, ES, EC y VC (Altfeld et al., 2003; Migueles et al., 2003; O'Brien, Gao, and Carrington, 2001).

En la población española la frecuencia del HLA B57 representa un 2.8% mientras que la frecuencia del HLA B27 se encontró con una frecuencia del 3.1% en (New Allele Frequency Database: <http://www.allelefreqencies.net>. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. *Tissue Antigens* 2003, 61, 403-407). Cabe destacar, que aunque la mayor asociación se ha visto con B5701/B5801, en nuestra cohorte no hay mucha representación, sólo lo presentan 2 de los 8 pacientes analizados (LTNP3 y LTNP56), mientras que el haplotipo B2705, lo presentan 4 de los 8 pacientes presentados en esta Tesis.

Es también importante destacar la presencia de los HLA-A 2402, HLA-B 5601 y HLA-B3503, representados en color rojo en la tabla 4.5, relacionados con progresión de la enfermedad en los pacientes LTNP17, LTNP2 y LTNP5 respectivamente. A pesar de la presencia de estos marcadores de progresión, todos los pacientes ancestrales analizados, presentan al menos un factor genético de protección, representados en verde en la tabla 4.5.

PACIENTES LTNP ANCESTRALES

PACIENTE	CCR2 V64I rs1799864	CCR5 del32, rs333	CCR5 haplotype		CCL3L1 (n)	HCP5 731T>G rs2395029	HLA-C rs9264942	ZNRD1 rs3869068	HLA-A1	HLA-A2	HLA-B	HLA-B
			HHC	HHG*1								
LTNP 1	11	11	HHC	HHG*1	3	11	12	11	0201	2401	1501	2705
LTNP 2	12	12	HHG*2	HHF*2	2	11	12	11	0201	1101	4402	5601
LTNP 3	11	11	HHC	HHE	3	11	22	11	0201	0205	2705	5801
LTNP 5	12	12	HHG*2	HHF*2	2	11	22	11	0201	6801	2705	3503
LTNP 17	11	11	HHC	HHE	3	11	22	11	2402	6801	2705	4402
LTNP 20	11	12	HHC	HHG*2	3	11	12	11	0201	2902	3901	4402
LTNP 21	12	11	HHC	HHG*2	1	11	12	11	0201	2902	1404	4402
LTNP 56	11	11	HHC	HHE	2	12	22	11	0101	0201	1402	5701

Tabla 4.5: Características genéticas de los pacientes LTNP ancestrales. Polimorfismos en gen CCR2 y CCR5: 11 Genotipo salvaje, 12, genotipo heterocigoto, 22 genotipo homocigoto mutado. Haplotipos en MHC I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y ZNRD1. Los colores representan el efecto protector en la progresión de la enfermedad. Verde claro efecto protector, verde oscuro, fuerte efecto protector, y rojo, sin efecto protector.

4.5 ANÁLISIS DEL GENOMA COMPLETO DEL VIH-1 EN PACIENTES LTNP ANCESTRALES.

4.5.1 Análisis de mutaciones, inserciones y deleciones

Para analizar si la ausencia de evolución viral observada en el grupo de pacientes LTNP ancestrales, después del largo período de tiempo transcurrido desde la seroconversión (18 años) y, después de analizar los distintos parámetros virológicos, inmunológicos y genéticos, podría deberse a algún defecto en el genoma viral, decidimos realizar el análisis del genoma completo de los virus presentes en estos pacientes a partir de ADN viral obtenido de las CMSP. La amplificación del genoma completo se llevó a cabo según se describe en el apartado 3.9.

El genoma completo pudo ser amplificado, secuenciado y analizado en distintas muestras a lo largo del seguimiento de los pacientes LTNP 1, 2, 3, 5 20 y 56.

4.5.1.1 Pacientes sin evolución viral: LTNP 2, 3, 20 y 56

Aunque no encontramos defectos en genes estructurales ni reguladores, la característica más importante encontrada en el ADN viral de los pacientes LTNP 2, 3, 20 y 56 fue la presencia de deleciones mayoritarias en el genoma que llegaron a ser dominantes en la cuasiespecie (Tabla 4.6). Las principales formas delecionadas se presentan en forma esquemática en la figura 4.10.

En los pacientes 2, 20 y 56, las deleciones encontradas, se localizaban en regiones no codificantes, más concretamente en el extremo 5'LTR del genoma. La muestra 2.3 del paciente LTNP 2 presentaba un 36% de genomas delecionados, con la presencia de una deleción mayoritaria de 79 nucleótidos, que representaba el 28% de la cuasiespecie, y una deleción minoritaria de 953 nucleótidos que se correspondía con el 8 % de los genomas presentes en la cuasiespecie viral.

La muestra 20.1 del paciente LTNP 20 presentaba un 79% de genomas delecionados en su cuasiespecie, con una deleción mayoritaria de 1088 nucleótidos (43% de la cuasiespecie), aunque encontramos también otras cuatro deleciones minoritarias en la misma región de 533 nucleótidos presente en un 15%, y de 967, 501 y 134 nucleótidos cada una de ellas, presentes en un 7% en la cuasiespecie viral.

Mientras que la muestra 56.12 del paciente LTNP 56, presentaba un 55% de genomas delecionados, con la presencia de una deleción mayoritaria de 228 nucleótidos, que se correspondía con un 37% de la cuasiespecie y, otra deleción minoritaria de 120 nucleótidos presente en un 18% de la población viral.

La muestra 3.5 del paciente LTNP 3, presentaba una deleción de 247 nucleótidos, localizada en el gen *pol*, desde el nucleótido 4865, correspondiente con el aminoácido 928 en la enzima integrasa, hasta el aminoácido en la posición 23 de la proteína Vif, por lo que se veía comprometida su capacidad de replicación, aunque mantenía un marco de lectura abierto que hacía posible la generación de una proteína de fusión pol-vif. El 100% de las secuencias analizadas de la muestra 3.5 obtenidas para esta región presentaban esta deleción (Fig 4.10).

Principales formas delecionadas encontradas en Pacientes LTNP ancestrales

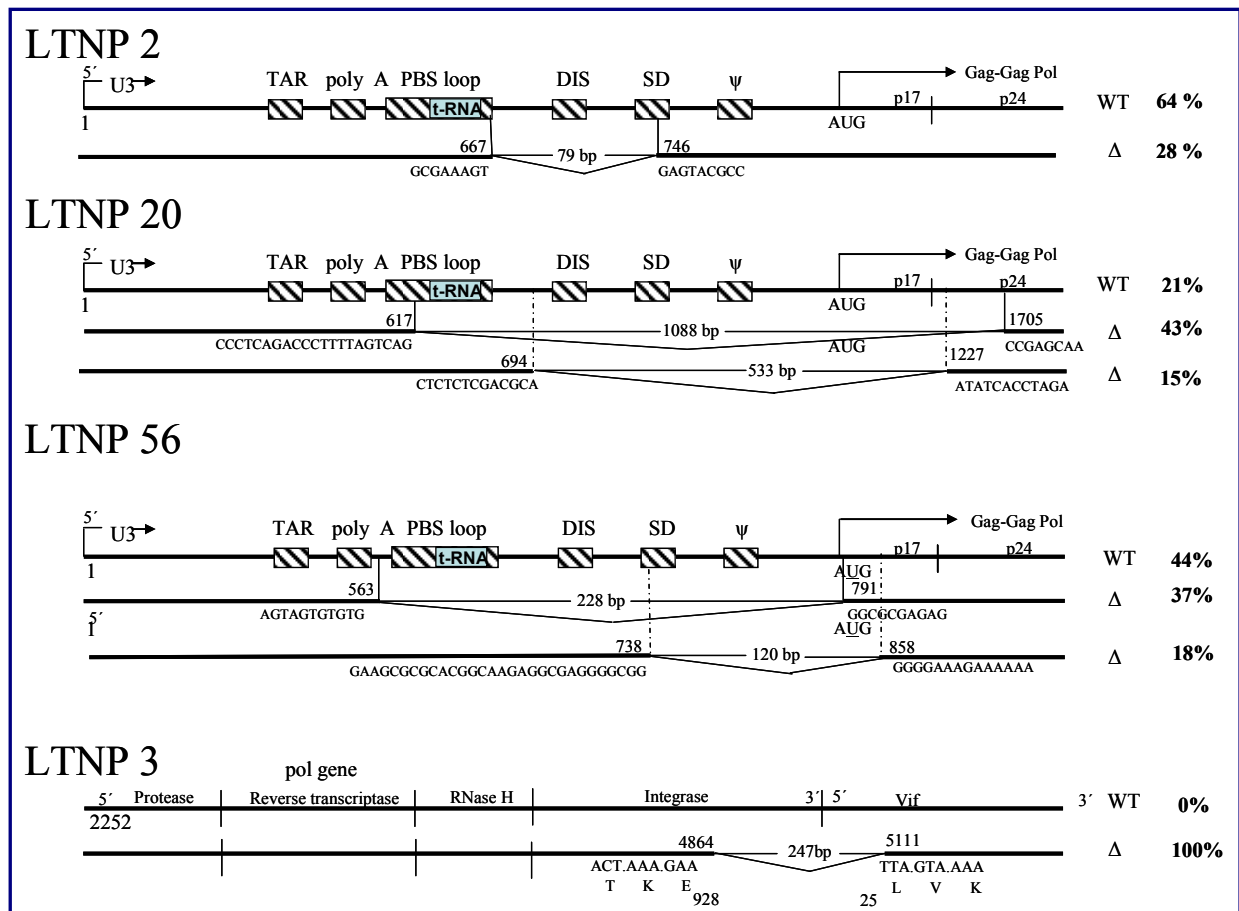


Figura 4.10 Representación esquemática de las principales formas delecionadas encontradas en los pacientes estudiados. En cada paciente se representa el virus completo (wt) y las formas delecionadas (Δ) encontradas mayoritariamente.

4.5.1.1.1 Cuantificación de las formas delecionadas a lo largo del seguimiento en pacientes sin evolución viral: LTNP 2, 3, 20 y 56.

Para evaluar la importancia de estas formas de ADN viral delecionadas, cuantificamos su presencia en la cuasiespecie viral en al menos tres muestras de cada paciente. Durante el seguimiento, las formas delecionadas fueron o llegaron a ser dominantes en la cuasiespecie de ADN de todos los pacientes. Desgraciadamente, no dispusimos de material para poder cuantificar la presencia de la deleción en las distintas muestras del paciente LTNP 2.

Como podemos observar en la tabla 4.6, en el paciente LTNP 3, la secuencia completa representaba el 100% de la cuasiespecie en la primera muestra estudiada (02/03), y llegó a ser completamente sustituida por la forma delecionada en la última muestra estudiada (01/05) donde toda la población proviral presentaba la deleción descrita anteriormente. El paciente LTNP 20 mostró durante el seguimiento una frecuencia constante entre formas completas y formas delecionadas, que se mantenía alrededor del 70% para la forma delecionada a lo largo del análisis, mientras que el paciente LTNP 56 mostró un incremento en la proporción de formas delecionadas desde un 33% en la primera muestra (04/02), hasta un 75% en la última muestra (06/05), estos resultados nos muestran la dominancia e imposición de formas de ADN delecionadas en estos pacientes ancestrales.

LTNP 3	LTNP 3.2	LTNP 3.3	LTNP 3.5
Muestra	02/03	10/03	01/05#
Genoma Completo	100% *	55%*	0%
Genoma Delecionado	0%	45%	100%
LTNP 20	LTNP 20.1	LTNP 20.2	LTNP 20.3
Muestra	10/04#	06/05	04/06
Genoma Completo	21%	23.5%	24%
Genoma Delecionado	79%	76.5%	76%
LTNP 56	LTNP 56.7	LTNP 56.12	LTNP 56.13
Muestra	04/02	11/04#	06/05
Genoma Completo	66%	44%	25%
Genoma Delecionado	33%	56%	75 %

Tabla 4.6 Cuantificación de las diferentes formas delecionadas encontradas en ADN mediante análisis por PCR en dilución límite. Análisis de la presencia de deleciones en distintas muestras de los pacientes ancestrales. * Cuantificación por análisis de bandas en gel de poliacrilamida. # Muestras en las que se analizó el genoma completo.

4.5.1.1.2 Análisis y cuantificación de genomas delecionados en pacientes LTNP modernos y progresores rápidos

Para intentar analizar si la presencia de estos genomas delecionados era una característica de nuestro grupo de pacientes LTNP ancestrales, analizamos también la región LTR-gag en otros pacientes ancestrales, (LTNP 1, 5 y AS-7), en 5 pacientes LTNP modernos (LTNP 7, 14, 16, 19 y 30) y en 4 progresores crónicos (R-8, R-20, R-32 y R-33).

Este análisis demostró la presencia de genomas delecionados en tres pacientes LTNP modernos y en un paciente progresor, aunque la presencia de estos genomas delecionados fue más alta en los virus de los pacientes ancestrales sin evolución viral (LTNP 2, 3, 20 y 56), y esta frecuencia iba disminuyendo desde el grupo de pacientes ancestrales (LTNP 1, 5 y AS7) hasta el grupo de pacientes progresores típicos (Tabla 4.7). Con excepción del paciente LTNP 3, ninguno de los pacientes ancestrales, presentó secuencias delecionadas en el fragmento pol-vif.

Pacientes		5'LTR-gag				ORF pol-vif			
		PCR+/PCR totales	Secuencia completa	Secuencias Δ		PCR+/PCR totales	Secuencia completa	Secuencias Δ	
				Nº	%			Nº	%
Ancestrales	LTNP 3	6+/12	6	0	0	5+19	0	5	100
	LTNP 2	11+/25	7	4	36	4+/14	4	0	0
	LTNP20	28+/129	6	22	78.5	5+/11	5	0	0
	LTNP56	16+/70	7	9	56	7+/23	7	0	0
	LTNP1	5+/7	4	1	20	4+/40	4	0	0
	LTNP 5	9+/34	9	0	0	3+/19	3	0	0
	AS-7	10+/25	10	0	0	4+/4	4	0	0
Modernos	LTNP 7	11+/18	10	1	9	-	-	-	-
	LTNP14	5+/16	4	1	20	-	-	-	-
	LTNP16	6+/16	6	0	0	-	-	-	-
	LTNP19	6+/16	6	0	0	-	-	-	-
	LTNP30	9+/18	8	1	11	-	-	-	-
Progresores	R-8	11+/15	9	2	18	-	-	-	-
	R-20	6+/15	6	0	0	-	-	-	-
	R-32	7+/15	7	0	0	-	-	-	-
	R-33	6+/15	6	0	0	-	-	-	-

Tabla 4.7: Cuantificación de los genomas delecionados en el fragmento LTR-gag y ORF pol-vif en los virus de distintos grupos de pacientes.

4.5.1.2 Análisis del genoma completo en pacientes con evolución viral: LTNP 1 y 5.

El análisis del genoma completo en estos dos pacientes mostró una única secuencia delecionada en la región 5'LTR del genoma viral en la muestra 1.4 del paciente LTNP1 que suponía un 20% del total de la cuasiespecie.

El análisis de la muestra 5.6 del paciente LTNP 5 demostró que éste presenta un virus completo, sin ninguna delección, ni inserción en regiones importantes para el ciclo vital del virus. Aunque es importante destacar que muchas de las secuencias obtenidas de este paciente presentaban codones de parada, posiblemente debido a un mecanismo de hipermutación.

Para comprender por qué estos dos pacientes ancestrales con cierta evolución, también controlan, aunque en menor medida, la replicación viral, decidimos analizar las mutaciones de escape a epítomos CTLs en los genes *gag*, *env* y *nef*, así como el grado de hipermutación de las secuencias nucleotídicas de los virus de estos pacientes.

4.5.1.2.1 Análisis de mutaciones en los epítomos de pacientes LTNP ancestrales con evolución viral: LTNP 1 y LTNP 5.

Los CTL eliminan células infectadas por el VIH-1 a través del reconocimiento de los epítomos presentados en la superficie de las células infectadas por las moléculas de HLA. Debido a la alta tasa de mutación, el VIH-1 es capaz de evadir la respuesta CTL a través de la generación de mutaciones en estos epítomos o cerca de ellos, cuyo resultado es una ineficiente presentación de antígenos y/o reconocimiento por los CTLs.

El análisis de las mutaciones en los epítomos mejor definidos de los pacientes LTNP 1 y 5, se realizó en los genes *gag*, *env* y *nef*. Este análisis demostró la presencia en el paciente LTNP 1 de tres mutaciones, una en la proteína P17 del gen *gag*, en el epítomo KYrLKHIVW (KW9) restringido por el HLA A24 y, dos en la proteína P24 del gen *gag* en los epítomos KRWILGhK (KK10), MMQkGNFRNQ (MQ10) restringidos por el HLA B27, que aparecen en las secuencias que presentan mayor evolución viral. Mientras que el paciente LTNP 5 presenta una mutación en la proteína P24 del gen *gag* en el epítomo PPIPVGelY (PY9), restringido por el HLA B35 (Anexo Fig 1). La aparición de estas mutaciones, podría indicar la existencia de virus que están escapando a la acción de los linfocitos T citotóxicos, y podría explicar en parte, el grado de evolución presente en estos dos pacientes. Mientras que en los genes *env* y *nef*, no apareció ninguna mutación de escape en estos dos pacientes (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology>).

4.5.1.2.2 Análisis de hipermutación en pacientes ancestrales con evolución viral: LTNP1, y LTNP5.

Para determinar la influencia de la hipermutación en el control de la replicación viral analizamos la frecuencia de genomas provirales hipermutados en los pacientes ancestrales que presentaban cierta evolución viral (Borman et al., 1995; Janini et al., 2001; Jin et al., 2005; Vartanian et al., 1991), utilizando el programa “Hypermut”, de la base de datos de los Álamos (LANL), (Gifford et al., 2008; Rose and Korber, 2000).

Las secuencias hipermutadas, están caracterizadas por la acumulación de transiciones G→A a lo largo del genoma, que conduce a la aparición de tripletes de terminación prematuros, y por lo tanto a la síntesis de proteínas no funcionales.

El análisis de hipermutación se realizó en base a la comparación con una secuencia que no presentaba codones de parada del paciente LTNP 5 y demostró la presencia de secuencias nucleotídicas altamente hipermutadas, y una distribución no homogénea a lo largo del genoma (Fig 4.11). Los cambios G→A se acumulaban mayoritariamente en los fragmentos 1 y 3 del genoma completo, correspondiente a los genes *gag*, *env*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* y *nef* (75-85%). El test estadístico F de Fisher da un p-valor altamente significativo en el fragmento 5’LTR-*gag*, y en el fragmento vif-3’LTR, para las secuencias incluidas en el análisis. Un análisis más detallado del tipo de cambios que están ocurriendo, indicó la acumulación preferencial de mutaciones G→A en el contexto GGD a AGD, (siendo D cualquier base nucleotídica excepto C), demostrando que el fenómeno de la hipermutación se está produciendo mediante el complejo enzimático APOBEC3G. Este análisis presentó un valor altamente significativo mediante el test estadístico F de Fisher de $3.79515e^{-12}$, $2.77451e^{-17}$ y $1.1988e^{-25}$ para las secuencias 5.6.1, 5.6.2 y 5.6.6 respectivamente. Mientras que el análisis de hipermutación en el contexto GAD→AAD, mostró un valor estadístico con el mismo test de 0.0705882, 0.00201854 y $2.29691e^{-05}$ para las mismas secuencias respectivamente, lo que hace improbable que el fenómeno de hipermutación se esté produciendo gracias al complejo enzimático APOBEC3F. (Hypermut 2.0). Con el mismo tipo de análisis en el paciente LTNP1 no se detectó hipermutación.

ANÁLISIS DE HIPERMUTACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL LTNP 5.6

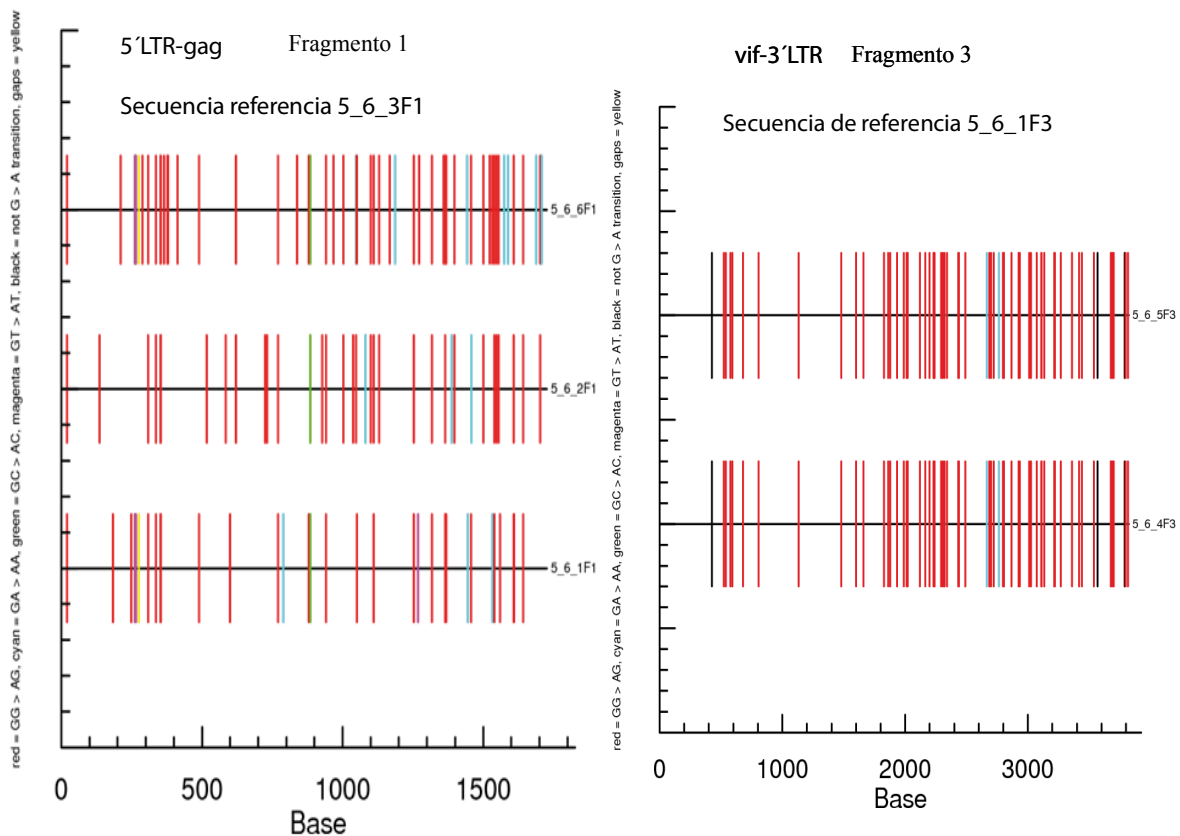


Fig 4.11: Análisis de hipermutación a lo largo del genoma del virus del paciente LTNP5.6. Este análisis se realizó mediante el programa Hypermut (Base de datos de los Álamos), para el análisis de la inducción de hipermutación inducida por APOBEC. El análisis se realizó utilizando como secuencia de referencia de cada fragmento, una secuencia no hipermutada perteneciente al paciente analizado.

(www.hiv.lanl.gov/HYPERMUT/hypermut.html)

4.5.2 Análisis de mutaciones en el genoma completo de LTNP ancestrales

Además de las principales formas delecionadas encontradas en la región LTR, y en la región integrasa-*vif*, el análisis de las secuencias de nucleótidos del genoma viral completo de los pacientes estudiados, no mostró otras deleciones ni inserciones en el genoma que pudieran dar como resultado proteínas no funcionales como se describía en otros estudios (Blankson et al., 2007; Miura et al., 2008; Wang et al., 2002b). Para intentar analizar si la acumulación de mutaciones subóptimas pudieran estar afectando la eficacia biológica de estos virus, analizamos la presencia de mutaciones comunes en estos virus con respecto a la secuencia consenso del subtipo B y que además fueran poco frecuentes en base de datos de los Álamos (LANL).

Este análisis mostró la presencia de 112 posiciones alteradas en al menos tres de los virus estudiados. De ellas seleccionamos aquellas mutaciones presentes en posiciones conservadas en al menos el 70% de las 264 secuencias aminoacídicas del subtipo B presentes en la base de datos de los Álamos (LANL), y que además la mutación observada no fuera frecuente en el mismo set de secuencias (<15%), (Alexander et al., 2001). De esta forma, las 112 mutaciones se reducen a 24 residuos en los genes codificantes y 3 posiciones en la 5'-LTR (Tabla 4.8). De las 24 mutaciones encontradas, 8 representan alteraciones aminoácidas fuertes (nivel 1-3), de acuerdo al nivel de aceptabilidad propuesto por (Feng, Johnson, and Doolittle, 1985). Entre estos cambios, hemos identificado la presencia de la mutación G123R en la región C-terminal de la proteína P17, que se encuentra localizada en el último residuo de la α -hélice, así como las mutaciones N372S/G, en la proteína P2 y H441Y en la proteína P1 del gen *gag*. Estas tres mutaciones se encuentran cercanas al sitio de procesamiento proteolítico. Las mutaciones encontradas en las proteínas P2 y P1, se han detectado también en un grupo de virus de pacientes controladores de élite (Blankson et al., 2007). Hemos detectado la presencia de la mutación N271H en el gen *gag* del paciente LTNP 1 que se ha asociado con una reducción de la infectividad, en pacientes que presentan el HLA B27 (Bailey et al., 2008).

Dados los criterios que hemos seleccionado para el análisis de las mutaciones, no hemos podido incluir otras mutaciones previamente descritas en pacientes controladores de élite en el gen *gag* (Miura et al., 2008). Entre ellas hemos detectado la mutación S67A en los pacientes LTNP 1, 2, 3, 5 y 20; y las mutaciones D102E y 389I en los virus de los LTNP 1, 2, 3, 5, 20 y 56.

GEN	POSICIÓN	CONSENSO B			PACIENTES		ACEPTABILIDAD	N° PACIENTES CON LA MUTACIÓN
		NUC	AA	%	MUTACIÓN	%		
5'LTR	68	C T T		95	A	0		6
	453			93	G/A	5/2		4/1
	541			93	C	0		3
GAG	P17 123		G	79	R	1	3	5
	P24 138		L	78	I	13	5	5
	P2 372		N	72	S/G	8/5	5/3	4/1
	P1 441		H	79	Y	6	3	6
POL	9		P	81	L	1	3	6
	55		S	76	G	5	5	6
	713		K	87	R	13	5	4
VIF	130		S	81	I	3	2	5
TAT	94		V	100	M	0	4	3
VPU	9		I	94	L	1	5	4
	58		E	80	G	1	4	3
	77		D	82	V	5	3	4
ENV	26		M	97	I	1	4	3
	211		E	93	D	2	5	4
	281		A	80	T	10	5	4
	292		V	91	I	8	5	6
	323		I	87	T	4	3	3
	329		N	75	D	4	5	3
	353		F	87	L/Y	2/9	4/5	4/1
	386		N	85	D	12	5	3
	737		G	99	D	1	4	4
756		I	80	F	12	4	5	
NEF	12		G	87	R	1	3	4
	50		A	63	T	11	5	5

Tabla 4.8: Análisis de Mutaciones infrecuentes encontradas en común en el genoma completo de los pacientes estudiados, con respecto a la secuencia consenso B obtenida de la base de datos de los Álamos (LANL).

DISCUSIÓN

El trabajo realizado en esta Tesis, ha estado encaminado al estudio de la variabilidad y evolución del virus VIH-1 en pacientes LTNP ancestrales. Con el abordaje realizado, hemos estudiado las características virológicas del VIH-1, como la variabilidad de la cuasiespecie presente en un momento dado en el individuo y su evolución a lo largo del seguimiento, así como las características, inmunológicas y genéticas del hospedador. Los estudios filogenéticos se han realizado en el gen *env*, ya que es en este gen donde se han descrito la mayor parte de las relaciones filogenéticas entre las variantes de las cuasiespecies, y además es en este gen donde se localizan importantes epítomos frente a los que se dirige la respuesta inmune del paciente e importantes propiedades fenotípicas. Además, el análisis del genoma proviral completo de estos pacientes, nos ha permitido explicar, la carencia de evolución que presentan los LTNP ancestrales después de 18 años de infección.

Los LTNPs son un grupo heterogéneo de pacientes, que presentan una gran variación en la carga viral plasmática (Bello et al., 2007b) y distintos patrones de evolución viral (Bello et al., 2007a; Casado et al., 2001). El método de datación de las poblaciones virales descrito en el apartado 4.1.1.1, nos permitió segregar los pacientes LTNP en dos grupos claramente diferentes: LTNP modernos y LTNP ancestrales. Aunque el grupo de pacientes LTNP modernos, no ha sido objeto de estudio en esta Tesis, hemos encontrado que estos pacientes LTNPs, se diferencian de los pacientes ancestrales, además de en la datación de sus secuencias nucleotídicas, en la heterogeneidad de sus cuasiespecies, y en diversos marcadores virológicos e inmunológicos.

El grupo de pacientes LTNP ancestrales, no sólo presenta una muy limitada replicación viral, a menudo una carga viral indetectable (<50 copias/ml), y una baja carga proviral (1-55 copias ADN VIH-1 /10⁶ CMSP). Además, la evolución viral que presenta este grupo de pacientes, es extremadamente baja y las poblaciones virales están cercanas a la población viral que causó la infección, como demuestra la distancia genética al ACMR en cada paciente (apartados 4.2.3.1 y 4.2.3.2). Estos datos, a su vez, están correlacionados con unos niveles muy bajos de diversos marcadores de activación del sistema inmune, como el número de células T CD8⁺, la concentración de β2- microglobulina en plasma o el título de Ac específicos frente al VIH-1.

Los mecanismos que conducen al control de la replicación viral en estos pacientes LTNP, han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años, sugiriendo que este control es alcanzado por una combinación de factores virológicos y genéticos del huésped (Deeks and Walker, 2007; Sandonis et al., 2009; Walker, 2007)

Los resultados obtenidos de los análisis realizados en los pacientes LTNP ancestrales, plantean varias preguntas:

1. ¿Es el grupo de pacientes LTNP ancestrales un grupo homogéneo?
2. ¿Qué factores están implicados en la falta de evolución detectada en estos pacientes?
3. ¿Puede ser por lo tanto la evolución viral un factor a tener en cuenta en la evolución clínica de estos pacientes?

Los estudios filogenéticos, virológicos e inmunológicos, demostraron que este grupo de pacientes ancestrales, no es un grupo homogéneo, y hemos podido identificar dos grupos de pacientes con distinta evolución viral.

- 1- Un grupo de pacientes caracterizado por una falta total de evolución viral (LTNPs 2, 3, 17, 20, 21 y 56).
- 2- Un segundo grupo de pacientes con una limitada y contenida replicación viral (LTNPs 1 y 5).

5.1 Mecanismos de control de la replicación viral en pacientes LTNP ancestrales.

a) Pacientes LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56

Los análisis filogenéticos del grupo de pacientes sin evolución viral (LTNP 2, 3, 17, 20, 21 y 56) demostraron que no existe un incremento con respecto al tiempo de la distancia genética al ACMR. Esta falta de evolución viral, después del largo periodo de tiempo transcurrido desde la seroconversión, podría estar de acuerdo con la existencia de una éstasis evolutiva de la cuasiespecie viral (Bello et al., 2007a), en la cuál el virus no acumula mutaciones a lo largo del tiempo.

Esto se refleja en cuasiespecies virales homogéneas, tal y como se demuestra en las reconstrucciones filogenéticas (Fig 4.2.3-4.2.8), en los bajos valores de heterogeneidad, próximos a 1, así como en las tasas de divergencia anual próximas a 0%.

Estos pacientes sin evolución viral, han presentado durante todo el seguimiento carga viral indetectable, con la presencia de algunos blips aislados (LTNP 56). Hemos podido observar que el número de células T CD4⁺ se ha mantenido constante durante todo el seguimiento sin pérdidas significativas y manteniéndose un cociente CD4/CD8 positivo (Andrade et al., 2008; Hunt et al., 2008; Madec et al., 2005), que podría sugerir que una respuesta celular efectiva tiene que ser crítica para mantener el control (Bailey et al., 2007), o bien que los virus que infectan a estos pacientes tienen una peor eficacia biológica.

b) Pacientes LTNP 1 y 5

Los análisis filogenéticos realizados en el grupo de pacientes que presentan una evolución limitada de las cuasiespecies virales (LTNP 1 y 5), se caracterizan por una falta de estructura temporal de las cuasiespecies, como se puede observar en las reconstrucciones filogenéticas (Fig 4.2.9-4.2.10A y B).

Estos dos pacientes se caracterizan, por presentar varias subpoblaciones virales claramente definidas por altos valores de remuestreo. En el caso del paciente LTNP5 los valores de remuestreo son los más bajos, y no hemos podido identificar si existe una superinfección. En estos pacientes, tanto la heterogeneidad como la divergencia aumentan (LTNP 1), (fig 4.4, tabla 4.4), o bien se mantienen constantes (LTNP 5A, tabla 4.3 A, fig 4.4), o fluctúan al azar con el tiempo (LTNP 5B, tabla 4.3 B, fig 4.4), (tabla 4.3 A-B, 4.4), sugiriendo que se está produciendo replicación, aunque a un nivel muy bajo.

El análisis virológico e inmunológico en los pacientes LTNP ancestrales con limitada evolución viral (LTNPs 1 y 5), demostró que aunque la carga viral se mantenía también indetectable, con presencia de algunos blips en ambos pacientes, el cociente CD4/CD8 era inferior a 1, y se estaba produciendo una pérdida significativa de células T CD4⁺ a lo largo del seguimiento (Fig 4.2.1). Esto indica un claro deterioro del sistema inmune, lo que se puede correlacionar a su vez con una peor evolución clínica. Estos datos pueden indicar, que estos pacientes podrían desarrollar eventualmente progresión de la enfermedad, como se demuestra en estudios previos (Lefrere et al., 1997; Westrop et al., 2009).

5.2 Análisis del genoma completo

5.2.1 Pacientes sin evolución viral: LTNPs 2, 3, 17, 20 21 y 56.

La secuenciación de los genomas completos a partir del ADN proviral presentes en los pacientes 2, 3, 20 y 56 demostró que estos pacientes están infectados por virus defectivos que se encuentran de forma mayoritaria y dominante en las cuasiespecies virales (56-100%), (tabla 4.7). Este análisis, demostró que los pacientes LTNP 2, 20 y 56, presentan importantes deleciones en la región 5'-LTR. Para comprobar que estas deleciones no eran un artefacto de la técnica de PCR, amplificamos la región 5'-LTR en los mismos pacientes con diferentes iniciadores y un enzima distinto, obteniendo idénticos resultados. Esta misma estrategia se utilizó para comprobar la deleción que presentaba el paciente LTNP 3 en la región integrasa del gen *pol*.

Además para comprobar que estos defectos en los genes eran característicos del grupo de pacientes LTNP ancestrales sin evolución viral, analizamos las regiones 5'-LTR e integrasa en distintos grupos de pacientes con un tiempo de infección similar, y pudimos comprobar, que el porcentaje de genomas defectivos disminuía significativamente en los grupos, a medida que aumentaba la progresión clínica (tabla 4.7).

Esto ha quedado demostrado también en otros estudios, donde se han detectado grandes deleciones y polimorfismos inusuales en diferentes genes, (Alexander et al., 2000a; Alexander et al., 2000b; Calugi et al., 2006; Deacon et al., 1995; Huang, Zhang, and Ho, 1998; Iversen et al., 1995; Kirchhoff et al., 1995; Mariani et al., 1996; Salvi et al., 1998; Sandonis et al., 2009; Wang et al., 2003; Yamada and Iwamoto, 2000), y la infección con cepas defectivas en distintos genes se ha asociado a una infección no progresiva (Alexander et al., 2002; Alexander et al., 2000b; Calugi et al., 2006; Deacon et al., 1995).

Estas formas virales defectivas pueden transcribirse, sin embargo, estarían generando virus defectivos o con baja eficiencia biológica debido a las deleciones que presentan. Estas formas virales defectivas, podrían estar contribuyendo en el control de la replicación viral de los virus completos, mediante mecanismos de interferencia previamente descritos en VIH-1 (Guan et al., 2001).

La presencia mayoritaria en la cuasiespecie viral, de estas formas deleccionadas podrían ser el resultado de la eliminación por parte del sistema inmune durante la primoinfección de células infectadas con virus competentes (Wang et al., 2002a).

La presencia de estos genomas defectivos y su contribución en la patogenia de la infección no está aclarada, sin embargo, la menor presencia de estos genomas delecionados en pacientes LTNP modernos (20%) o progresores crónicos (18%) podrían estar indicando su importancia en la patogénesis de la infección por el VIH-1.

Aunque existen evidencias de un estricto control de la replicación viral en este grupo de pacientes, la presencia de ramas minoritarias en las cuasiespecies, con una mayor distancia al ACMR (1.8-11%), detectadas en los árboles filogenéticos de los pacientes LTNP 2, 3, 20, 21 y 56, podría indicar la existencia de una replicación viral residual contenida y limitada. Estas secuencias más evolucionadas, podrían por lo tanto estar representando virus replicativos, como los obtenidos en otro estudio a partir de 4 “elite controllers”(Blankson et al., 2007), o bien virus responsables de una viremia persistente (Hatano et al., 2009). Sin embargo, tampoco podemos descartar que representen variantes minoritarias presentes ya en la cuasiespecie viral que inició la infección.

5.2.2 Pacientes con evolución viral limitada: LTNP 1 y LTNP 5

La secuenciación del genoma completo en estos pacientes, demostró que la presencia de genomas delecionados era mucha más baja (0-20%) que en el grupo anterior. Un estudio reciente, demostró la transmisión viral desde un paciente progresor que desarrolló SIDA a un paciente que llegó a ser controlador de élite (Bailey et al., 2008), y otro estudio documentó superinfección de un controlador de élite (Rachinger et al., 2008) demostrando, que mientras este paciente mantenía un relativo control de la replicación viral, otros dos pacientes infectados con el mismo aislado presentaron altas cargas virales.

Estos resultados pueden demostrar que los pacientes que controlan la replicación viral de forma espontánea pueden estar infectados con virus patogénicos, por lo que deben de existir además otros factores implicados en el control replicativo en estos pacientes LTNP ancestrales.

A diferencia de los LTNP ancestrales con estasis evolutiva, la limitada progresión viral en el paciente LTNP 5 puede ser debida a la existencia de un alto porcentaje de genomas hipermutados, como se demuestra en el análisis filogenético del gen *env*, donde aproximadamente el 60% de las secuencias presentan hipermutación G→A.

En el análisis del genoma completo, hemos podido observar que el fenómeno de la hipermutación se está produciendo principalmente en los fragmentos 1 y 3, según la estrategia de amplificación (apartado 3.9). Cabe destacar que todas las secuencias amplificadas que incluyen el gen *vif* están intactas, y por lo tanto, no podemos explicar esta masiva hipermutación que se está produciendo en el virus de este paciente, aunque las secuencias aisladas de este paciente presentan la mutación R132S en el gen *vif*, descrita por otros autores, implicada en la reducción de la infectividad viral (Hassaine et al., 2000).

El paciente LTNP 1, presenta varias mutaciones de escape en las proteínas P17 y P24 del gen *gag*, que podrían ser las responsables del bajo grado de evolución presente en este paciente, debido a la baja eficacia biológica que presentan los mutantes de escape (Martinez-Picado et al., 2006).

Podemos suponer, que la diversidad viral presente en estos dos pacientes, podría ser debida a la activación de reservorios latentes del virus, y la replicación viral estaría controlada por el sistema inmune del paciente (Grossman et al., 2006). En consecuencia, aunque los virus que surgen después de cada activación viral podrían estar sujetos a selección, la falta de una evolución viral continuada, dificultaría su imposición en la población. Además, la destrucción masiva de virus después de cada ronda de replicación así como el pequeño tamaño poblacional efectivo, sería una importante oportunidad para la actuación de la deriva genética o el azar (Frost et al., 2000).

5.3 Análisis de mutaciones en los pacientes LTNP ancestrales

El análisis de las mutaciones inusuales en residuos conservados (Tabla 4.8), en los seis pacientes analizados, no indica un claro fenotipo defectivo. Estas mutaciones no generan codones de parada, no alteran sitios catalíticos, ni producen cambios importantes en la estructura de las proteínas virales. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los estudios de (Blankson et al., 2007; Miura et al., 2008). Otros estudios demuestran que este fenotipo deletéreo podría ser causado por una combinación de mutaciones subóptimas (Alexander et al., 2001). Un estudio reciente, ha encontrado tres mutaciones estadísticamente significativas en el gen *gag*, (S67A, D102E y 389I), asociadas con controladores de la replicación viral (Miura et al., 2008). Aunque estas mutaciones no están presentes en la tabla 4.8, debido a los criterios de selección utilizados, la mutación S67A está presente en los pacientes

LTNP 1, 2, 3, 5 y 20 y las mutaciones D102E y 389I, la presentan todos los pacientes LTNP analizados.

Además, el análisis de mutaciones (tabla 4.8), demostró que los virus de los pacientes LTNP ancestrales presentan un alto número de mutaciones comunes (112). Estos resultados, junto con una fecha de infección similar (tabla 4.1.A), el mismo origen geográfico documentado, así como la misma vía de infección (UDIV), indican que los pacientes LTNP ancestrales podrían estar formando un grupo o “cluster” con un origen común, (Casado et al, manuscrito en preparación). Este origen común de los virus no ha sido hasta ahora encontrado en otros grupos de controladores de replicación viral (VIH controllers, controladores de élite o elite suppressors), (Blankson et al., 2007; Miura et al., 2008).

5.4 Factores genéticos del huésped

Uno de los primeros polimorfismos genéticos asociado a una menor susceptibilidad a la infección por VIH, fue la delección de 32 pb en el gen del correceptor CCR5. Aunque esta delección no parece estar específicamente asociada a pacientes controladores de VIH (Lambotte et al., 2005), en los análisis realizados en los pacientes LTNP ancestrales, hemos encontrado que los pacientes LTNP 2, 5 y 20 son heterocigotos para esta delección.

El control viral de la infección, se ha asociado frecuentemente con la presencia de ciertos alelos de los HLA, en particular del HLA-B (Kiepiela et al., 2004). Algunos estudios han demostrado que los HLA-B57/58 y B27, están fuertemente enriquecidos en una cohorte de controladores de la replicación viral, cuando lo comparaban con un grupo de no controladores (Bailey et al., 2006d; Lambotte et al., 2005; MIGUELES et al., 2000). Los análisis de los factores genéticos en el grupo de pacientes LTNP ancestrales, demostraron la presencia de los HLA protectivos B57/58 y HLA-B27 en 5 de los pacientes. El HLA protector B4402 y B3901, que están incluidos dentro del supertipo B27, que también confiere características protectoras, se encuentra presente en 4 de los pacientes ancestrales. Mientras que los pacientes LTNP 2, 5 y 17, presentan un HLA (B5601, B3503 y A-2402, respectivamente) marcadores de progresión de enfermedad (Tabla 4.5). Cabe destacar que la cohorte de los pacientes LTNP ancestrales presentados, está enriquecida con el HLA B27, más que en el HLA B57/58.

Pese a que se han descrito otros genes humanos que podrían estar implicados en el control de la replicación viral, estudios recientes de asociación de marcadores en genomas completos (SNPs) (Fellay et al., 2009; Fellay et al., 2007) reafirman el papel central del HLA en el control del VIH, confirmando sólo dos grupos de polimorfismos genéticos asociados con los locus HLA-B y HLA-C.

El primero de ellos está localizado en el gen HCP5 y la variante asociada presenta un alto desequilibrio de unión con el alelo HLA B5701 (presente en el paciente LTNP 56). El segundo polimorfismo identificado se localiza en la región 5' del gen HLA-C (rs9264942), y se ha asociado con los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) y proteína de HLA-C, indicando que los niveles de expresión de HLA-C influyen en el control viral. Este polimorfismo está presente en homocigosis en los pacientes LTNPs 3, 5, 17 y 56, mientras que en el resto de los pacientes se encuentra en heterocigosis y se ha asociado con bajas cargas virales (Catano et al., 2008; Fellay et al., 2007; Shrestha et al., 2009).

Mecanismos, como la actividad APOBEC3G/F se han asociado con el control de la replicación viral de virus patogénicos en pacientes controladores (Goila-Gaur and Strebel, 2008). Un estudio, demostró que todos los clones provirales del gen *gag*, amplificados desde un paciente controlador de élite, presentaban codones de parada prematuros debido al fenómeno de la hipermutación, sugiriendo así, que un fuerte mecanismo de control de la replicación viral esta actuando en estos pacientes (Wang et al., 2003).

Sin embargo, otro estudio demostró que no había diferencias significativas en la frecuencia de clones provirales hipermutados entre una cohorte de pacientes controladores de replicación viral y un grupo de pacientes con progresión de la enfermedad que recibían TARGA (Gandhi et al., 2008), lo que puede sugerir, que el alto grado de actividad APOBEC3 no bloquea de manera absoluta la replicación viral, y por lo tanto, el aumento de actividad APOBEC3 no parece ser el mecanismo responsable del control de replicación viral en el grupo de pacientes controladores de replicación. En la cohorte de pacientes LTNP ancestrales analizados, aunque hemos encontrado alguna secuencia hipermutada en todos los pacientes, cabe destacar el caso del paciente LTNP5, en el que un alto porcentaje de secuencias están hipermutadas pese a que no hemos encontrado ningún defecto en el gen *vif*.

5.5 Nomenclatura en pacientes LTNP ancestrales

Este grupo de pacientes LTNP ancestrales, que son capaces de controlar la replicación viral de forma espontánea y que mantienen consistentemente cargas virales indetectable, son equivalentes a los pacientes controladores de élite (en inglés EC), supresores de élite (en inglés ES), y en general al grupo de controladores de VIH, (Bailey et al., 2006a; Deeks and Walker, 2007; Lambotte et al., 2005; Saez-Cirion et al., 2007b).

Los criterios fundamentales utilizados para definir estos pacientes, han sido los niveles de viremia y la duración del control de la viremia. Aunque existen diferencias fundamentalmente en cuanto a la duración del periodo considerado por los distintos grupos (Bailey et al., 2006a; Bailey et al., 2006c; Hunt, 2009; Lambotte et al., 2005; Pereyra et al., 2009), en la mayoría de los casos este periodo supera los diez años. El tiempo post-seroconversión de los pacientes LTNP ancestrales analizados en este trabajo, varía entre los 13-24 años, y por lo tanto formarían parte de un grupo especial de individuos que cumplen los dos criterios de control de la replicación viral. Estos pacientes presentan carga viral indetectable en la mayoría de las muestras y ausencia de progresión de la enfermedad en ausencia de tratamiento antirretroviral durante un periodo superior a 10 años.

En resumen, la ausencia de carga viral plasmática, los bajos niveles de ADN proviral y la baja diversidad genética observada en los virus obtenidos de estos pacientes ancestrales, han sugerido la infección por virus de baja eficacia biológica (Lambotte et al., 2005; Sandonis et al., 2009; Wang et al., 2003). Todos los datos obtenidos indican que el control de la replicación observada en todos los pacientes analizados se alcanza mediante una combinación de distintos factores, tanto inmunológicos como del huésped y/o por la infección con virus con poca capacidad replicativa (Deeks and Walker, 2007; Sandonis et al., 2009).

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos estudiado una serie de propiedades que caracterizan a los pacientes infectados por el VIH-1 no progresores (LTNPs) y con características ancestrales. De los análisis realizados podemos concluir:

- 1- El grupo de pacientes LTNPs ancestrales es un grupo heterogéneo de pacientes donde hemos podido diferenciar dos grupos:
 - a. un grupo de pacientes que no presentan evolución viral, en los que la falta de evolución se correlaciona con el mantenimiento de un buen estadio clínico a lo largo del seguimiento.
 - b. un segundo grupo de pacientes que se caracteriza por la presencia de una evolución viral limitada que se corresponde con un deterioro clínico y que está causado principalmente por la pérdida de células T CD4⁺ a lo largo del seguimiento.

A pesar de estas diferencias, los pacientes LTNP ancestrales presentan las siguientes características comunes.

- 2- La acumulación de genomas provirales defectivos, por deleciones y/o por hipermutación contribuye a la falta de evolución viral.
- 3- Aunque no existe un factor genético común asociado a estos pacientes ancestrales, todos y cada uno de los individuos presenta uno o más factores genéticos que previamente han sido asociados a un mejor pronóstico en cuanto a la evolución de la enfermedad.
- 4- La nula o limitada evolución que caracteriza a los virus encontrados en pacientes LTNP ancestrales, está determinada por una combinación de factores virológicos y genéticos del huésped. Esto indicaría que no existe un único mecanismo que pueda explicar el control de la replicación viral.
- 5- La presencia de mutaciones comunes, junto con la fecha de infección, el origen geográfico de los pacientes y el hecho de que todos ellos hayan sido o sean UDIV, sugiere un mismo origen para los virus que infectaron a estos pacientes LTNPs ancestrales.

- 6- El estudio de la evolución viral dentro de este grupo de individuos y en general en pacientes con diferente progresión viral, puede ser un marcador importante de la evolución clínica de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams, M. R., Anderson, J. A., Giorgi, E. E., Seoighe, C., Mlisana, K., Ping, L. H., Athreya, G. S., Treurnicht, F. K., Keele, B. F., Wood, N., Salazar-Gonzalez, J. F., Bhattacharya, T., Chu, H., Hoffman, I., Galvin, S., Mapanje, C., Kazembe, P., Thebus, R., Fiscus, S., Hide, W., Cohen, M. S., Karim, S. A., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Hahn, B. H., Korber, B. T., Swanstrom, R., Williamson, C., and for the, C. A. I. S. T. a. t. C. f. H. I. V. A. V. I. C. (2009). Quantitating the Multiplicity of Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Reveals a Non-Poisson Distribution of Transmitted Variants, Vol. 83, pp. 3556-3567.
- Addo, M. M., Yu, X. G., Rathod, A., Cohen, D., Eldridge, R. L., Strick, D., Johnston, M. N., Corcoran, C., Wurcel, A. G., Fitzpatrick, C. A., Feeney, M. E., Rodriguez, W. R., Basgoz, N., Draenert, R., Stone, D. R., Brander, C., Goulder, P. J., Rosenberg, E. S., Altfeld, M., and Walker, B. D. (2003). Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* **77**(3), 2081-92.
- Alexander, L., Aquino-DeJesus, M. J., Chan, M., and Andiman, W. A. (2002). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a two-amino-acid insertion in HIV-1 Vif from a nonprogressing mother and child. *J Virol* **76**(20), 10533-9.
- Alexander, L., Denekamp, L., Czajak, S., and Desrosiers, R. C. (2001). Suboptimal nucleotides in the infectious, pathogenic simian immunodeficiency virus clone SIVmac239. *J Virol* **75**(8), 4019-22.
- Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T. C., Gaddis, N. C., Auerbach, M. R., Malim, M. H., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (2000a). Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* **74**(9), 4361-76.
- Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T. C., Gaddis, N. C., Auerbach, M. R., Malim, M. H., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (2000b). Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* **74**(9), 4361-76.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**(5270), 1955-8.
- Altfeld, M., Addo, M. M., Rosenberg, E. S., Hecht, F. M., Lee, P. K., Vogel, M., Yu, X. G., Draenert, R., Johnston, M. N., Strick, D., Allen, T. M., Feeney, M. E., Kahn, J. O., Sekaly, R. P., Levy, J. A., Rockstroh, J. K., Goulder, P. J., and Walker, B. D. (2003). Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *Aids* **17**(18), 2581-91.
- Allen, T. M., O'Connor, D. H., Jing, P., Dzuris, J. L., Mothe, B. R., Vogel, T. U., Dunphy, E., Liebl, M. E., Emerson, C., Wilson, N., Kunstman, K. J., Wang, X., Allison, D. B., Hughes, A. L., Desrosiers, R. C., Altman, J. D., Wolinsky, S. M., Sette, A., and Watkins, D. I. (2000). Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* **407**(6802), 386-90.
- Andrade, A., Bailey, J. R., Xu, J., Philp, F. H., Quinn, T. C., Williams, T. M., Ray, S. C., Thomas, D. L., and Blankson, J. N. (2008). CD4+ T cell depletion in an untreated HIV type 1-infected human leukocyte antigen-B*5801-positive patient with an undetectable viral load. *Clin Infect Dis* **46**(8), e78-82.
- Bacchetti, P., and Moss, A. R. (1989). Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature* **338**(6212), 251-3.
- Bailey, J. R., Lassen, K. G., Yang, H.-C., Quinn, T. C., Ray, S. C., Blankson, J. N., and Siliciano, R. F. (2006a). Neutralizing Antibodies Do Not Mediate Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Elite Suppressors or Selection of Plasma Virus Variants in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *J. Virol.* **80**(10), 4758-4770.
- Bailey, J. R., Lassen, K. G., Yang, H. C., Quinn, T. C., Ray, S. C., Blankson, J. N., and Siliciano, R. F. (2006b). Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **80**(10), 4758-70.
- Bailey, J. R., O'Connell, K., Yang, H.-C., Han, Y., Xu, J., Jilek, B., Williams, T. M., Ray, S. C., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2008). Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Patient Who Developed AIDS to an Elite Suppressor, Vol. 82, pp. 7395-7410.
- Bailey, J. R., Sedaghat, A. R., Kieffer, T., Brennan, T., Lee, P. K., Wind-Rotolo, M., Haggerty, C. M., Kamireddi, A. R., Liu, Y., Lee, J., Persaud, D., Gallant, J. E., Cofrancesco, J., Jr., Quinn, T. C., Wilke, C. O., Ray, S. C., Siliciano, J. D., Nettles, R. E., and Siliciano, R. F. (2006c). Residual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia in Some Patients on Antiretroviral Therapy Is Dominated by a Small Number of Invariant Clones Rarely Found in Circulating CD4+ T Cells. *J. Virol.* **80**(13), 6441-6457.

- Bailey, J. R., Williams, T. M., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2006d). Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* **203**(5), 1357-69.
- Bailey, J. R., Zhang, H., Wegweiser, B. W., Yang, H. C., Herrera, L., Ahonkhai, A., Williams, T. M., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2007). Evolution of HIV-1 in an HLA-B*57-positive patient during virologic escape. *J Infect Dis* **196**(1), 50-5.
- Baker, B. M., Block, B. L., Rothchild, A. C., and Walker, B. D. (2009). Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther* **9**(1), 55-69.
- Balfe, P., Simmonds, P., Ludlam, C. A., Bishop, J. O., and Brown, A. J. L. (1990). Concurrent Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Patients Infected from the Same Source: Rate of Sequence Change and Low Frequency of Inactivating Mutations. *Journal of Virology* **64**, 6221-6233.
- Barker, E., Mackewicz, C. E., Reyes-Teran, G., Sato, A., Stranford, S. A., Fujimura, S. H., Christopherson, C., Chang, S. Y., and Levy, J. A. (1998). Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **92**(9), 3105-14.
- Bello, G., Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J., Carvajal-Rodriguez, A., Posada, D., and Lopez-Galindez, C. (2007a). Lack of temporal structure in the short term HIV-1 evolution within asymptomatic naive patients. *Virology* **362**, 294-303.
- Bello, G., Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., and Lopez-Galindez, C. (2004). Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *J Gen Virol* **85**(Pt 2), 399-407.
- Bello, G., Casado, C., Sandonis, V., Alonso-Nieto, M., Vicario, J. L., Garcia, S., Hernando, V., Rodriguez, C., Romero, J. d., and Lopez-Galindez, C. (2005). A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *J Gen Virol* **86**(2), 355-364.
- Bello, G., Casado, C., Sandonis, V., Alvaro-Cifuentes, T., Dos Santos, C. A., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J., Pilotto, J. H., Grinsztejn, B., Veloso, V. G., Morgado, M. G., and Lopez-Galindez, C. (2007b). Plasma viral load threshold for sustaining intrahost HIV type 1 evolution. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**(10), 1242-50.
- Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M., and Malim, M. H. (2004). APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* **305**(5684), 645.
- Blankson, J. N., Bailey, J. R., Thayil, S., Yang, H. C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S. K., Siliciano, J. D., Williams, T. M., and Siliciano, R. F. (2007). Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* **81**(5), 2508-18.
- Bonhoeffer, S., Holmes, E. C., and Nowak, M. A. (1995). Causes of HIV diversity [letter]. *Nature* **376**(6536), 125.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., and Van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28** (3), 495-503.
- Borman, A. M., Quillent, C., Charneau, P., Dauguet, C., and Clavel, F. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol* **69**(4), 2058-67.
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B. A., and Shaw, G. M. (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nature Medicine* **3**, 205-211.
- Buchbinder, S. P., Katz, M. H., Hessol, N. A., O'Malley, P. M., and Holmberg, S. D. (1994). Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* **8**(8), 1123-8.
- Bukrinsky, M. I., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., and Stevenson, M. (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *SCIENCE* **254**, 423-427.
- Butler, I. F., Pandrea, I., Marx, P. A., and Apetrei, C. (2007). HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr HIV Res* **5**(1), 23-45.
- Butto, S., Argentini, C., Mazzella, A. M., Iannotti, M. P., Leone, P., Leone, P., Nicolosi, A., and Rezza, G. (1997). Dual infection with different strains of the same HIV-1 subtype. *Aids* **11**(5), 694-6.
- Calugi, G., Montella, F., Favalli, C., and Benedetto, A. (2006). Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env. *J Virol* **80**(23), 11892-6.

- Canducci, F., Marinozzi, M. C., Sampaolo, M., Berre, S., Bagnarelli, P., Degano, M., Gallotta, G., Mazzi, B., Lemey, P., Burioni, R., and Clementi, M. (2009). Dynamic features of the selective pressure on the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 CD4-binding site in a group of long term non progressor (LTNP) subjects. *Retrovirology* **6**, 4.
- Carrington, M., Dean, M., Martin, M. P., and O'Brien, S. J. (1999a). Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences. *Hum Mol Genet* **8**(10), 1939-45.
- Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S. J. (1999b). HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage [see comments]. *Science* **283**(5408), 1748-52.
- Casado, C., Colombo, S., Rauch, A., Martinez, R., Gunthard, H. F., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J., Telenti, A., and Lopez-Galindez, C. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* **5**(6), e11079.
- Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., Bello, G., and Lopez-Galindez, C. (2001). Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Gen Virol.* **82**(Pt 10), 2495-508.
- Casado, C., Pernas, M., Alvaro, T., Sandonis, V., Garcia, S., Rodriguez, C., Romero, J. D., Grau, E., Ruiz, L., and Lopez-Galindez, C. (2007). Coinfection and Superinfection in Patients with Long-Term, Nonprogressive HIV-1 Disease. *J Infect Dis* **196**(6), 895-9.
- Casado, C., Urtasun, I., Martin-Walther, M. V., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., and Lopez-Galindez, C. (2000). Genetic analysis of HIV-1 samples from Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**(1), 68-74.
- Catano, G., Kulkarni, H., He, W., Marconi, V. C., Agan, B. K., Landrum, M., Anderson, S., Delmar, J., Telles, V., Song, L., Castiblanco, J., Clark, R. A., Dolan, M. J., and Ahuja, S. K. (2008). HIV-1 disease-influencing effects associated with ZNRD1, HCP5 and HLA-C alleles are attributable mainly to either HLA-A10 or HLA-B*57 alleles. *PLoS One* **3**(11), e3636.
- Craig, J. K., Patterson, B. K., Paranjpe, S., Kulka, K., Ding, M., Mellors, J., Montelaro, R. C., and Gupta, P. (2004). Persistent HIV type 1 infection in semen and blood compartments in patients after long-term potent antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(11), 1196-209.
- Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T. C., Kuo, Y. H., Brookmeyer, R., Zeiger, M. A., Barditch-Crovo, P., and Siliciano, R. F. (1997a). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188.
- Chun, T. W., Engel, D., Mizell, S. B., Ehler, L. A., and Fauci, A. S. (1998). Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med* **188**(1), 83-91.
- Chun, T. W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., and Siliciano, R. F. (1995). In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med* **1**(12), 1284-90.
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A. M., Baseler, M., Lloyd, A. L., Nowak, M. A., and Fauci, A. S. (1997b). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13193-13197.
- David, S. A., Smith, M. S., Lopez, G. J., Adany, I., Mukherjee, S., Buch, S., Goodenow, M. M., and Narayan, O. (2001). Selective transmission of R5-tropic HIV type 1 from dendritic cells to resting CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**(1), 59-68.
- Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V. A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Leramont, J., Sullivan, J. S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., and Mills, J. (1995). Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients. *Science* **270**, 988-991.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R., Study, H. G. a. D., Study, M. A. C., Study, M. H. C., Cohort, S. F. C., Study, A., and St.J, O. B. (1996). Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the CKR5 Structural Gene. *Science* **273**, 1856-1862.
- Deeks, S. G., and Walker, B. D. (2007). Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity* **27**(3), 406-416.
- Delassus, S., Cheyner, R., and Wain-Hobson, S. (1991). Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef and Long Terminal Repeat Sequences Over 4 Years in vivo and in vitro. *J. Virol.* **65**, 225-231.
- Delassus, S., Cheyner, R., and Wain-Hobson, S. (1992). Nonhomogeneous distribution of Human immunodeficiency virus type 1 proviruses in the spleen. *J Virol* **66**, 5642-5.

- Derdeyn, C. A., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Mokili, J. L., Muldoon, M., Denham, S. A., Heil, M. L., Kasolo, F., Musonda, R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Korber, B. T., Allen, S., and Hunter, E. (2004). Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* **303**(5666), 2019-22.
- Dinoso, J. B., Kim, S. Y., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2008). A comparison of viral loads between HIV-1-infected elite suppressors and individuals who receive suppressive highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **47**(1), 102-4.
- Domingo, E. (1997). RNA Virus Evolution, Population Dynamics, and Nutritional Status. *Biological Trace Element Research* **56**, 23-30.
- Domingo, E., Escarm's, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S. F., Quer, J., Novella, I. S., and Holland, J. J. (1996). Basic concepts in RNA virus evolution. *The FASEB Journal* **10**, 859-863.
- Draenert, R., Le Gall, S., Pfafferoth, K. J., Leslie, A. J., Chetty, P., Brander, C., Holmes, E. C., Chang, S. C., Feeney, M. E., Addo, M. M., Ruiz, L., Ramduth, D., Jeena, P., Altfeld, M., Thomas, S., Tang, Y., Verrill, C. L., Dixon, C., Prado, J. G., Kiepiela, P., Martinez-Picado, J., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004). Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med* **199**(7), 905-15.
- Dyer, W. B., Zaunders, J. J., Yuan, F. F., Wang, B., Learmont, J. C., Geczy, A. F., Saksena, N. K., McPhee, D. A., Gorry, P. R., and Sullivan, J. S. (2008). Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* **5**, 112.
- Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* **58**(10), 465-523.
- Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* **362**, 359-362.
- Emu, B., Sinclair, E., Favre, D., Moretto, W. J., Hsue, P., Hoh, R., Martin, J. N., Nixon, D. F., McCune, J. M., and Deeks, S. G. (2005). Phenotypic, Functional, and Kinetic Parameters Associated with Apparent T-Cell Control of Human Immunodeficiency Virus Replication in Individuals with and without Antiretroviral Treatment. *J. Virol.* **79**(22), 14169-14178.
- Emu, B., Sinclair, E., Hatano, H., Ferre, A., Shacklett, B., Martin, J. N., McCune, J. M., and Deeks, S. G. (2008). HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *J Virol* **82**(11), 5398-407.
- Fang, G., Weiser, B., Kuiken, C., Philpott, S. M., Rowland-Jones, S., Plummer, F., Kimani, J., Shi, B., Kaul, R., Bwayo, J., Anzala, O., and Burger, H. (2004). Recombination following superinfection by HIV-1. *Aids* **18**(2), 153-9.
- Fellay, J., Ge, D., Shianna, K. V., Colombo, S., Ledergerber, B., Cirulli, E. T., Urban, T. J., Zhang, K., Gumbs, C. E., Smith, J. P., Castagna, A., Cozzi-Lepri, A., De Luca, A., Easterbrook, P., Gunthard, H. F., Mallal, S., Mussini, C., Dalmau, J., Martinez-Picado, J., Miro, J. M., Obel, N., Wolinsky, S. M., Martinson, J. J., Detels, R., Margolick, J. B., Jacobson, L. P., Descombes, P., Antonarakis, S. E., Beckmann, J. S., O'Brien, S. J., Letvin, N. L., McMichael, A. J., Haynes, B. F., Carrington, M., Feng, S., Telenti, A., and Goldstein, D. B. (2009). Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet* **5**(12), e1000791.
- Fellay, J., Shianna, K. V., Ge, D., Colombo, S., Ledergerber, B., Weale, M., Zhang, K., Gumbs, C., Castagna, A., Cossarizza, A., Cozzi-Lepri, A., De Luca, A., Easterbrook, P., Francioli, P., Mallal, S., Martinez-Picado, J., Miro, J. M., Obel, N., Smith, J. P., Wyniger, J., Descombes, P., Antonarakis, S. E., Letvin, N. L., McMichael, A. J., Haynes, B. F., Telenti, A., and Goldstein, D. B. (2007). A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. In "Science", Vol. 317, pp. 944-947.
- Feng, D. F., Johnson, M. S., and Doolittle, R. F. (1985). Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *J Mol Evol* **21**(2), 112-25.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science* **272**, 872-877.
- Finzi, D., Blankson, J., Siciliano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisiewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T. C., Chaison, R. E., Rosenberg, e., Walker, B., Gange, S., Gallant, J., and Siciliano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Med* **5**(5), 512-517.

- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D. D., Richman, D. D., and Siciliano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**, 1295-1300.
- Finzi, D., and Silliciano, R. F. (1998). Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**(5), 665-71.
- Fisher, A. G., Ensoli, B., Looney, D., Rose, A., Gallo, R. C., Saag, M. S., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Wong-Staal, F. (1988). Biologically diverse molecular variants within a single HIV-1 isolate. *Nature* **334**(6181), 444-7.
- Folks, T. M., Clouse, K. A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J. H., and Fauci, A. S. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7), 2365-8.
- Frankel, A. D., and Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25.
- Frost, S. D., Nijhuis, M., Schuurman, R., Boucher, C. A., and Brown, A. J. (2000). Evolution of lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: the relative roles of drift and selection. *J Virol* **74**(14), 6262-8.
- Gandhi, S. K., Siliciano, J. D., Bailey, J. R., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2008). Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors. *J Virol* **82**(6), 3125-30.
- Ganeshan, S., Dickover, R., Korber, B. T. M., Bryson, Y. J., and Wolinsky, S. M. (1997a). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic Evolution in Children with Different Rates of Development of Disease. *J Virol* **71**, 663-677.
- Ganeshan, S., Dickover, R. E., Korber, B. T., Bryson, Y. J., and Wolinsky, S. M. (1997b). Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* **71**(1), 663-77.
- Gange, S. J., Mellors, J. W., Lau, B., Detels, R., Phair, J. P., Munoz, A., and Margolick, J. B. (2001). Longitudinal patterns of HIV type 1 RNA among individuals with late disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**(13), 1223-9.
- Gao, X., Nelson, G. W., Karacki, P., Martin, M. P., Phair, J., Kaslow, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., O'Brien, S. J., and Carrington, M. (2001). Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* **344**(22), 1668-75.
- Gelderblom, H. C., Vatakis, D. N., Burke, S. A., Lawrie, S. D., Bristol, G. C., and Levy, D. N. (2008). Viral complementation allows HIV-1 replication without integration. *Retrovirology* **5**, 60.
- Geldmacher, C., Currier, J. R., Herrmann, E., Haule, A., Kuta, E., McCutchan, F., Njovu, L., Geis, S., Hoffmann, O., Maboko, L., Williamson, C., Bix, D., Meyerhans, A., Cox, J., and Hoelscher, M. (2007). CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J Virol* **81**(5), 2440-8.
- Gifford, R. J., Rhee, S. Y., Eriksson, N., Liu, T. F., Kiuchi, M., Das, A. K., and Shafer, R. W. (2008). Sequence editing by Apolipoprotein B RNA-editing catalytic component [corrected] and epidemiological surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *Aids* **22**(6), 717-25.
- Goila-Gaur, R., and Strebel, K. (2008). HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**, 51.
- Gojobori, T., Moriyama, E. N., and Kimura, M. (1990). Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(24), 10015-8.
- Goletti, D., Weissman, D., Jackson, R. W., Graham, N. M., Vlahov, D., Klein, R. S., Munsiff, S. S., Ortona, L., Cauda, R., and Fauci, A. S. (1996). Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol* **157**(3), 1271-8.
- Gonzalez, E., Bamshad, M., Sato, N., Mummidi, S., Dhanda, R., Catano, G., Cabrera, S., McBride, M., Cao, X. H., Merrill, G., O'Connell, P., Bowden, D. W., Freedman, B. I., Anderson, S. A., Walter, E. A., Evans, J. S., Stephan, K. T., Clark, R. A., Tyagi, S., Ahuja, S. S., Dolan, M. J., and Ahuja, S. K. (1999). Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21), 12004-9.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H.M. Schanker, J. D. Weismann, P.T. Fan, R.A. Wolf, and A. Saxon (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. **10**(305(24)), 1425-31

- Goudsmit, J., Bogaards, J. A., Jurriaans, S., Schuitemaker, H., Lange, J. M., Coutinho, R. A., and Weverling, G. J. (2002). Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *Aids* **16**(5), 791-3.
- Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., and Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* **23**(9), 1163-9.
- Griffiths, P. D. (2005). Improved understanding of human genetic control of HIV pathogenicity. *Rev Med Virol* **15**(1), 1-2.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E., and Picker, L. J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* **12**(3), 289-95.
- Guan, Y., Diallo, K., Dettori, M., Whitney, J. B., Liang, C., and Wainberg, M. A. (2001). Partial restoration of replication of simian immunodeficiency virus by point mutations in either the dimerization initiation site (DIS) or Gag region after deletion mutagenesis within the DIS. *J Virol* **75**(23), 11920-3.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., and Gascuel, O. (2005). PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue), W557-9.
- Han, Y., Lai, J., Barditch-Crovo, P., Gallant, J. E., Williams, T. M., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2008). The role of protective HCP5 and HLA-C associated polymorphisms in the control of HIV-1 replication in a subset of elite suppressors. *Aids* **22**(4), 541-4.
- Harris, R. S., and Liddament, M. T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* **4**(11), 868-77.
- Hassaine, G., Agostini, I., Candotti, D., Bessou, G., Caballero, M., Agut, H., Autran, B., Barthalay, Y., and Vigne, R. (2000). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 vif gene in long-term asymptomatic individuals. *Virology* **276**(1), 169-80.
- Hatano, H., Delwart, E. L., Norris, P. J., Lee, T. H., Dunn-Williams, J., Hunt, P. W., Hoh, R., Stramer, S. L., Linnen, J. M., McCune, J. M., Martin, J. N., Busch, M. P., and Deeks, S. G. (2009). Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol* **83**(1), 329-35.
- Haynes, B. F., Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1996). Toward an Understanding of the Correlates of Protective Immunity to HIV Infection. *Science* **271**, 324-327.
- Hendriks, J. C., Medley, G. F., van Griensven, G. J., Coutinho, R. A., Heisterkamp, S. H., and van Druten, H. A. (1993). The treatment-free incubation period of AIDS in a cohort of homosexual men. *Aids* **7**(2), 231-9.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995a). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995b). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**(6510), 123-6.
- Holland, J., and Domingo, E. (1998). Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**(1), 13-21.
- Holland, J. J., De La Torre, J. C., and Steinhauer, D. A. (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 1-20.
- Huang, Y., Paxton, W. A., Wolinsky, S. M., Neumann, A. U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N. R., Phair, J., Ho, D. D., and Koup, R. A. (1996). The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* **2**, 1240-1243.
- Huang, Y., Zhang, L., and Ho, D. D. (1998). Characterization of gag and pol sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* **240**(1), 36-49.
- Hubert, J. B., Burgard, M., Dussaix, E., Tamalet, C., Deveau, C., Le Chenadec, J., Chaix, M. L., Marchadier, E., Vilde, J. L., Delfraissy, J. F., Meyer, L., and Rouzioux (2000). Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *Aids* **14**(2), 123-31.
- Hunt, P. W. (2009). Natural control of HIV-1 replication and long-term nonprogression: overlapping but distinct phenotypes. *J Infect Dis* **200**(11), 1636-8.
- Hunt, P. W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J. M., Roland, M., Page-Shafer, K., Hsue, P., Emu, B., Krone, M., Lampiris, H., Douek, D., Martin, J. N., and Deeks, S. G. (2008). Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* **197**(1), 126-33.

- Ioannidis, J. P., Rosenberg, P. S., Goedert, J. J., Ashton, L. J., Benfield, T. L., Buchbinder, S. P., Coutinho, R. A., Eugen-Olsen, J., Gallart, T., Katzenstein, T. L., Kostrikis, L. G., Kuipers, H., Louie, L. G., Mallal, S. A., Margolick, J. B., Martinez, O. P., Meyer, L., Michael, N. L., Operskalski, E., Pantaleo, G., Rizzardì, G. P., Schuitemaker, H., Sheppard, H. W., Stewart, G. J., Theodorou, I. D., Ullum, H., Vicenzi, E., Vlahov, D., Wilkinson, D., Workman, C., Zagury, J. F., and O'Brien, T. R. (2001). Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med* **135**(9), 782-95.
- Iversen, A. K. N., Shaper, E. G., Rodrigo, A. G., Hirsch, M. S., Walker, B. D., Sheppard, H. W., Merigan, T. C., and Mullins, J. I. (1995). Persistence of Attenuated rev Genes in a Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Asymptomatic Individual. *Journal of Virology* **69**, 5743-5753.
- Janini, M., Rogers, M., Bix, D. R., and McCutchan, F. E. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4(+) T cells. *J Virol* **75**(17), 7973-86.
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D., and Dougherty, J. P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **74**(3), 1234-40.
- Jin, X., Brooks, A., Chen, H., Bennett, R., Reichman, R., and Smith, H. (2005). APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA Levels Associate Inversely with Human Immunodeficiency Virus Viremia. *J Virol* **79**(17), 11513-11516.
- Jones, N. A., Wei, X., Flower, D. R., Wong, M., Michor, F., Saag, M. S., Hahn, B. H., Nowak, M. A., Shaw, G. M., and Borrow, P. (2004). Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from the Primary CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response. *J. Exp. Med.* **200**(10), 1243-1256.
- Kaslow, R. A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Mu-oz, A., Saah, A. J., Goedert, J. J., Winkler, C., O'Brien, S. J., Rinaldo, C., Detels, R., Blattner, W., Phair, J., Erlich, H., and Mann, D. L. (1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nature Medicine* **2**, 405-411.
- Katzenstein, T. L., Eugen-Olsen, J., Hofmann, B., Benfield, T., Pedersen, C., Iversen, A. K., Sorensen, A. M., Garred, P., Koppelhus, U., Svejgaard, A., and Gerstoft, J. (1997). HIV-infected individuals with the CCR delta32/CCR5 genotype have lower HIV RNA levels and higher CD4 cell counts in the early years of the infection than do patients with the wild type. Copenhagen AIDS Cohort Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **16**(1), 10-4.
- Kedzierska, K., Crowe, S. M., Turville, S., and Cunningham, A. L. (2003). The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* **13**(1), 39-56.
- Keet, I. P., Krol, A., Klein, M. R., Veugelers, P., de Wit, J., Roos, M., Koot, M., Goudsmit, J., Miedema, F., and Coutinho, R. A. (1994). Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4+ cell counts. *J Infect Dis* **169**(6), 1236-43.
- Kent, S. J., Woodward, A., and Zhao, A. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cell responses correlate with control of acute HIV-1 infection in macaques. *J Infect Dis* **176**(5), 1188-97.
- Kessler, H. H., Deuretzbacher, D., Stelzl, E., Daghofer, E., Santner, B. I., and Marth, E. (2001). Determination of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by a rapid method useful for the routine diagnostic laboratory. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(5), 1018-20.
- Khanlou, H., Salmon-Ceron, D., and Sicard, D. (1997). [Characteristics of rapid progressors in HIV infection]. *Ann Med Interne (Paris)* **148**(2), 163-6.
- Kiepiela, P., Leslie, A. J., Honeyborne, I., Ramduth, D., Thobakgale, C., Chetty, S., Rathnavalu, P., Moore, C., Pfafferott, K. J., Hilton, L., Zimbwa, P., Moore, S., Allen, T., Brander, C., Addo, M. M., Altfeld, M., James, I., Mallal, S., Bunce, M., Barber, L. D., Szinger, J., Day, C., Klenerman, P., Mullins, J., Korber, B., Coovadia, H. M., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004). Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**(7018), 769-75.
- Kiepiela, P., Ngumbela, K., Thobakgale, C., Ramduth, D., Honeyborne, I., Moodley, E., Reddy, S., de Pierres, C., Mncube, Z., Mkhwanazi, N., Bishop, K., van der Stok, M., Nair, K., Khan, N., Crawford, H., Payne, R., Leslie, A., Prado, J., Prendergast, A., Frater, J., McCarthy, N., Brander, C., Learn, G. H., Nickle, D., Rousseau, C., Coovadia, H., Mullins, J. I., Heckerman, D., Walker, B. D., and Goulder, P. (2007). CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* **13**(1), 46-53.

- Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettl, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1995). Brief Report: Absence of Intact nef Sequences in a Long-Term Survivor with Nonprogressive HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine* **332**, 228-232.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains [see comments]. *Science* **288**(5472), 1789-96.
- Korber, B. T., Sharp, P. M., and Ho, D. D. (1999). Dating the origin of HIV-1 subtypes. *Nature* **400**, 326.
- Koshiba, T., and Chan, D. C. (2003). The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions. *J Biol Chem* **278**(9), 7573-9.
- Kostrikis, L. G., Huang, Y., Moore, J. P., Wolinsky, S. M., Zhang, L., Guo, Y., Deutsch, L., Phair, J., Neumann, A. U., and Ho, D. D. (1998). A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med* **4**(3), 350-3.
- Koup, R. A. (1994). Virus Escape from CTL Recognition **180**, 779-782.
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology* **68**, 4650-4655.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., and Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**(12), 1244-1245.
- Laeyendecker, O., Rothman, R. E., Henson, C., Horne, B. J., Ketlogetswe, K. S., Kraus, C. K., Shahan, J., Kelen, G. D., and Quinn, T. C. (2008). The effect of viral suppression on cross-sectional incidence testing in the Johns Hopkins Hospital emergency department. *J Acquir Immune Defic Syndr* **48**(2), 211-5.
- Lambotte, O., Boufassa, F., Madec, Y., Nguyen, A., Goujard, C., Meyer, L., Rouzioux, C., Venet, A., and Delfraissy, J. F. (2005). HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* **41**(7), 1053-6.
- Lambotte, O., Demoustier, A., de Goer, M. G., Wallon, C., Gasnault, J., Goujard, C., Delfraissy, J. F., and Taoufik, Y. (2002). Persistence of replication-competent HIV in both memory and naive CD4 T cell subsets in patients on prolonged and effective HAART. *Aids* **16**(16), 2151-7.
- Lamine, A., Caumont-Sarcos, A., Chaix, M. L., Saez-Cirion, A., Rouzioux, C., Delfraissy, J. F., Pancino, G., and Lambotte, O. (2007). Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *Aids* **21**(8), 1043-5.
- Lang, W., Perkins, H., Anderson, R. E., Royce, R., Jewell, N., and Winkelstein, W., Jr. (1989). Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**(1), 63-9.
- Lawn, S. D., Butera, S. T., and Folks, T. M. (2001). Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* **14**(4), 753-77, table of contents.
- Lefrere, J. J., Morand-Joubert, L., Mariotti, M., Bludau, H., Burghoffer, B., Petit, J. C., and Roudot-Thoraval, F. (1997). Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **90**(3), 1133-40.
- Leitner, T., and Albert, J. (1999). The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19), 10752-7.
- Leslie, A. J., Pfafferott, K. J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M. M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E. C., Allen, T., Prado, J. G., Altfeld, M., Brander, C., Dixon, C., Ramduth, D., Jeena, P., Thomas, S. A., St John, A., Roach, T. A., Kupfer, B., Luzzi, G., Edwards, A., Taylor, G., Lyall, H., Tudor-Williams, G., Novelli, V., Martinez-Picado, J., Kiepiela, P., Walker, B. D., and Goulder, P. J. (2004). HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* **10**(3), 282-9.
- Levy, J. A., Ed. (1998). HIV and the pathogenesis of AIDS. Second ed. Overall features of HIV pathogenesis: prognosis for long-term survival. Edited by A. S. o. Aids. Washington.
- Li, Y., Migueles, S. A., Welcher, B., Svehla, K., Phogat, A., Louder, M. K., Wu, X., Shaw, G. M., Connors, M., Wyatt, R. T., and Mascola, J. R. (2007). Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nat Med* **13**(9), 1032-4.
- Lichterfeld, M., Mou, D., Cung, T. D., Williams, K. L., Waring, M. T., Huang, J., Pereyra, F., Trocha, A., Freeman, G. J., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., and Yu, X. G. (2008). Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood* **112**(9), 3679-87.

- Limou, S., Le Clerc, S., Coulonges, C., Carpentier, W., Dina, C., Delaneau, O., Labib, T., Taing, L., Sladek, R., Deveau, C., Ratsimandresy, R., Montes, M., Spadoni, J. L., Lelievre, J. D., Levy, Y., Therwath, A., Schachter, F., Matsuda, F., Gut, I., Froguel, P., Delfraissy, J. F., Herberg, S., and Zagury, J. F. (2009). Genomewide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genomewide Association Study 02). *J Infect Dis* **199**(3), 419-26.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. (1996). Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* **86**, 367-377.
- Liu, S. L., Schacker, T., Musey, L., Shriner, D., McElrath, M. J., Corey, L., and Mullins, J. I. (1997). Divergent Patterns of Progression to AIDS after Infection from the Same Source: Human Immunodeficiency Virus Type 1 Evolution and Antiviral Responses. *Journal of Virology* **71**, 4284-4295.
- Lyles, C. M., Dorrucchi, M., Vlahov, D., Pezzotti, P., Angarano, G., Sinicco, A., Alberici, F., Alcorn, T. M., Vella, S., and Rezza, G. (1999). Longitudinal human immunodeficiency virus type 1 load in the italian seroconversion study: correlates and temporal trends of virus load. *J Infect Dis* **180**(4), 1018-24.
- Madec, Y., Boufassa, F., Porter, K., and Meyer, L. (2005). Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverters. *Aids* **19**(17), 2001-7.
- Mansky, L. M. (1996). Forward Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in a T Lymphoid Cell Line. *AIDS Research and Human Retroviruses* **12**, 307-314.
- Mansky, L. M., and Temin, H. M. (1995). Lower In Vivo Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 than That Predicted from the Fidelity of Purified Reverse Transcriptase. *Journal of Virology* **69**, 5087-5094.
- Mariani, R., Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Sullivan, J. L., Desrosiers, R. C., and Skowronski, J. (1996). High Frequency of Defective nef Alleles in a Long-Term Survivor with Nonprogressive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology* **70**, 7752-7764.
- Markowitz, M., Louie, M., Hurley, A., Sun, E., Di Mascio, M., Perelson, A. S., and Ho, D. D. (2003). A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. *J Virol* **77**(8), 5037-8.
- Martin, M. P., Dean, M., Smith, M. W., Winkler, C., Gerrard, B., Michael, N. L., Lee, B., Doms, R. W., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Hilgartner, M. W., Vlahov, D., O'Brien, S. J., and Carrington, M. (1998). Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* **282**(5395), 1907-11.
- Martinez-Picado, J., Prado, J. G., Fry, E. E., Pfafferoth, K., Leslie, A., Chetty, S., Thobakgale, C., Honeyborne, I., Crawford, H., Matthews, P., Pillay, T., Rousseau, C., Mullins, J. I., Brander, C., Walker, B. D., Stuart, D. I., Kiepiela, P., and Goulder, P. (2006). Fitness Cost of Escape Mutations in p24 Gag in Association with Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **80**(7), 3617-3623.
- McCutchan, F. E., Hoelscher, M., Tovanabutra, S., Piyasirisilp, S., Sanders-Buell, E., Ramos, G., Jagodzinski, L., Polonis, V., Maboko, L., Mmbando, D., Hoffmann, O., Riedner, G., von Sonnenburg, F., Robb, M., and Birx, D. L. (2005). In-Depth Analysis of a Heterosexually Acquired Human Immunodeficiency Virus Type 1 Superinfection: Evolution, Temporal Fluctuation, and Intercompartment Dynamics from the Seronegative Window Period through 30 Months Postinfection. *J. Virol.* **79**(18), 11693-11704.
- McCutchan, F. E., Salminen, M. O., Carr, J. K., and Burke, D. S. (1996). HIV-1 genetic diversity. *Aids* **10 Suppl 3**, S13-20.
- Mellors, J. W., Kingsley, L. A., Rinaldo, J. C. R., Todd, J. A., Hoo, B. S., Kokka, R. P., and Gupta, P. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Ann Intern Med* **122**, 573-579.
- Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., and Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**(5265), 1167-70.
- Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjo, B., and Wain-Hobson, S. (1989). Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**(5), 901-10.
- Michael, N. L., Chang, G., d'Arcy, L. A., Ehrenberg, P. K., Mariani, R., Busch, M. P., Birx, D. L., and Schwartz, D. H. (1995). Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1- infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* **69**(7), 4228-36.

- Migueles, S. A., Laborico, A. C., Imamichi, H., Shupert, W. L., Royce, C., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., Hallahan, C. W., and Connors, M. (2003). The differential ability of HLA B*5701+ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences. *J Virol* **77**(12), 6889-98.
- Migueles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., and Connors, M. (2002). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* **3**(11), 1061-8.
- Migueles, S. A., Osborne, C. M., Royce, C., Compton, A. A., Joshi, R. P., Weeks, K. A., Rood, J. E., Berkley, A. M., Sacha, J. B., Cogliano-Shutta, N. A., Lloyd, M., Roby, G., Kwan, R., McLaughlin, M., Stallings, S., Rehm, C., O'Shea, M. A., Mican, J., Packard, B. Z., Komoriya, A., Palmer, S., Wiegand, A. P., Maldarelli, F., Coffin, J. M., Mellors, J. W., Hallahan, C. W., Follman, D. A., and Connors, M. (2008). Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* **29**(6), 1009-21.
- Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., Hallahan, C. W., Selig, S. M., Schwartz, D., Sullivan, J., and Connors, M. (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6), 2709-14.
- Migueles, S. A., Weeks, K. A., Nou, E., Berkley, A. M., Rood, J. E., Osborne, C. M., Hallahan, C. W., Cogliano-Shutta, N. A., Metcalf, J. A., McLaughlin, M., Kwan, R., Mican, J. M., Davey, R. T., Jr., and Connors, M. (2009). Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy. *J Virol* **83**(22), 11876-89.
- Mikhail, M., Wang, B., and Saksena, N. K. (2003). Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* **5**(4), 230-44.
- Miura, T., Brockman, M. A., Brumme, C. J., Brumme, Z. L., Carlson, J. M., Pereyra, F., Trocha, A., Addo, M. M., Block, B. L., Rothchild, A. C., Baker, B. M., Flynn, T., Schneidewind, A., Li, B., Wang, Y. E., Heckerman, D., Allen, T. M., and Walker, B. D. (2008). Genetic Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Elite Controllers: Lack of Gross Genetic Defects or Common Amino Acid Changes. *In "J.Virol."* Vol. 82, pp. 8422-8430.
- Miura, T., Brockman, M. A., Schneidewind, A., Lobritz, M., Pereyra, F., Rathod, A., Block, B. L., Brumme, Z. L., Brumme, C. J., Baker, B., Rothchild, A. C., Li, B., Trocha, A., Cutrell, E., Frahm, N., Brander, C., Toth, I., Arts, E. J., Allen, T. M., and Walker, B. D. (2009a). HLA-B57/B*5801 Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Controllers Select for Rare Gag Variants Associated with Reduced Viral Replication Capacity and Strong Cytotoxic T-Lymphocyte Recognition, Vol. 83, pp. 2743-2755.
- Miura, T., Brumme, C. J., Brockman, M. A., Brumme, Z. L., Pereyra, F., Block, B. L., Trocha, A., John, M., Mallal, S., Harrigan, P. R., and Walker, B. D. (2009b). HLA-Associated Viral Mutations Are Common in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Elite Controllers. *In "J.Virol"*, Vol. 83, pp. 3407-3412.
- Mole, L., Ripich, S., Margolis, D., and Holodniy, M. (1997). The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* **176**(3), 766-70.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., and Fauci, A. S. (1999). Induction of HIV-1 replication by allogeneic stimulation. *J Immunol* **162**(12), 7543-8.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., Mizell, S. B., Ehler, L. A., and Fauci, A. S. (2000). In vitro reactivation of human immunodeficiency virus 1 from latently infected, resting CD4+ T cells after bacterial stimulation. *J Infect Dis* **181**(6), 2041-4.
- Mothe, B. R., Weinfurter, J., Wang, C., Rehauer, W., Wilson, N., Allen, T. M., Allison, D. B., and Watkins, D. I. (2003). Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* **77**(4), 2736-40.
- Muñoz, A., Wang, M.-C., Bass, S., Taylor, J. M. G., Kingsley, L. A., Chmiel, J. S., Polk, B. F., and Group, T. M. A. C. S. (1989). Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)-Free Time After Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Seroconversion in Homosexual Men. *American Journal of Epidemiology* **130**, 530-9.
- (1995). Virus taxonomy - the classification and nomenclature of viruses: sixth report of the International Committee of Taxonomy of viruses. Murphy, F., Fauquet, C. M., and Bishop, D. H. L.
- Myers, G., Korber, B. T., Foley, B. T., Jeang, K. T., Mellors, J. W., Wain-Hobson, S., and Eds (1996). Human retroviruses and AIDS 1996: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos, New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.

- Nei, M., and Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**(5), 418-26.
- O'Brien, S. J., Gao, X., and Carrington, M. (2001). HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol Med* **7**(9), 379-81.
- O'Brien, S. J., and Moore, J. P. (2000). The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* **177**, 99-111.
- O'Brien, T. R., Rosenberg, P. S., Yellin, F., and Goedert, J. J. (1998). Longitudinal HIV-1 RNA levels in a cohort of homosexual men. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **18**(2), 155-61.
- O'Brien, T. R., Winkler, C., Dean, M., Nelson, J. A., Carrington, M., Michael, N. L., and White, G. C., 2nd (1997). HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet* **349**(9060), 1219.
- O'Brien, W. A., Grovit-Ferbas, K., Namazi, A., Ovcak-Derzic, S., Wang, H. J., Park, J., Yeramian, C., Mao, S. H., and Zack, J. A. (1995). Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood* **86**(3), 1082-9.
- Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinnan, G., Agan, B. K., and Dolan, M. J. (2009). Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *J Infect Dis* **200**(11), 1714-23.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., and Fauci, A. S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**, 355-358.
- Paroli, M., Propato, A., Accapezzato, D., Francavilla, V., Schiaffella, E., and Barnaba, V. (2001). The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol Lett* **79**(1-2), 127-9.
- Pasquier, C., Millot, N., Njouom, R., Sandres, K., Cazabat, M., Puel, J., and Izopet, J. (2001). HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. *J Virol Methods* **94**(1-2), 45-54.
- Pedroza Martins, L., Chenciner, N., and Wain-Hobson, S. (1992). Complex Intrapatient Sequence Variation in the V1 and V2 Hypervariable Regions of the HIV-1 gp120 Envelope Sequence. *Virology* **191**, 837-845.
- Perelson, A. S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D. D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**, 188-191.
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**(5255), 1582-6.
- Pereyra, F., Addo, M. M., Kaufmann, D. E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., Ueda, P., Lu, Z., Cohen, D., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Rosenberg, E. S., and Walker, B. D. (2008a). Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. In "Journal of Infectious Diseases", Vol. 197, pp. 563-571.
- Pereyra, F., Addo, M. M., Kaufmann, D. E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., Ueda, P., Lu, Z., Cohen, D., Wrin, T., Petropoulos, C. J., Rosenberg, E. S., and Walker, B. D. (2008b). Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* **197**(4), 563-71.
- Pereyra, F., Palmer, S., Miura, T., Block, Brian L., Wiegand, A., Rothchild, Alissa C., Baker, B., Rosenberg, R., Cutrell, E., Seaman, Michael S., Coffin, J. M., and Walker, Bruce D. (2009). Persistent Low Level Viremia in HIV-1 Elite Controllers and Relationship to Immunologic Parameters. In "J Infec Dis", Vol. 200, pp. 984-990.
- Pernas, M., Casado, C., Fuentes, R., Perez-Elias, M. J., and Lopez-Galindez, C. (2006). A dual superinfection and recombination within HIV-1 subtype B 12 years after primoinfection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **42**(1), 12-8.
- Persaud, D., Pierson, T., Ruff, C., Finzi, D., Chadwick, K. R., Margolick, J. B., Ruff, A., Hutton, N., Ray, S., and Siliciano, R. F. (2000). A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J Clin Invest* **105**(7), 995-1003.
- Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R. M., Rizza, C. R., and McMichael, A. J. (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**, 453-459.
- Piantadosi, A., Chohan, B., Chohan, V., McClelland, R. S., and Overbaugh, J. (2007). Chronic HIV-1 Infection Frequently Fails to Protect against Superinfection. *PLoS Pathog* **3**(11), e177.

- Piatak, J. M., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Lifson, J. D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**, 1749-54.
- Pierson, T. C., Zhou, Y., Kieffer, T. L., Ruff, C. T., Buck, C., and Siliciano, R. F. (2002). Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **76**(17), 8518-31.
- Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S., and Montefiori, D. C. (1997). Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* **176**(4), 924-32.
- Pomerantz, R. J., Trono, D., Feinberg, M. B., and Baltimore, D. (1990). Cells Nonproductively Infected with HIV-1 Exhibit an Aberrant Pattern of Viral RNA Expression: A Molecular Model for Latency. *Cell* **61**, 1271-1276.
- Price, D. A., Goulder, P. J. R., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R. M., and Phillips, R. E. (1997). Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1890-1895.
- Quan, Y., Brenner, B. G., Dascal, A., and Wainberg, M. A. (2008). Highly diversified multiply drug-resistant HIV-1 quasispecies in PBMCs: a case report. *Retrovirology* **5**, 43.
- Quinones-Mateu, M. E., and Arts, E. J. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 83-140.
- Rachinger, A., Navis, M., van Assen, S., Groeneveld, P. H., and Schuitemaker, H. (2008). Recovery of viremic control after superinfection with pathogenic HIV type 1 in a long-term elite controller of HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis* **47**(11), e86-9.
- Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. A., and Holmes, E. C. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* **5**(1), 52-61.
- Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J. E., Markowitz, M., Moore, J. P., Perelson, A. S., and Ho, D. D. (1999). Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet* **354**(9192), 1782-5.
- Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., Huang, X. L., Fan, Z., Mullins, J. I., Gange, S., Farzadegan, H., Shankarappa, R., Munoz, A., and Margolick, J. B. (1998). Anti-HIV type 1 memory cytotoxic T lymphocyte responses associated with changes in CD4+ T cell numbers in progression of HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**(16), 1423-33.
- Robbins, K. E., Lemey, P., Pybus, O. G., Jaffe, H. W., Youngpairoj, A. S., Brown, T. M., Salemi, M., Vandamme, A. M., and Kalish, M. L. (2003). U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol* **77**(11), 6359-66.
- Robertson, D. L., Hahn, B. H., and Sharp, P. M. (1995). Recombination in AIDS Viruses. *Journal of Molecular Evolution* **40**, 249-259.
- Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J. M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S., and Soriano, V. (2004). Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids* **18**(8), 1109-16.
- Rodrigo, A. G., Goracke, P. C., Rowhanian, K., and Mullins, J. I. (1997). Quantitation of Target Molecules from Polymerase Chain Reaction-Based Limiting Dilution Assays. *AIDS Research and Human Retroviruses* **13**, 737-742.
- Rose, P. P., and Korber, B. T. (2000). Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics* **16**(4), 400-1.
- Rousseau, C. M., Learn, G. H., Bhattacharya, T., Nickle, D. C., Heckerman, D., Chetty, S., Brander, C., Goulder, P. J., Walker, B. D., Kiepiela, P., Korber, B. T., and Mullins, J. I. (2007). Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections. *J Virol* **81**(9), 4492-500.
- Saez-Cirion, A., Lacabartz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barre-Sinoussi, F., Delfraissy, J. F., Sinet, M., Pancino, G., and Venet, A. (2007a). HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(16), 6776-81.
- Saez-Cirion, A., Pancino, G., Sinet, M., Venet, A., and Lambotte, O. (2007b). HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol* **28**(12), 526-34.
- Saez-Cirion, A., Sinet, M., Shin, S. Y., Urrutia, A., Versmisse, P., Lacabartz, C., Boufassa, F., Avettand-Fenoel, V., Rouzioux, C., Delfraissy, J. F., Barre-Sinoussi, F., Lambotte, O., Venet, A., and Pancino, G. (2009). Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses. *J Immunol* **182**(12), 7828-37.
- Sajadi, M. M., Constantine, N. T., Mann, D. L., Charurat, M., Dadzan, E., Kadlecik, P., and Redfield, R. R. (2009). Epidemiologic characteristics and natural history of HIV-1 natural viral suppressors. *J Acquir Immune Defic Syndr* **50**(4), 403-8.

- Saksena, N. K., Rodes, B., Wang, B., and Soriano, V. (2007). Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev* **9**(4), 195-207.
- Salvi, R., Garbuglia, A. R., Di Caro, A., Pulciani, S., Montella, F., and Benedetto, A. (1998). Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol* **72**(5), 3646-57.
- Sandonis, V., Casado, C., Alvaro, T., Pernas, M., Olivares, I., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., and Lopez-Galindez, C. (2009). A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. *Virology* **391**(1), 73-82.
- Sguanci, L., Bagnoli, F., and Lio, P. (2007). Modeling HIV quasispecies evolutionary dynamics. *BMC Evol Biol* **7 Suppl 2**, S5.
- Shankarappa, R., Margolick, J. B., Gange, S. J., Rodrigo, A. G., Upchurch, D., Farzadegan, H., Gupta, P., Rinaldo, C. R., Learn, G. H., He, X., Huang, X. L., and Mullins, J. I. (1999). Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **73**(12), 10489-502.
- Shattock, R. J., Friedland, J. S., and Griffin, G. E. (1994). Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis modulates human immunodeficiency virus replication in human monocytic cells. *J Gen Virol* **75 (Pt 4)**, 849-56.
- Sheppard, H. W., Lang, W., Ascher, M. S., Vittinghoff, E., and Winkelstein, W. (1993). The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *Aids* **7**(9), 1159-66.
- Shrestha, S., Aissani, B., Song, W., Wilson, C. M., Kaslow, R. A., and Tang, J. (2009). Host genetics and HIV-1 viral load set-point in African-Americans. *Aids* **23**(6), 673-7.
- Shriner, D., Liu, Y., Nickle, D. C., and Mullins, J. I. (2006). Evolution of intrahost HIV-1 genetic diversity during chronic infection. *Evolution Int J Org Evolution* **60**(6), 1165-76.
- Silvestri, G., and Feinberg, M. B. (2003). Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* **112**(6), 821-4.
- Simmonds, P., Balfe, P., Ludlam, C. A., Bishop, J. O., and Leigh-Brown, A. J. (1990). Analysis of Sequence Diversity in Hypervariable Regions of the External Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* **64**, 5840-5850.
- Simmonds, P., Zhang, L. Q., McOmish, F., Balfe, P., Ludlam, C. A., and Brown, A. J. L. (1991). Discontinuous Sequence Change of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 env Sequences in Plasma Viral and Lymphocyte-Associated Proviral Populations In Vivo; Implications for Models of HIV Pathogenesis. *Journal of Virology* **65**, 6266-6276.
- Smith, D. B., McAllister, J., Casino, C., and Simmonds, P. (1997a). Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *Journal of General Virology* **78**, 1511-1519.
- Smith, M. W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Lomb, D. A., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Kaslow, R., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Vlahov, D., Hoots, K., Hilgartner, M. W., Study, H. G. a. D., Study, M. A. C., Center, M. H. C., Cohort, S. F. C., Study, A., and O'Brien, S. J. (1997b). Contrasting Genetic Influence of CCR2 and CCR5 Variants on HIV-1 Infection and Disease Progression. *Science* **277**, 959-965.
- Spina, C. A., Guatelli, J. C., and Richman, D. D. (1995). Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in vitro. *Journal of Virology* **69**, 2977-2988.
- Stafford, M. A., Corey, L., Cao, Y., Daar, E. S., Ho, D. D., and Perelson, A. S. (2000). Modeling plasma virus concentration during primary HIV infection. *J Theor Biol* **203**(3), 285-301.
- Stanley, S., Ostrowski, M. A., Justement, J. S., Gantt, K., Hedayati, S., Mannix, M., Roche, K., Schwartzentruber, D. J., Fox, C. H., and Fauci, A. S. (1996). Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* **334**(19), 1222-30.
- Stewart, G. J., Ashton, L. J., Biti, R. A., Ffrench, R. A., Bennetts, B. H., Newcombe, N. R., Benson, E. M., Carr, A., Cooper, D. A., and Kaldor, J. M. (1997). Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *Aids* **11**(15), 1833-8.
- Streeck, H., Li, B., Poon, A. F. Y., Schneidewind, A., Gladden, A. D., Power, K. A., Daskalakis, D., Bazner, S., Zuniga, R., Brander, C., Rosenberg, E. S., Frost, S. D. W., Altfeld, M., and Allen, T. M. (2008). Immune-driven recombination and loss of control after HIV superinfection. *In "J. Exp. Med"*, Vol. 205, pp. 1789-1796.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**(8), 1596-9.

- Tang, J., Shelton, B., Makhatadze, N. J., Zhang, Y., Schaen, M., Louie, L. G., Goedert, J. J., Seaberg, E. C., Margolick, J. B., Mellors, J., and Kaslow, R. A. (2002). Distribution of chemokine receptor CCR2 and CCR5 genotypes and their relative contribution to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion, early HIV-1 RNA concentration in plasma, and later disease progression. *J Virol* **76**(2), 662-72.
- Taylor, J. E., and Korber, B. T. (2005). HIV-1 intra-subtype superinfection rates: estimates using a structured coalescent with recombination. *Infect Genet Evol* **5**(1), 85-95.
- Vartanian, J. P., Meyerhans, A., Asjo, B., and Wain-Hobson, S. (1991). Selection, recombination, and G---A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* **65**(4), 1779-88.
- Wain-Hobson, S. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in vivo and ex vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 181-93.
- Walker, B. D. (2007). Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* **15**(4), 134-6.
- Wang, B., Dyer, W. B., Zaunders, J. J., Mikhail, M., Sullivan, J. S., Williams, L., Haddad, D. N., Harris, G., Holt, J. A., Cooper, D. A., Miranda-Saksena, M., Boadle, R., Kelleher, A. D., and Saksena, N. K. (2002a). Comprehensive analyses of a unique HIV-1-infected nonprogressor reveal a complex association of immunobiological mechanisms in the context of replication-incompetent infection. *Virology* **304**(2), 246-64.
- Wang, B., Dyer, W. B., Zaunders, J. J., Mikhail, M., Sullivan, J. S., Williams, L., Haddad, D. N., Harris, G., Holt, J. A. G., and Cooper, D. A. (2002b). Comprehensive Analyses of a Unique HIV-1-Infected Nonprogressor Reveal a Complex Association of Immunobiological Mechanisms in the Context of Replication-Incompetent Infection. *Virology* **304**(2), 246-264.
- Wang, B., Mikhail, M., Dyer, W. B., Zaunders, J. J., Kelleher, A. D., and Saksena, N. K. (2003). First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* **312**(1), 135-50.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifso, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Saag, M. S., and Shaw, G. M. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**, 117-122.
- Westrop, S. J., Qazi, N. A., Pido-Lopez, J., Nelson, M. R., Gazzard, B., Gotch, F. M., and Imami, N. (2009). Transient nature of long-term nonprogression and broad virus-specific proliferative T-cell responses with sustained thymic output in HIV-1 controllers. *PLoS One* **4**(5), e5474.
- Williamson, S. (2003). Adaptation in the env Gene of HIV-1 and Evolutionary Theories of Disease Progression. *Mol Biol Evol* **20**(8), 1318-1325.
- Winkler, C., Modi, W., Smith, M. W., Nelson, G. W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J. J., O'Brien, T. R., Jacobson, L. P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., and O'Brien, S. J. (1998). Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* **279**(5349), 389-93.
- Wolfs, T. F. W., Jong, J. J. d., Berg, H. v. d., Tijnagel, J. M. G. H., Krone, W. J. A., and Goudsmit, J. (1990). Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 is host dependent, rapid, and continuous. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9938-9942.
- Wolinsky, S. M., Kunstman, K. J., Safrit, J. T., Koup, R. A., Neumann, A. U., and Korber, B. T. (1996). Response: HIV-1 Evolution and Disease Progression. *Science* **274**(5289), 1010-1011.
- Xiao, L., Owen, S. M., Rudolph, D. L., Lal, R. B., and Lal, A. A. (1998). Plasmodium falciparum antigen-induced human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated through induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Infect Dis* **177**(2), 437-45.
- Yahi, N., Fantini, J., Tourres, C., Tivoli, N., Koch, N., and Tamalet, C. (2001). Use of drug resistance sequence data for the systematic detection of non-B human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes: how to create a sentinel site for monitoring the genetic diversity of HIV-1 at a country scale. *J Infect Dis* **183**(9), 1311-7.
- Yamada, T., and Iwamoto, A. (2000). Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Virol* **145**(5), 1021-7.
- Yamaguchi-Kabata, Y., and Gojobori, T. (2000). Reevaluation of amino acid variability of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein and prediction of new discontinuous epitopes. *J Virol* **74**(9), 4335-50.
- Yamaguchi, J., Vallari, A. S., Swanson, P., Bodelle, P., Kaptue, L., Ngansop, C., Zekeng, L., Gurtler, L. G., Devare, S. G., and Brennan, C. A. (2002). Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**(4), 269-82.

- Yant, L. J., Friedrich, T. C., Johnson, R. C., May, G. E., Maness, N. J., Enz, A. M., Lifson, J. D., O'Connor, D. H., Carrington, M., and Watkins, D. I. (2006). The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* **80**(10), 5074-7.
- Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A., and Chen, I. S. Y. (1990). HIV-1 Entry into Quiescent Primary Lymphocytes: Molecular Analysis Reveals a Labile, Latent Viral Structure. *Cell* **61**, 213-222.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., and Korber, B. (2004). Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* **14**(12), 1229-46.
- Zhang, Y., Nakata, K., Weiden, M., and Rom, W. N. (1995). Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *J Clin Invest* **95**(5), 2324-31.
- Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., and Ho, D. D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-597.
- Zhuang, J., Jetzt, A. E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., Preston, B. D., and Dougherty, J. P. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol* **76**(22), 11273-82.
- Zimmerli, S. C., Harari, A., Cellerai, C., Vallelian, F., Bart, P. A., and Pantaleo, G. (2005). HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(20), 7239-44.
- Zuñiga, R., Lucchetti, A., Galvan, P., Sanchez, S., Sanchez, C., Hernandez, A., Sanchez, H., Frahm, N., Linde, C. H., Hewitt, H. S., Hildebrand, W., Altfeld, M., Allen, T. M., Walker, B. D., Korber, B. T., Leitner, T., Sanchez, J., and Brander, C. (2006). Relative Dominance of Gag p24-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Is Associated with Human Immunodeficiency Virus Control. *J. Virol.* **80**(6), 3122-3125.

ANEXO

LTR

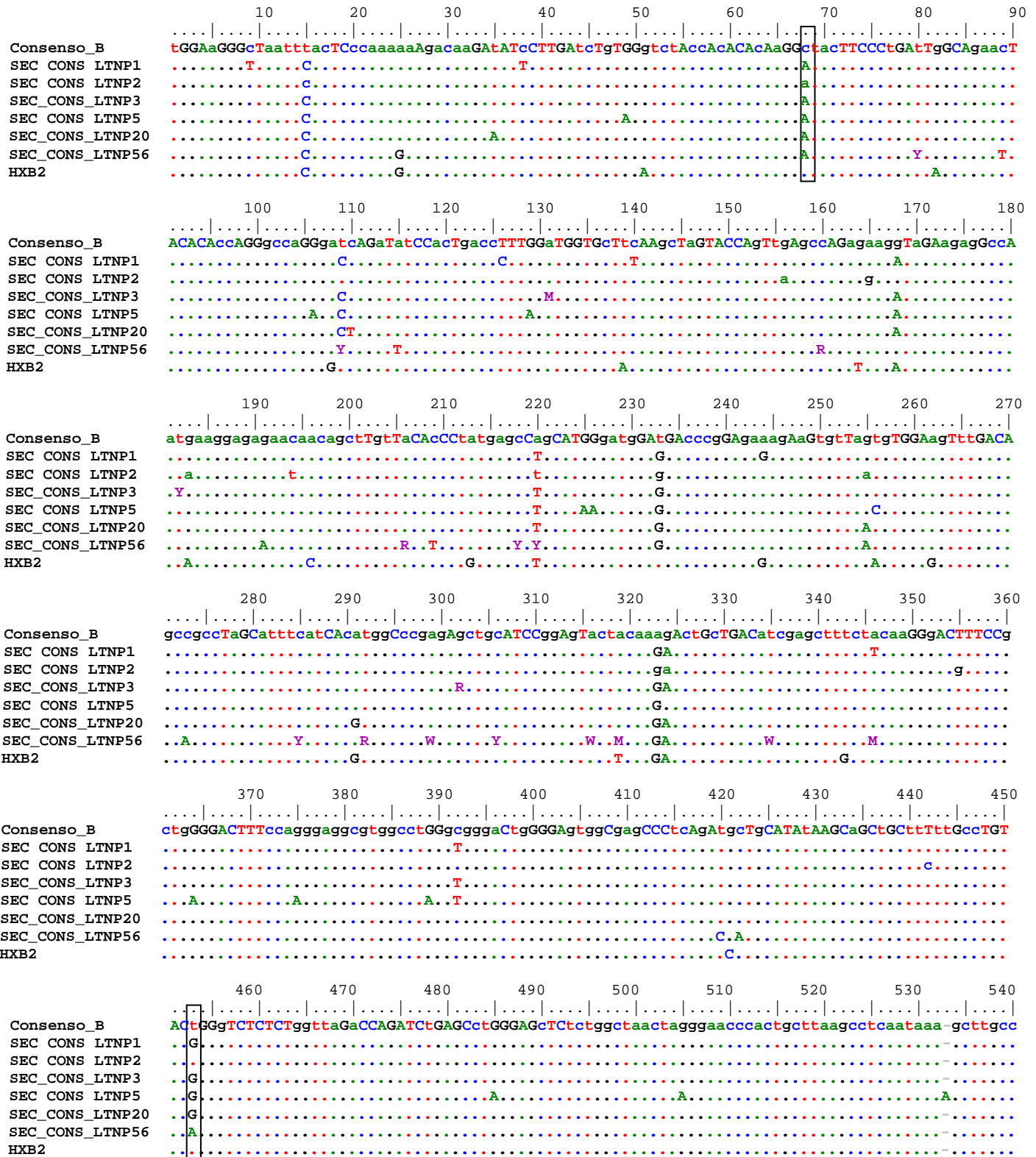


Fig 1: Análisis del genoma completo de los pacientes LTNP ancestrales

LTR

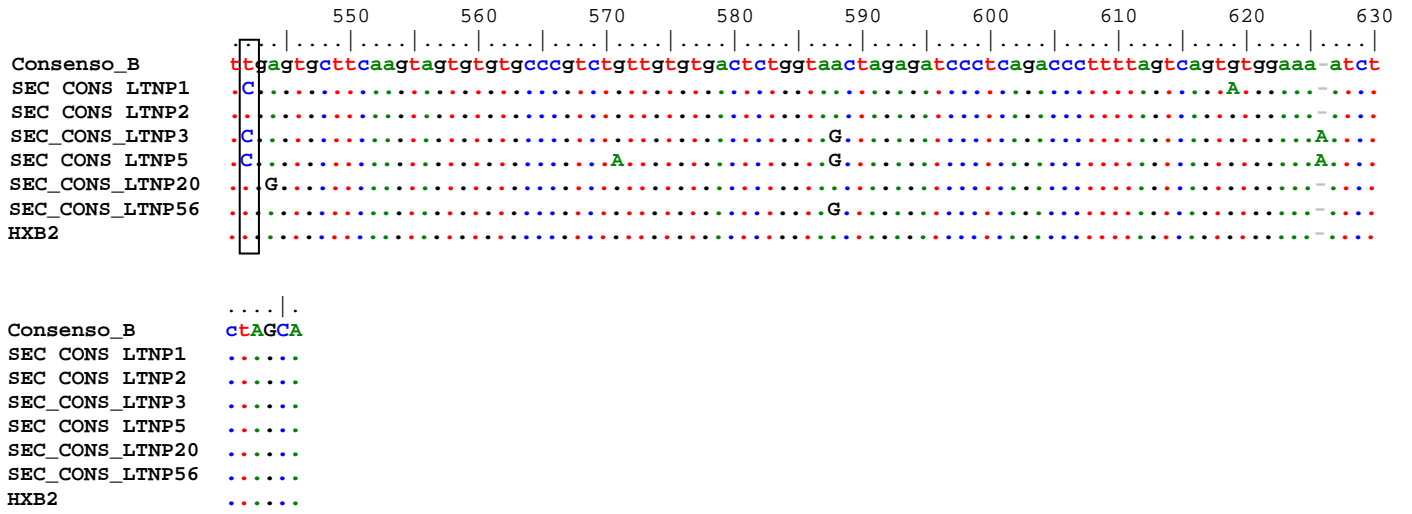


Fig 1: Continuación

GAG

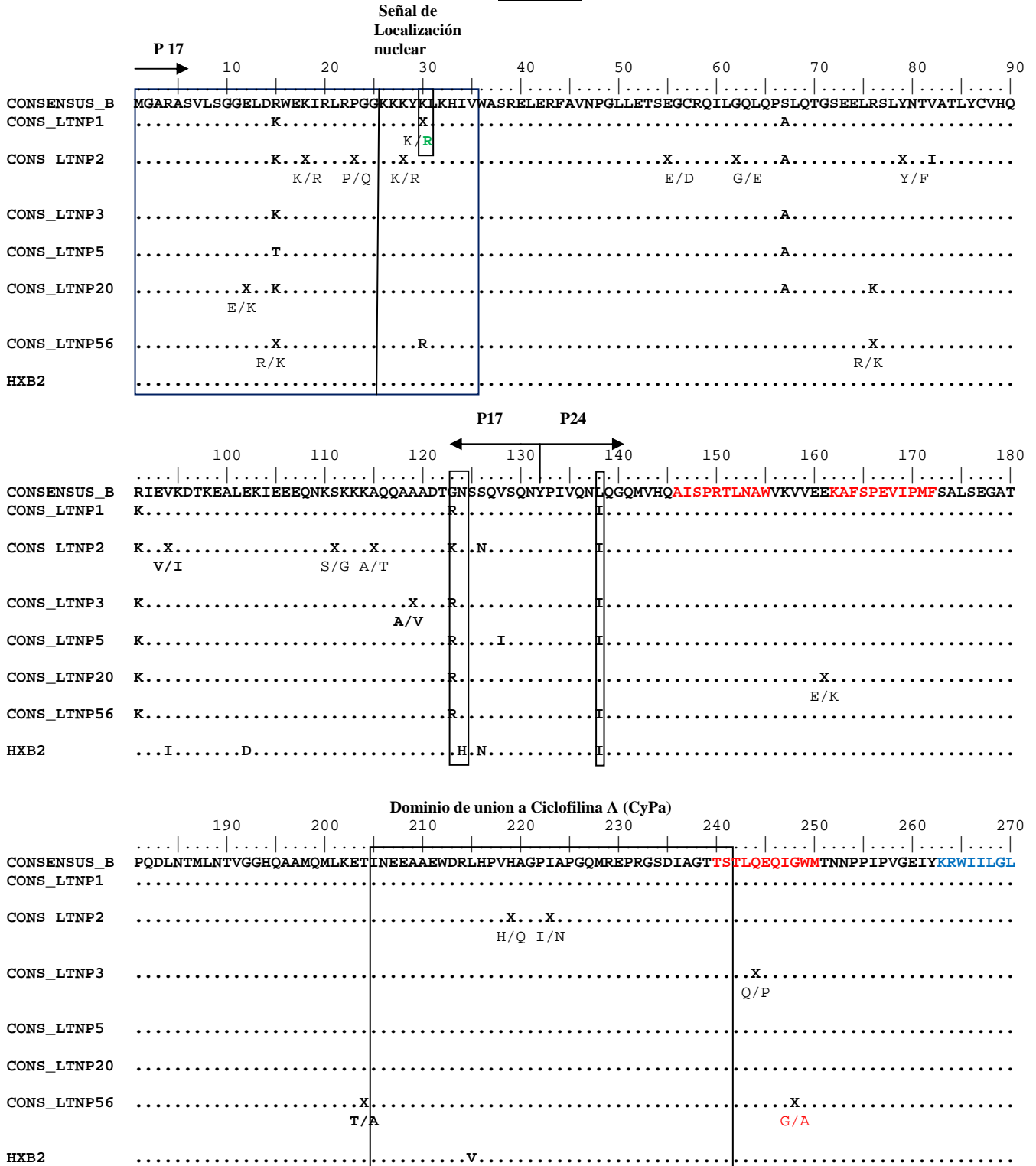


Fig 1: Continuación

GAG

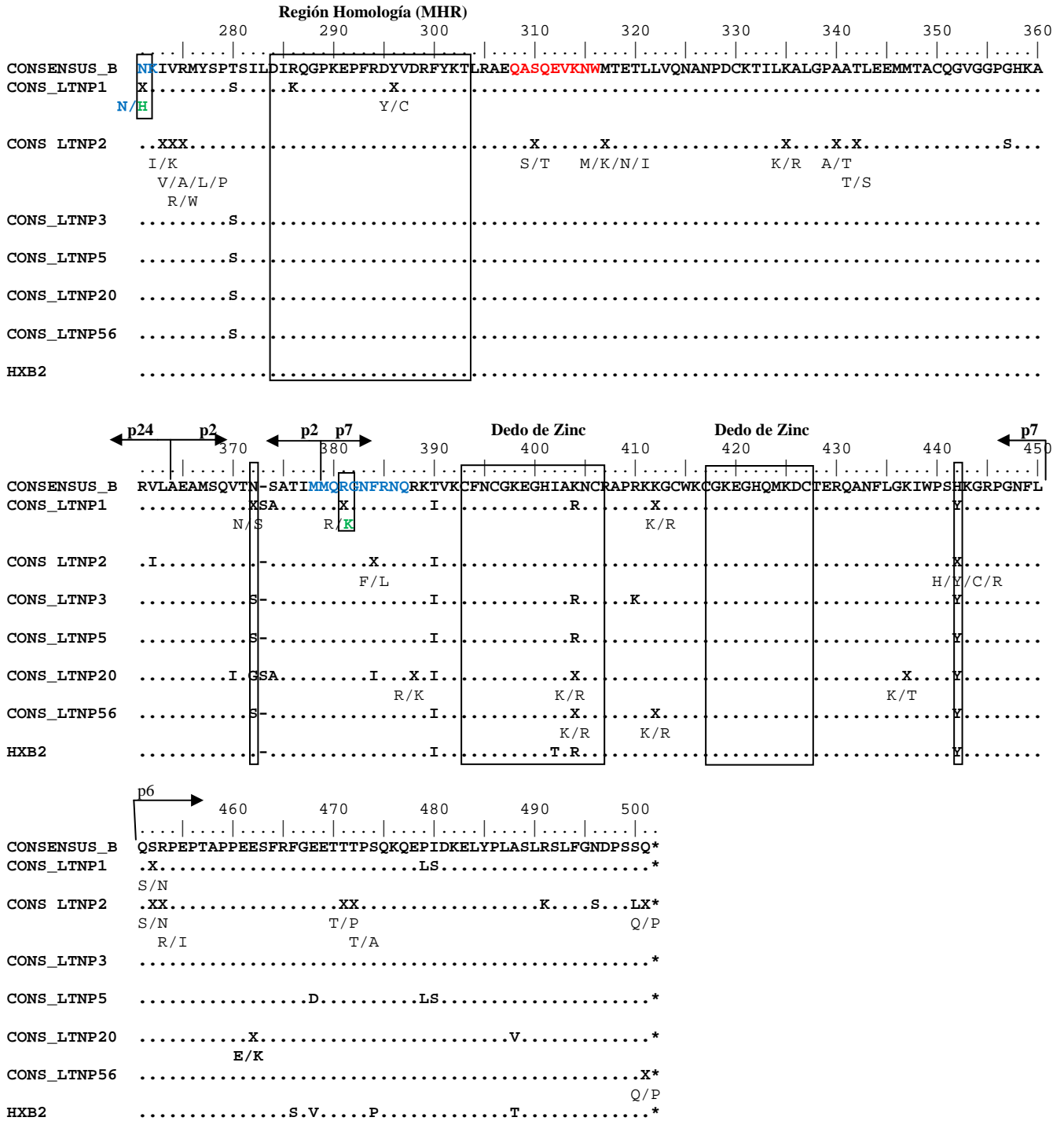


Fig 1: Continuación

POL

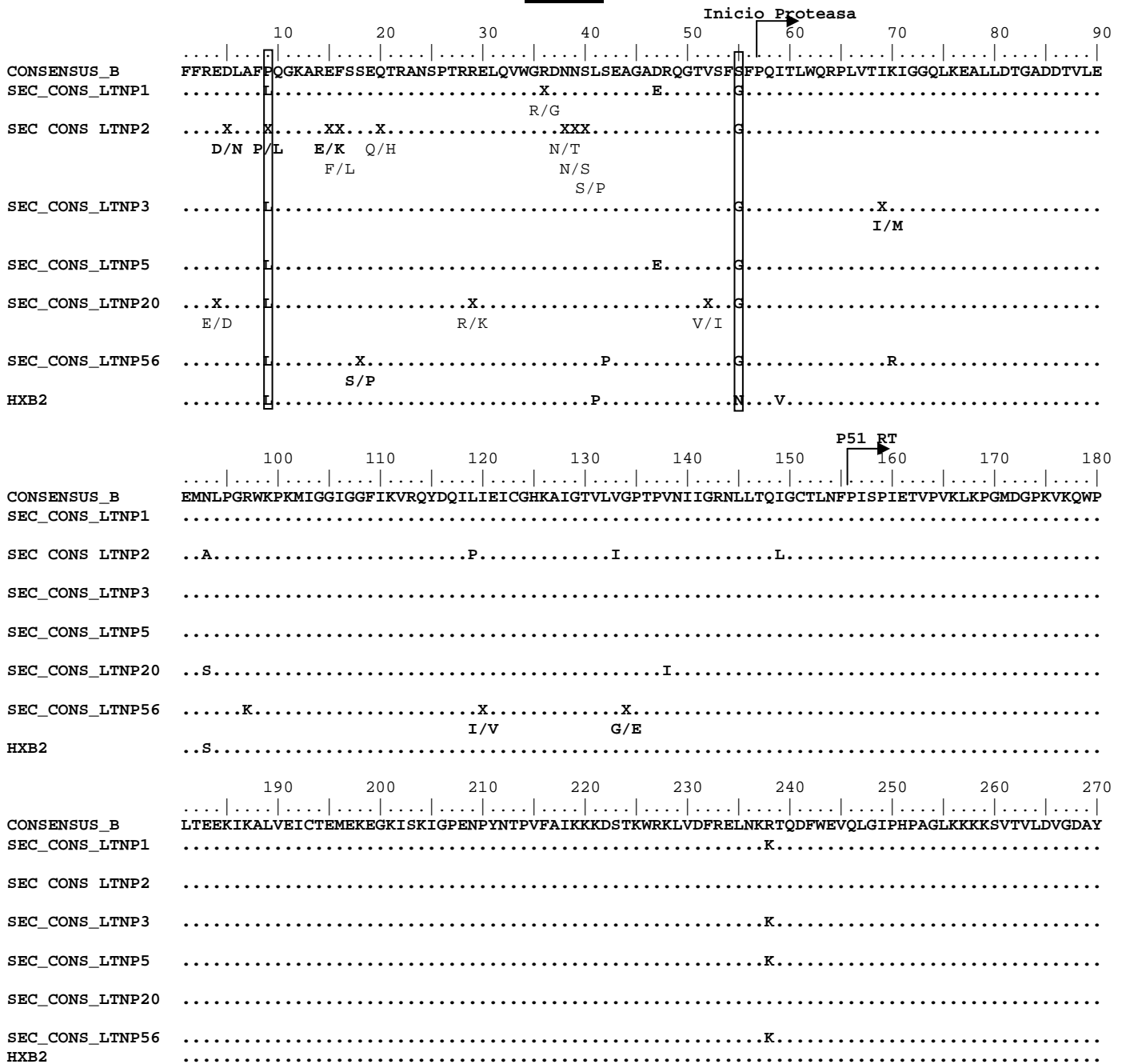


Fig 1: Continuación

POL

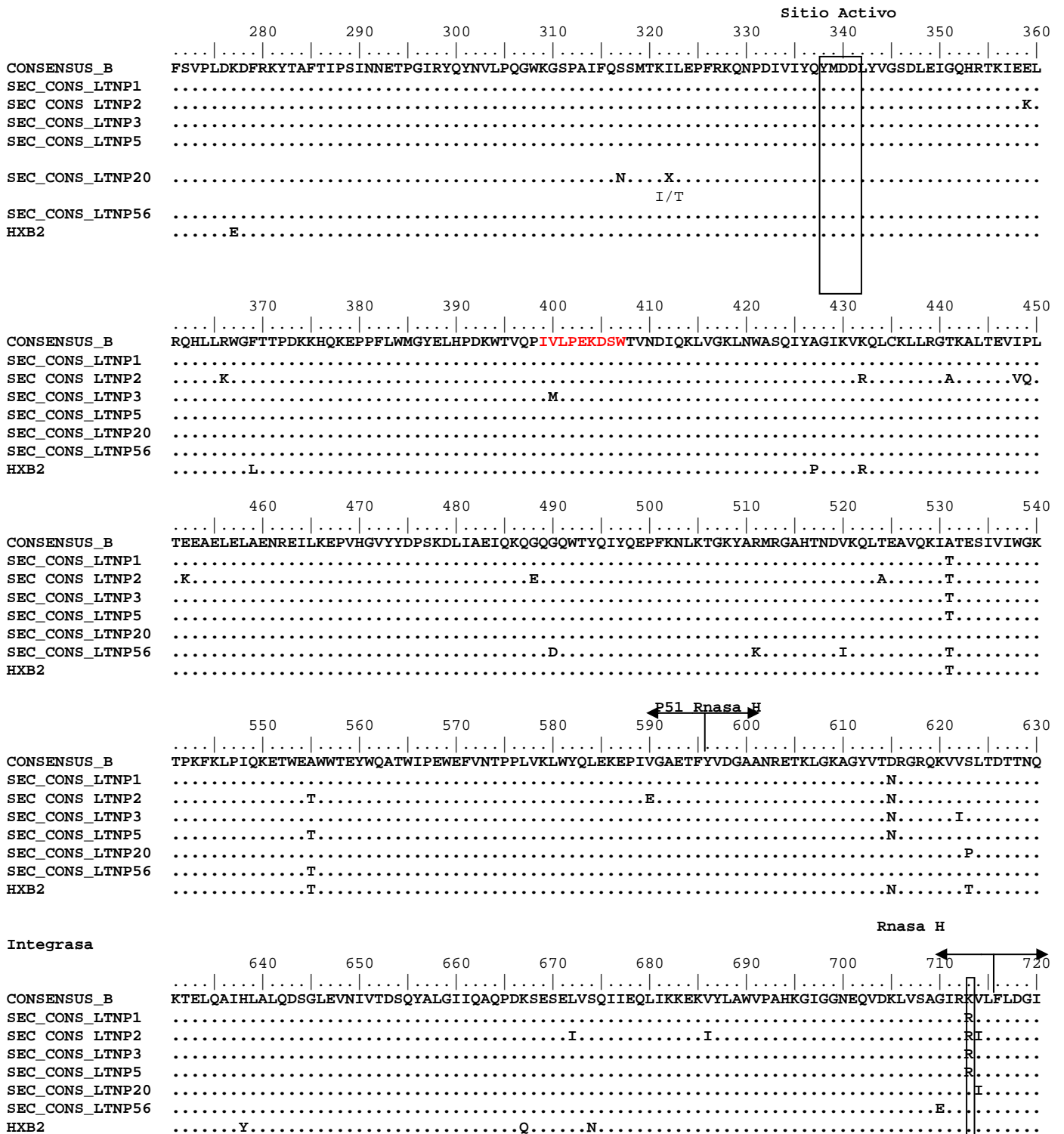


Fig 1: Continuación

VPR

```

.....|...
CONSENSUS_B      RNGASRS*
SEC_CONS_LTNP1   .H.....*
SEC_CONS_LTNP2   .....*
SEC_CONS_LTNP3   .....*
SEC_CONS_LTNP5   .....*
SEC_CONS_LTNP20  .....*
SEC_CONS_LTNP56  .....*
HXB2             .....*
    
```

VPU

	10	20	30	40	50	60	70	80	
CONSENSUS_B	MQSLQLAIVVALVVAALIAIVVWSIVFIEYRKILRQRKIDRLIDRIRERAEDSGNESEGDEEELSALV---EMGHAPWDVDDL*								
SEC_CONS_LTNP1	L.....I.....K.....GE.....Y.....LIN..*								
SEC_CONS_LTNP2VT...I.....KX.....G..IN..*								
	K/R								
SEC_CONS_LTNP3	L.....I.....G.....VINN..*								
SEC_CONS_LTNP5	L.....I.....G.....VINN..*								
SEC_CONS_LTNP20	...V.L.....I.....S.....VIN..*								
SEC_CONS_LTNP56	...X.....I.....S.....Y.....VIN..*								
	I/T								
HXB2	T.PIP.V.....I.....I.....LI.....I.....EMGV.....*								

ENV

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
CONSENSUS_B	MRVKGIRKNYQHLW---RWGTMLLGMLMICSAAEKLWVTVYVGVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWVWATHACVPTDPNPQEVVLE								
SEC_CONS_LTNP1	..EX.....L..X.....								
	G/R								
	M/I								
SEC_CONS_LTNP2I.....X.N.....G								
	A/T								
SEC_CONS_LTNP3	..E.....L..I.....								
SEC_CONS_LTNP5	..E.....L..I.....								
SEC_CONS_LTNP20R.....L.....T.....								
SEC_CONS_LTNP56L.....								
HXB2	...E---K....RWGW.....T.....V								

Fig 1: Continuación

ENV

	100	110	120	130	140	150	160	170	180
CONSENSUS_B								
SEC CONS LTNP1	NVTENFMWKNMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDLMNATNTNT---TIIYRWRGEIKNCFSNITTSIRDKVQKEYAL								
WR.X...TX--SSGGTMEX.....								
A/T T/N/S R/G.....								
SEC CONS LTNP2	X...T.....R...XX---XGGMIEG..M.....M.....								
	N/K.....T/S N/S.....								
N/S.....								
SEC_CONS_LTNP3WR...TS--SSGGTMX.....								
G/E.....								
SEC_CONS_LTNP5WR...TS--SSGGTME.....								
SEC_CONS_LTNP20WK.....S---SNGGTME.....L...K.....								
SEC_CONS_LTNP56D.....R.NCTDLRNNSSSGGXVE.....XX.....								
M/T S/R.....								
I/L.....								
HXB2D.....S.K...K.D...S--SSGRMIMEK.....S...G.....F								
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
CONSENSUS_B								
SEC CONS LTNP1	FYKLDVVPIDN--DNTSYRLISCNTSVITQACPKVSEFPIPIHYCAPAGFALKCNDKKFNGTGPCINVTSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNG								
N--X.....D.....T.....K...K.....I.....								
R/S.....								
SEC CONS LTNP2I.....--ETS.....D.....T.....K.....								
SEC_CONS_LTNP3--S.....N.....T.....K.....								
SEC_CONS_LTNP5--S...L.....D.....T.....K.....								
SEC_CONS_LTNP20DN.SS.....I.....T.....								
SEC_CONS_LTNP56	..X.....K--S.....T.D.....T.....K...K.K...X.....								
	K/N.....N/H.....								
HXB2II.....--T...K.T.....N.T.....								
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
CONSENSUS_B								
SEC CONS LTNP1	SLAEEVVIRSENFDTNAKTIIVQLNESVEINCTRPNNTRKSIHI--GPGRAFYTTEIIGDIRQAHCNISRAKWNNTLKQIVKKLREQ								
IL.X.E.T.....K.....X--.....T.....L.....D.X.X.X.....								
A/D H/P T/A K/R.....								
K/Q.....								
SEC CONS LTNP2D.I.T.....K.....--.....K.....X..Q..X.								
K/E K/T.....								
SEC_CONS_LTNP3D.....X.....T.....L.....X.....								
N/K N/D.....								
SEC_CONS_LTNP5D.....K.....T.....L.....D.....R.....								
SEC_CONS_LTNP20I...A.....T.....--.....L.....DD...A.....								
SEC_CONS_LTNP56D.....X.IX..X.....X.....X.....X.....T.....								
A/T I/M K/T E/K N/S.....								
HXB2V.....T.....R.R.QR...V.I.~K..NM.....AS.....								

Fig 1: Continuación

ENV

	370	380	390	400	410	420	430	440	450
CONSENSUS_B	FG-NKTIVFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTTQLFNSTWNGT-W-----NNTTEGN--ITLPCRKIQIINMWQEVGKAMYAPP								
SEC CONS LTNP1	L-X.V.X	X	X	S	X.E	GX.X.E	XTX	X	
	N/S	N/K	M/T	N/D	I/V	L/S	S/I	E/K	
	I/V					N/K	I/L		
SEC CONS LTNP2	P.T	T	S	LFNSTGN	DTDGSNSTEGT				
SEC CONS LTNP3	L	K	T	DS	X.EES	EGSK	E.XXL		
					V/D		I/T		
							T/P		
SEC CONS LTNP5	L	T	DS	V.E	GS	E.ITL			
SEC CONS LTNP20	L	T	SS	V	EGS	I.K	DT		
SEC CONS LTNP56	YX	X	T	S	V.EGSNVTEGS	E		X	K
	R/M	P/L						I/F	
HXB2	N	I.K	T	S	FNST.ST	EGS	SDT	K	S
.....									
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
CONSENSUS_B	GQIRCSSNITGLLLTRDGGNN--ETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYVVKIEPLGVAPTAKRRRVQREKRAVGIGAMFLGFLGAAGSTM								
SEC CONS LTNP1		X.DS	X					V	
		N/K	T/P						
SEC CONS LTNP2	V	XNG						V	
		M/T							
SEC CONS LTNP3		DXK						V	
		N/S							
SEC CONS LTNP5		DS		L				V	
SEC CONS LTNP20		E.D-G				R		V	
SEC CONS LTNP56	I	NSN				X		V	
						K/R			
HXB2		SNN.S						L	
.....									
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
CONSENSUS_B	GAASMTLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARVLAVERYLKDQQLGIWGCSCGLICTTAVPWNASWSNKS								
SEC CONS LTNP1	L	X	X			X	X	T	
		R/K	H/Q			K/R	I/L		
SEC CONS LTNP2	L								X
									N/S
SEC CONS LTNP3	L							T	
SEC CONS LTNP5	L							T	
SEC CONS LTNP20	L							T	N
SEC CONS LTNP56	L							T	X
									A/V
									A/R
HXB2					I				E

Fig 1: Continuación

ENV

	640	650	660	670	680	690	700	710	720	
CONSENSUS_B									
SEC CONS LTNP1	EIWDNMTWMEWEREIDNYTSLIYTLIEESQNOQEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRO									
	K..X.....N..X.....K.....X.....K.....T.....									
	D/N		S/N						V/I	
SEC CONS LTNP2N..G.....X.....X.....K.....T.....									
	E/K				N/T					
SEC CONS LTNP3	K..N.....N.....K.....X.....									
									V/I	
SEC CONS LTNP5	K..N.....N.....K.....									
SEC CONS LTNP20	K.....N.....K.....V..T.....									
SEC CONS LTNP56	K..N.....N.....K.....X.T.....									
									V/A	
HXB2	Q..NHT....D..N.....HS.....N.....L.....									
	730	740	750	760	770	780	790	800	810	
CONSENSUS_B									
SEC CONS LTNP1	GYSPLSFQTRLPA PRGPDRPEGIEEEEGERDRDRSGRLVDGFLALIWDDLRSCLF SYHRLRDL LLI VTRIVELLGRRGWEVLKYWNLL									
	F/L		G/D		S/G		I/V		I/N	
	R/H									
SEC CONS LTNP2K.....I..V.....A.....									
SEC CONS LTNP3D.....G.....F.V.....									
SEC CONS LTNP5D.....G.....F.V.....									
SEC CONS LTNP20D..Q...S..G...F.V.....V.....T.....									
SEC CONS LTNP56	P.....T.....		S.....		F.V.....		P.....		X..X..	
									K/N N/S	
HXB2H..T.....I..N.S...A.....									
	820	830	840	850	860					
CONSENSUS_B									
SEC CONS LTNP1	QYWSQELKNSAVSLLNATAI A VAEGTDRVIEVVORACRAILHIPRRIRQGLERALL*									
F.....X..L..Y.....T.....*									
	V/A									
SEC CONS LTNP2TI..V.....XL..I.....T.....*									
	V/A									
SEC CONS LTNP3Q.....L..Y.....T.....T...*									
SEC CONS LTNP5L..Y.....T.....*									
SEC CONS LTNP20N.....L..Y...I..T.....V...*									
SEC CONS LTNP56T.....XL..Y..F..T.....*									
	V/I									
HXB2G...R.....I...*									

Fig 1: Continuación

TAT

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CONSENSUS_B  MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKGLGISYGRKKRRRQRRRAPQDSQTHQVLSKQPASQPRGDPTGPKESKKK
SEC_CONS_LTNP1 .....R...T.....K.....Q..S.....T.R.....
SEC_CONS_LTNP2 .....R...T.....L.....TK.A.....
SEC_CONS_LTNP3 .....R...T.....
SEC_CONS_LTNP5 .....R...T.....T.....
SEC_CONS_LTNP20 .....T.....A.....
SEC_CONS_LTNP56 .....R...T.....S..N.....P.....P.....
HXB2 .....A.....H.N.....A.....T.....*..
    
```

```

          100
.....|.....|..
CONSENSUS_B  VERETETDPVD*
SEC_CONS_LTNP1 .....*
SEC_CONS_LTNP2 .....N.E.*
SEC_CONS_LTNP3 M.....A*
SEC_CONS_LTNP5 M.....GA*
SEC_CONS_LTNP20 M.SK.....A*
SEC_CONS_LTNP56 .....A...A*
HXB2 .....F.*
    
```

REV

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CONSENSUS_B  MAGRSGDSDEELLKTVRLIKFLYQSNPPSPPEGTRQARRNRRRRWRERQRQIRSISEWILSTYLGRPAEPVPLQLPPLERLTLDCNEDCG
SEC_CONS_LTNP1 .....N.D.....G.....R...F.D.....E.....
SEC_CONS_LTNP2 .....R.....K..G...N...T.....N.....
SEC_CONS_LTNP3 .....L.G...F.....
SEC_CONS_LTNP5 .....AL.G...F.....
SEC_CONS_LTNP20 .....L.....A...Q.L.G...F...T.....G..

SEC_CONS_LTNP56 .....D..R.I.....L.G.L..F.....X..
                                                                D/N
HXB2 .....IR.....L.....N.....H...R..G...S.....
    
```

```

          100      110
.....|.....|.....|.....|..
CONSENSUS_B  TSGTQGVGSPQILVESPAVLESSTKE*
SEC_CONS_LTNP1 .....T.....*
SEC_CONS_LTNP2 .....T.....*
SEC_CONS_LTNP3 .....T...T.*
SEC_CONS_LTNP5 .....T.....*
SEC_CONS_LTNP20 .....N.E...T.....*
SEC_CONS_LTNP56 .....X...T...X.*
                I/L      K/Q
HXB2 .....T.....*
    
```

Fig 1: Continuación

NEF

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
CONSENSUS_B	MGGKWSKRSVVCWPTVRRERMRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAISSNTAANNADCAWLEAQEEE-EVGFPVVRPQVPLRPMTYK GALDLSH								
SEC_CONS_LTNP1C.AD...A.....T.S.....Y...--TD..T.....-.....I.....								
SEC_CONS_LTNP2P..AA.....V.....V.....A.....X.....								
SEC_CONS_LTNP3DR..A.....X..A.....X.-.....X....								
					N/T	E/G			L/V
SEC_CONS_LTNP5MDR..A.....T..A.....-.....V....								
SEC_CONS_LTNP20GDR..A.....Q.....R.....T..A.....-.....F.....								
SEC_CONS_LTNP56XN.DR..A.....E.....N.....X..A.....-.....A.V....								
	R/H				A/T				
HXB2S..I.....R..A.....T..A.....-.....T.....A.V....								
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
CONSENSUS_B	FLKEKGGLEGLIYSQKRQDILDLVVYHTQGYFPDWNYPGPGIRYPLTFGWCFKLVPEPEKVEEANEENSSLHPMSLHGMDDPERE								
SEC_CONS_LTNP1H.....T.....L.....I.....E.....								
SEC_CONS_LTNP2H.....KX.X.....K.....E..K.								
						P/S			
						E/D			
SEC_CONS_LTNP3H.....T.....I.....E..K.								
SEC_CONS_LTNP5H.....T.....I.....E..K.								
SEC_CONS_LTNP20H..E.....T.....I.....E..K.								
SEC_CONS_LTNP56H..R.....X.F.....X.....X..E..K.								
				I/T		Q/R		L/P	
HXB2H..R.....I.....*.....V.....Y.....D.I..K..T..V.....								
	190	200							
CONSENSUS_B	VLVWKFDSRLAFHHMARELHPEYYKDC*								
SEC_CONS_LTNP1N.*								
SEC_CONS_LTNP2	..M.....N.*								
SEC_CONS_LTNP3N.*								
SEC_CONS_LTNP5N.*								
SEC_CONS_LTNP20	..M.....V.....N.*								
SEC_CONS_LTNP56	..M.....S...X.X...X..XX.N.*								
	H/Y	H/Y	Y/S						
	K/R	Y/F							
HXB2	..E.R.....V.....F.N.*								

Fig 1: Continuación

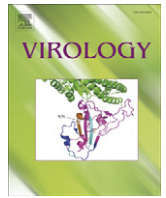
ROJO: EPÍTOPOS B57
AZUL: EPÍTOPOS B27
VERDE: MUTACIONES ESCAPE

Paciente		Año Muestra	Carga Viral	CD4 ⁺ cel/ml	CD8 ⁺ cel/ml	CD4/CD8	B-2 µg/ml ^a	Título Ab ^b	
LTNP 1		Mayo 98	<500	830	1132	0.7			
		Oct 98	1100	867	1199	0.7			
		Mayo 99	98	725	987	0.7			
		Nov 99	79	786	1206	0.7			
		Abril 00	367	868	1158	0.7			
		Oct 00	90	795	973	0.8			
		Abril 01	<50	746	1176	0.6			
		LTNP1.1	19.11.01	<50	815	1197	0.7		
			Julio 02	102	690	1011	0.7		
		LTNP1.2	17.02.03	<50	883	1285	0.7		1x10 ³
		LTNP1.3	3.03.04	125	628	1023	0.6	1.9	
			Junio 04	267	779	1098	0.7		
		LTNP1.4	21.09.05	112	657	1206	0.5		3x10 ⁴
			Mar 07	70	595	1196	0.5		
		Mayo 08	724	518	1151	0.4			
LTNP 2		Ago 97	<500	1066	1146	0.9			
		Mar 99	<500	1067	1157	0.9			
		Nov 99	96	1312	1042	1.3			
		Nov 00	<50	1215	1114	1.1			
		Mayo 01	205	967	859	1.1			
		LTNP2.1	28.11.01	53	1387	1272	1.1		
		LTNP2.2	1.10.02	<50	1834	1285	1.4		2x10 ⁴
	LTNP2.3	8.10.03	<50	1433	1142	1.3	0.1	1x10 ⁴	
LTNP 3		Ene 98	<500	1153	933	1.2			
		Nov 98	<500	1123	636	1.8			
		Oct 99	<50	1043	685	1.5			
		Mar 00	<50	952	639	1.5			
		LTNP3.1	4.02.02	<50	850	651	1.3		
		LTNP3.2	24.02.03	<50	800	535	1.5		8x10 ³
		LTNP3.3	8.10.03	<50	819	600	1.4		
		LTNP3.4	12.04.04	<50	823	567	1.5		
		LTNP3.5	10.01.05	<50	880	604	1.5		3x10 ³
		LTNP3.6	26.01.05	<50	880	604	1.5	2.2	
			Jul 05	<50	867	554	1.6		
			Ene 07	<50	812	529	1.5		
			Sep 07	<50	942	732	1.3		
			Abr 08	<50	539	275	2		
		Oct 08	<50	515	204	2.5			
		Feb 09	<50	512	432	1.2			
		Jun 09	<50	633	540	1.2			
LTNP 5		May 98	<500	931	1257	0.7			
		Feb 99	674	1148	1489	0.8			
		Ene 00	58	1185	1501	0.8			
		Feb 01	<50	1132	1583	0.7			
		LTNP5.1	11.06.02	<50	1095	1412	0.8		
		LTNP5.2	7.04.03	<50	842	1218	0.7		4x10 ⁵
		LTNP5.3	26.05.04	<50	592	844	0.7		

Paciente		Año Muestra	Carga Viral	CD4 ⁺ cel/ml	CD8 ⁺ cel/ml	CD4/CD8	B-2 µg/ml ^a	Título Ab ^b
LTNP 5	LTNP5.4	1.12.04	<50	762	1044	0.7	4.1	
	LTNP5.6	10.10.05	<50	559	746	0.7		1x10 ⁶
		Dic 05	<50	728	2128	0.6		
		Nov 06	<50	793	1302	0.7		
		May 07	215	877	1308	0.7		
		Mar 08	104	756	1123	0.7		
		Nov 08	<50	865	1283	0.7		
LTNP 17		Jun 99	<50	1325	610	2.2		
		Abr 00	<50	1742	747	2.3		
		Jun 02	<50	1234	595	2.1		
		Sep 03	<50	1307	714	1.8		
	LTNP17.1	10.05.04	<50	1354	643	2.1		2x10 ⁴
	LTNP17.2	17.11.04	<50	1220	614	2	1.29	
	LTNP17.3	31.10.05	<50	1440	939	1.5		
	LTNP17.4	5.06.06	<50	1251	645	1.9		1x10 ⁴
	Ene 08	<50	1081	607	1.8			
LTNP 20		Dic 99	90	856	906	0.9		
		Feb 01	<50	757	843	0.9		
	LTNP20.1	18.10.04	51	894	740	1.2		3x10 ⁵
	LTNP20.2	13.06.05	<50	855	697	1.2	2.48	
	LTNP20.3	26.04.06	<50	855	885	1.0		3x10 ⁴
		Ene 07	<50	1028	937	1.1		
		Feb 08	69	1175	1244	1		
		Nov 08	<50	1102	1021	1.1		
	Mar 09	<50	1133	877	1.3			
LTNP 21	LTNP21.1	2.02.05	<50	718	740	1		2x10 ⁴
	LTNP21.2	11.05.05	<50	487	401	1.2	3.2	
	LTNP21.3	1.06.05	<50	433	218	2		2x10 ⁴
		Nov 05	<50	373	234	1.6		
	LTNP21.4	16.01.06	<50	512	274	1.9		
		May 06	<50	793	616	1.3		
		Oct 06	<50	866	839	1		
LTNP56		Ene 98	1343	967	593	1.6		
	LTNP 56.1	1.06.98	627	1034	507	2		
		Nov 98	<500	728	432	1.7		
	LTNP 56.3	08.02.99	1762	969	434	2.2		
		May 99	<50	912	456	2		
		Oct 99	<50	1162	591	2		
	LTNP 56.4	28.02.00	<50	946	571	1.7		
		Jun 00	<50	727	371	2		
		Nov 00	<50	1048	627	1.7		
		Mar 01	<50	1179	652	1.8		
	LTNP 56.6	11.07.01	300	824	422	2		

Paciente		Año Muestra	Carga Viral	CD4 ⁺ cel/ml	CD8 ⁺ cel/ml	CD4/CD8	B-2 $\mu\text{g/ml}^a$	Título Ab ^b
LTNP 56		Nov 01	<50	987	527	1.9		
	LTNP 56.7	08.04.02	109	974	557	1.7		3X10 ³
	LTNP 56.8	15.10.02	<50	1111	591	1.9		
		Ene 03	51	909	462	2		
		Jun 03	<50	941	454	2.1		
	LTNP 56.9	15.12.03	<50	828	488	1.7		
	LTNP56 10	14.06.04	<50	972	457	2.1		
	LTNP56.11	29.11.04	<50	938	437	2.1	1.8	
	LTNP56.12	20.12.04	<50	938	437	2.1		
	LTNP56.13	8.06.05	<50	906	466	1.9		3X10 ³
		Dic 05	<50	956	452	2.1		
	LTNP56.14	19.06.06	158	1063	470	2.3		
		Dic 06	<50	1087	477	2.3		
		Jul 07	<50	1279	583	2.2		
		Ene 08	<50	1235	605	2		
		Ago 08	<50	1044	405	2.6		
	Dic 08	<50	1138	513	2.2			
	Ago 09	<50	1066	467				

Tabla 1. Características virológicas e inmunológicas de los pacientes LTNP ancestrales a lo largo del seguimiento. Las muestras presentes en el laboratorio presentan la nomenclatura de LTNP seguido del número de la muestra. a) Concentración de Beta 2 microglobulina, b) Título de anticuerpos frente a gp160 del VIH-1.



A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNP

Virginia Sandoñs^{a,1}, Concepción Casado^{a,1}, Tamara Alvaro^a, Maria Pernas^a, Isabel Olivares^a, Soledad García^b, Carmen Rodríguez^b, Jorge del Romero^b, Cecilio López-Galíndez^{a,*}

^a Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Pozuelo Km 2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

^b Centro Sanitario Sandoval (CSS), IMSALUD, Comunidad Autónoma de Madrid, Madrid 28010, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2009

Returned to author for revision 19 March 2009

Accepted 20 May 2009

Available online 25 June 2009

Keywords:

HIV-1 Genetic variation Evolution LTNP

Ancestral LTNP

Modern LTNP

HIV controllers

Elite controllers

Viral DNA

Deletions

Complete genome sequence

Host factors

HLA

ABSTRACT

We studied viral evolution in three HIV-1 ancestral patients from a group of LTNP; although some minor sequences showing viral evolution were detected in all patients, the extremely low viral evolution of their viruses was shown by the phylogenetic analysis of the *env* sequences. Complete nucleotide sequencing of viral DNA showed the major presence of deletions. In two patients, deletions of 1088 and 228 nucleotides mapped to 5' LTR-*gag* region; in the other, a 247 nucleotide deletion was positioned in *pol* gene up to the *vif* ORF. These deleted genomes became dominant during follow up. Patient's viruses displayed 13 common mutations in conserved residues, from the 5' LTR to the *nef* gene. These mutations provided evidence of a common origin. Regarding host characteristics, one patient had HLA B2705/B5801; another B1402/B5701; whereas a third showed B3901/B4402 and was Δ 32-CCR5 heterozygous. These HIV controllers presented a combination of deleted viral genomes and host protective factors.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Individuals achieving stricter control of viral replication among long-term non-progressor patients (LTNP) (Buchbinder et al., 1994; Keet et al., 1994; Learmont et al., 1992; Lifson et al., 1991; Sheppard et al., 1993) are designated HIV controllers, elite suppressors, or elite controllers (Bailey et al., 2006; Blankson et al., 2007; and Saez-Cirion et al., 2007). We defined a group of ancestral LTNP showing only ancestral nucleotide sequences, i.e. sequences close in dating time to seroconversion (Bello et al., 2005) with a viral dating methodology (Bello et al., 2004) based on the analysis of nucleotide sequences. Similarly, another group of LTNP, referred to as modern, displayed modern viral dating: i.e. sequence time estimation close to the sampling date (Bello et al., 2005). In the ancestral group, the viral dating resulted from the absence of viral evolution since primary-infection; whereas in the modern subset, the classification was determined as a consequence of continuous viral replication (Bello et al., 2005). Because the HIV patients of the study—who display the ancestral viruses—fulfill all the criteria for HIV controllers or elite controllers, these distinct categories of HIV controllers or elite

controllers and ancestral LTNP should be considered equivalent. Similarly, patients with modern viruses are also equivalent to clinical LTNP.

The control of viral replication in LTNP has been associated with various host, immune, and viral factors. Regarding host characteristics, certain HLA alleles, particularly HLA B*27 and B*57, have been found to be overrepresented in LTNP (Migueles et al., 2000). Other genetic markers, such as the heterozygous Δ 32 CCR5 genotype have been related to a longer clinical evolution and control of viral replication (Stewart et al., 1997; Wu et al., 1997a). Other polymorphisms in CCR2, CCL3L1 and CCR5 have been associated with LTNP (Gonzalez et al., 2001; Gonzalez et al., 2005).

From a virological point of view, important deletions and deleterious mutations have been found predominantly in the *nef* gene (Deacon et al., 1995; Kirchoff et al., 1995) but also in *tat*, *rev*, *vif*, and *env* genes of viruses from LTNP (Alexander et al., 2000; Calugi et al., 2006; Farrow et al., 2005; Wu et al., 1997b). Viral mutations occurring in the complete genome of one LTNP were reported (Wang et al., 2003); in the replicating viruses of four Elite controllers (Blankson et al., 2007); in a transmitted pair (Bailey et al., 2008); in one Italian patient (Calugi et al., 2006); and recently in 17 elite controllers LTNP from a Boston cohort (Miura et al., 2008).

We studied viral evolution in three HIV-1 ancestral LTNP with extremely low viral evolution. During follow up of these patients, we

* Corresponding author. Fax: +34 91 509 79 19.

E-mail address: clopez@isciii.es (C. López-Galíndez).

¹ Both authors equally contributed to this work.

estimated the genetic variation of the viral quasispecies in the *env* gene, and these data were correlated with clinical, immunological and host markers. Finally, we determined the complete nucleotide sequence of the viral DNA from the three patients in whom we detected, as common characteristics, the major presence of deleted forms and 13 unusual mutations in the viral genome.

Results

Clinical, virological, immunological and host characteristics of the patients

Viral evolution was studied in viruses from three HIV-1 LTNP (patients 3, 20 and 56) with an extreme control of their viral replication. For these viruses, the time estimation of the nucleotide sequence or “viral dating” was ancestral—close to the seroconversion time (Table 1) (Bello et al., 2005). Plasma viral load in those patients, except for independent blips below 2000 cp/ml, was below the detection limit (<50 copies/ml) (Table 1 and Fig. 1). DNA copies per million cells were estimated close to 2 copies in patients 3 and 56 and at a mean of 55 in patient 20 (Table 1). These characteristics show that these patients could also be considered HIV controllers or Elite controllers (Blankson et al., 2007; Pereyra et al., 2008). The viruses from these ancestral patients were compared with those of two LTNPs (patients 7 and 30) infected for the same period of time, but displaying viruses with “modern dating” (Table 1). The viral load of modern patients was below 2000 copies in patient 7; above this threshold in patient 30, and the mean DNA load was 14.3 and 46.8 copies/10⁶ PBMC respectively. The co-culture of the patient PBMCs, performed in one or two samples per patient, was negative in all the ancestral patients but positive for those with a modern dating. The same co-culture method (see Materials and methods) was positive in

only one of another 8 ancestral LTNPs but in 6 out of 8 with modern dating (data not shown).

Regarding immunological characteristics, ancestral patients (3, 20 and 56) presented normal values of CD4+, CD8+ cells and β-2 microglobulin. In the two modern LTNPs patients (30 and 7) their values were very different for all markers, including a CD4+/CD8+ inverted ratio <1 (see Fig. 1 and Table 2).

In relation to host characteristics, patient 3 showed the protective HLAs B2705/B5801 alleles, patient 56 the B5701, whereas patient 20 showed the B4402 allele together with the protective CCR5 Δ32 genotype (Table 2). Modern LTNP 7 showed the protective HLA A2601 and B4403 alleles and it was Δ32 heterozygous, while patient 30 displayed the A2601 haplotype. The analysis of all these virological, immunological and host markers support the drastic differences between HIV-1 ancestral patients and the modern LTNPs.

Phylogenetic analysis of the patient viral quasispecies

Viral evolution was analyzed in the viral DNA from the patients PBMC. Patient viral nucleotide sequences, in the C2–V5 region of *env* gene, were obtained from 6 to 28 nested PCR products per sample performed at limiting dilution. Each patient studied displayed all its viral sequences in one cluster of a general tree (data not shown). In the viruses from the HIV ancestral patients 3, 20 and 56, the Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees showed extremely short branch length (Fig. 2) and consequently an extremely low viral evolution from their MRCA (Most Recent Common Ancestor), in spite of the ancestral patients having been infected for more than 18 years. The genetic heterogeneity obtained in each sample was extremely low (with mean values below 1%) (Table 1). In addition, all viral divergence values were always below 1.5% and moreover they did not increase with time (Table 1).

Table 1
Virological data of the patients.

Patient	Sampling date (month/year)	Serocon /year ^a	Viral Dating ^b	HIV-1 RNA (copies/ml)	HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ PBMCs)	Heterogeneity ^c	Divergence ^d
LTNP3	02/03	<1988	1986	<50	1.0	0.70 ± 0.18	1.27 ± 0.43
	10/03		1986	<50	1.6	0.42 ± 0.19	1.00 ± 0.63
	04/04		1986	<50	1.2	0.29 ± 0.16	1.31 ± 0.48
	01/05		1986	<50	4.3	1.27 ± 0.31	1.36 ± 0.41
Mean				2.0	0.67	1.23	
LTNP 20	10/04	1988	1988	51	75.6	0.59 ± 0.16	1.32 ± 0.50
	06/05		1988	<50	29.8	0.52 ± 0.14	1.29 ± 0.50
	04/06		1988	68	59.6	0.01 ± 0.00	1.12 ± 0.50
Mean				55	0.37	1.24	
LTNP56	06/98	<1989	1987	627	1.2	0.53 ± 0.17	0.72 ± 0.30
	02/99		1987	1762	1.6	0.47 ± 0.14	0.44 ± 0.19
	02/00		1987	<50	2.2	0.08 ± 0.08	0.23 ± 0.18
	07/01		1987	300	ND	0.34 ± 0.12	0.54 ± 0.26
	04/02		1987	109	1.3	0.23 ± 0.14	0.42 ± 0.24
	11/04		1987	<50	2.6	0.90 ± 0.25	1.87 ± 0.54
	06/05		1987	<50	3.4	0.15 ± 0.10	0.28 ± 0.19
Mean				1.9	0.39	0.64	
LTNP7	09/02	1987	2001	672	13	5.83 ± 0.27	4.78 ± 0.74
	09/04		681	13	8.74 ± 0.50	6.15 ± 0.12	
	03/05		818	17	11.33 ± 0.34	9.55 ± 1.36	
Mean				724	14.3	8.63	6.83
LTNP30	01/98	<1989	2000	4973	18	9.27 ± 0.45	6.99 ± 0.67
	12/98			5062	7	11.09 ± 0.55	8.65 ± 0.83
	04/00			17567	64	11.26 ± 0.43	10.03 ± 1.10
	09/01			2518	16	5.00 ± 0.38	13.95 ± 0.32
	04/02			5890	31	5.57 ± 0.35	14.68 ± 0.26
	09/02			15381	76	7.65 ± 0.40	13.86 ± 0.16
	04/04			46819	116	11.15 ± 0.46	13.29 ± 1.05
Mean				14030	46.8	8.71	11.63

^a Estimation of the seroconversion year.

^b Viral dating estimated according to Bello et al. (2004).

^c Heterogeneity is the mean nucleotide genetic distance as a percentage between all pair-wise comparisons of sequences from each time point ± SEM (See Materials and methods).

^d Divergence is the mean nucleotide genetic distance as a percentage of all pair-wise comparisons of sequences to the MRCA ± SEM. (See Materials and methods).

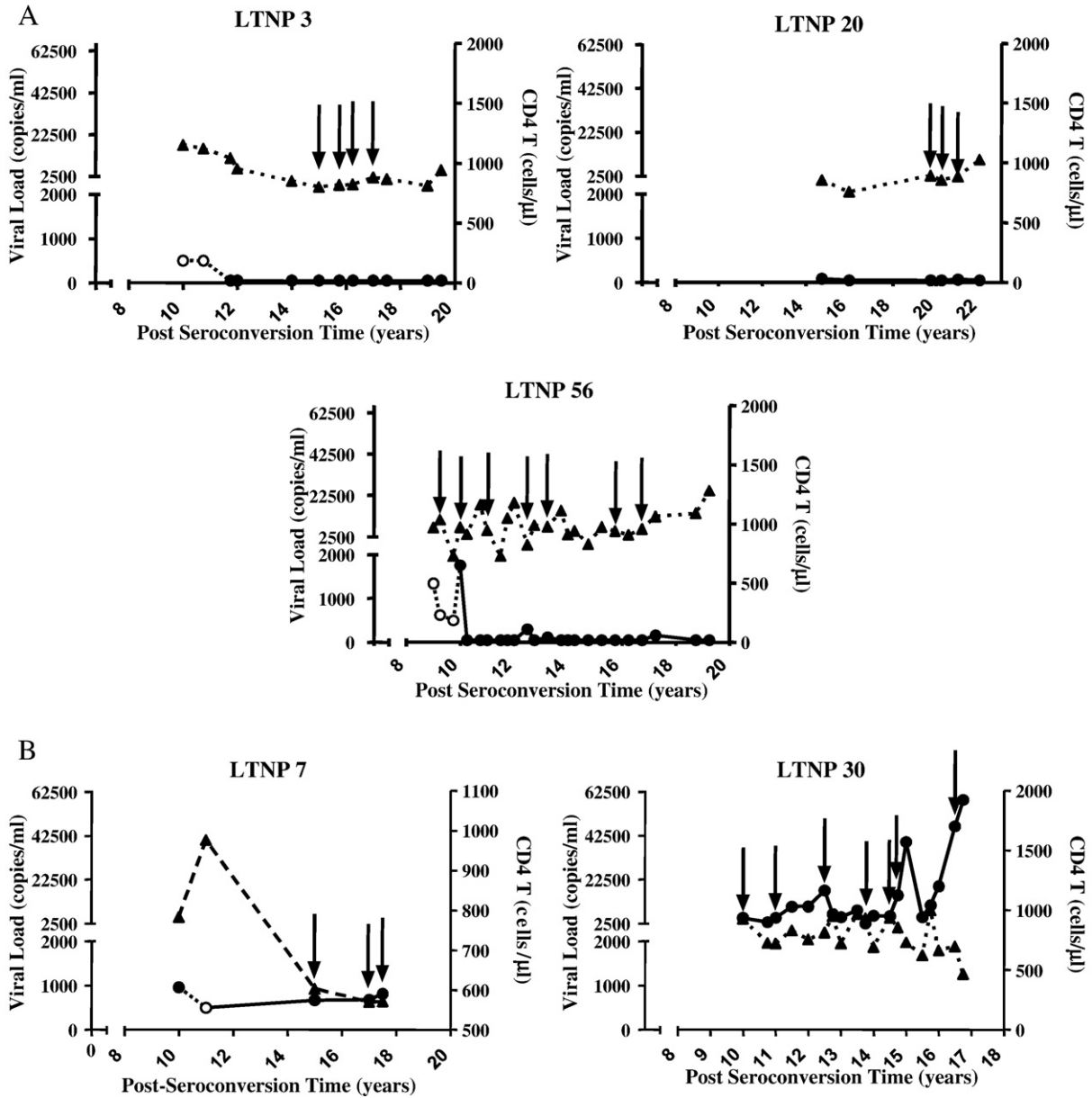


Fig. 1. Plasma RNA viral load and CD4+ T cell values over time in the patients studied. Each graph represents plasma viral load and CD4+ T numbers as a function of time. Plasma RNA viral loads (copies/ml) are shown by solid black circles on the left vertical axis and are joined by a solid line. Empty circles represent viral loads determined by the Amplicor HIV Monitor test with a detection limit of 500 copies/ml. For samples with an RNA viral load below the detection limit (50 cp/ml), we assigned a value of 50 cp/ml. Numbers of CD4+ T cell counts are depicted on the right vertical axis and marked by solid black triangles and joined by a dotted line. Arrows indicate the samples in which viral quasisppecies were analyzed. In A) are shown the graphs of LTNPs 3, 20 and 56 displaying ancestral viruses; whereas B) display the values of LTNPs 7 and 30 with modern viruses.

In contrast, the phylogenetic trees of the viruses from the two modern LTNPs (patient 7 and 30) showed a progressive increase in the divergence from the MRCA (from 4.78 to 9.55% in 3 years and from 6.99 to 14.68% in 6 years respectively) as can be seen by the longer branches in the phylogenetic trees (Fig. 2B). Viruses from modern patients also showed much higher heterogeneity values (from 5.83 to 11.33% in patient 7 and (from 9.27 to 11.15%) in patient 30.

In addition, in every HIV ancestral patient, we found, however, minority sequences (encircled in the trees of Fig. 2A) showing longer genetic distances to the MRCA. These sequences displaying more evolution were observed in one sequence of patient 3 (1.8%), in 2 sequences (2.6%) of patient 20 and in 10 sequences (11%) of patient 56. In patient 3, the evolved sequence (3.5.59) diverged by a mean of 5.6% to the MRCA. In patient 20, sequences (20.1.36 and 20.2.7) obtained in different years-showed a 5.8% genetic distance to the MRCA. In patient 56, 10 sequences of sample 11/04 showed a mean

divergence of 2.4%. In spite of the presence of these minority evolved sequences, all virological data studied showed that viral populations within this subset of HIV ancestral LTNPs have remained highly homogeneous and have not diverged from the infecting viral populations.

Complete nucleotide sequencing

To analyze if the absence of viral evolution observed in the patients with ancestral dating was a consequence of defects in the viruses, complete nucleotide sequencing from viral DNA was undertaken. A complete consensus sequence from sample 01/05 of patient 3, sample 10/04 from patient 20 and sample 11/04 from patient 56 (Table 4), achieved with the BioEdit program and derived from at least three different amplifications, was derived from three fragments covering

Table 2
Immunological and genetic characteristics of the patients.

Patient	Sampling year	CD4 ⁺ cells/μl	%CD4 ⁺	CD8 ⁺ cells/μl	%CD8 ⁺	Ratio	β-2 μg/ml	CCR5	HLA-A	HLA-B
LTNP 3	02/03	800	43.5	535	29	1.5	1.7			
	10/03	819	42.9	600	31	1.4				
	04/04	823	44.7	567	31	1.5				
	01/05	880	43.8	604	30	1.5				
Mean		830	44	576	30	1.5				
LTNP 20	10/04	894	43	740	36	1.2	2.48	+/ Δ32	A0201/A2902	B3901/ <u>B4402</u> ^b
	06/05	855	43	697	35	1.2				
	04/06	855	40	885	40	1.0				
	Mean		868	42	774	37				
LTNP 56	06/98	1034	49	507	24	2	1.1	+/ Δ32	A0101/A0201	B1402/ B5701
	02/99	969	54	434	24	2.2				
	02/00	946	46	571	28	1.7				
	07/01	824	50	422	26	2				
	04/02	974	45	557	26	1.7				
	11/04	938	50	437	23	2.1				
	06/05	906	48	466	25	1.9				
	Mean		941	49	485	25				
LTNP 7	09/02	603	15	2718	66	0.2	2.7	+/ Δ32	A2601 /A2902	<u>B4403</u> /B4901
	09/04	570	15	2073	71	0.2				
	03/05	571	15	3212	74	0.2				
	Mean		581	15	2668	70				
LTNP 30	01/98	930	36	1058	41	0.3	3.8	+/ Δ32	A1101 / A2601	<i>B1501</i> / <i>B3501</i> ^c
	12/98	723	35	869	43	0.8				
	04/00	812	35	1016	44	0.8				
	09/01	933	33	1263	44	0.7				
	04/02	937	32	1271	44	0.7				
	09/02	858	30	1218	42	0.7				
	04/04	691	31	1001	45	0.7				
Mean		840	33	1099	43	0.6				

All these effects as in (Altfeld et al., 2006).

^a Bold font indicate a strong protective HLA and Δ32 protective alleles.

^b Underlined haplotypes are genotypes with a milder protective effect.

^c HLA in italics are associated with AIDS progression.

the complete genome (see Materials and methods). Consensus sequence is shown in Fig. 1 of supplementary material.

The most important and common characteristic found in ancestral patient's viral DNA was the major presence of deletions in the genomes. These deletions were dominant in patient's quasispecies (Table 3). The 247 nucleotides deletion in patient 3 was localized in *pol* gene from nucleotide 4865, corresponding to amino-acid 928 in integrase, until amino-acid 23 in *vif* protein (Fig. 3). This deletion maintained the open reading frame between integrase and *vif* protein that could result in a fusion protein. In patients 20 and 56, the deletions mapped in the 5' LTR (Fig. 3). In patient 20, the major deletion was of 1088 nucleotides (43% of the quasispecies) although four other deleted genomes in the same region of 533 nucleotides (present in 15%) and of 967, 501 and 134 nucleotides were detected (each present in 7% in the viral population and not shown in Fig. 3). Patient 56 showed a major deletion of 228 nucleotides (37%) but also another of 120 nucleotides present in 18% in the viral population (Fig. 3). Genomic analysis of the same LTR-*gag* region, in 4 other ancestral patients (with similar viral and clinical evolution), in 5 modern LTNPs and in 4 regular progressors (Table 3) was performed. This analysis showed that, although some deletions were observed in other LTNPs (ancestral and modern) and in regular progressor, the presence of deleted genomes was higher in the viruses from the ancestral patients of our study and its frequency decreased until the regular patient group (Table 3).

In order to evaluate the importance of these deleted DNA viral forms, we quantified their presence in the viral quasispecies in at least

3 samples from each patient. During the follow up, the deleted forms were or became dominant in the DNA quasispecies of all patients. In patient 3, the complete sequence was present at 100% in the first sample (02/03) studied and it was completely substituted by the deleted form in the last sample (01/05) (Table 4). Patient 20 showed, during follow up, the constant frequency of the deleted form at around 75% of the quasispecies (Table 4). Patient 56 showed an increase in the proportion of the deleted form from 33% in the first sample (04/02) to 75% in the last one analyzed (06/05) (Table 4). These results illustrate the dominance and imposition of the deleted forms in the ancestral patients.

Analysis of the mutations occurring in complete genomes

Apart from the major deletions observed in the LTR and integrase region in *pol* gene, analysis of the complete viral nucleotide sequence showed no minor deletions or insertions in the genomes resulting in non-functional proteins as in other studies (Blankson et al., 2007; Wang et al., 2002; Miura et al., 2008). In order to look for a possible role for suboptimal mutations in viral genotype (Alexander et al., 2001), we analyzed the sequences for infrequent changes. Accordingly, we observed 94 positions altered in at least two viruses, in comparison with the consensus subtype B sequence from the Los Alamos data base (LANL) due to a lack of complete genome sequences from Spanish samples. Fifty five alterations were mutated in the three viruses studied. In order to analyze their importance, we selected changes that occurred in conserved positions (those residues present

Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic trees of patients viral sequences in *env* gene. Partial gp120 *env* sequences derived from PBMC DNA, at limiting dilution, of patients 3, 20 and 56 in (A) and modern LTNP 30 and 7 in (B). These late patients were used as controls of patients with the same infection time but showing evolution. Phylogenetic trees are represented along with Spanish reference strain S61 and LAI as outgroups. Sequences are represented with arbitrary symbols corresponding to the sampling year, as explained in the key. Numbers at branch nodes refer to the bootstrap support (only values greater than 60% are shown). Evolved sequences in HIV controllers are included within circular lines. Branch lengths are drawn to scale, but scale in patients 3, 20 and 56 (0.01) is double than in patients 7 and 30 (0.02).

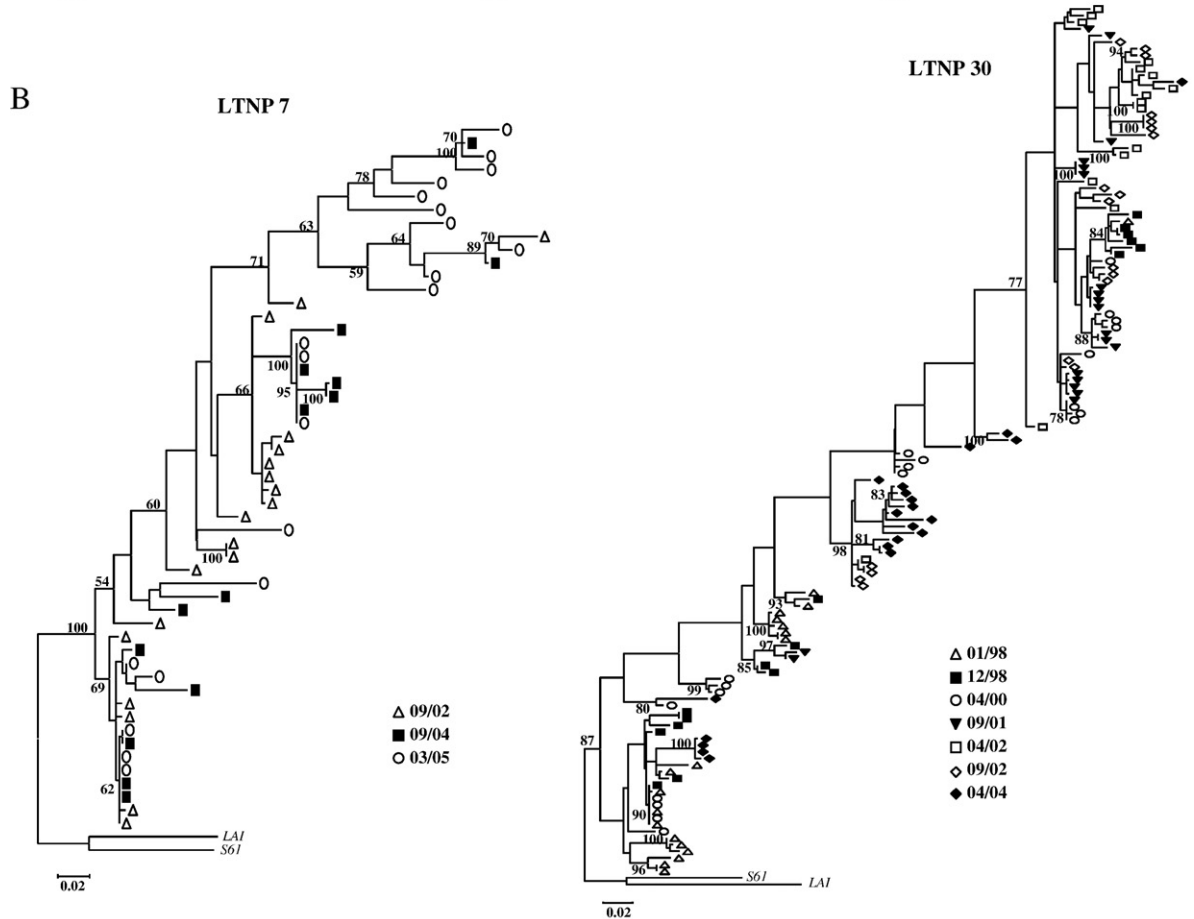
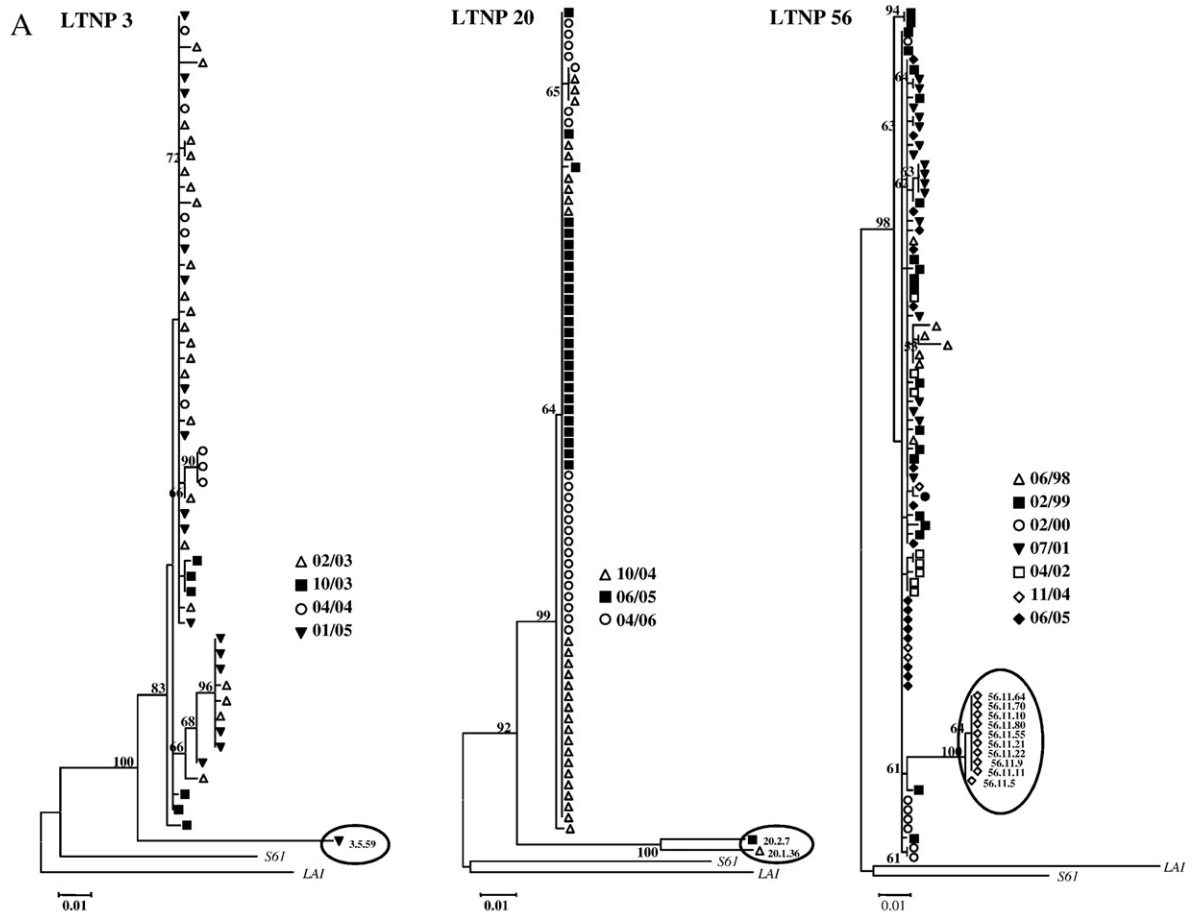


Table 3
Quantification of the deleted genomes in the LTR–gag fragment and pol–vif ORF in the virus from different groups of patients.

Patients	5' LTR–gag region				pol–vif ORF region				
	PCR+/PCR performed	Complete sequence	Δ Sequence		PCR+/PCR performed	Complete sequence	Δ Sequence		
			No.	%			No.	%	
Ancestral patients									
LTNP-3	6+/12	6	0	0	5+/19	0	5	100	
LTNP-20	28+/129	6	22	78.5	5+/11	5	0	0	
LTNP 56	16+/70	7	9	56	7+/23	7	0	0	
Other ancestral^a									
LTNP-2	11+/25	7	4	36	4+/14	4	0	0	
AS-7	10+/25	10	0	0	4+/4	4	0	0	
LTNP-1	5+/7	4	1	20	4+/40	4	0	0	
LTNP-5	9+/34	9	0	0	3+/19	3	0	0	
Modern LTNP^b									
LTNP-7	11+/18	10	1	9	–	–	–	–	
LTNP-14	5+/16	4	1	20	–	–	–	–	
LTNP-16	6+/16	6	0	0	–	–	–	–	
LTNP-19	6+/16	6	0	0	–	–	–	–	
LTNP-30	9+/18	8	1	11	–	–	–	–	
Regular progressors^c									
R-8	11+/15	9	2	18	–	–	–	–	
R-20	6+/15	6	0	0	–	–	–	–	
R-32	7+/15	7	0	0	–	–	–	–	
R-33	6+/15	6	0	0	–	–	–	–	

^a Other LTNP with an ancestral dating under study in our laboratory.

^b LTNP with a modern viral dating.

^c HIV infected patients with a regular infection.

in at least 70% of the subtype B nucleotide sequences of the LANL data base), and also considered that the mutated residue was not frequent in the data base (<15% in subtype B nucleotide sequences) as in

(Alexander et al., 2001). This analysis disclosed 11 residues and 2 nucleotide positions in the 5' LTR which are summarized in Table 5. Among these changes, we identified mutation G123R in p17 gag

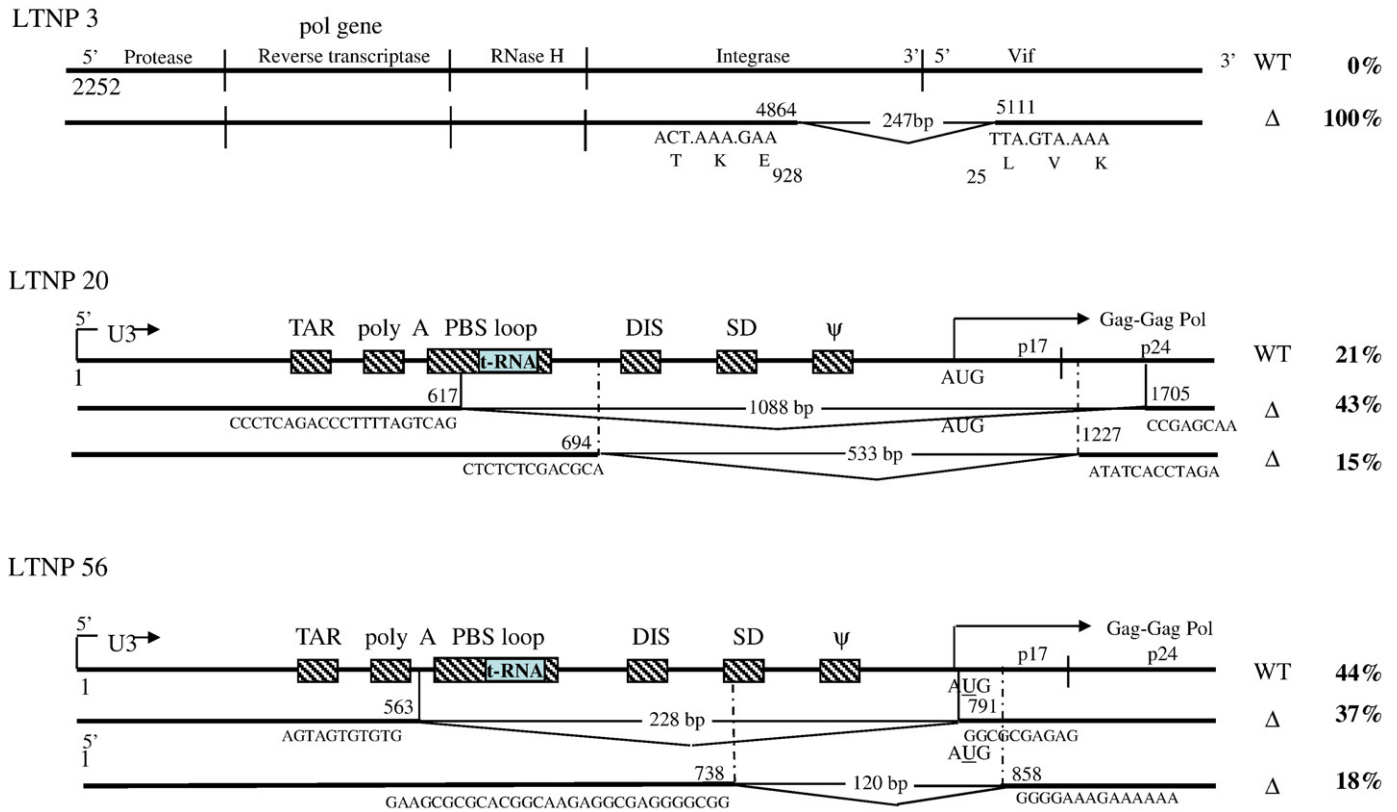


Fig. 3. Schematic representation of the major deletions forms found in the patients studied. In each patient, the upper line correspond the complete wt genome and the lines below depict the major deleted form with the nucleotide numbers (starting at the beginning of the U3 sequence) before and after the deletions. In patients 20 and 56, the hatched boxes represent functional motifs in the leader sequence such as the t-RNA PBS, the dimerization (DIS), the splice donor (SD) and the ψ signals loops (not to scale). In patient 3, the limits of the deletion are shown in nucleotides and in amino acids. Percentages on the right column correspond to the absolute percentage of each genomic form in the quasispecies.

Table 4
Quantification of the major deleted DNA forms in the samples analyzed in each patient.

LTNP 3			
Sampling date ^a	02/03	10/03	01/05#
Complete genome	100%*	55%*	0%
Deleted genome	0%	45%	100%
LTNP 20			
Sampling date ^a	10/04#	06/05	04/06
Complete genome	21%	23.5%	24%
Deleted genome	79%	76.5%	76%
LTNP 56			
Sampling date ^a	04/02	11/04#	06/05
Complete genome	66%	44%	25%
Deleted genome	33%	56%	75%

^aSampling time like in Table 1. Quantification of the different DNA forms has been made by clonal analysis at limiting dilution PCRs. *Quantification performed by acrylamide gel band analysis. # Samples submitted to complete genome analysis.

located in the last residue of a α -Helix, in the C terminal part of the protein. We also detected mutations N372S/G, in the middle of p2, as well as mutation H441Y in the middle of p1. These three mutations were close to proteolytic cleavage sites. The last two mutations were also found in a set of replicating virus in a group of American elite controllers (Blankson et al., 2007). Mutations in gp120 were mapped in the external part of the protein. Among these 11 common changes, 9 represented strong alterations (level 3 or 4) according to Feng et al. (1985) (Table 5).

Discussion

Our study of the virological, clinical and immunological characteristics in three HIV ancestral LTNPs showed extremely low viral evolution a result that was deduced from the genetic variation values (Table 1) and the phylogenetic trees (Fig. 2). The complete genome sequencing of viral DNA, from these patients, showed the major presence (from 56 to 100%) of genomes with deletions as the dominant form. In addition, HIV ancestral patients presented several host protective markers such as HLA B2701, B5701; B5801; or the B4402; and Δ 32-CCR5 genotype. Although differences were evident among the patients, the control of viral replication seems to be achieved by various combinations of virological and host protective factors (Deeks and Walker, 2007).

These results contrast with those obtained by analyzing modern LTNPs patients infected for the same time duration but displaying signs of viral evolution. In these patients, all these virological markers were different (Table 1, Figs. 1 and 2). In addition, deleted genomes were present at a lower proportion (Table 3). In this study we have used the classification of ancestral and modern LTNPs based on the existence of viral evolution. Our patients fulfilled the criteria of Elite controllers or HIV controllers: more than 10 years of infection: <50 cp/ml viral load and blips of less than 2000 copies/ml. Although these categories account for different markers, these ancestral patients are equivalent to the HIV controllers or elite controllers.

Although there is a strict control of viral replication in ancestral patients, multiple evidence showed the occurrence of occasional and constrained viral replication. Viral replication was deduced, for example, by the presence of longer branches in the phylogenetic trees. These sequences were present occasionally and in minor proportion (from 11% to 1.8%) in the quasispecies (Fig. 2 and Table 3), and they cannot be considered to have come from a super or co-infection because they shared, with a high bootstrap value, the same MRCA with the other sequences of each patient (see Fig. 2). These evolved sequences probably represent replicating viruses, and they could correspond to the replicating viruses obtained in another study with 4 elite controllers (Blankson et al., 2007) or the viruses responsible for the persistent viremia in another study (Hatano et al., 2009).

The complete genome analysis disclosed that the three viruses from the ancestral patients presented important deletions. For the

first time in LTNPs, two of the viruses mapped the deletions in the 5' LTR (Visco-Comandini et al., 1999). It is probable that the detection in this region is related to the strategy and position of the primers used for the complete genome sequencing (Miura et al., 2008). To test that these deletions were not a PCR artifact, we amplified the 5' LTR region in these same patients with different primers and with Taq polymerase instead of the Expand High Fidelity for which we obtained the same deletions. We also performed the same comparison in the integrase region in *pol* gene in patient 3 that resulted in an identical deletion. In addition, when analyzing patients with a similar infection time, we found fewer deletions in the 5' LTR region in 9 other LTNPs: 4 ancestral patients (36% to 0%) and 5 modern LTNPs (20 to 0%). Lower percentages were found in 4 regular progressors (18 to 0%) (Table 3). In addition, the presence of deletions in viral quasispecies from regular progressors has been previously described in the *env* gene (Meyerhans et al., 1989) or in other genes (Li et al., 1991).

Deletions in patients 20 and 56 included important motifs for viral replication in the leader sequence, such as the PBS, DIS, SD, and Ψ loops or the lack of p17 in patient 20 (Fig. 3). These deletions make the replication of these viruses unlikely. In addition, the viral deletion in virus from patient 3 maintained the open reading frame between integrase and vif protein.

Both the presence of these deleted viruses and their contribution to the pathology of the infection are still not clear. However the minor presence of deletions from the ancestral to the modern LTNPs group (up to 20%) and their low presence (18%) or absence in regular progressor patients could indicate their importance in HIV pathogenesis (see Table 3). Our ancestral patients showed low DNA viral loads; close to 55 copies per million PBMCs cells in patient 20 or extremely low, close to 2 cells per million PBMCs in patient 3 and 56. Upon activation of these reservoir cells, these deleted viral forms will be transcribed because of their dominance in the quasispecies (from 56% to 100%). However, they will lead to defective or at least less efficient virus. In contrast, the replication of the complete virus will be minor

Table 5

Analysis of infrequent mutations found in common in the complete genome of the patients studied compared to the LANL data base sequences.

Gene	Position ^a	Consensus B		Patients		Acceptability ^c
		NUC	AA	Mutation	% ^b	
5' LTR	68	C		A	0	
	453	T		G	5	
				A	2	
GAG	P17 123		G	R	1	3
	P2 372		N	S	8	5
				G	5	3
	P1 441		H	Y	6	3
POL	9		P	L	14	3
	55		S	G	5	5
VIF	130		S	I	3	2
VPU	77		D	V	5	3
ENV gp120	292		V	I	8	5
	353		F	L	2	4
				Y	9	5
gp41	756		I	F	12	4
NEF	12		G	R	1	3

^a Numbering as in the LANL data base.

^b Percentage of the presence of this nucleotide or amino-acid in the LANL data base.

^c According to (Feng, Johnson, and Doolittle, 1985), where 6 indicates changes by the same amino-acid and 1 changes with the strongest alteration.

which favors the virus control by the immune system. In addition, these deleted forms could contribute to the control of viral replication of the complete virus by an interfering mechanism as previously demonstrated in HIV-1 (Guan et al., 2001; Huang and Baltimore, 1970; Trono, Feinberg, and Baltimore, 1989). On the other hand, the major presence of these deleted forms in viral quasispecies could be the consequence of the elimination, by the immune system at the time of primo infection (Wang et al., 2002), of the cells harboring the complete replicating forms. Perhaps, these deleted genomes could also be generated upon replication of the complete virus by a variant reverse transcriptase or because of structural motifs (such as loops or hairpins) in the deleted regions like in the U5 in the LTR.

Analysis of the common but unusual mutations (infrequent amino acids or nucleotide in conserved residues, Table 5) in the three patients did not indicate a clear defective phenotype. These mutations did not suppose premature stop codons, altered catalytic sites or important changes in the structural motifs of viral proteins as shown in other studies (Blankson et al., 2007; Miura et al., 2008). The presence of these unusual mutations or "signature" alterations in other Spanish samples is unknown because only one complete genome sequence is available in the LANL data base and also because few partial nucleotide sequences from Spain are present in these data bases. Taking into account that the deleterious phenotype could be conferred by a combination of suboptimal mutations (Alexander et al., 2001), the replicative characteristics conferred by the different mutations in single and multiple combinations are under investigation. A recent study has found only three mutations in the *gag* gene (67A, 102E and 389I) with an statistical significance, associated with HIV elite controllers (Miura et al., 2008). Although these mutations did not appear in Table 3 due to the selection criteria, however, patients 3 and 20 showed the 67A and patients 3, 20 and 56 the 102E and 389I in *gag* gene.

The presence of a high number of common mutations in all three patient's viruses indicates a common origin as the consequence of a founder effect. All the nucleotide sequences from these viruses were, however, always segregated (by different phylogenetic analysis), in different branches of phylogenetic trees performed with Spanish samples (Casado et al. manuscript in preparation). This common origin of the viruses is in contrast with previous studies where a common origin was not found in HIV controllers or elite controllers (Blankson et al., 2007; Miura et al., 2008).

Many host factors have been associated with patients having a non progressive HIV-1 infection. The strongest association was found with certain HLA alleles and indeed patients 3 and 56 displayed the B2705, the B5801 and B5701 alleles respectively (Migueles et al., 2000). Patient 20 had the B4402 protective haplotype and the B3901 HLA allele included in the B*27 supertype family that also conferred protective characteristics. Moreover, this later patient was also heterozygous for the $\Delta 32$ CCR5 receptor related to a delayed clinical progression (Stewart et al., 1997). Then the HIV-1 controller patients studied showed at least one, and even two host markers related with non progression.

In the viruses from three HIV ancestral patients we have identified a very limited viral evolution, important deletions and a possible common phylogenetic origin. In addition, these ancestral patients showed important host protective alleles. In summary, control of viral replication in three ancestral patients was achieved by different combinations of virological and host protective factors.

Materials and methods

Study subjects

We analyzed three patients (3, 20 and 56) from the Centro Sanitario Sandoval (IMSALUD) who fulfilled the LTNP criteria: infected for more than 18 years but also with extreme control of

viral replication. Patients 3, 20 and 56 are considered ancestral because the viral dating of the resident nucleotide sequence of the virus was estimated to be close to their seroconversion time (Bello et al., 2004). We compared these patients to control modern LTNPs patients (7 and 30) that were infected for the same duration. Plasma RNA viral load, except for blips in patient 56 and 20, was <50 copies/ml (or <500 copies in older samples). We analyzed three to six samples for each patient obtained from 9 to 19 years after seroconversion and over a period of two to eight years. Patients 3, 56, 7 and 30 have been included in previous studies (Bello et al., 2005, 2007b). Other control patients in the ancestral (LTNP-2, AS-7, LTNP-1 and LTNP-5) and in modern LTNP group (LTNP-14, 16 and 19) and 4 patients with a regular progression (R-8, R-20, R-32 and R-33) were also analyzed in the 5' LTR and *pol* regions (Table 3).

Plasma HIV-1 RNA viral load was quantified with the Branched DNA Siemens versant HIV RNA 3.0 assay (bDNA), with a detection limit of 50 copies/ml. In the two initial samples from patient 2 and the three initial samples from patient 56, the detection limit was 500 copies using the Amplicor HIV Monitor test kit, (Roche Diagnostics Systems, Somerville, NJ).

Virus isolation by co-culture of peripheral blood molecular cells (PBMC) cells from patients

PBMC and plasma samples were obtained as described by (Casado et al., 2001). 4.3×10^6 purified CD4+ T cells in patient 3 and 3.3×10^6 in patient 20 and 6×10^6 in patient 56 were resuspended in RPMI 1640 (Bio-Whittaker) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) plus 1% antibiotics (Bio-Whittaker) and Human Recombinant Interleukin 2 (2.5 ng/ml, Sigma). They were co-cultured with 10^7 PBMC from a healthy donor previously treated with Mitomycin C (from *Streptomyces caespitosus*, Sigma) for 30 min. The co-culture was stimulated with 2 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA-Lectin, Sigma) and incubated overnight at 37 °C. Next day, the co-culture was centrifuged at 300 g for 10 min, the supernatant removed and 10^7 CD8+ depleted PBMC, pre-stimulated for three days with PHA, were added. The culture medium was changed twice a week and the co-cultures were fed with 10^7 fresh pre-stimulated PBMC weekly. After 9 days of co-culture, viral replication was estimated in the supernatant by an ELISA to measure p24 antigen (Roche Diagnostic). Co-cultures were maintained and tested for viral replication for one month, but always with negative results in the HIV ancestral patients.

As a control of the co-culture technique, samples from a group of 8 modern LTNPs were assayed and 6 of the 8 co-cultures were positive, including patients 7 and 30. Co-culture of PBMCs from 8 other ancestral LTNPs patients was negative except for one sample in one patient: this sample had a viral load of 125 RNA copies per ml. This result could give an estimation of the sensitivity of the co-culture technique.

β_2 -microglobulin determination

Plasma β_2 -microglobulin concentrations were measured using an ELISA (DRG Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. A control value of 1.02 μ g was obtained using this kit in a set of 37 uninfected patients (Bello et al., 2005; Michael et al., 1997).

Characterization of the Δ -32 CCR5 genotype

Analysis of the Δ -32 CCR5 genotype was performed on PBMC DNA by PCR as described by Michael et al. (1997). Primers amplified a gene fragment of 225 nt for the wild-type allele and of 193 nt for the Δ -32 CCR5 allele, which were separated in 8% TBE polyacrylamide gel.

Viral DNA quantification, PCR amplification and nucleotide sequencing

PBMC-associated DNA was obtained from 10^7 cells by standard phenol extraction methods. HIV DNA was amplified with different primers from a single copy by limiting dilution PCR in the C2–V5 region in *env* gene as explained in (Bello et al., 2007a). PCR products in the C2 to V5 region of the HIV *env* were sequenced with primer 27EU (Bello et al. 2005) using the ABI PRISM Dye Terminator reaction kit (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) according to manufacturer's instructions in an ABI PRISM 377 automated sequencer. All PCRs amplifications were done with procedural safeguards and physical separation of sample processing and post-PCR handling steps in order to control for cross-contamination. For PCR amplification and to minimize the introduction of non authentic mutations, we used Expand High Fidelity polymerase (Roche).

Nucleotide sequence and phylogenetic analysis in *env* gene

Nucleotide sequences obtained by limiting dilution PCRs of the 614-bp C2–C5 fragment in *env* gene (nucleotides 7068 to 7682 in HXB2 clone) were examined. Nucleotide sequences were initially edited using the SeqMan program version 3.61 (Inc. Dnastar, Madison, Wis) and aligned with program CLUSTAL X version 1.8. Alignments were later corrected by hand to assure a correct open reading frame. All positions with an alignment gap were excluded from the analysis. First, nucleotide sequences were included in a global data base with the sequences obtained from patients studied in our laboratory and a phylogenetic tree was constructed to detect cross-contamination between samples. All samples were segregated in distinct clusters of the phylogenetic tree, then excluding contamination. For each patient, best-fit models of nucleotide substitution were selected according to the Akaike Information Criterion (AIC) in Modeltest 3.6 (Posada and Crandall, 2001). Maximum likelihood trees were constructed under this best-fit model using the algorithm implemented in Phylml v.2.4.1 (Guindon et al., 2005), starting the search from a BIONJ tree (Gascuel, 1997). Phylogenetic confidence was assessed by bootstrap analysis of 1000 replicates.

Intrasample (heterogeneity) and intersample (divergence) genetic distances within each patient were estimated by the best-fit model of nucleotide substitution. To estimate viral heterogeneity at a given time point, we determined the mean and standard error for pair-wise nucleotide distances between all sequences obtained at that time point. To estimate viral divergence at a given time point, we determined the mean and standard error for pair-wise nucleotide distances between all sequences from that time point and the patient most recent common ancestor sequence (MRCA). The MRCA for each patient was obtained using the PAUP4.0b10 program from reconstructed trees by the Maximum likelihood method. This MRCA sequence represents the most distal node of the tree from which all nucleotide sequences from the patient originate.

Viral dating

An estimation of viral infection time or “viral dating” was deduced, assuming a molecular clock, from the genetic distance of the nucleotide sequence of each patient virus to the MRCA of the HIV-1 Spanish epidemic according to (Bello et al., 2004) and (Bello et al., 2005, 2007b).

PCR amplification and sequencing of the complete genome

To perform the complete genome sequencing, the genome (9250 bp) was divided into three fragments. In each fragment, from three to 9 limiting dilution PCR were analyzed. We used nested PCRs and Expand High Fidelity DNA polymerase (Roche) to amplify viral DNA. Primer localization and fragment amplification are shown in

Table 1 of the Supplementary materials. The first PCR, amplified an 1807 bp fragment from the 5' LTR to the *gag* region. The second PCR encompassed a 3545 bp fragment in the *pol-vif* region. The third comprised a 3906 bp fragment from *vif* gene until U5 at the 3' end of the HIV-1 genome.

Cycling conditions of the nested PCR for the first fragment were the following: one cycle of 94 °C for 5 min, 10 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 2 min. Subsequently, 25 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min with an extension of 5 s each cycle, and a final step of 72 °C for 10 min. For the second fragment, cycling conditions were the same except that the annealing temperature was 60 °C and the length of the elongation step was 4 min. For the third fragment, cycling conditions were the same as for the first fragment except for the length of the elongation step which was 4 min.

GenBank accession numbers of the viral nucleotide sequences of the patients are pending.

Acknowledgments

The preliminary work on these patients and helpful discussions of Gonzalo Bello is greatly appreciated, as well as the excellent technical work of Rosa Fuentes. We very much appreciate the work of David Peck for the English editing. We acknowledge the collaboration of Jose Luis Vicario for the HLA typing. Work in the Centro Nacional de Microbiología was supported by grants, SAF 2005/03833, SAF 2007-61036 by the Plan Nacional del SIDA and in part by the "Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA (Red de grupos 173) of the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISs).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.virol.2009.05.022.

References

- Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T.C., Gaddis, N.C., Auerbach, M.R., Malim, M.H., O'Brien, S.J., Walker, B.D., Sullivan, J.L., Desrosiers, R.C., 2000. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J. Virol.* 74 (9), 4361–4376.
- Alexander, L., Denekamp, L., Czajak, S., Desrosiers, R.C., 2001. Suboptimal nucleotides in the infectious, pathogenic simian immunodeficiency virus clone SIMmac239. *J. Virol.* 75 (8), 4019–4022.
- Altfeld, M., Kalife, E.T., Qi, Y., Streeck, H., Lichterfeld, M., Johnston, M.N., Burgett, N., Swartz, M.E., Yang, A., Alter, G., Yu, X.G., Meier, A., Rockstroh, J.K., Allen, T.M., Jessen, H., Rosenberg, E.S., Carrington, M., Walker, B.D., 2006. HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the Initial CD8(+) T cell response against HIV-1. *PLoS Med.* 3 (10), e403.
- Bailey, J.R., Williams, T.M., Siliciano, R.F., Blankson, J.N., 2006. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J. Exp. Med.* 203 (5), 1357–1369.
- Bailey, J. R., O'Connell, K., Yang, H.-C., Han, Y., Xu, J., Jilek, B., Williams, T. M., Ray, S.C., Siliciano, R. F., and Blankson, J. N. (2008). Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Patient Who Developed AIDS to an Elite Suppressor. *Vol. 82*, pp. 7395–7410.
- Bello, G., Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., Lopez-Galindez, C., 2004. Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasiespecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt. 2), 399–407.
- Bello, G., Casado, C., Sardonis, V., Alonso-Nieto, M., Vicario, J.L., Garcia, S., Hernando, V., Rodriguez, C., Romero, J. d., Lopez-Galindez, C., 2005. A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *J. Gen. Virol.* 86 (2), 355–364.
- Bello, G., Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J., Carvajal-Rodriguez, A., Posada, D., Lopez-Galindez, C., 2007a. Lack of temporal structure in the short term HIV-1 evolution within asymptomatic naive patients. *Virology* 362, 294–303.
- Bello, G., Casado, C., Sardonis, V., Alvaro-Cifuentes, T., Dos Santos, C.A., Garcia, S., Rodriguez, C., Del Romero, J., Pilotto, J.H., Grinsztejn, B., Veloso, V.G., Morgado, M.G., Lopez-Galindez, C., 2007b. Plasma viral load threshold for sustaining intrahost HIV type 1 evolution. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23 (10), 1242–1250.
- Blankson, J.N., Bailey, J.R., Thayil, S., Yang, H.C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S.K., Siliciano, J.D., Williams, T.M., Siliciano, R.F., 2007. Isolation and characterization of

- replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J. Virol.* 81 (5), 2508–2518.
- Buchbinder, S.P., Katz, M.H., Hessel, N.A., O'Malley, P.M., Holmberg, S.D., 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* 8 (8), 1123–1128.
- Calugi, G., Montella, F., Favalli, C., Benedetto, A., 2006. Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env. *J. Virol.* 80 (23), 11892–11896.
- Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., Bello, G., Lopez-Galindez, C., 2001. Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt. 10), 2495–2508.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V.A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Leramont, J., Sullivan, J.S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dowton, D., Mills, J., 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988–991.
- Deeks, S.G., Walker, B.D., 2007. human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27 (3), 406–416.
- Farrow, M.A., Somasundaran, M., Zhang, C., Gabuzda, D., Sullivan, J.L., Greenough, T.C., 2005. Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 21 (6), 565–574.
- Feng, D.F., Johnson, M.S., Doolittle, R.F., 1985. Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *J. Mol. Evol.* 21 (2), 112–125.
- Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14 (7), 685–695.
- Gonzalez, E., Dhand, R., Bamshad, M., Mummidi, S., Geevarghese, R., Catano, G., Anderson, S.A., Walter, E.A., Stephan, K.T., Hammer, M.F., Mangano, A., Sen, L., Clark, R.A., Ahuja, S.S., Dolan, M.J., Ahuja, S.K., 2001. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (9), 5199–5204.
- Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., Nibbs, R.J., Freedman, B.I., Quinones, M.P., Bamshad, M.J., Murthy, K.K., Rovin, B.H., Bradley, W., Clark, R.A., Anderson, S.A., O'Connell, R.J., Agan, B.K., Ahuja, S.S., Bologna, R., Sen, L., Dolan, M.J., Ahuja, S.K., 2005. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 1101160.
- Guan, Y., Diallo, K., Detorio, M., Whitney, J.B., Liang, C., Wainberg, M.A., 2001. Partial restoration of replication of simian immunodeficiency virus by point mutations in either the dimerization initiation site (DIS) or Gag region after deletion mutagenesis within the DIS. *J. Virol.* 75 (23), 11920–11923.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O., 2005. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue), W557–W559.
- Hatano, H., Delwart, E.L., Norris, P.J., Lee, T.H., Dunn-Williams, J., Hunt, P.W., Hoh, R., Stramer, S.L., Linnen, J.M., McCune, J.M., Martin, J.N., Busch, M.P., Deeks, S.G., 2009. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J. Virol.* 83 (1), 329–335.
- Huang, A.S., Baltimore, D., 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226 (5243), 325–327.
- Keet, I.P., Krol, A., Klein, M.R., Veugelers, P., de Wit, J., Roos, M., Koot, M., Goudsmit, J., Miedema, F., Coutinho, R.A., 1994. Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4+ cell counts. *J. Infect. Dis.* 169 (6), 1236–1243.
- Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L., Desrosiers, R.C., 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 228–232.
- Learmont, J., Tindall, B., Evans, L., Cunningham, A., Cunningham, P., Wells, J., Penny, R., Kaldor, J., Cooper, D.A., 1992. Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* 340 (8824), 863–867.
- Li, Y., Kappes, J.C., Conway, J.A., Price, R.W., Shaw, G.M., Hahn, B.H., 1991. Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue: identification of replication-competent and-defective viral genomes. *J. Virol.* 65, 3973–3985.
- Lifson, A.R., Buchbinder, S.P., Sheppard, H.W., Mawle, A.C., Wilber, J.C., Stanley, M., Hart, C.E., Hessel, N.A., Holmberg, S.D., 1991. Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J. Infect. Dis.* 163 (5), 959–965.
- Meyerhans, A., Cheyner, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjo, B., Wain-Hobson, S., 1989. Temporal fluctuations in HIV quasiespecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 58 (5), 901–910.
- Michael, N.L., Louie, L.G., Rohrbaugh, A.L., Schultz, K.A., Dayhoff, D.E., Wang, C.E., Sheppard, H.W., 1997. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 3 (10), 1160–1162.
- Miguel, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., Connors, M., 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (6), 2709–2714.
- Miura, T., Brockman, M.A., Brumme, C.J., Brumme, Z.L., Carlson, J.M., Pereyra, F., Trocha, A., Addo, M.M., Block, B.L., Rothchild, A.C., Baker, B.M., Flynn, T., Schneidewind, A., Li, B., Wang, Y.E., Heckerman, D., Allen, T.M., Walker, B.D., 2008. Genetic Characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *Int. J. Virol.* 82, 8422–8430.
- Pereyra, F., Addo, M.M., Kaufmann, D.E., Liu, Y., Miura, T., Rathod, A., Baker, B., Trocha, A., Rosenberg, R., Mackey, E., Ueda, P., Lu, Z., Cohen, D., Wrin, T., Petropoulos, C.J., Rosenberg, E.S., Walker, B.D., 2008. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 197, 563–571.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol. Biol. Evol.* 18 (6), 897–906.
- Saez-Cirion, A., Pancino, G., Sinet, M., Venet, A., Lambotte, O., 2007. HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol.* 28 (12), 526–534.
- Sheppard, H.W., Lang, W., Ascher, M.S., Vittinghoff, E., Winkelstein, W., 1993. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *Aids* 7 (9), 1159–1166.
- Stewart, G.J., Ashton, L.J., Biti, R.A., Ffrench, R.A., Bennetts, B.H., Newcombe, N.R., Benson, E.M., Carr, A., Cooper, D.A., Kaldor, J.M., 1997. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *Aids* 11 (15), 1833–1838.
- Trono, D., Feinberg, M.B., Baltimore, D., 1989. HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell* 59 (1), 113–120.
- Visco-Comandini, U., Yun, Z., Vahlne, A., Sonnerborg, A., 1999. No association of HIV type 1 long terminal repeat sequence pattern with long-term nonprogression and in vivo viral replication levels in European subjects. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 15 (7), 609–617.
- Wang, B., Dyer, W.B., Zaunders, J.J., Mikhail, M., Sullivan, J.S., Williams, L., Haddad, D.N., Harris, G., Holt, J.A., Cooper, D.A., Miranda-Saksena, M., Boadle, R., Kelleher, A.D., Saksena, N.K., 2002. Comprehensive analyses of a unique HIV-1-infected nonprogressor reveal a complex association of immunobiological mechanisms in the context of replication-incompetent infection. *Virology* 304 (2), 246–264.
- Wang, B., Mikhail, M., Dyer, W.B., Zaunders, J.J., Kelleher, A.D., Saksena, N.K., 2003. First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* 312 (1), 135–150.
- Wu, L., Paxton, W.A., Kassam, N., Ruffing, N., Rottman, J.B., Sullivan, N., Choe, H., Sodroski, J., Newman, W., Koup, R.A., Mackay, C.R., 1997a. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1. *In Vitro* 185, 1681–1691.
- Wu, L., Paxton, W.A., Kassam, N., Ruffing, N., Rottman, J.B., Sullivan, N., Choe, H., Sodroski, J., Newman, W., Koup, R.A., Mackay, C.R., 1997b. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1. *In Vitro* 185, 1681–1692.

Coinfection and Superinfection in Patients with Long-Term, Nonprogressive HIV-1 Disease

Concepción Casado,¹ María Pernas,¹ Tamara Alvaro, Virginia Sandonis,¹ Soledad García,² Carmen Rodríguez,² Jorge del Romero,² Eulalia Grau,³ Lidia Ruiz,³ and Cecilio Lopez-Galindez¹

¹Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, and ²Centro Sanitario Sandoval, Instituto Madrileño de la Salud, Comunidad Autónoma de Madrid, Madrid, and IrsiCaixa Foundation, Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain

Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) dual infections are considered important because they have been related to AIDS progression. We identified dual infections in 2 patients with long-term, nonprogressive HIV-1 disease; the first patient was diagnosed as being already coinfecting, on the basis of the first sample analyzed, but a previous superinfection could not be excluded; the second patient was diagnosed as having a superinfection, on the basis of the 9-year difference between the viral dating of the 2 strains. Dual infections occur in patients with long-term, nonprogressive disease, with no immediate clinical manifestations. Such occurrences could indicate a general phenomenon in natural HIV-1 infections.

Infection with more than 1 strain of HIV-1 has been considered to be an extraordinary event in the natural history of the infection. However, the detection of dual infections in patients with HIV-1, as either a coinfection or a superinfection, has been described, mostly in individuals who have engaged in high-risk practices [1–6]. Obtaining systematic data on the frequency of HIV dual infections is difficult, but, when different subtypes circulate, the identification of different strains becomes feasible, and superinfection seems to be more frequent

than previously thought [7, 8]. Moreover, the detection of many circulating recombinant forms and unique recombinant forms [8] argues that it occurs at high frequency in the natural history of HIV-1.

The importance of HIV-1 dual infections is related to their pathogenic consequences, because most studies have found an elevated HIV-load set point and disease progression after superinfection [3, 5, 9]. However, the clinical outcome of HIV-1 dual infection needs to be definitively established. Here we report the identification of dual infections without apparent clinical consequences in 2 patients infected, for >18 years, with long-term, nonprogressive (LTNP) HIV-1 disease.

Patients and methods. Patient 1 was a former intravenous drug user followed up in an outpatient clinical center (Centro Sanitario Sandoval, IMSALUD), and patient 2 was a homosexual man treated in the HIV Clinical Unit (Hospital Germans Trias i Pujol, Laboratory of Retrovirology, IrsiCaixa Foundation). Both patients were included in the study after they gave free and informed consent, according to the guidelines of the institutional ethical committees. Patient 1 had been infected for at least 18 years, patient 2 for 20 years. Both patients had remained asymptomatic without antiretroviral therapy and with CD4 levels >500 cells/mL, fulfilling the LTNP criterion. The immunologic and virologic data, together with the samples analyzed, are summarized in figure 1. Plasma HIV-1 RNA was quantified by use of the Amplicor HIV Monitor test kit, with a detection limit of 50 copies/mL (Roche Diagnostics Systems), according to the manufacturer's instructions.

Five samples from each patient were analyzed (figure 1). Peripheral blood mononuclear cells were obtained by use of standard protocols, and viral DNA was obtained from 1×10^7 cells by a standard phenol-extraction method. HIV DNA was amplified from a single copy in the C2–V5 region of the *env* gene, by use of limiting-dilution polymerase chain reaction (PCR) with different primers [10]. The final PCR products (661 bp), spanning the C2–V5 region of the HIV *env* gene, were sequenced by use of primer 27EU and the ABI PRISM Dye Terminator reaction kit (Perkin-Elmer), according to the manufacturer's instructions, in an ABI PRISM 377 automated sequencer.

Unique nucleotide sequences obtained from different points in each patient were aligned by use of the CLUSTAL X program together with HIV reference sequences (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) and with Spanish-patient nucleotide sequences, obtained from the HIV database and from our laboratory, and then were hand-edited. All positions with an align-

Received 22 February 2007; accepted 10 April 2007; electronically published 14 August 2007.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Spanish Ministerio de Educación (grants SAF 2003/04987 and SAF 2005/03833); Plan Nacional del SIDA; Fundació IrsiCaixa (Institut de Recerca de la SIDA/Caixa); Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA (Red de grupos 173) del FISs.

Reprints and correspondence: Cecilio López-Galindez, Servicio de Virología Molecular, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda, Pozuelo, Km. 2.200, Majadahonda, Madrid 28220, Spain (clopez@isciii.es).

The Journal of Infectious Diseases 2007;196:895–9

© 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2007/19606-0014\$15.00

DOI: 10.1086/520885

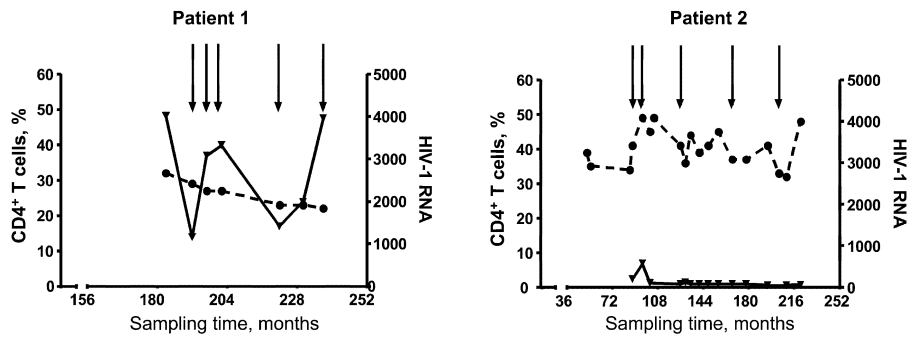


Figure 1. Clinical and virologic data on 2 patients with HIV-1, including CD4⁺ T cell percentage (*black circles*) and human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) RNA viral load (*black downward-pointing triangles*), at various sampling times during follow-up. The downward-pointing arrows indicate the samples analyzed in the present study.

ment gap were excluded from the analysis. Best-fit models of nucleotide substitution were selected according to the Akaike information criterion in Modeltest (version 3.6; David Posada Web page, <http://www.darwin.uvigo.es>). Maximum-likelihood trees were estimated under the best-fit model by use of the algorithm implemented in Phylml (version 2.4.1; <http://www.atge.lirmm-fr/phyml>) and by starting the search from a BIONJ tree. Phylogenetic confidence was assessed by bootstrap analysis of 1000 replicates [10]. Identical sequences derived from the same or different samples were used only once to reconstruct the phylogenetic tree shown in figure 2.

To perform the viral dating of the different viral populations in each patient, the genetic distance of the reconstructed most recent common ancestor (MRCA) for each clade was compared with that of a reconstructed MRCA for the Spanish epidemic. The viral dating time was estimated by use of a linear-correlation equation previously developed on the basis of a large set of Spanish samples, an equation that correlates the V3 nucleotide-sequence divergence to the Spanish-epidemic MRCA and the sampling time [11, 12]. (Genbank accession numbers are EF517970–EF518214.)

Results. Phylogenetic analysis of viral sequences obtained from Spanish patients with LTNP HIV-1 disease and of nucleotide sequences derived from unrelated Spanish patients with HIV-1 disease (either LTNP or typically progressive) showed that all isolates were subtype B. Nucleotide sequences obtained from each patient formed monophyletic groups with high bootstrap values (>75%), except for patients 1 and 2, each of whose nucleotide sequences were separated into 2 groups (a and b in figure 2), situated in different branches of the tree, and supported by bootstrap values >85%.

The mean genetic distances between groups a and b—5.4% for patient 1 and 11.2% for patient 2 (table 1)—were higher than the genetic distances to other nonepidemiologically related Spanish HIV-1 isolates (table 1), as indicated in other studies [3]. For patient 1, the range of genetic distances between each

clade and unrelated HIV Spanish isolates was 2.2%–17.8% for clade a and 2.0%–18.3% for clade b; the corresponding values for patient 2 were 6.3%–19.2% for clade a and 7.4%–20.4% for clade b. The presence of 2 statistically differentiated clusters within these 2 patients' quasispecies, together with the greater genetic distance between clusters a and b compared with that in unrelated viruses, indicates that HIV dual infection with subtype B has occurred in these 2 patients.

Because the 2 groups (i.e., a and b) of nucleotide sequences were present in all the analyzed samples from each patient and because no samples close to the seroconversion time were available, it was not possible to determine whether coinfections or superinfections had occurred. To address this problem, we performed viral dating of the different patients' clusters, according to the method that our laboratory had established for Spanish isolates and that has been explained in the "Patients and methods" section above. According to this method, we interpolated the year of the nucleotide sequence of each of the different patient clades (table 1). The years obtained for clades a and b for patient 1 were identical (i.e., 1992), whereas those obtained for clades a and b for patient 2 were different; for the latter patient, the dating year for clade a was 1987, close to the seroconversion time, and the dating year for cluster b was 1996 (i.e., 9 years later). The viral dating indicates that a superinfection had occurred in patient 2, whereas analysis of the first sample from patient 1 showed that he already was coinfecting, although a previous superinfection could not be ruled out.

Discussion. In the present report, we have presented data on dual infections, with subtype B variants, in 2 patients with LTNP HIV-1 disease who had no clinical manifestations. Although both patients had LTNP characteristics, >15 years of infection, and no clinical symptoms and had not received antiretroviral therapy, they showed different levels of CD4⁺ T cell counts, RNA viral load, and risk practices. Whereas patient 1 showed multiple peaks in viral load and a continuous but slow decline in CD4⁺ T cell count, patient 2 showed a more constant

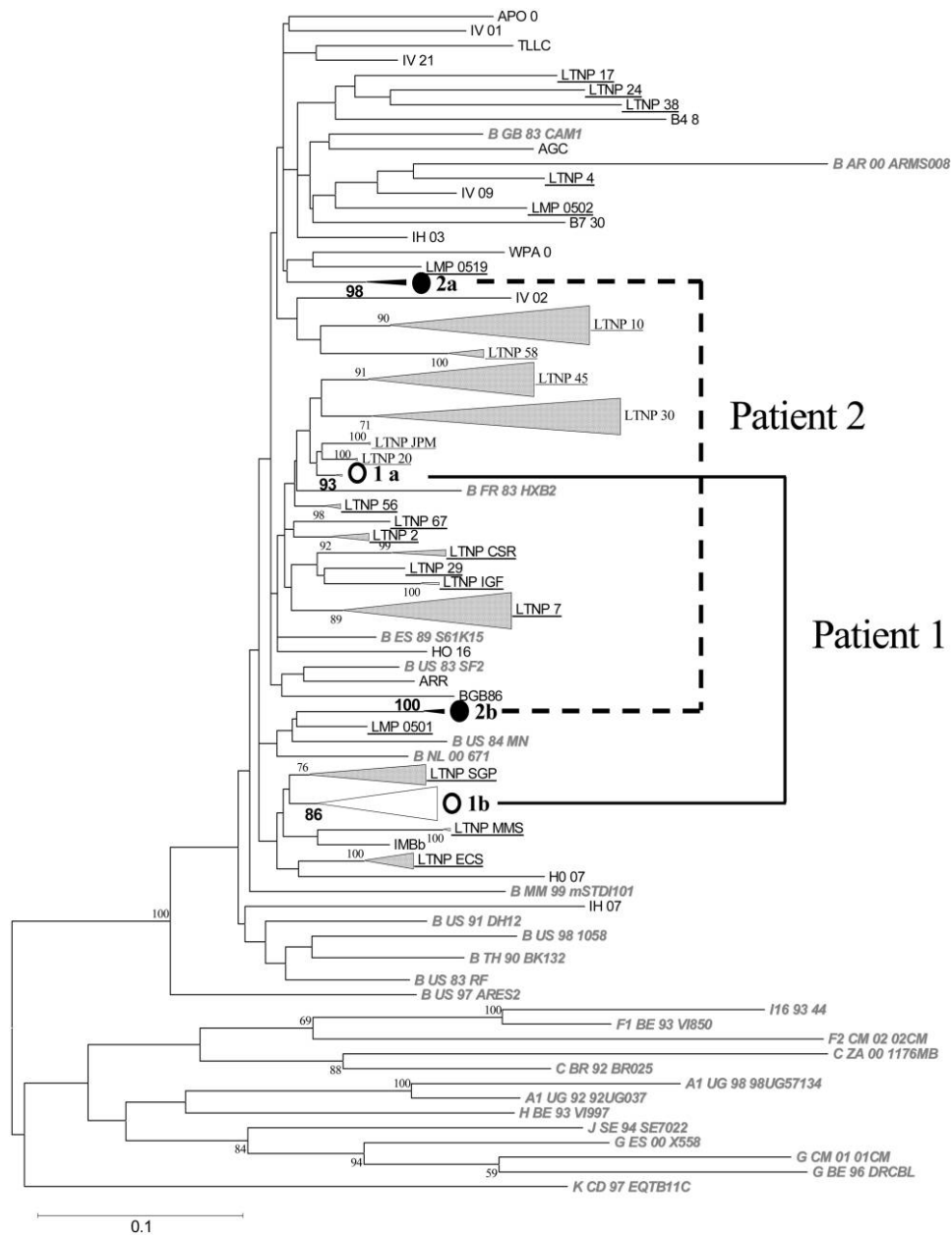


Figure 2. Maximum-likelihood tree calculated on the basis of unique nucleotide sequences derived from the V3–C5 *env* region from Spanish patients with HIV-1. Nucleotide sequences from patients with long-term, nonprogressive (LTNP) disease are underlined, except for those from patient 1 (*white circles*, denoted by boldface “1a” and “1b”) and patient 2 (*black dots*, denoted by boldface “2a and “2b”). Nucleotide sequences from Spanish patients without LTNP disease are shown in standard typeface; reference strains from different subtypes are shown in gray and are italicized. Subtrees obtained from LTNP quasispecies analysis are collapsed and are represented by the gray-shaded leftward-pointing triangles. Bootstrap values for each clade are denoted by boldface numbers. All quasispecies studied resulted in single clusters, except for those from patients 1 and 2, which formed 2 different clusters. The scale bar at the bottom of the figure represents 10% genetic distance.

CD4⁺ T cell count, undetectable or low RNA 1 load, and 2 sporadic blips. Both individuals were and remain classified as having LTNP disease.

We used a phylogenetic approach to distinguish between coinfection and superinfection events. It is known that a molecular clock operates in HIV-1 evolution, and this has per-

mitted estimation of the time of origin of either the global epidemic or the epidemic in individual countries [13], although the approach depends on the method used. Along this line, we have previously demonstrated that a molecular clock operates in the Spanish HIV-1 epidemic [12]. This approach allowed us to estimate the viral dates for different isolates and to detect

Table 1. Characteristics of patients and clades defined in figure 2.

Source	Year		Heterogeneity ^b within clade, mean ± SE	Genetic distance, %	
	First documented HIV-1+ test	Dating of nucleotide sequences ^a		Between clades, ^c %	From unrelated isolates ^d
Patient 1	1986			5.4	
Group a		1992	1.18 ± 0.18		2.2–17.9
Group b		1992	4.70 ± 0.50		2.0–18.3
Patient 2	1988			11.2	
Group a		1987	0.93 ± 0.22		6.3–19.2
Group b		1996	1.15 ± 0.34		7.4–20.4

^a Estimated on the basis of the genetic distance to a reconstructed Spanish most recent common ancestor (MRCA), according to the method of Bello et al. [11].

^b Calculated in terms of nucleotides and between all pairwise comparisons of sequences within each clade.

^c Between the reconstructed most common recent ancestors in the clades.

^d Between the reconstructed most recent common ancestor in each clade and the nucleotide sequences obtained from Spanish patients with HIV-1.

sequences with different dates within individual quasispecies [11, 14]. Using this methodological approach, we obtained the same date for the 2 viruses in patient 1 (1992) and different dates (1987 for clade a and 1996 for clade b) for the 2 viruses in patient 2. These results strongly suggest that patient 2 was infected with 1 virus and then, 9 years later, became superinfected with another virus, which showed an 11.2% genetic distance from the first virus. In contrast, patient 1 was coinfecting, for at least 18 years, with 2 viruses differing by a genetic distance of 5.4%, although it is not possible to rule out a previous superinfection (table 1). The present study indicates the usefulness of a viral dating strategy to clarify situations that occur in HIV-1 viral evolution in infected patients [11, 14]. These data show that in these 2 patients there was control of the replication of not only a single virus but also of a second, divergent strain. Moreover, the superinfection in patient 2 occurred 9 years after the primoinfection and in the presence of an effective immune control of viral replication.

In most previous reports in the literature, dual infection has been associated with a clinical deterioration of patients [5]. Only 1 case of superinfection in a long-term survivor has been described, and this individual showed a clear progression of disease after an acute febrile illness and the detection of a superinfecting strain [15]. To our knowledge, the present report is the first to describe the occurrence of dual infection in 2 patients with LTNP HIV-1 disease who have maintained this clinical characteristic and who have not shown any sign of either clinical deterioration or faster clinical progression.

Dual infection has been detectable in these 2 patients with LTNP HIV-1 disease because of the limited and compartmentalized nature of viral replication. Detection of superinfection by the phylogenetics methods is difficult, because of frequent recombination, which affects the segregation of subclades and bootstrap values. This methodological problem, together with

the need for samples to be obtained close to the superinfection event, could contribute to the underdetection of superinfection. In general, superinfection has been detected only in patients in whom an increase in viral load set point or in other pathogenic markers has occurred.

Previous reports in the literature [3–6, 9, 15] have generally assumed that superinfection is associated with disease progression. Therefore, patients with LTNP disease who have not experienced disease progression for >10 years could be expected, a priori, to have no superinfections—or at least a low rate of superinfection. Moreover, if superinfection occurs in 2 groups of patients with HIV-1 with different characteristics (e.g., typical and LTNP), it can be considered a general phenomenon that probably occurs in every group of infected patients. In summary, in the present study we have found that dual infections also occur in patients with LTNP HIV-1 disease and are not associated with clinical manifestations.

Acknowledgments

We thank Ingrid Outschoorn for review of the manuscript.

References

- Blackard JT, Mayer KH. HIV superinfection in the era of increased sexual risk-taking. *Sex Transm Dis* **2004**; *31*:201–4.
- Chohan B, Lavreys L, Rainwater SM, Overbaugh J. Evidence for frequent reinfection with human immunodeficiency virus type 1 of a different subtype. *J Virol* **2005**; *79*:10701–8.
- Gottlieb GS, Nickle DC, Jensen MA, et al. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* **2004**; *363*:619–22.
- Pernas M, Casado C, Fuentes R, Perez-Elias MJ, Lopez-Galindez C. A dual superinfection and recombination within HIV-1 subtype B 12 years after primoinfection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006**; *42*: 12–8.
- Smith DM, Richman DD, Little SJ. HIV superinfection. *J Infect Dis* **2005**; *192*:438–44.

6. Yerly S, Jost S, Monnat M, et al. HIV-1 co/superinfection in intravenous drug users. *AIDS* **2004**;18:1413–21.
7. Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, et al. Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2006**;22:599–606.
8. McCutchan FE, Hoelscher M, Tovanabutra S, et al. In-depth analysis of a heterosexually acquired human immunodeficiency virus type 1 superinfection: evolution, temporal fluctuation, and intercompartment dynamics from the seronegative window period through 30 months postinfection. *J Virol* **2005**;79:11693–704.
9. Grobler J, Gray CM, Rademeyer C, et al. Incidence of HIV-1 dual infection and its association with increased viral load set point in a cohort of HIV-1 subtype C-infected female sex workers. *J Infect Dis* **2004**;190:1355–9.
10. Bello G, Casado C, Garcia S, et al. Lack of temporal structure in the short term HIV-1 evolution within asymptomatic naive patients. *Virology* **2007**;362:294–303.
11. Bello G, Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Lopez-Galindez C. Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *J Gen Virol* **2004**;85:399–407.
12. Casado C, Urtasun I, Martin-Walther MV, et al. Genetic analysis of HIV-1 samples from Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2000**;23:68–74.
13. Korber B, Muldoon M, Theiler J, et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains [see comments]. *Science* **2000**;288:1789–96.
14. Bello G, Casado C, Sandonis V, et al. A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *J Gen Virol* **2005**;86:355–64.
15. Fang G, Weiser B, Kuiken C, et al. Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS* **2004**;18:153–9.

Plasma Viral Load Threshold for Sustaining Intrahost HIV Type 1 Evolution

GONZALO BELLO,¹ CONCEPCIÓN CASADO,² VIRGINIA SANDONIS,²
TAMARA ALVARO-CIFUENTES,² CAIO A. RODRIGUES DOS SANTOS,¹ SOLEDAD GARCÍA,³
CARMEN RODRÍGUEZ,³ JORGE DEL ROMERO,³ JOSÉ H. PILOTTO,⁴ BEATRIZ GRINSZTEJN,⁴
VALDILEA G. VELOSO,⁴ MARIZA G. MORGADO,¹ and CECILIO LÓPEZ-GALÍNDEZ²

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine if natural suppression of plasma viremia below the detection limit of commercial assays (50–80 copies HIV-1 RNA/ml) can contain the HIV-1 evolution. HIV-1 quasispecies complexity in PBMC DNA was assessed in the *env* gene at two time points in 14 long-term nonprogressors (LTNPs). Sequence changes consistent with viral evolution was found in all patients with a median plasma RNA viral load >100 copies/ml. Evidence of low-level viral evolution was detected in two of four patients with intermittent viremia and a median plasma HIV-1 RNA load of <80 copies/ml. No significant evolution was observed in the three LTNPs with persistent viral suppression below the detection limit. Overall, a significant positive correlation ($p < 0.001$) was observed between viral evolution and plasma RNA viral load in the LTNPs analyzed. These results suggest that the detection limit of ultrasensitive viremia assays could represent an important threshold below which intrahost HIV-1 evolution does not occur.

INTRODUCTION

DURING THE FIRST YEARS AFTER SEROCONVERSION about 7–9% of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients spontaneously display at least two consecutive viral load measurements below 400–500 copies/ml,^{1,2} and around 5% of seroconverters have an HIV RNA load below 40 copies/ml on at least two visits.³ However, most individuals show a progressive loss of control of viral replication over time,^{4,5} and only a small fraction (<1%) of HIV-1-infected patients, called “HIV controllers” or “elite suppressors,” appears to be able to maintain undetectable plasma viremia without antiretroviral treatment for >10 years.^{6,7} Little is known about viral evolution in patients who naturally maintain undetectable plasma viremia.

Two recent works have shown evidence for the absence of viral evolution in some long-term nonprogressors (LTNPs) that could be classified as HIV controllers,^{8,9} suggesting that natural suppression of viral replication below limits of detection

would be enough to avoid any significant intrahost HIV-1 evolution. Consistent with this hypothesis, a number of studies suggested that HIV-1 evolution and development of drug resistance can be precluded for several years in highly active antiretroviral therapy (HAART)-treated patients achieving suppression of viremia to levels below 20–50 copies/ml.^{10–16} Yet, other studies have shown sequence changes consistent with viral evolution and/or development of drug resistance in some treated patients who maintain a plasma RNA viral load below 50 copies/ml but exhibit intermittent episodes of very low levels of detectable viremia (“blips”),^{17–23} or even in some successfully treated patients without plasma HIV RNA blips.^{24–26} Thus, it remains unclear whether the reduction of viral replication to below the limits of detection of current ultrasensitive assays is enough to prevent any significant intrahost HIV-1 evolution.

In the present study the relationship between HIV-1 RNA viral load and the magnitude of viral evolution was investigated in a group of 14 LTNPs who naturally controlled viral replication at distinct levels, including seven HIV controllers and seven

¹Laboratorio de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

²Servicio de Virología Molecular, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

³Centro Sanitario Sandoval, IMSALUD, Comunidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

⁴Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

LTNPs with persistent viremia. HIV-1 quasispecies complexity from the DNA compartment was assessed in the C2–C4 *env* region at two different time points per patient.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

Patients were selected from two outpatient clinics: “Centro Sanitario Sandoval–IMSALUD” in Madrid, Spain, and “Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas–FIOCRUZ” in Rio de Janeiro, Brazil. We defined an LTNP as a subject with a documented HIV-1 infection for more than 10 years, no AIDS-related conditions without antiretroviral treatment, and for whom >90% of the CD4⁺ lymphocyte count measurements were ≥ 500 cells μl^{-1} . At the first visit, a clinical history was completed, including epidemiological and risk behavior data, particularly since infection with HIV-1. Patients were scheduled for clinical examination and laboratory testing (including CD4⁺ cell counts and plasma HIV-1 RNA copies) every 6–12 months, at which time serum and cell samples were obtained and stored. The Spanish LTNPs were from a previously characterized cohort that participated in a cross-sectional study of intrahost HIV-1 variability.⁹ Patients 30 and 45 had also participated in two longitudinal studies of intrahost HIV-1 evolution.^{27,28} All patients were included in the study after free and informed consent according to the respective Institutional Ethical Committees.

Laboratory data

CD4⁺ cell counts were measured by flow cytometry (Epics-XL; Beckman Coulter, CA). Plasma HIV-1 RNA of Spanish LTNPs was quantified with the Amplicor HIV-1 Monitor test kit (detection limit, 50 copies/ml; Roche Diagnostics, Branch-

burg, NJ), while plasma HIV-1 RNA of Brazilian LTNPs was quantified using the Nuclisens test kit (detection limit, 80 copies/ml; Organon Teknika, Durham, NC).

HIV-1 DNA amplification and sequencing

DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by the standard phenol-chloroform method or by extraction using the QIAamp DNA kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

Viral DNA load from patients 10, 30, 45 (first sample), 58, 64, and 67 was quantified by endpoint-dilution polymerase chain reaction (PCR),²⁹ and between 20 and 50 copies of viral DNA were included in the PCR. A 2- μl aliquot of the nested PCR product was ligated into plasmid pCR2.1, cloned according to the TOPO TA cloning kit instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 18–20 clones per sample were sequenced. Although resampling problems cannot be completely discarded, particularly in those samples with a PCR input close to 20 copies, the high mean viral diversity values and the elevated number of distinct clones (>15) observed within each sample clearly suggest that the genetic diversity of cloned samples was not heavily underestimated.

For those samples at which the very low proviral load did not allow the simultaneous amplification of at least 20 copies of provirus (patients 02, 03, 05, 42, 44, 45 second sample, 46, 52, and 56), a different procedure was followed to assess HIV-1 DNA diversity. In these samples, we diluted the extracted DNA until no more than 30% of the reactions were positive after nested PCR, providing a >70% probability that a single viral template was present in each reaction mixture.²⁹ The nested PCR products were purified using the Qiagen PCR purification kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) and directly sequenced, analyzing between 10 and 20 clones per sample.

Nested PCR was used to amplify the C2–C4 region of the *env* gene. First-round PCR primers were 169ECU and 96ED,⁹

TABLE 1. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS

LTNP	Gender ^a	Born (year)	Transmission ^b	Origin	Seroconversion ^c (year)
2	M	1963	IVDU	Spain	1987
3	M	1957	IVDU	Spain	1988
5	M	1964	Heterosexual	Brazil	≤ 1993
10	M	1946	Homosexual	Spain	1991
30	M	1953	Homosexual	Spain	1988
42	F	1954	Heterosexual	Brazil	1993
44	M	1967	Homosexual	Brazil	≤ 1996
45	F	1962	IVDU	Spain	1987
46	M	1965	Homosexual	Brazil	≤ 1992
52	F	1972	Heterosexual	Brazil	1996
56	F	1958	IVDU	Spain	1989
58	M	1966	Homosexual	Spain	1991
64	M	1965	IVDU	Spain	1985
67	M	1965	IVDU	Spain	1989

^aM, male; F, female.

^bIVDU, intravenous drug user.

^cThe date of seroconversion was estimated as the midpoint between the most recent negative and first positive test (separated by less than 2 years). In those patients without a negative test, the uppermost limit for the seroconversion date was set to the first positive test. All patients were infected with HIV-1 subtype B strains.

or JH44³⁰ and ES8,³¹ while second-round PCR was carried out with 1 μ l of the first PCR product and primers 27EU and 167ED,⁹ or ES7³⁰ and JH48,³¹ respectively. Cycling conditions for first and second round PCRs were as previously described,³² using Taq polymerase, which had an estimated error rate at the same amplification conditions in our laboratory of 6.6×10^{-3} mutations (V. Sanchez-Merino, personal communication). Purified nested PCR products were sequenced using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and analyzed in an ABI PRISM 377 or 3100 automate sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Sequence analysis

All nucleotide sequence analyses were carried out on a fragment of around 500 bp spanning the C2–C4 region of the *env* gene. Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL X³³ and manually edited. All positions with gaps were excluded from the analysis. Neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees were constructed using the Kimura two-parameter model, as implemented in the *MEGA* version 3.1 program.³⁴ Phylogenetic confidence was assessed by bootstrap with 1000 replicates.

Genetic distances within each patient were estimated with the Kimura two-parameter model, with the standard deviation (SD) calculated from 1000 bootstrapped replicates using the

MEGA program. For each patient, the following values were estimated: (1) viral diversity, mean nucleotide distance between all sequences obtained at the same time point; (2) intersample distance, mean nucleotide distances between all sequences obtained at two different time points; (3) viral divergence, mean nucleotide distance between all sequences at a given time point and the more recent common ancestor (MRCA) sequence; and (4) net divergence, the difference of the average divergence between the second and first samples divided by the observation time (years). The MRCA sequence of a patient represents the most distal node that includes all of the sequences from the same patient and was inferred using a maximum-likelihood estimation as described previously.²⁷

Statistical analysis

All statistical calculations were done using the Prism program version 2.01 (GraphPad, San Diego, CA).

RESULTS

Patient classification

Fourteen LTNPs were analyzed in the present study (Table 1). Plasma HIV-1 RNA load was periodically assessed with cur-

TABLE 2. MARKERS OF VIRAL REPLICATION

Group	LTNP	Median RNA VL ^a (range)	Proportion of values < LD ^b (%)	Consecutive values < LD ^c	Consecutive values > LD ^c	VL detected/year ^d
1	03	<50	100	9	0	1.4
	44	<80	100	12	0	1.7
	52	<80	100	13	0	1.9
2	02	51 (<50–205)	67	3	1	1.5
	42	<80 (<80–340)	67	3	3	2.1
	46	<80 (<80–1,300)	76	7	2	2.4
	56	<50 (<50–1,762)	85	10	1	2.7
	05	340 (<80–4,300)	27	2	5	2.1
3	45	324 (150–1,957)	0	0	17	2.4
	58	621 (193–2,151)	0	0	7	3.0
	10	4,352 (559–20,580)	0	0	15	1.9
4	30	6,680 (962–46,819)	0	0	18	3.0
	64	3,196 (1,665–21,277)	0	0	10	2.0
	67	8,595 (2,963–18,426)	0	0	9	2.3

^aVL, viral load; median HIV-1 RNA load (copies/ml) between 1998 and 2005.

^bLD, limit of detection; proportion of viral load determinations below the limit of detection.

^cMaximum number of viral load determinations below and above the limit of detection.

^dMean number of viral load determinations per year for each patient.

rent ultrasensitive assays (detection limit, 50–80 copies/ml) since 1998, and permitted the segregation of patients into four groups according to the level of suppression of plasma viremia (Table 2).

Group 1 (patients 03, 44, and 52) included subjects who maintained HIV-1 RNA levels below the limit of quantification in all determinations throughout the study period. Between 9 and 13 consecutive plasma RNA viral load measurements be-

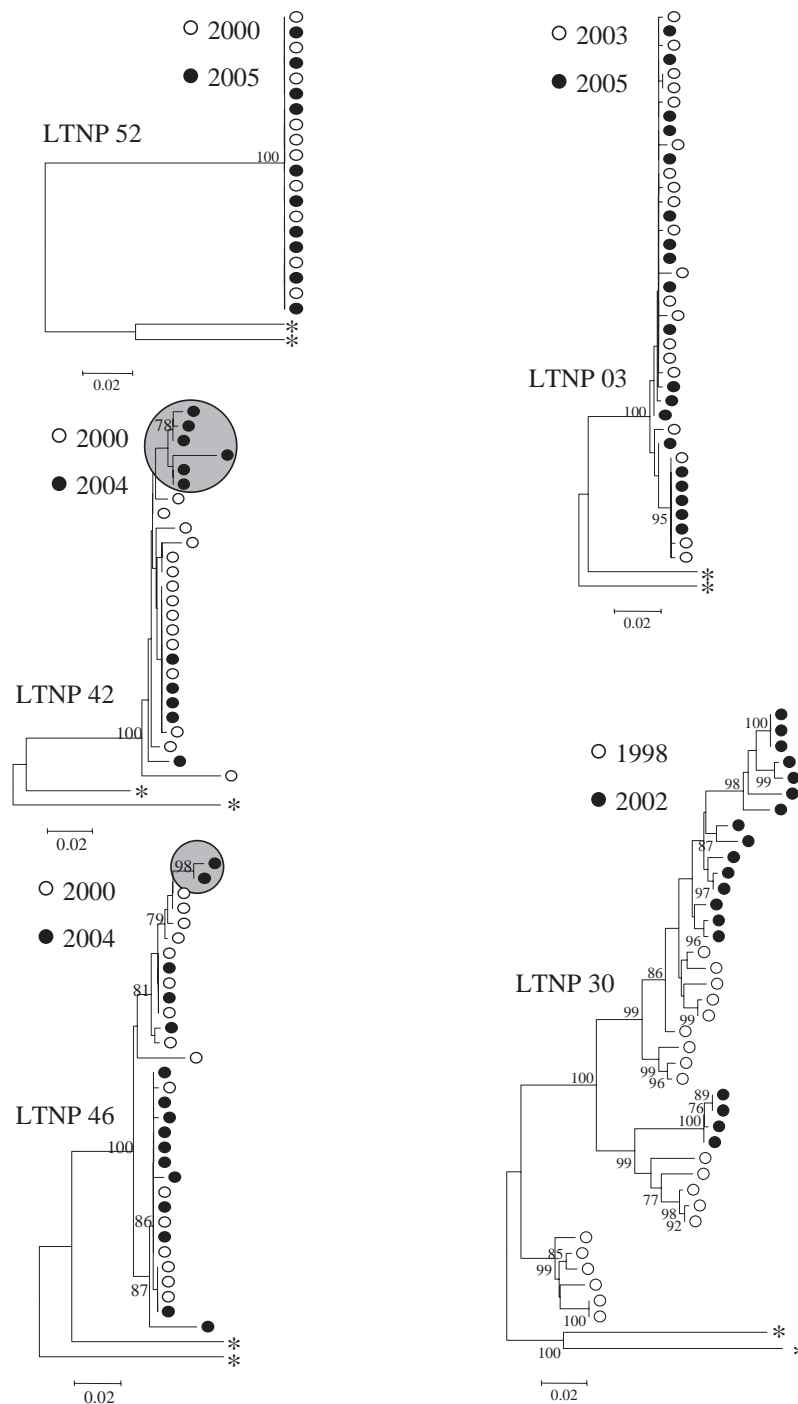


FIG. 1. Neighbor-joining phylogenetic trees of partial HIV-1 PBMC-derived gp120 *env* sequences of LTNPs representing four different evolutionary patterns: LTNP 52, no viral evolution with no viral sequence variation; LTNP 3, no viral evolution with very low viral sequence variation; LTNPs 42 and 46, low-level viral evolution; and LTNP 30, high-level viral evolution. Sequences are represented by an arbitrary symbol corresponding to the sampling years as indicated in the key. Reference strains are represented by an asterisk. Circles in patients 42 and 46 enclose later variants that were more distant from the MRCA than the earlier ones. Numbers at branch nodes refer to the bootstrap support; only frequencies greater than 75% are shown. Horizontal branch lengths are drawn to scale.

low the detection limit were observed in those patients. Group 2 (patients 02, 42, 46, and 56) contained individuals with infrequent (<35%) episodes of plasma HIV RNA levels ("blips") in the low but detectable range (51–2000 copies/ml) and a median plasma HIV RNA load at or below the detection limit. These patients displayed up to 3–10 consecutive plasma RNA viral load measurements below the detection limit, and from one to three consecutive blips. Group 3 (patients 05, 45, and 58) included LTNPs with frequent (>70%) or persistent plasma HIV-1 RNA levels in the low but detectable range (90–5000 copies/ml) and a median plasma viremia between 10^2 and 10^3 copies/ml. Patients from this group displayed no more than two consecutive plasma RNA viral load measurements below the detection limit. Finally, group 4 (patients 10, 30, 64, and 67) comprised LTNPs with plasma RNA viral load measurements always above the limit of detection (range, 500–50,000 copies/ml) and a median plasma viremia between 10^3 and 10^4 copies/ml. These groups were defined on a mean of 13 viral load determinations per subject (interquartile range, 8–17) and 2.2 viral load determinations per year for each patient (range, 1.4–3.0) (Table 2).

All patients from groups 1 and 2 could be classified as HIV controllers according to the classification proposed by Lambotte *et al.* (subjects with >10 years of documented infection,

who had received no antiretroviral treatment, and for whom >90% of the plasma HIV RNA load measurements were ≤ 400 copies/ml).⁷ It is also interesting to note that previously defined "ancestral" LTNPs patients with viral sequences dating close to the seroconversion time⁹ were distributed across groups 1 (patient 03), 2 (patients 02 and 56), and 3 (patient 58), while "modern" LTNPs (patients with viral sequences dating close to the sampling time) were placed in groups 3 (patient 45) and 4 (patients 10, 30, 64, and 67).

Evolution of viral sequences in the env gene

The diversity of the PBMC-associated viral DNA was assessed for each patient in one sample taken between 10 and 15 years after seroconversion. In most subjects (except patient 67) a second sample (taken 2–5 years apart from the first one) was also analyzed, and the mean intersample distance and the net annual divergence rate from the MRCA were determined. Between 10 and 20 clones were amplified at each sampling point from each patient. Four different evolutionary patterns were identified according to the levels of viral diversity and ongoing viral evolution.

In the first pattern, corresponding to patient 52 (aviremic HIV controller), only one single mutation was observed among

TABLE 3. MARKERS OF VIRAL EVOLUTION

Group	LTNP	Diversity (%) ^a	Time from seroconversion (years) ^b	Intersample distance (%) ^c	Time between samples (years) ^d	Net divergence/year (%) ^e
1	03	0.74 ± 0.17	15	0.66 ± 0.18	2.0	0
	44	1.11 ± 0.33	10	0.80 ± 0.23	5.0	0
	52	0	10	0	5.0	0
Mean ± SE		0.62 ± 0.33	12	0.49 ± 0.25	4.0	0
2	02	1.24 ± 0.20	15	0.93 ± 0.16	2.0	0
	42	1.43 ± 0.33	12	1.29 ± 0.27	5.0	0.12
	46	1.52 ± 0.28	13	1.97 ± 0.33	5.0	0
	56	0.46 ± 0.12	10	0.34 ± 0.11	5.0	0
Mean ± SE		1.16 ± 0.24	12	1.13 ± 0.34	4.2	0.03 ± 0.03
3	05	4.63 ± 0.66	12	3.05 ± 0.48	5.0	0.38
	45	3.73 ± 0.46	14	4.19 ± 0.47	4.5	0.05
	58	1.80 ± 0.28 ^f	12	1.75 ± 0.31	3.5	0.39
Mean ± SE		3.39 ± 0.83	13	3.00 ± 0.70	4.3	0.27 ± 0.11
4	10	6.00 ± 0.50 ^f	13	7.07 ± 0.60	3.0	0.71
	30	7.49 ± 0.67	10	7.88 ± 0.84	4.0	0.82
	64	4.40 ± 0.50	14	5.86 ± 0.57	2.5	0.85
	67	5.50 ± 0.60 ^f	12	nd	na	nd
Mean ± SE		5.85 ± 0.64	12	6.94 ± 0.59	3.2	0.79 ± 0.04

nd, not done; na, non applicable.

^aMean intrasample genetic distance of viral sequences, analyzed between 10 and 15 years after seroconversion date.

^bTime from seroconversion at which the mean viral diversity was measured.

^cMean intersample genetic distance of viral sequences.

^dTime interval between the two samples analyzed.

^eMean annual increase of the genetic distance of viral sequences to the MRCA sequence.

^fDiversity values previously published.⁹

sequences from the same or from different time points (Fig. 1). Thus, the mean viral diversity, intrasample distance, and divergence were 0% (Table 3), indicating a complete lack of viral evolution.

The second pattern, observed in two aviremic (patients 03 and 44) and two viremic (patients 02 and 56) HIV controllers, was characterized by an extremely low, but detectable, level of viral variability (Fig. 1). The mean genetic distances both within and between samples were always above zero (range, 0.34–1.24%) (Table 3). These mean genetic distances, however, are negligible considering the fast inhost evolutionary rate of the *env* gene (~1% per year)³⁵ and the long time since patient infection (>10 years) and between samples (2–5 years). This suggests that ongoing viral evolution was minimal or absent in these patients. Consistent with this idea, isolates from different samples within each patient were indistinguishable (Fig. 1), and no measurable increase in distance from MRCA was observed over a 2–5 year interval (Table 3).

The other two viremic HIV controllers (patients 42 and 46) displayed a pattern similar to that previously described for patients 02, 03, 44, and 56, but showed some evidence of limited ongoing viral evolution. Some variants isolated at earlier time points gave rise to later variants that were more distant from

the MRCA than the first ones (Fig. 1). The mean viral diversity and intersample distances were low but slightly higher than those previously described (range, 1.29–1.97%), and a detectable increase of 0.12%/year of the net divergence from the MRCA was observed in patient 42 (Table 3).

Finally, all patients from groups 3 and 4 displayed a pattern characterized by a continuous replacement of viral lineages over time (Fig. 1). These patients exhibited higher levels of mean viral diversity and intersample genetic distances (~2–8%) and a detectable increase of the mean annual divergence that ranged from 0.4% to 0.8% (except patient 45), characteristic of fast evolving HIV-1 quasispecies (Table 3).

Overall, the mean viral diversity, mean intersample genetic distance, and mean net divergence rate were all positively correlated with the median RNA viral load in the 14 LTNPs analyzed ($p < 0.0001$) (Fig. 2a, b, and c).

DISCUSSION

A small fraction of untreated patients, and a significant proportion of HAART-treated patients, can achieve and maintain prolonged suppression of plasma viremia to below the level of

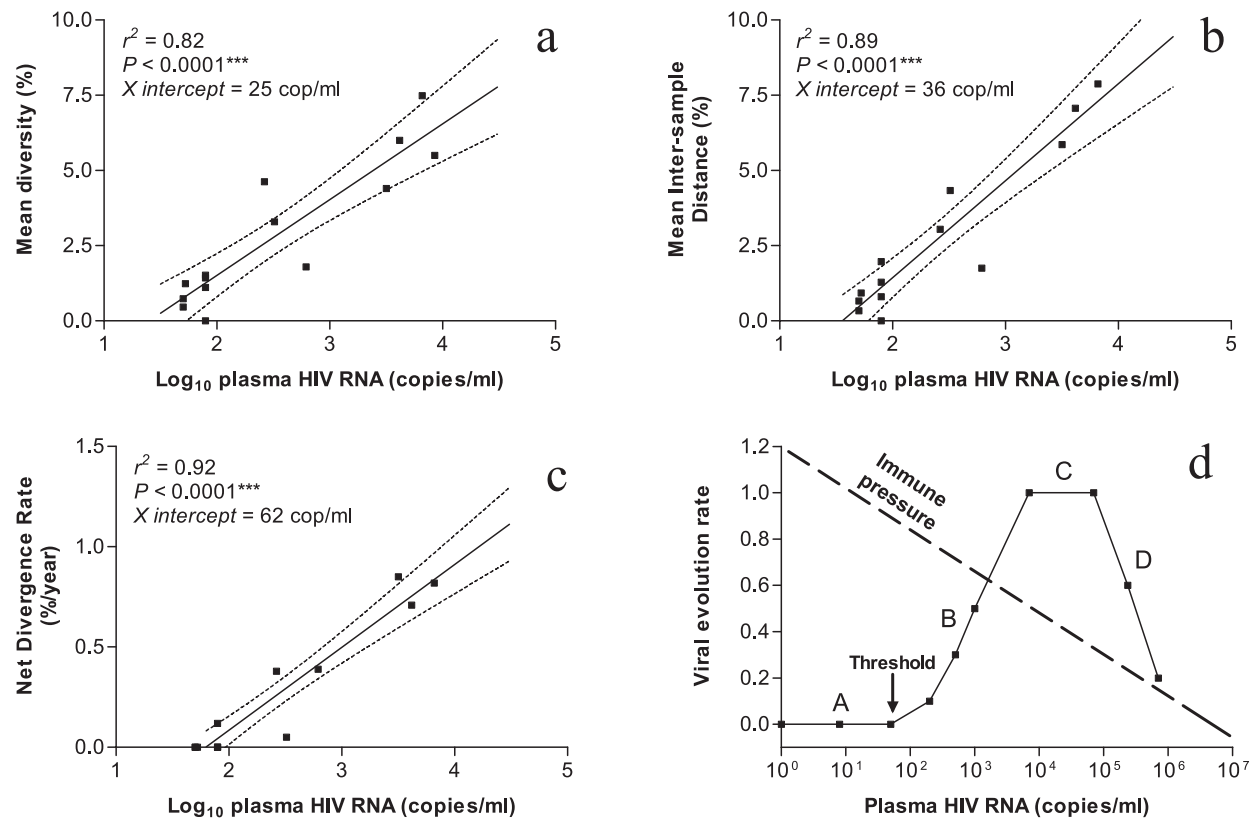


FIG. 2. The mean nucleotide distance within sample (a), between samples (b), and the mean annual divergence rate (c) for each subject were plotted against median number (log₁₀ transformed) of viral RNA copies/ml of plasma. The regression line and 95% confidence intervals are shown. Coefficient of regression, p values, and X intercepts are indicated in each graph. (d) Schematic diagram of the proposed relationship between viral load and rate of viral evolution adapted from Grenfell *et al.*⁵⁵ Letters correspond to phylodynamic patterns: (A) overwhelming immune pressure and no adaptation; (B) high immune pressure and low adaptation; (C) medium immune pressure and high adaptation; and (D) low immune response and low adaptation. Values shown should not be taken literally.

detection of commercially available assays. Whether such a reduction in viral replication can completely suppress intrahost viral evolution remains controversial. In this study, we examined distinct markers of HIV-1 evolution in a group of 14 LTNP patients who were divided into four groups according to the level of suppression of plasma viremia. Significant differences in the pattern of viral evolution were observed between patients of groups 1 and 2 (HIV controllers) and LTNPs of groups 3 and 4. Consistent evidence of viral evolution was found in all patients from groups 3 and 4, similar to that previously described in other LTNPs and typical progressor patients.^{36–40} No or little evidence of ongoing viral evolution was found in patients from groups 1 and 2, comparable to some HAART-treated patients achieving undetectable viremia (<20–50 copies/ml) for several years.^{10–16} This suggests that natural, or drug-induced, control of HIV viremia below the limit of detection of current ultrasensitive assays would be enough to prevent any significant *intra*host HIV-1 evolution.

Two caveats should be noted. First, since HIV-1 proviral DNA has an extremely long half-life and can survive for years,^{13,41–43} comprising both replication-competent and defective viruses, studies based on proviral DNA would not be as sensitive as studies with viral RNA to detect viral evolution. Second, the existence of ongoing viral replication and evolution in others tissue compartments cannot be excluded. Our conclusions, however, are in agreement with previous results that also support a lack of sequence evolution in some LTNP.⁹ In particular, HIV sequences from subjects 02, 03, and 56 samples obtained around 2000 had a viral dating close to the patient's seroconversion time, suggesting that the proviral DNA reservoir was probably established during the prime infection.⁹ It is difficult to explain the dominance of such ancestral proviral sequences up to 16 years after seroconversion in the context of a continuous ongoing viral evolution.

Contrary to previous assumptions,^{6,7} HIV controllers do not form a homogeneous group of patients, although they all displayed viral quasispecies with a very low genetic diversity. Subjects 42 and 46 exhibited evidence of a very limited ongoing viral evolution, even though their median plasma HIV-1 RNA load was maintained at <80 copies/ml. This low-level ongoing viral evolution could be associated with the detection of two or more consecutive blips in such patients (Table 2), as has recently been described in successfully HAART-treated individuals.²³ Consecutive blips have also been associated with a greater risk of virological failure of HAART compared to single blips,⁴⁴ and could represent a potential risk for development of immune escape variants in viremic HIV controllers. In contrast, no evidence of ongoing evolution was detected in either viremic HIV controllers with intermittent blips (subjects 2 and 56) or aviremic HIV controllers (group 1). The pattern of low viral diversity observed in subjects 02, 56, 03, and 44 resembles that of Wang *et al.* previously described by for one LTNP that also achieved undetectable plasma viremia over several years.⁸ Subject 52, however, exhibited an even more homogeneous viral quasispecies with only one single mutation among 20 templates sequenced from two different samples. To our knowledge, this is the first time that such a low degree of *env* viral diversity has been described in a chronic HIV-1-infected patient.

Finally, an overall positive correlation between the degree of evolution of *env* sequences and the median RNA viral load

was observed in the 14 LTNPs. This result is consistent with previous studies that suggest a direct correlation between viral evolution rate and plasma viremia (or disease progression rate),^{40,45–47} but disagrees with other reports that suggest an inverse correlation between the rate of viral diversification and the level of viral replication (or disease progression rate),^{36,48–52} or no specific association between these parameters.^{53,54} These apparent contradictory observations could be reconciled by a general phylodynamic framework recently described by Grenfell *et al.*,⁵⁵ which proposes that a complex correlation exists between the net rate of viral adaptation (evolution) and the viral replication level (or rate of disease progression) (Fig. 2d). According to such a framework, the fastest viral adaptation rate occurs when a substantial immune response coincides with appreciable virus replication, as in LTNPs of group 4 and typical progressors (phase C). Lower adaptation rates occur when a weak immune pressure reduces the strength of natural selection for escape variants, as in rapid progressors (phase D), or when a strong immune response greatly reduces the viral population size limiting the number of escape mutants, as in LTNPs of group 3 (phase B). However, no viral adaptation is expected when an overwhelming immune pressure reduces HIV replication to below a threshold level, as in elite suppressors (phase A).

In summary, this work demonstrate that some LTNPs that naturally control viral replication below the detection limit of 50–80 copies/ml seem to exhibit an efficient containment of viral evolution. We postulate that those LTNPs with an efficient suppression of virus evolution probably represent true nonprogressor patients and their study may provide important information for the design of vaccine and therapeutic approaches. The existence of various degrees of HIV-1 evolution within LTNPs patients must be taken into account when making comparative studies between nonprogressors and other progressor categories.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. Vera Bongertz for critical reviewing of the manuscript. Work in the Instituto Oswaldo Cruz was supported by CNPq grants. Work in the Centro Nacional de Microbiología was supported by SAF 2003/04987 grants, and SAF 2005/03833, by the Plan Nacional del SIDA and in part by the Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA (Red de grupos 173) of the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISs) and by the ISCIII-RETIC RD06/006. G.B. was supported by a FAPERJ-FIOCRUZ fellowship.

REFERENCES

1. Madec Y, Boufassa F, Rouzioux C, Delfraissy JF, and Meyer L: Undetectable viremia without antiretroviral therapy in patients with HIV seroconversion: An uncommon phenomenon? *Clin Infect Dis* 2005;40:1350–1354.
2. Madec Y, Boufassa F, Porter K, and Meyer L: Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverters. *AIDS* 2005;19:2001–2007.
3. Lefrere JJ, Mariotti M, Morand-Joubert L, Thauvin M, and Roudot-Thoraval F: Plasma human immunodeficiency virus RNA below 40 copies/mL is rare in untreated persons even in the first years of infection. *J Infect Dis* 1999;180:526–529.

4. Hubert JB, Burgard M, Dussaix E, *et al.*: Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS* 2000;14:123–131.
5. Goudsmit J, Bogaards JA, Jurriaans S, *et al.*: Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *AIDS* 2002;16:791–793.
6. Lefrere JJ, Morand-Joubert L, Mariotti M, *et al.*: Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997;90:1133–1140.
7. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, *et al.*: HIV controllers: A homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* 2005;41:1053–1056.
8. Wang B, Mikhail M, Dyer WB, Zaunders JJ, Kelleher AD, and Saksena NK: First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* 2003;312:135–150.
9. Bello G, Casado C, Sandois V, *et al.*: A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population. *J Gen Virol* 2005;86:355–364.
10. Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, *et al.*: Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol* 1998;72:2422–2428.
11. Karlsson AC, Birk M, Lindback S, Gaines H, Mittler JE, and Sonnerborg A: Initiation of therapy during primary HIV type 1 infection results in a continuous decay of proviral DNA and a highly restricted viral evolution. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:409–416.
12. Hermankova M, Ray SC, Ruff C, *et al.*: HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *JAMA* 2001;286:196–207.
13. Ruff CT, Ray SC, Kwon P, *et al.*: Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J Virol* 2002;76:9481–9492.
14. Persaud D, Siberry GK, Ahonkhai A, *et al.*: Continued production of drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 in children on combination antiretroviral therapy who have undetectable viral loads. *J Virol* 2004;78:968–979.
15. Kieffer TL, Finucane MM, Nettles RE, *et al.*: Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: Virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads. *J Infect Dis* 2004;189:1452–1465.
16. Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, *et al.*: Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 2005;293:817–829.
17. Gunthard HF, Frost SD, Leigh-Brown AJ, *et al.*: Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol* 1999;73:9404–9412.
18. Martinez-Picado J, DePasquale MP, Kartsonis N, *et al.*: Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10948–10953.
19. Frost SD, Gunthard HF, Wong JK, Havlir D, Richman DD, and Leigh Brown AJ: Evidence for positive selection driving the evolution of HIV-1 env under potent antiviral therapy. *Virology* 2001;284:250–258.
20. Gunthard HF, Havlir DV, Fiscus S, *et al.*: Residual human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis* 2001;183:1318–1327.
21. Cohen Stuart JW, Wensing AM, Kovacs C, *et al.*: Transient relapses (“blips”) of plasma HIV RNA levels during HAART are associated with drug resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;28:105–113.
22. Frenkel LM, Wang Y, Learn GH, *et al.*: Multiple viral genetic analyses detect low-level human immunodeficiency virus type 1 replication during effective highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2003;77:5721–5730.
23. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, *et al.*: Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: Expression of archival virus and replication of virus. *J Virol* 2005;79:9625–9634.
24. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, *et al.*: Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999;340:1605–1613.
25. Birk M, Aleman S, Visco-Comandini U, and Sonnerborg A: Proviral HIV-1 dynamics and evolution in patients receiving efficient long-term antiretroviral combination therapy. *HIV Med* 2000;1:205–211.
26. Riva E, Pistello M, Narciso P, *et al.*: Decay of HIV type 1 DNA and development of drug-resistant mutants in patients with primary HIV type 1 infection receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:1599–1604.
27. Bello G, Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, and Lopez-Galindez C: Co-existence of recent and ancestral nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *J Gen Virol* 2004;85:399–407.
28. Bello G, Casado C, Garcia S, *et al.*: Lack of temporal structure in the short term HIV-1 evolution within asymptomatic naive patients. *Virology* 2007;362:294–303.
29. Rodrigo AG, Goracke PC, Rowhanian K, and Mullins JI: Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:737–742.
30. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, *et al.*: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257–1261.
31. Tanuri A, Swanson P, Devare S, *et al.*: HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 1999;20:60–66.
32. Casado C, Garcia S, Rodriguez C, del Romero J, Bello G, and Lopez-Galindez C: Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Gen Virol* 2001;82:2495–2508.
33. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG: The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876–4882.
34. Kumar S, Tamura K, and Nei M: MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150–163.
35. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, *et al.*: Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999;73:10489–10502.
36. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, *et al.*: Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 1996;272:537–542.
37. Menzo S, Sampaolesi R, Vicenzi E, *et al.*: Rare mutations in a domain crucial for V3-loop structure prevail in replicating HIV from long-term non-progressors. *AIDS* 1998;12:985–997.
38. Bagnarelli P, Mazzola F, Menzo S, Montroni M, Butini L, and Clementi M: Host-specific modulation of the selective constraints driving human immunodeficiency virus type 1 env gene evolution. *J Virol* 1999;73:3764–3777.
39. Wang B, Spira TJ, Owen S, Lal RB, and Saksena NK: HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 re-

- gion extension unique to slow progressors and non-progressors. *AIDS* 2000;14:213–223.
40. Markham RB, Wang WC, Weisstein AE, *et al.*: Patterns of HIV-1 evolution in individuals with differing rates of CD4 T cell decline. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12568–12573.
 41. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, *et al.*: Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999;5:512–517.
 42. Persaud D, Pierson T, Ruff C, *et al.*: A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J Clin Invest* 2000;105:995–1003.
 43. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, *et al.*: Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 2003;9:727–728.
 44. Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, *et al.*: Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002;16:1967–1969.
 45. Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, and Viscidi RP: Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J Virol* 1995;69:7548–7558.
 46. Mani I, Gilbert P, Sankale JL, Eisen G, Mboup S, and Kanki PJ: Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_AG-IbNG infection. *J Virol* 2002;76:10745–10755.
 47. Mikhail M, Wang B, Lemey P, *et al.*: Role of viral evolutionary rate in HIV-1 disease progression in a linked cohort. *Retrovirology* 2005;2:41.
 48. Lukashov VV, Kuiken CL, and Goudsmit J: Intra-host human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period. *J Virol* 1995;69:6911–6916.
 49. Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, and Wolinsky SM: Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* 1997;71:663–677.
 50. Liu SL, Schacker T, Musey L, *et al.*: Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: Human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol* 1997;71:4284–4295.
 51. Shioda T, Oka S, Xin X, *et al.*: In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: Association of V2 extension with slow disease progression. *J Virol* 1997;71:4871–4881.
 52. Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, *et al.*: Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* 1997;71:7498–7508.
 53. Zhang L, Diaz RS, Ho DD, Mosley JW, Busch MP, and Mayer A: Host-specific driving force in human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo. *J Virol* 1997;71:2555–2561.
 54. Bello G, Casado C, Garcia S, *et al.*: Plasma RNA viral load is not associated with inpatient quasispecies heterogeneity in HIV-1 infection. *Arch Virol* 2004;149:1761–1771.
 55. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, *et al.*: Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 2004;303:327–332.

Address reprint requests to:

Cecilio López-Galíndez
 Servicio de Virología Molecular
 Centro Nacional de Microbiología
 Instituto de Salud Carlos III
 Carretera de Majadahonda–Pozuelo, Km. 2.200
 Majadahonda
 Madrid 28220, Spain

E-mail: clopez@isciii.es

A subset of human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors is characterized by the unique presence of ancestral sequences in the viral population

Gonzalo Bello,¹ Concepción Casado,¹ Virginia Sandonis,¹ Manuela Alonso-Nieto,² José Luis Vicario,² Soledad García,³ Victoria Hernando,³ Carmen Rodríguez,³ Jorge del Romero³ and Cecilio López-Galíndez¹

Correspondence
Cecilio López-Galíndez
clopez@isciii.es

¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

²Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, 28032 Madrid, Spain

³Centro Sanitario Sandoval, IMSALUD, 28010 Madrid, Spain

Within human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients, there are those who have been infected for more than 10 years with a CD4⁺ cell count of >500 cells μl⁻¹ and who remain asymptomatic without antiretroviral therapy; these patients are designated long-term non-progressors (LTNPs). In a set of 16 LTNPs, viral dating, DNA viral load, quasispecies heterogeneity and antibody (Ab) titres against gp160 and β₂ microglobulin (β₂m) were determined. Plasma viral RNA and CD4⁺ and CD8⁺ T-cell numbers were estimated in more than three samples per patient. Host genetic characteristics, such as Δ32-CCR5 genotype and human leukocyte antigen (HLA) genotype and supertypes, and clinical-epidemiological factors were evaluated. Dating of global populations and of DNA and RNA viral quasispecies identified two subsets of patients: one displaying only ancestral sequences and the other displaying predominantly modern sequences. The ancestral patients displayed a significant reduction in RNA and DNA viral loads, quasispecies heterogeneity, CD8⁺ cell number, anti-gp160 Ab titres and β₂m level, and they were also associated with better use of safe-sex practices and higher presence of the HLA sB58 supertype than the modern subset. Viral dating has therefore permitted the segregation of LTNPs into two subsets that show very different virological, immunological, host and clinical-epidemiological characteristics. Moreover, whereas the modern subset displayed low levels of virus replication, the ancestral group displayed not only a very limited virus replication, often to undetectable levels, but also very slow or arrested viral evolution, maintaining the close relationship of the viral population to the transmitted virus.

Received 30 June 2004
Accepted 15 October 2004

INTRODUCTION

The natural history of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection is heterogeneous because of the diverse duration of the AIDS-free period, although the median time of appearance of AIDS clinical symptoms is between 8 and 10 years after infection (Bacchetti & Moss, 1989; Hendriks *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 1989). However, cohort studies have identified a small fraction of infected people, about 5–10% (Buchbinder *et al.*, 1994; Keet *et al.*, 1994; Lefrère *et al.*, 1997; Sheppard *et al.*, 1993), who, despite infection for more than 10 years, remain symptomless and maintain a relatively high CD4⁺ cell count (>500 CD4⁺ cells μl⁻¹) without antiviral therapy (Buchbinder *et al.*, 1994; Keet

et al., 1994; Learmont *et al.*, 1992; Lifson *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 1993). Different designations have been used for these patients, such as non-progressors (Lifson *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 1993), long-term survivors (Levy, 1993), long-term asymptomatics (Keet *et al.*, 1994) and long-term non-progressors (LTNPs) (Buchbinder *et al.*, 1994).

LTNPs have been associated with a low viral burden (Barker *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1995; Hogervorst *et al.*, 1995; Pantaleo *et al.*, 1995; Rinaldo *et al.*, 1995) and a strong cellular (Barker *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1995; Harrer *et al.*, 1996; Hogervorst *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1995; Pantaleo *et al.*, 1995; Rinaldo *et al.*, 1995) or humoral (Cao *et al.*,

1995; Carotenuto *et al.*, 1998; Hogervorst *et al.*, 1995; Keet *et al.*, 1994; Lifson *et al.*, 1991; Montefiori *et al.*, 1996; Pantaleo *et al.*, 1995; Pilgrim *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997) specific immune response. Also, lower non-specific immune system activation (Buchbinder *et al.*, 1994; Lifson *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 1993), specific human leukocyte antigen (HLA) haplotypes (Hogan & Hammer, 2001) and supertypes (Trachtenberg *et al.*, 2003), a 32 bp deletion in the *CCR5* gene (Dean *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 1997) and infection with less virulent HIV-1 strains (Cao *et al.*, 1995; Keet *et al.*, 1994; Learmont *et al.*, 1992) are associated with long-term survival.

HIV-1 has a replication machinery that leads to the accumulation of mutations, due to the lack of repair systems. The correlation between viral genetic divergence and time has been used to trace the origin of the HIV-1 (Korber *et al.*, 2000) and HIV-2 (Lemey *et al.*, 2003) global or country-wide epidemics (Casado *et al.*, 2000; Lukashov & Goudsmit, 2002; Robbins *et al.*, 2003), a familial transmission case (Leitner & Albert, 1999) and the validation of an old HIV-1 sample (Zhu *et al.*, 1998). Recently, we used the correlation of genetic divergence with time, derived from the Spanish epidemic, for dating different HIV-1 viral subpopulations within patient quasispecies, revealing the co-existence of ancestral and modern subpopulations (Bello *et al.*, 2004).

In the present study, we extended the dating of viral sequences to a group of LTNPs. This analysis permitted the identification of two subsets of patients, one showing only ancestral viral sequences and the other showing predominantly modern viral sequences. We have also compared several clinical, virological, immunological and host genetic markers between the subsets.

METHODS

Study subjects. Sixteen LTNP HIV-1-infected individuals were selected at random from patients of an outpatient clinic [Centro Sanitario Sandoval, IMSALUD, Madrid (CSS)]. We defined LTNP patients as subjects with documented HIV-1 infection for more than 10 years, absence of AIDS-related conditions, CD4⁺ lymphocyte counts of ≥ 500 cells μl^{-1} and no antiretroviral treatment. At the first visit, a clinical history was completed, including epidemiological and risk behaviour data, particularly since infection with HIV-1. Subjects were monitored every 6–12 months and a physical examination, risk practices and haematological and virological profiles (including CD4⁺ and CD8⁺ cell counts and plasma HIV-1 RNA copies) were assessed at each visit.

Blood samples. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma samples were obtained as described previously (Casado *et al.*, 2001) and the CD4⁺ and CD8⁺ cell counts were measured with mAbs by flow cytometry (Epics-XL; Beckman Coulter).

Separation, amplification and quantification of viral nucleic acids. PBMC-associated DNA was obtained from 1×10^7 cells by standard methods. Viral RNA was isolated from 200–500 μl plasma according to Boom *et al.* (1990). Nested PCR and RT-PCR were used to amplify the C2–V5 region in *env* as described previously (Casado *et al.*, 2001). DNA viral load was determined in the same

region, as reported previously (Rodrigo *et al.*, 1997). To avoid genetic bottlenecks, the first PCR included at least 20 copies of viral DNA and primers 169ECU (5'-AATGGCAGCACAGTACAATGTACAC-3' at positions 6945–6969; all numbering is as for the HXB2 clone) and 96ED (5'-AGACAATAATTGTCTGGCCTGTACCGT-3', positions 7862–7836). The second PCR included a 1 μl aliquot of the first PCR product and primers 27EU (Casado *et al.*, 2001) and 167ED (5'-ATGAATTCTGGGTCCCTCCTGAGGA-3', positions 7314–7339). When a low proviral load did not allow the simultaneous amplification of at least 20 copies of provirus, two to ten first-round PCR products were pooled and a 5 μl aliquot was used in the second PCR to prevent the loss of sequence heterogeneity. In this study, we analysed two viral populations: the global viral population, which is the result of PCR amplification of at least 20 copies of the DNA sample, and a quasispecies analysis, which refers to the study of 20 clones of the global population.

Plasma HIV-1 RNA was quantified with an Amplicor HIV Monitor test kit, which has a detection limit of 50 copies ml^{-1} (Roche); in patients with undetectable viral load, a value of 50 copies was used for the estimation of mean values.

To obtain the viral RNA sequence from patient plasma, the first RT-PCR included 50–100 copies of viral RNA, deduced from the viral load, and primers 169ECU and 96ED. The second PCR included a 1 μl aliquot of the first RT-PCR product and primers 27EU and 167ED.

Cloning and sequencing. To obtain the proviral DNA and viral RNA global sequences from each patient, purified nested PCR and RT-PCR products were sequenced with primer 27EU by using an ABI PRISM Dye Terminator kit in an ABI PRISM 377 sequencer (both from Perkin-Elmer). To analyse proviral quasispecies, a 2 μl aliquot of the nested PCR product was ligated into plasmid pCR2.1, cloned according to the TOPO TA cloning kit instructions (Invitrogen) and 18–20 clones per sample were sequenced.

Dating viral global nucleotide sequences. HIV-1 subtype B V3 *env* nucleotide sequences from 96 Spanish samples, collected between 1993 and 2001, were used to generate a Spanish consensus nucleotide sequence, which contained the most frequent nucleotide at each position (Casado *et al.*, 2000). Also, the most recent common ancestor (MRCA) for this nucleotide sequence set (Spanish MRCA) was inferred by the DNAML program (PHYLIP version 3.1) as explained previously (Bello *et al.*, 2004). The genetic distance of each patient's V3 sequence from the Spanish consensus sequence was estimated by the Kimura two-parameter model (transition/transversion ratio, 2.0) as implemented in MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) with 100 bootstrapped datasets, or to the Spanish MRCA by the F-84 method with the DNADIST program (in PHYLIP version 3.1). These values were used to estimate viral dating by using the equations derived previously (Bello *et al.*, 2004). Dating using the Spanish consensus or the Spanish MRCA did not result in statistically different dates and, for clarity, only the results with the Spanish consensus are shown in Table 1.

Nucleotide distance analysis. For nucleotide sequence analysis, a 614 bp fragment of the C2–C5 region (nt 7068–7682 in the HXB2 clone) in the *env* gene was used. Nucleotide sequences were aligned by using CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) and later edited manually. All positions with an alignment gap in at least one nucleotide sequence were excluded from the analysis. The mean intrasample heterogeneity was expressed as the mean distance for all pairwise comparisons between proviral nucleotide sequences within quasispecies, estimated by the Kimura two-parameter model (transition/transversion ratio, 2.0) as implemented in MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) with 100 bootstrapped datasets.

Table 1. Time estimation of patients' viral populations

Patients were segregated into two subsets according to the dating of the viral global sequences. 'Ancestral' classifies patients with a dating close to the seroconversion time and 'Modern' identifies patients with a dating close to the sampling time. —, Negative amplification under our RT-PCR conditions.

Patient	Seroconversion year	Sampling year	Estimated date (DNA)*	Estimated date (RNA)*
Ancestral				
1	Before 1990	2001	1987 ± 1.5	—
		2003	1986 ± 2.0	—
2	1987	2001	1988 ± 1.3	—
		2002	1988 ± 1.3	—
3	1988	2002	1987 ± 1.5	—
		2003	1986 ± 2.0	—
27	1986	1998	1987 ± 1.5	—
		2000	1990 ± 1.0	—
29	1987	1998	1991 ± 0.9	—
		2000	1991 ± 0.9	—
56	1989	1999	1987 ± 1.5	—
		2001	1987 ± 1.5	—
58	1991	1999	1990 ± 1.0	1992 ± 0.9
		2002	1992 ± 0.9	1992 ± 0.9
Modern				
4	1992	2002	2003 ± 1.3	2003 ± 1.3
7	1987	2002	2001 ± 0.9†	2001 ± 0.9
10	1991	2003	2003 ± 1.3	2003 ± 1.3
24	1988	1998	2001 ± 0.9	2003 ± 1.3
30‡	1988	1999	2000 ± 0.7	1998 ± 0.6
38	1988	1998	1999 ± 0.6	—
45‡	1987	1998	2000 ± 0.7	2004 ± 1.3
64	1985	2002	1999 ± 0.6	1999 ± 0.6
67	1989	2002	2002 ± 1.0	1999 ± 0.6

*Dating (mean ± SD) of PBMC-associated DNA and plasma RNA global viral sequences, using the correlation plot between sampling year and genetic distance to the Spanish consensus sequence or to the Spanish MRCA, as explained in Methods and by Bello *et al.* (2004); only consensus values are shown.

†In this patient, DNA dating was performed in individual clones.

‡Patients 30 and 45 have been studied in a previous work (Bello *et al.*, 2004).

Serological assays. End-point plasma titres of antibodies to the gp160 protein were determined by an ELISA kit (Genelavia Mixt detection kit; Sanofi Diagnostics Pasteur).

Plasma β_2 -microglobulin (β_2m) concentrations were measured by using an ELISA (DRG Diagnostics). As a control, the β_2m level in 32 HIV-1-negative blood donors was determined.

Characterization of HLA alleles. Generic exon 2 and 3 DNA amplification for the HLA-A and B genes and hybridization with sequence-specific probes coupled to fluorescent beads was performed with LifeMATCH kits (Orchid Diagnostics). Higher resolution by sequence-based typing was also used when needed in order to precisely define the HLA supertypes (Sette & Sidney, 1999; Trachtenberg *et al.*, 2003).

Characterization of the $\Delta 32$ -CCR5 genotype. Analysis of the $\Delta 32$ -CCR5 genotype was performed on PBMC DNA by PCR as described by Michael *et al.* (1997). The primers amplified a gene

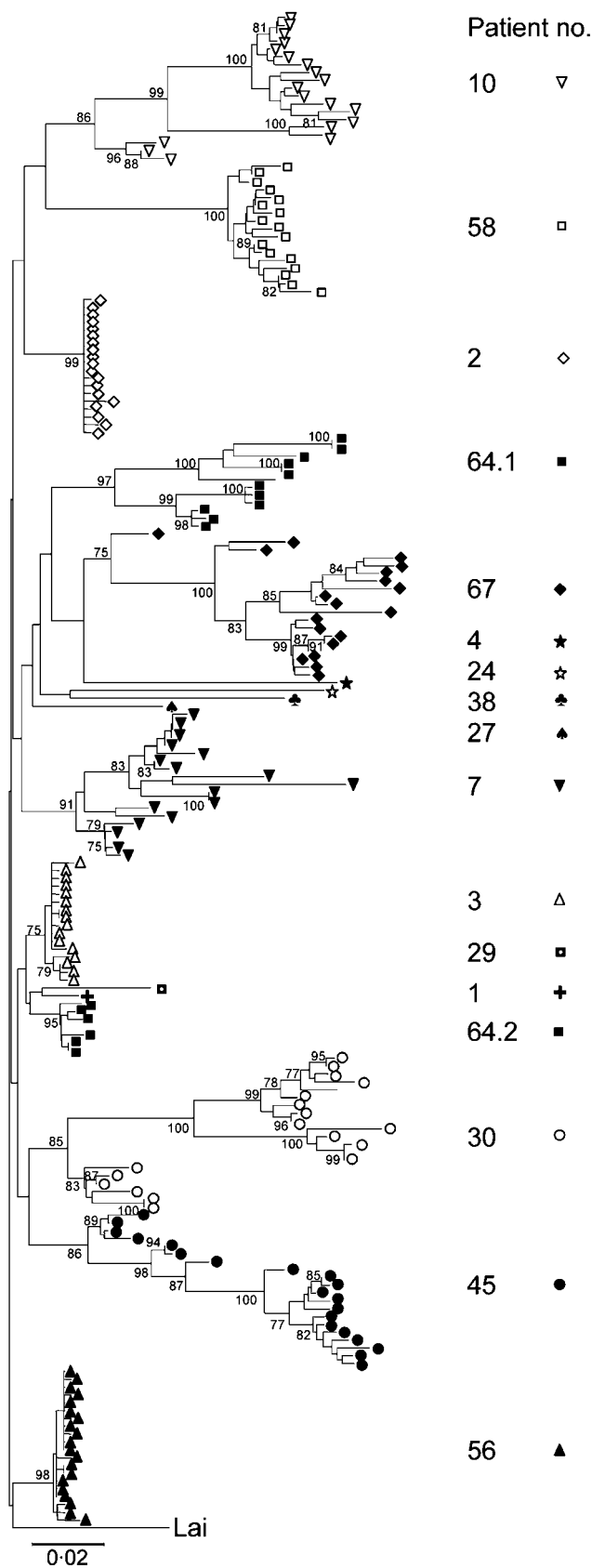
fragment of 225 nt for the wild-type allele and of 193 nt for the $\Delta 32$ -CCR5 allele, which were separated in 7% TBE polyacrylamide gels.

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out with the Statgraphics Plus 5.0 program (Statistical Graphics Corporation) and SPSS 11-0 (SPSS Inc.). An unpaired Student's *t*-test was used to compare group means, except for DNA proviral load and CD4/CD8 ratio, where a Wilcoxon non-parametric test was used, and in the analysis of the HLA alleles, where *P* was calculated by a χ^2 test and the Bonferroni correction.

RESULTS

Dating of the viral population identified two subsets of LTNPs

Dating of the viral sequences in a group of 16 LTNPs allowed the identification of two different subsets. For this analysis,



we used the correlation of genetic distance with time that was obtained by our group for the Spanish epidemic by using two different methods, as reported previously (Bello *et al.*, 2004) and described briefly in Methods. According to this methodology, we defined ancestral sequences as those that date close to the patient's seroconversion time (± 3 years), whereas the modern sequences correspond to sequences that have an estimated date similar to the sampling time (± 2 years), as explained previously (Bello *et al.*, 2004). The dating of patient sequences was performed on global DNA sequences, confirmed by DNA quasispecies analysis and reconfirmed by dating global plasma viral RNA.

The samples analysed were taken between 1998 and 2003 and seroconversion times ranged from 1985 to 1992. Of the 16 LTNP studied, a subset of seven LTNP were designated 'ancestral' LTNP, whereas the other nine patients were identified as 'modern' LTNP. In the ancestral LTNP, the global DNA and RNA viral sequences (when amplified), as well as all individual sequences in the DNA viral quasispecies, had a dating that was very distant from the sampling time (9–15 years earlier) and close to the patient seroconversion time (± 3 years) (Table 1). This viral dating indicated very slow or arrested viral divergence in the ancestral LTNP. In these patients, the dating of the viral global sequence was confirmed in a second sample that was separated from the first by at least 1 year, giving similar results (Table 1). In the modern subset, the global DNA and RNA viral sequences and the majority of the individual sequences in the DNA viral quasispecies analysis had a dating close to the sampling time (± 2 years). In the modern LTNP, although the DNA viral quasispecies were dominated by modern clones, some individual sequences were ancestral. The only exception to this trend were the viral quasispecies of patient 7, where only a minority of the DNA clones were modern. However, like all the other modern LTNP, patient 7 displayed a modern global RNA viral sequence (Table 1). The modern dating of the viral sequences in this subset indicated a continuous process of viral evolution during HIV-1 infection.

Fig. 1. Phylogenetic tree derived from patients' viral quasispecies and global sequences in the *env* gene. Nucleotide viral sequences of PBMC-derived HIV-1 C2–C5 gp120 *env* DNA from patients in whom viral quasispecies analysis was performed (see Table 2) and global sequences from the remaining patients were processed as indicated in Methods to obtain a neighbour-joining tree. The Lai reference sequence was used as outgroup. Numbers at nodes refer to the number of bootstrap repetitions (out of 1000) in which nucleotide sequences grouped together. Only bootstrap values $> 75\%$ are shown. All sequences from the same patient formed monophyletic clusters except for patient 64, in whom two separated clades, 64.1 and 64.2, were observed. Bar, 2% genetic distance.

Virological and immunological characteristics of patients

To further characterize these two subsets of patients, several virological and immunological markers were analysed. Firstly, a phylogenetic analysis of the sequences from viral quasispecies was performed. This analysis showed that all sequences from each patient formed monophyletic groups, with bootstrap values of >75% separating the sequences between patients, except in patient 64 of the modern subset, who displayed two distinct clades that clustered in different branches of the tree (see Fig. 1). Also, the viral phenotype in all patients was deduced from the V3 sequence; all of the viruses were non-syncytial (Barker *et al.*, 1998; Hogervorst *et al.*, 1995; Keet *et al.*, 1994).

The virological markers analysed revealed statistically significant differences in mean quasispecies heterogeneity, plasma RNA copies and PBMC-associated DNA viral load between the two subsets (Table 2). The modern subset respectively displayed higher mean RNA viral loads (3420 vs 275 copies ml⁻¹), DNA viral loads (344 vs 10 copies in 10⁶ cells) and quasispecies heterogeneity (5.8 vs 0.9%) than

the ancestral subset (Table 2). Only patients with ancestral viral sequences displayed RNA viral loads below 50 copies ml⁻¹, DNA viral loads below 10 copies in 10⁶ cells and heterogeneity values below 1%. All of these markers emphasize very limited virus replication in the ancestral LTNP patients.

Immunological analysis revealed no significant differences in the mean number of CD4⁺ cells between subsets, although two patients of the modern subset (24 and 67) had a significantly negative CD4⁺ slope, suggesting some degree of disease progression (Table 3). Furthermore, the modern group displayed higher mean CD8⁺ cell numbers (1505 vs 793 cells μl⁻¹), anti-gp160 antibody titres (15 672 vs 5092) and β₂m levels (2.7 vs 1.7 μg ml⁻¹) than the ancestral subset (Table 3). The mean CD4/CD8 ratio in the subsets was not significantly different, but only patients with ancestral sequences showed a non-inverted CD4/CD8 ratio (patients 2, 3 and 56; Table 3). All of these markers revealed elevated immune-system activation in patients with modern viral sequences, characteristic of HIV-1-infected patients (Barker *et al.*, 1998; Buchbinder *et al.*, 1994; Lefrère *et al.*,

Table 2. Patients' virological data

P values between ancestral and modern samples were calculated by Student's *t*-test. ND, Not done.

Patient	HIV-1 RNA [copies (ml plasma) ⁻¹]*	No. samples/years (ratio)†	HIV-1 DNA (copies in 10 ⁶ PBMCs)‡	Mean heterogeneity (DNA)§
Ancestral				
1	111 (<50–367)	8/5 (1.6)	3	ND
2	91 (<50–205)	5/4 (1.25)	7	0.3 ± 0.1
3	<50	4/4 (1)	5	0.9 ± 0.2
27	385 (121–643)	6/4 (1.5)	ND	ND
29	<50	4/4 (1)	ND	ND
56	473 (<50–2 500)	15/6 (2.5)	2	0.5 ± 0.1
58	764 (193–2 151)	6/5 (1.2)	31	1.8 ± 0.2
Mean ± SD	275 ± 275	6.8/4.5 (1.4)	10 ± 12	0.9 ± 0.6
Modern				
4	765 (108–1 953)	4/5 (0.8)	30	ND
7	713 (500–966)	3/6 (0.5)	13	5.1 ± 0.6
10	3 662 (2 285–5 315)	6/5 (1.2)	100	6.0 ± 0.5
24	5 134 (1 027–5 365)	15/7 (2.1)	ND	ND
30	7 192 (2 518–17 567)	16/7 (2.3)	110	7.1 ± 0.7
38	<500	4/2 (2)	ND	ND
45	561 (147–1 957)	13/5 (2.6)	18	4.6 ± 0.5
64	3 436 (1 665–11 926)	9/6 (1.5)	320	6.7 ± 0.7
67	8 816 (2 963–18 426)	9/6 (1.5)	1821	5.5 ± 0.6
Mean ± SD	3 420 ± 3 111	8.9/5.4 (1.6)	344 ± 659	5.8 ± 1.2
<i>P</i>	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

*Plasma RNA, mean and range (in parentheses) (detection limit was 50 copies ml⁻¹ except for patient 38, for whom it was 500 copies ml⁻¹).

†No. determinations performed during the patient's follow-up in years and ratio (samples per year).

‡PBMC-associated viral DNA, assessed only in the first sample on which dating was performed.

§Mean ± SD nucleotide distance between all pairwise comparisons of sequences from each patient, assessed in the first sample on which the dating was performed.

Table 3. Patients' immunological data

P values were calculated by Student's *t*-test.

Patient	CD4 ⁺ cells (μl^{-1})*	CD4 ⁺ cell loss (μl^{-1} month ⁻¹)†	CD8 ⁺ cells (μl^{-1})*	CD4/CD8*	α -gp160 Ab titre‡	$\beta_2\text{m}$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)§
Ancestral						
1	788	NS	1 124	0.7	6 997	1.5
2	1 342	NS	1 114	1.2	6 762	1.9
3	911	ND	628	1.5	3 437	1.7
27	571	NS	624	0.8	12 759	2.9
29	721	ND	772	0.9	729	1.2
56	965	NS	487	2.0	955	1.1
58	715	NS	799	0.8	4 012	1.4
Mean \pm SD	859 \pm 250		793 \pm 246	1.1 \pm 0.5	5 092 \pm 4 188	1.7 \pm 0.6
Modern						
4	1 101	ND	1 412	0.8	15 248	3.6
7	787	ND	2 299	0.3	16 449	2.7
10	588	NS	1 244	0.5	18 664	2.2
24	508	13.23	1 364	0.4	12 412	2.0
30	827	NS	1 058	0.8	15 032	3.8
38	1 082	ND	1 120	0.7	13 347	1.8
45	1 070	NS	1 314	0.9	13 138	2.1
64	560	NS	1 873	0.3	20 018	2.9
67	638	9.90	1 861	0.3	16 738	3.5
Mean \pm SD	796 \pm 239		1 505 \pm 414	0.6 \pm 0.2	15 672 \pm 2 565	2.7 \pm 0.8
<i>P</i>	> 0.05		< 0.05	> 0.05	< 0.05	< 0.05

*No. samples analysed is the same as that given in the third column of Table 2.

†Assessed only when more than five values were available. ND, Not done; NS, not significantly different from 0.

‡Antibody titres against gp160 protein, expressed as the reciprocal serum dilution at which the absorbance was equal to the cut-off value after a regression analysis.

§ $\beta_2\text{m}$ level was determined only in the first sample on which the dating was performed. As a negative control, the $\beta_2\text{m}$ levels in a group of 32 blood donors were determined to be 1.02 ± 0.22 , which was statistically significantly different from the two groups of HIV-1 patients.

1997; Lifson *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 1993). In contrast, patients with ancestral viral sequences presented values for the CD4⁺, CD8⁺ and $\beta_2\text{m}$ markers that were close to those in uninfected control individuals (Barker *et al.*, 1998; Buchbinder *et al.*, 1994; Lifson *et al.*, 1991; Sheppard *et al.*, 1993).

Host genetic characteristics of the patients

Different host genetic characteristics have been associated with the rate of disease progression, such as the $\Delta 32$ -CCR5 genotype or some HLA supertypes. Analysis of the $\Delta 32$ -CCR5 genotype revealed one heterozygous individual in the ancestral subset (14%) and three in the modern one (33%). These percentages were not significantly different from the HIV-1-negative population ($P > 0.05$; Table 4).

The results of the HLA supertype analysis are shown in Table 4. Regarding the HLA B gene, the only significant difference found was a higher frequency of the sB58 supertype in the ancestral subset (57%) than in the HIV-1-negative control group (11%) ($P = 0.007$; Table 4). This

frequency was also higher than the frequency in the modern group (22%), but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$; Table 4).

Clinical, epidemiological and risk behaviour characteristics of the patients

To study whether clinical, epidemiological or risk behaviour history of the patients could also be related to the differences observed between the subsets, several parameters were evaluated. No statistically significant differences were found between the groups in age, gender, infection route or time from HIV-1 infection, nor in the self-reported use of alcohol or other drugs (data not shown). The presence of serological markers for other pathogens, such hepatitis B or C viruses, *Mycobacterium tuberculosis* or *Toxoplasma gondii*, did not differ between subsets. Re-exposure to HIV after infection was evaluated by different markers: syringe sharing, sexually transmitted infections or safe-sex practices. The proportion of patients that shared syringes (67 vs 17%) and displayed sexually transmitted infections (67 vs 29%) after HIV infection was higher in the modern subset than in the

Table 4. Host genetic factors

Numbers in parentheses indicate the absolute no. patients presenting the characteristic. *P* values were calculated by using a χ^2 test and the Bonferroni correction.

Genotype	LTNPs		HIV-1 ⁻ (<i>n</i> = 30/97)*	<i>P</i>
	Ancestral (<i>n</i> = 7)	Modern (<i>n</i> = 9)		
CCR5				
Δ32†	14 % (1)	33 % (3)	13 % (4)	>0.05
HLA A				
sA1	29 % (2)	67 % (6)	36 % (35)	>0.05
sA2	86 % (6)	22 % (2)	53 % (51)	>0.05
sA3	14 % (1)	33 % (3)	36 % (35)	>0.05
sA24	57 % (4)	22 % (2)	34 % (33)	>0.05
sA others	—(0)	22 % (2)	20 % (19)	>0.05
HLA B				
sB7	14 % (1)	22 % (2)	49 % (48)	>0.05
sB27	57 % (4)	44 % (4)	26 % (25)	>0.05
sB44	29 % (2)	44 % (4)	61 % (59)	>0.05
sB58	57 % (4)	22 % (2)	11 % (11)	0.042 (C vs A‡)
sB762	14 % (1)	11 % (1)	14 % (14)	>0.05
sB others	—(0)	22 % (2)	14 % (14)	>0.05

*HIV-1-negative control groups included 30 individuals for the Δ32 study and 97 individuals for the HLA study.

†Indicates the Δ32 heterozygous genotype.

‡Control versus ancestral groups.

ancestral one, respectively, but only the practice of safe sex reached statistical significance. The practice of safe sex showed 100 % compliance in the ancestral subset, versus 22 % in the modern group (*P* = 0.0032). All patients with ancestral sequences were partners of HIV-negative individuals, who were followed thoroughly in the CSS because they were included in a cohort of discordant couples. However, as mentioned previously, we only detected a double infection in one of the patients analysed (patient 64; see Fig. 1).

DISCUSSION

In this study, dating of the viral population in LTNP patients allowed the identification of two subsets. One subset displayed global viral sequences that dated close to the sampling time (modern LTNPs), whereas the other subset exhibited global viral sequences that dated near to the patient's seroconversion time (ancestral LTNPs). The segregation of the patients into two subsets was also supported by several virological, immunological, clinical and epidemiological markers.

DNA quasispecies analysis revealed a significant difference in the mean viral heterogeneity between subsets. In the modern LTNPs, the mean inpatient quasispecies heterogeneity was >4.5 %, whereas in the ancestral LTNPs, this

marker was usually <1 %. The modern dating and high heterogeneity of the viral quasispecies in the modern LTNPs indicated clearly that the virus is constantly evolving and accumulating viral divergence, although there is no clinical progression. In the ancestral LTNPs, however, after so many years of HIV-1 infection, viral evolution seems to be arrested or very slow, as suggested by the ancestral dating and low heterogeneity of the viral quasispecies. These data are compatible with viral latency. In fact, these individuals often presented viral loads of <50 copies ml⁻¹ and occasional blips (Table 2). However, these blips appear to correspond to independent events, as they did not result in the accumulation of viral genetic variation. In several studies on viral evolution, it was possible to detect some LTNPs with highly homogeneous quasispecies, similar to our ancestral patients (Mani *et al.*, 2002; Markham *et al.*, 1998; Menzo *et al.*, 1998; Visco-Comandini *et al.*, 2001). Recently, Wang *et al.* (2003) described the first demonstration of lack of viral evolution in one LTNP.

The segregation of the patients could have been performed according to the RNA viral load only, and would have resulted in similar groupings. However, the RNA viral load did not identify patients with ancestral or modern viral sequences directly, as there are patients in the ancestral group with equal or higher viral loads (patients 56 and 58) than modern ones (patients 4, 7, 38 and 45) (Table 2). Moreover, the ancestral viral dating gives evidence not only of a very limited replication, but also of arrested or very limited viral evolution.

The DNA quasispecies analysis revealed that, in the ancestral subset, all clones, as well as the global DNA and RNA sequences, were ancestral. In contrast, the modern subset showed predominantly modern DNA populations, but the DNA quasispecies were heterogeneous, with the presence of ancestral sequences (up to 37 % of sequences in the quasispecies, except in patient 7). As a control on the presence of ancestral sequences in non-LTNP patients, we performed the dating in 10 individuals with high viral loads. At the global DNA level, only modern sequences were obtained, but this needs to be confirmed at the quasispecies level and in a larger number of patients.

Segregation of LTNPs into the modern and ancestral subsets was also supported by immunological markers. Whereas all ancestral LTNPs displayed almost constant CD4⁺ cell numbers and values of the CD8⁺ and β₂m markers that were close to those in uninfected control patients, the modern LTNP subset displayed higher mean CD8⁺ cell numbers, anti-gp160 antibody titres and β₂m levels, indicating a superior HIV-1-specific and non-specific immune activation than in the ancestral group. Patients with immunological characteristics similar to our ancestral subset have been reported: Hogervorst *et al.* (1995) described that LTNPs could be divided into two groups according to low or high p24 antibody titres. Several studies also described a subset of LTNPs with extremely low viral loads and neutralizing antibodies (Cao *et al.*, 1995;

Carotenuto *et al.*, 1998; Harrer *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Ferbas *et al.* (1995) identified three patients, among 12 LTNPs, with a low virus burden, but without evidence of activated circulating anti-HIV CD8⁺ cells. Finally, Lefrère *et al.* (1997) identified two LTNPs, from a group of 12, with undetectable plasma viral loads and normal concentrations of IgG, IgA, β_2 M and neopterin. All of these data support a correlation between HIV-1 replication, HIV antigenic stimulation *in vivo* and the anti-HIV immune response (Ferbas *et al.*, 1995). It is possible that, in the ancestral LTNPs, the number of circulating virus particles was not sufficient to elicit a high specific antibody response and a non-specific immune-system activation. At the same time, the low degree of immune activation resulted in reduced HIV-1 replication, because the massive replication of HIV-1 takes place predominantly in activated CD4⁺ cells (Finzi & Siliciano, 1998). In fact, within the group of 16 LTNPs, a significantly positive correlation between RNA viral load and different markers of immune activation (CD8⁺ cell number, β_2 m concentration and anti-gp160 antibody titre) was observed (data not shown).

Within the host genetic factors analysed, the only significant difference found was a higher frequency of the sB58 supertype in the ancestral group compared to the HIV-1-negative control group (53 and 11 %, respectively) (Table 4). The sB58 and sB27 supertype alleles, alone or in combination, were associated with lower viral loads (Trachtenberg *et al.*, 2003). However, it seems improbable that this HLA supertype could fully explain the differences between subsets, as this supertype was also found in the modern LTNPs. These results, although derived from a small number of patients, support the notion that a particular host genotype, coupled with other viral or host factors, could contribute to explaining the difference between subsets.

Activation of the immune system has shown to be important for virus replication in patients (Fauci, 1996). This marker was quantified by the β_2 m marker, which was statistically significantly different between groups (1.7 ± 0.6 vs $2.7 \pm 0.8 \mu\text{g ml}^{-1}$) and different from the control group ($1.02 \pm 0.22 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Table 3). However, activation was also analysed in relation to clinical and epidemiological characteristics of the patients, such as exposure to other infectious micro-organisms or re-exposure to HIV-1. No significant difference in exposure to other infectious micro-organisms was found between subsets (data not shown). However, by the analysis of behavioural markers, the ancestral group showed a lack of risk behaviour and a lower opportunity for re-exposure to HIV than the modern subset, as measured by the safe-sex behaviour marker (100 vs 22 %, respectively) or syringe sharing (17 vs 67 %, respectively). However, it is worth highlighting that superinfection or double infection was detected by phylogenetic analysis in only one individual of the cohort examined (patient 64 of the modern subset; Fig. 1).

Although HIV-infected individuals could be described by

a continuous spectrum of disease-progression rates, the segregation of LTNPs into individuals with modern and ancestral viral sequences also corresponds to patients with very different virological and immunological characteristics. Based on the very low viral burden, limited viral evolution and almost normal immunological parameters, it could be inferred that the ancestral LTNPs could correspond to authentic non-progressors or at least to very slow progressors (Balotta *et al.*, 1997; Ferbas *et al.*, 1995; Harrer *et al.*, 1996; Lefrère *et al.*, 1997), whereas modern LTNP patients with a low but detectable viral burden, high viral diversity and abnormal immunological characteristics could represent the slow progressors. Therefore, ancestral viral dating in LTNPs could have prognostic value. The existence of these differences within non-progressor patients could be particularly important and must be considered when making comparative studies between LTNPs and other progressor groups. The heterogeneity of the characteristics of LTNPs could be seen even within each subset and could be the result of differences in the relative influence of virological, immunological and host factors to disease progression within each patient.

In conclusion, by dating the viral populations that are present in HIV-1 LTNP patients, we have been able to define two subsets of individuals that are also differentiated by several virological, immunological and host characteristics. Determining the role of the viral, immunological and host factors that could contribute to the differences within these patients may provide new insights into the long-term control of HIV-1 infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

Work in the Centro Nacional de Microbiología was supported by grants MPY 1359/02 and SAF2003-04987 and in part by the 'Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA' (Red de grupos 173) of the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISs). The CSS was supported by grant SAF2003-04987. Work in the Centro de Transfusión was supported by grants FIS 00/0363 and FIS G03/104 from the FISs.

REFERENCES

- Bacchetti, P. & Moss, A. R. (1989). Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature* **338**, 251–253.
- Balotta, C., Bagnarelli, P., Riva, C. & 9 other authors (1997). Comparable biological and molecular determinants in HIV type 1-infected long-term nonprogressors and recently infected individuals. *AIDS Res Hum Retrovir* **13**, 337–341.
- Barker, E., Mackewicz, C. E., Reyes-Terán, G., Sato, A., Stranford, S. A., Fujimura, S. H., Christopherson, C., Chang, S.-Y. & Levy, J. A. (1998). Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **92**, 3105–3114.
- Bello, G., Casado, C., Garcia, S., Rodríguez, C., del Romero, J. & López-Galíndez, C. (2004). Co-existence of recent and ancestral

- nucleotide sequences in viral quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 patients. *J Gen Virol* **85**, 399–407.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E. & van der Noordaa, J. (1990).** Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* **28**, 495–503.
- Buchbinder, S. P., Katz, M. H., Hessel, N. A., O'Malley, P. M. & Holmberg, S. D. (1994).** Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* **8**, 1123–1128.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J. & Ho, D. D. (1995).** Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **332**, 201–208.
- Carotenuto, P., Looij, D., Keldermans, L., de Wolf, F. & Goudsmit, J. (1998).** Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. *AIDS* **12**, 1591–1600.
- Casado, C., Urtasun, I., Martin-Walther, M. V., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J. & Lopez-Galindez, C. (2000).** Genetic analysis of HIV-1 samples from Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**, 68–74.
- Casado, C., Garcia, S., Rodriguez, C., del Romero, J., Bello, G. & López-Galindez, C. (2001).** Different evolutionary patterns are found within human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Gen Virol* **82**, 2495–2508.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C. & 14 other authors (1996).** Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. *Science* **273**, 1856–1862.
- Fauci, A. S. (1996).** Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* **384**, 529–534.
- Ferbas, J., Kaplan, A. H., Hausner, M. A. & 7 other authors (1995).** Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *J Infect Dis* **172**, 329–339.
- Finzi, D. & Siliciano, R. F. (1998).** Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**, 665–671.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A. & 10 other authors (1996).** Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* **12**, 585–592.
- Hendriks, J. C., Medley, G. F., van Griensven, G. J., Coutinho, R. A., Heisterkamp, S. H. & van Druten, H. A. (1993).** The treatment-free incubation period of AIDS in a cohort of homosexual men. *AIDS* **7**, 231–239.
- Hogan, C. M. & Hammer, S. M. (2001).** Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med* **134**, 978–996.
- Hogervorst, E., Jurriaans, S., de Wolf, F. & 8 other authors (1995).** Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis* **171**, 811–821.
- Keet, I. P., Krol, A., Klein, M. R. & 7 other authors (1994).** Characteristics of long-term asymptomatic infection with human immunodeficiency virus type 1 in men with normal and low CD4+ cell counts. *J Infect Dis* **169**, 1236–1243.
- Klein, M. R., van Baalen, C. A., Holwerda, A. M. & 7 other authors (1995).** Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med* **181**, 1365–1372.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S. & Bhattacharya, T. (2000).** Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789–1796.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. & Nei, M. (2001).** MEGA2: molecular evolutionary genetic analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244–1245.
- Learmont, J., Tindall, B., Evans, L., Cunningham, A., Cunningham, P., Wells, J., Penny, R., Kaldor, J. & Cooper, D. A. (1992).** Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* **340**, 863–867.
- Lefrère, J.-J., Morand-Joubert, L., Mariotti, M., Bludau, H., Burghoffer, B., Petit, J.-C. & Roudot-Thoraval, F. (1997).** Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **90**, 1133–1140.
- Leitner, T. & Albert, J. (1999).** The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10752–10757.
- Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M. & Vandamme, A.-M. (2003).** Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6588–6592.
- Levy, J. A. (1993).** HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* **7**, 1401–1410.
- Lifson, A. R., Buchbinder, S. P., Sheppard, H. W., Mawle, A. C., Wilber, J. C., Stanley, M., Hart, C. E., Hessel, N. A. & Holmberg, S. D. (1991).** Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* **163**, 959–965.
- Lukashov, V. V. & Goudsmit, J. (2002).** Recent evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1 subtype B: reconstruction of epidemic onset based on sequence distances to the common ancestor. *J Mol Evol* **54**, 680–691.
- Mani, I., Gilbert, P., Sankalé, J.-L., Eisen, G., Mboup, S. & Kanki, P. J. (2002).** Inpatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_AG-IbNG infection. *J Virol* **76**, 10745–10755.
- Markham, R. B., Wang, W.-C., Weisstein, A. E. & 8 other authors (1998).** Patterns of HIV-1 evolution in individuals with differing rates of CD4 T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12568–12573.
- Menzo, S., Sampaolesi, R., Vicenzi, E. & 7 other authors (1998).** Rare mutations in a domain crucial for V3-loop structure prevail in replicating HIV from long-term non-progressors. *AIDS* **12**, 985–997.
- Michael, N. L., Chang, G., Louie, L. G., Mascola, J. R., Dondero, D., Birx, D. L. & Sheppard, H. W. (1997).** The role of viral phenotype and *CCR-5* gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* **3**, 338–340.
- Montefiori, D. C., Pantaleo, G., Fink, L. M., Zhou, J. T., Zhou, J. Y., Bilska, M., Miralles, G. D. & Fauci, A. S. (1996).** Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis* **173**, 60–67.
- Muñoz, A., Wang, M.-C., Bass, S., Taylor, J. M. G., Kingsley, L. A., Chmiel, J. S. & Polk, B. F. (1989).** Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-free time after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. *Am J Epidemiol* **130**, 530–539.
- Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M. & 11 other authors (1995).** Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **332**, 209–216.
- Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S. & Montefiori, D. C. (1997).**

Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* **176**, 924–932.

Rinaldo, C., Huang, X.-L., Fan, Z. & 8 other authors (1995). High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* **69**, 5838–5842.

Robbins, K. E., Lemey, P., Pybus, O. G., Jaffe, H. W., Youngpairoj, A. S., Brown, T. M., Salemi, M., Vandamme, A. M. & Kalish, M. L. (2003). U.S. human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol* **77**, 6359–6366.

Rodrigo, A. G., Goracke, P. C., Rowhanian, K. & Mullins, J. I. (1997). Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays. *AIDS Res Hum Retrovir* **13**, 737–742.

Sette, A. & Sidney, J. (1999). Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* **50**, 201–212.

Sheppard, H. W., Lang, W., Ascher, M. S., Vittinghoff, E. & Winkelstein, W. (1993). The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* **7**, 1159–1166.

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

Trachtenberg, E., Korber, B., Sollars, C. & 12 other authors (2003). Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nat Med* **9**, 928–935.

Visco-Comandini, U., Aleman, S., Yun, Z. & Sonnerborg, A. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 variability and long-term non-progression. *J Biol Regul Homeost Agents* **15**, 299–303.

Wang, B., Mikhail, M., Dyer, W. B., Zaunders, J. J., Kelleher, A. D. & Saksena, N. K. (2003). First demonstration of a lack of viral sequence evolution in a nonprogressor, defining replication-incompetent HIV-1 infection. *Virology* **312**, 135–150.

Zhang, Y. J., Fracasso, C., Fiore, J. R., Bjorndal, A., Angarano, G., Gringeri, A. & Fenyo, E. M. (1997). Augmented serum neutralizing activity against primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in two groups of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Infect Dis* **176**, 1180–1187.

Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M. & Ho, D. D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594–597.