

EL PRISMA DE LA EVOLUCIÓN Y EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Monzón de Orozco, A¹., Sánchez, M². & Aponte, C^{*3}.

¹Lab. de Inmunología. Instituto de Hematología y Oncología. Universidad Central de Venezuela (UCV). Apdo. 1040. Caracas, Venezuela

²Hospital José Gregorio Hernández. Parroquia San José. Caracas, Venezuela

³Gerencia de Docencia e Investigación. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Apdo. 1040. Caracas, Venezuela

RESUMEN

Entre los virus conocidos, uno de los cuales se le ha dedicado una extensiva atención es a la epidemiología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Más recientemente, el interés se ha expandido esencialmente al origen y evolución de su estructura genética, mecanismos patogénicos y respuesta inmune. Este artículo describe recientes trabajos para la comprensión del origen y evolución del VIH.

ABSTRACT

Among viruses, extensive attention has been devoted to the molecular epidemiology of human immunodeficiency virus (HIV). Recently, this interest has expanded essentially to the origin and evolution of viral genetic structure, pathogenic mechanism and immune response. This article describes recent work about the origin and evolution of HIV.

INTRODUCCIÓN

El Nostromo, una nave de cargo, se desplaza en medio de la inmensidad del espacio de regreso a la Tierra. Pero intercepta una llamada SOS proveniente de un planeta de explotación minera. Un grupo de los miembros del *Nostromo* salen a explorar el área. Kane (Jhon Hurt) descubre un recinto donde se encuentran varias estructuras orgánicas en forma de huevo. Kane se acerca a una de estas entidades y de la misma se proyecta un organismo que se le aferra fuertemente al rostro perforando la máscara de protección, ingresando inconsciente a la nave y con ese extraño organismo adherido a la cara. Los primeros análisis de laboratorio indican que el organismo estableció un nexo con el huésped manteniendo un intenso intercambio de fluidos. Horas más tarde la criatura se separa y muere. Kane se levanta al poco rato aparentemente sano y asintomático. Sin embargo, en su seno resguardaba, sin saberlo, un organismo parásito en desarrollo. Lenta y inexorablemente la muerte del actor estaba decretada. Nació así **Alien, el octavo pasajero**, (1979)¹ perforando la caja torácica de Kane. Todos los miembros del *Nostromo* quedaron expuestos a la mayor plaga jamás vista. Este film de Rindley Scottt parece en la actualidad una alegoría de la pandemia VIH/SIDA, la cual afecta a más de 40 millones de personas en el mundo y solamente para finales del año

* Autor al que debe dirigirse la correspondencia. Dirección de correo: Gerencia de Docencia e Investigación. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Apdo 1040, Caracas-Venezuela, Teléfax: (02) 693 45 51. Correo electrónico: capontet@hotmail.com

2001. Más de 25 millones pertenecen al África. El 95% de las nuevas infecciones por el VIH aparecen en aquellos habitantes de países pobres sin posibilidades de limitar la extensión de la enfermedad y la tasa de infecciones es de unas 5 millones de personas al año.^{2,3} El continente suramericano contribuye con 1.5 millones de infectados con unas 60 000 muertes para el final del 2002⁴. La diferencia es que ahora “Alien” no es una bestia que dobla la longitud promedio de un ser humano sino que mide el irrisorio diámetro de unos 90 - 140 nanómetros. Entidades microscópicas de geometría icosaédrica cubiertas de una delgada membrana constituida de lípidos. Estas estructuras pertenecen a una gran familia de virus denominada: *Retroviridae* (Los retrovirus).

La infección por retrovirus se traduce en el huésped en: oncogénesis^{5,6}, inmunodeficiencia^{7,8} o neurodegeneración^{9,10}. Si bien es cierto que el mecanismo preciso por el cual el VIH causa el SIDA permanece sin ser totalmente elucidado, el VIH induce una dramática disminución de células T CD4⁺ que conlleva a una severa alteración del metabolismo celular¹¹ e inmunodeficiencia^{12,13,14}. Durante la infección activa una sustancial cantidad de virus es presente en varios de los fluidos corporales con una importante utilización por parte del virus de diversos reservorios celulares (células T CD4⁺ de memoria y “naive”) y sistémicos (p. ej. El sistema nervioso central)^{14,15}. En el plasma el recambio de partículas virales es alto con la producción de alrededor de 10⁹ partículas/día; teniendo el virión una vida media de aproximadamente 6 horas^{16,17}. En el paciente VIH-1 positivo que se encuentra bajo terapia HAART la cantidad de viriones deviene prácticamente indetectable en sangre (< 50 copias de ARN VIH/ml de sangre). Sin embargo, al detener el tratamiento se dispara un aumento dramático de la viremia. Este aumento parece ser dependiente de compartimientos tisulares que actúan como reservorios de variantes de VIH¹⁸. Precisamente, VIH existe como una población de distintas variantes o “cuasiespecies”, pues la alta frecuencia de mutación del virus (3 x 10⁵ mutaciones/nucleótido/ciclo de replicación) acoplada a la alta tasa continua de producción viral son la base sobre la cual descansa gran parte del reservorio de

variantes dentro de un mismo hospedante y el blanco fértil para la acción de la presión de selección^{19,20,21}.

ORIGEN DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El descubrimiento de la variación genética y antagónica del VIH ha presentado una gran preocupación en relación con las estrategias necesarias para el desarrollo de terapias basadas en drogas antiretrovirales y el diseño de vacunas eficaces. Pero como dijera Theodosius Dobzhansky: “*Nada tiene sentido en biología excepto bajo el prisma de la evolución*”²². Por ende, la naturaleza e historia del VIH como entidad biológica sólo puede tener sentido si utilizamos el conocimiento que nos proporciona el prisma de la evolución. Desde la introducción del VIH en el hombre a partir del chimpancé alrededor de 1930 en África central occidental²³, el virus ha evolucionado en base a variación genética por mutación^{20,24}, recombinación²⁵, inserción y delección²⁶.

El grupo principal (M) HIV-1 domina la potencia epidémica global de la infección viral siendo filogenéticamente un único cluster en arreglo complejo con otros diferentes virus de inmunodeficiencia de simio (SIVcpz) y humano (grupo N y O). El grupo M es subdividido al menos en 12 distintos linajes o subtipos (A-D, F-H y J) y formas recombinantes (AE, AG, AG1)²⁷. El grupo O (de “outlier”) que se encuentra esencialmente distribuido al oeste del África central²⁸. Análisis filogenético del tipo HIV-2 conlleva a una subclasificación adicional en los subtipos A – F. Así, en la comunidad científica existe un cierto consenso respecto a que estas mayores subdivisiones podrían ser el producto de distintas introducciones humanas separadas²⁷. Es generalmente aceptado que al menos tres transmisiones separadas de chimpancés a humanos ha ocurrido, una por cada grupo de VIH conocido. En tanto, los primates han actuado como reservorio; existiendo no menos de 18 tipos distintos de SIV sin efecto clínico sobre su hospedero (*Cercopithecus*, *Chlorocebus*, *Cercocebus*, *Miopithecus*, *Colobus*, *Mandrillus*, *Pan*, *Erythrocebus* y *Papio*). Análisis genómico demuestra que las especies de SIV

relacionadas con HIV-1 y HIV-2 son SIVcpz y SIVsm, respectivamente. SIVcpz se encuentra en chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes*) mientras que SIVsm esta en monos mangabeys tiznados (*Cercocebus atys*)²⁷. Dada la información evolutiva contenida en el acervo macromolecular de cada tipo de VIH y el estatus geográfico ocupado por cada uno de ellos se han establecidos relaciones filogenéticas relevantes. Así, el VIH-2 es estrechamente similar al virus SIVsm y el rango de distribución de monos mangabeys tiznados en África es aceptado como el área de origen del VIH-2. Estas áreas (Senegal, Guinea-Bissau, Guinea y Costa de Marfil)²⁸ son los epicentros de dispersión del VIH-2. Por su parte, VIH-1 esta más estrechamente relacionado a nivel filogenético a SIVcpz de *P.t. troglodytes* y mantiene coincidencia geográfica (Gabón, Guinea Ecuatorial, Camerún y la República del Congo) para todos los grupos de VIH-1 con las áreas de caza y amaestramiento de chimpancés. Esto sugiere una posible ruta de transmisión zoonótica de VIH-1^{27,28}. Así mismo en diversos mercados del África Centro Occidental exhiben para su venta y consumo carne y órganos de primates lo que potencia la posible transmisión al hombre. Se estima que tal barrera ínter especie fue cruzada hacia el año 1930. El potencial de recombinación entre VIH circulantes y posibles variantes SIV juega aún un rol de importancia en la aparición de virus con nuevas potencialidades biológicas. Para 1999, un alto número de recombinantes HIV-1 M fue reportado en la zona de Congo-Kinshasa^{29, 30}.

En la actualidad, se desestima en mucho la hipótesis que implicaba que la administración de la vacuna de polio oral en el Congo Belga durante los años '50 y '60 era responsable de la introducción del VIH en humanos³¹. Según Hooper, la cepa viral de la vacuna antipoliomelítica (CHAT) ha sido producida en células de chimpancés lo que hacia probable la transmisión del VIH al hombre. Sin embargo, S. Plotkin (2000) reportó que las vacunas americanas y europeas utilizadas hasta 1960 eran producidas sobre células de macacos provenientes de la India e Indonesia³². Además, varios testimonios, documentaciones de la época, análisis epidemiológico y datos moleculares parecen de-

mostrar que la contaminación por el VIH de las vacunas fabricadas es muy improbable.

EL PRISMA DE LA EVOLUCIÓN Y VIRUS ARN

Los virus ARN son los parásitos más comunes que infectan humanos, animales y plantas³³. La emergencia y reemergencia de nuevos patógenos pertenecientes a las familias ARN (*Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Myxoviridae*, *Picornaviridae* y *Retroviridae*) es producto de una incrementada adaptación de estos antagonistas a nuevos huéspedes en períodos de tiempo variables. Dicha adaptabilidad es favorecida por la enorme plasticidad genética existente en estas poblaciones en cuestión y la materialización de una alteración ambiental (tipo de huésped, presión inmunológica sobre el parásito, tipo de tejido o célula, presencia de drogas, antibióticos, entre otras alteraciones). Si dicha adaptabilidad la traducimos en términos de virulencia podemos observar que la velocidad de la misma incrementa rápidamente en los virus del tipo ARN, mientras que es menor en los virus del tipo ADN y en bacterias, y mucho más lenta en los eucariotes. Estos agentes frecuentemente tienen fenotipos que aumenta su supervivencia en nuevos habitats (factores de virulencia, habilidad de enlazar e invadir las células del huésped, y resistencia a las defensas químicas y celulares del huésped)³⁴. Esto sugiere que el tiempo de generación y la velocidad de mutación determina la velocidad de cambio del parásito³⁵. Los retrovirus, tal como el VIH, el cual replica continuamente y a una alta tasa, desarrolla un alto grado de diversidad de secuencia en cada uno de los huéspedes infectados³⁶.

Los mecanismos subyacentes bajo los cuales los virus escapan a las presiones que le son impuestas son múltiples. Así, tenemos la frecuente generación de mutaciones, la continua competición entre variantes genómicas y la selección de aquellas variantes mejor adaptadas³⁷. Diversos análisis^{38,39,40} del patrón de sustitución nucleotídica en el gen *env* viral han mostrado evolución en función de una selección positiva en el modelo VIH respecto a agentes de selección no totalmente defini-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
El Prisma de la
Evolución y el Virus
de la Inmunodeficiencia
Humana

do (respuesta inmune, utilización de correceptor, entre otros). En este mismo modelo, el gen *pol* (fracción proteasa/polimerasa) conlleva selección positiva en presencia de agentes antiretrovirales⁴¹. Todo esto en función de una maximización de la adaptabilidad del parásito dentro de un balance costo/beneficio de su asociación con un huésped dado. En este punto es importante recordar que en términos evolutivos la unidad de selección es el virus completo y no un gen o porción informativa del mismo.

La plasticidad genética existente en las poblaciones de virus ARN surge en cada generación por mutaciones nuevas, por recombinación homóloga y no-homóloga, y por rearrreglo genético³⁷. Así, para los virus VIH-1 subtipo C se han reportado de tres a cuatro secuencias “enhancer” NFkB, a diferencia de los otros subtipos virales que poseen dos de estas secuencias⁴². Las poblaciones virales ARN (replicones) almacenan gran número de alteraciones genéticas, sin que las mismas sean particularmente adaptativas a un momento dado⁴³. Con tasas de mutación por sitio nucleotídico de 10^{-3} - 10^{-5} para un genoma de 10 kb durante replicación y retrotranscripción se garantiza un promedio de 0.1 - 10 mutaciones⁴⁴. Por tanto, una población determinada de replicones puede presentar variantes denominadas cuasi-especies, esto es distribuciones dinámicas y complejas de poblaciones de replicones relacionadas pero no idénticas^{37, 43, 45}. Como ya sabemos la mayoría de la diversidad genética existente en las poblaciones de VIH surgen como consecuencia de mutaciones, recombinación y frecuentes inserciones y deleciones²⁶. VIH es considerado que existe como una población de distintas variantes o “cuasiespecies”⁴⁶. La diversidad genética en el seno de estas poblaciones de cuasi-especies constituye claramente un prerrequisito para el cambio evolutivo. Así, si todos los replicones fueran idénticos para una población dada, no podrá darse evolución hasta la aparición de un nuevo replicón por mutación. Por ejemplo, en el virus de la fiebre amarilla, la existencia de una atenuación de la virulencia parece corresponder a una alteración de la estructura secundaria de la región 3' no traducible⁴⁷. Ahora bien, en el proceso de evolución, la presión de selección ejercida por el

huésped impone condicionantes sobre la propia evolución del parásito, pero en tal proceso de coevolución cada uno de los protagonistas (huésped-parásito) está obligado a ajustar sus capacidades adaptativas para no quedar eliminado⁴⁸, el modelo de La Reina Roja. Así, las velocidades bajas de evolución observadas en arbovirus podrían ser debidas a restricciones impuestas por la alternancia de hospedantes durante el ciclo vital de virus⁴⁹. Dicha alternancia también podría ser observada para aquellos virus con tropismo celular diferencial. Por ejemplo, mutaciones específicas han sido detectada en el virus de la linfocoriomeningitis murina asociadas con su tropismo por neuronas o por células linfocitarias⁵⁰. Sin duda, en ambos casos arriba citados claramente se observa una coadaptación genética provocada por un aumento de “fitness” en la relación huésped-parásito. Si intentamos integrar los conceptos de coevolución y el de “cuasiespecies”, basados en el modelo de La Reina Roja, para evaluar el devenir de una infección podríamos predecir fluctuaciones importantes en ambas poblaciones (huésped-parásito). Así, sabemos que la tasa crítica de error (fidelidad) aceptada para la polimerasa RNA viral dependerá tanto de la complejidad de la información ha ser mantenida como de la estabilidad superior de la secuencia “master” sobre el resto de replicones competitivos⁵¹. Pero también dicha fluctuación intrínseca de la población viral es fuertemente dependiente de los factores de resistencia del huésped. Recientemente, Crotty et al. (2001)⁵², utilizando ribavirina, inducen “error catastrophe” en virus ARN. Ribavirina actúa como un potente mutágeno para virus ARN. En el caso de poliovirus, el tratamiento con 400mM de ribavirina aumenta a más de 4X el promedio de mutaciones / genoma^{52,53}. Estos datos experimentales demuestran que existe una tasa de mutación límite por debajo de la cual se garantiza la viabilidad de la población viral. Es decir, en poblaciones virales ARN se observa una importante correlación entre exposición a la ribavirina y la disminución de la infectividad. Así, parece existir un límite intrínseco de variación genética para un sistema dado.

Todo diseño matemático de predicción sobre la estabilidad coevolutiva huésped-parásito

debe parametrizarse en función de la virulencia, la transmisibilidad, la heterogeneidad intrínseca de la población viral y la resistencia del huésped (status inmune, terreno genético, entre otros). Sin embargo, parece ser que la estabilidad de tales poblaciones descansa de manera directa en el potencial que estas mismas poblaciones tienen para realizar cambios evolutivos a corto plazo bajo presiones selectivas fluctuantes. Ciertos modelos propuestos^{54,55,56} predicen tanto equilibrios estables como inestables (tendientes a extinción) para una relación huésped-parásito dada. Análisis sobre el patrón de sustitución nucleotídica en el gen viral *env* han detectado evolución bajo presión selectiva positiva^{57,58,59}. Recientes análisis utilizando el modelo VIS revela la existencia de acumulación de substituciones aminoacídicas en varias regiones epitópicas blanco HCM clase I-restringidas y que originalmente fueron reconocidas por actividades CTL⁶⁰. Una importante proporción de estos epítopes variantes poseen una inmunogenicidad disminuida. Existe una fuerte selección por aquellos virus que pueden evadir la respuesta inmune y, así tenemos que virus de escape anticuerpo tienden a poseer un incremento en el “fitness” replicativo en el sistema modelo macaco-SIV (Virus de inmunodeficiencia simio)³⁶. Así también, la introducción de myxoma virus como agente de control biológico de conejos resultó en una rápida evolución hacia la disminución de la virulencia en pocos años⁶⁰.

Por tanto, intentar una aproximación de los mecanismos sobre los cuales descansa el devenir evolutivo del virus de la inmunodeficiencia humana conlleva a considerar los elementos ya destacados en el apartado anterior para los virus RNA. Una perspectiva “ecológica” podría ser de ayuda para estudiar la naturaleza dinámica de las diversas presiones selectivas (p.ej. la respuesta inmunológica del huésped y la acción de antiretrovirales) ejercidas sobre el virus durante el curso progresivo de la enfermedad en un paciente dado³⁴. Por tanto, es muy probable que condiciones ambientales específicas (considerando que para un parásito obligatorio el medio ambiente es representado por su huésped específico) sean necesarias para la generación de diferencias en adaptabilidad (“fitness”) entre variantes virales.

REFERENCIAS

1. SCOTT, R. (1979). Alien. El octavo pasajero. FOX
2. THE BODY. (2001). Aids Epidemic update: December 2000. Disponible en <http://www.thebody.com/unaid/update/overview.html>
3. RAMONET, I. (2004) La Mort Inégale. En Apartheid Medicale. *Maniere de voir. Le Monde Diplomatique*. Février-Mars. 73: 6-7
4. SCHALCHLI, I. (2003). Le SIDA. En Bac to Basic. *La Recherche*. 370: 83 - 86
5. CANN, A. J. (1997) Cell transformation by retroviruses. In *Principle of Molecular Virology*. Academic Press. pp 216-221
6. LÖWER, R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *TIM*. 7: 350-356
7. CLEMENTS, J. & PAYNE, S. (1994) Molecular basis of the pathobiology of lentivirus. *Virus Res*. 32: 97-107
8. LEVY, J. (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection *Microbiol. Rev*. 57:183-289
9. PRICE, R. (1996) Neurological complications of HIV infection. *The Lancet*. 348: 445-452
10. FUJINAMI, R. & LIBBEY, J. (1999) Endogenous retroviruses: are they the cause of multiple sclerosis. *TIM*. 7: 263-264
11. DE SIMONE, C, FAMULARO, G., CIFONE, G. & MITSUYA, H. (1996). HIV infection and cellular metabolism. *Imm.Today*
12. OLESKE, J., MINNEFOR, A., COOPER, R., THOMAS, K., DELACRUZA, AHDIEH, H., GUERRERO, I., JOSHI, V., AND DESPOSITO, F. (1983) Immune deficiency syndrome in children *JAMA*. 249: 2345-2349
13. SCHITTMAN, S. & FAUCI, A. (1994). Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: an update. *Ad. Int. Med*. 39:305-355
14. BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J. C. & REY, F. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency virus. *Science*. 220: 868-871
15. GRAZIOSI, C., PANTALEO, G., DEMAREST, J.F. et al. (1993). HIV-1 infection in the lymphoid organs. *AIDS* (suppl 2): S53-S58
16. CAVERT, W. & HAASE, A. T. (1998). A national tissue bank to track HIV eradication and immune reconstitution. *Science* 280: 1865-1866
17. HO, D.D., NEUMANN, A.U. & PERELSON, A.S. et al. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4+ lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 373: 123-126
18. CHUN, TW, DAVEY, RT JR, OSTROWSKI, M, SHAWN, JUSTEMENT, J, ENGEL, D, MULLINS, JI, FAUCI, AS. (2000) Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nature Medicine*. 6: 757
19. WEI, X., GHOSH, S.K., TAYLOR, M.N. et al. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373: 117-122
20. COFFIN, J.M. (1996) HIV viral dynamics. *AIDS* 10 (suppl 3): S75-S84
21. PHILLIPS, RE., OXENIUS, A., PRICE, DA., BANGHAM, CHRM. (2000). AIDS: The evolving story. *TIM*. 8: 147-147
22. DOBZAHANSKY, T. (1951). Genetics and the origin of species. New York. Columbia University Press.
23. BIRX, D.L., VANCOTT, TH., MICHAEL, N. et al. (1996) Summary of track A: Basic science. *AIDS* 10 (suppl 3): S85-S106



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
El Prisma de la
Evolución y el Virus
de la Inmunodeficiencia
Humana

24. ROBERTS,JD. ET AL. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 242: 1171-1173.
25. BURKE, DS. (1997). Recombination in HIV: An important viral evolutionary strategy. *Emerg. Inf. Dis.* 3: 253-258
26. KORBER, B., THEILER, J., WOLINSKY, S. (1998). Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science*. 280: 1868-1871
27. HAHN, BH., SHAW, GM., De COCK, KM., SHARP, PM. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287: 607-614
28. COHEN, J. (1999). AIDS virus traced to chimp subspecies. *Science*. 283: 772-773
29. SHARP, PM., BAILES, E., CHAUDHURI, RR., RODENBURG, CM, SANTIAGO, MO., HAHN, BH. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* 356: 867-876.
30. VANGROENWEGHE, D. (2001) The earliest cases of human immunodeficiency virus type 1 group M in Congo-Kinshasa, Rwanda and Burundi and the origin of acquired immune deficiency syndrome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* 356: 923-925
31. HOOPER E. (1999) The river: a journey back to the source of HIV and AIDS. London: Allen Lane.
32. NANICHE, D. (2001) Origine du SIDA: La fin d'une polémique? *La Recherche*. 338: 14-15
33. MURPHY, FA. (1996) Virus taxonomic. In *Fields Virology*, ed. BN. Fields, DM. Knipe, PM Howley, RM. Channock, JL. Melnick, et al. pp. 15-57. Philadelphia:Lippincott-Raven
34. LEVIN, BR. LIPSITCH, M. & BONHOEFFER, S. (1999). Population biology, evolution, and infectious disease: Convergence and synthesis. *Science*.283: 806-809
35. EBERT D. (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* 20:1432-5
36. OVERBAUGH, J. & BANGHAM, CH.R.M. (2001). Selection forces and constraints on retroviral sequences variation. *Science*. 292: 1106-1109
37. DOMINGO E, MENENDEZ-ARIAS L, HOLLAND JJ. (1997) RNA virus fitness.: *Rev Med Virol.* 7(2):87-96
38. CHUN TW, CARRUTH L, FINZI D, SHEN X, DIGIUSEPPE JA, TAYLOR H, HERMANKOVA M, CHADWICK K, MARGOLICK J, QUINN TC, KUO YH, BROOKMEYER R, ZEIGER MA, BARDITCH-CROVO P, SILICIANO RF.(1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*.387, 183-188.
39. BONHOEFFER, S., HOLMES, E.C. & NOWAK, M.A. (1995). Causes of HIV diversity. *Nature*. 376: 125
40. WOLFS, T.F.W., ZWART, G., BAKKER, M. & GOUDSMIT, J. (1992) HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission *Virology*. 189: 103-110
41. CLAVEL, F., RACE, E. & MAMMANO, F. (2000). HIV drug resistance and viral fitness. *Adv. Pharmacol.* 49: 41-65
42. ESSEX, M. (1999). Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Adv. In Virus Res.* 53: 71-80
43. EIGEN, M. (1993). The origin of genetic information: Viruses as models. *Gene*. 135: 37-47
44. DRAKE, (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 4171-4175
45. EIGEN, M. (1998). Molecular quasi-species. *J. Phys. Chem.* 92: 6881-6891
46. EIGEN, M. (1996). On the nature of viral quasi-species. *Trends Microbiol.* 4: 212-214
47. PROUTSKI V, GAUNT MW, GOULD EA, HOLMES EC. (1997) Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J Gen Virol.* Pt7:1543-9.
48. VAN VALEN, L. (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theo.* 1: 1-30
49. NOVELLA, IS., CLARKE, DK., QUER, J., DUARTE, EA., LEE, CH. et al (1995) Extreme fitness differences in mammalian and insect host after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *J. Virol.* 69: 6805-6809
50. DOCKTER, J., EVANS, CF., TISHON, A., OLDSTONE, MBA. (1996). Competitive selection in vivo by a cell for one variant over another: implications for RNA virus quasispecies in vivo. *J. Virol.* 70: 1799-803
51. SWETINA, J. & SCHUSTER, P. (1982) Self-replication with error –a model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* 16: 329-345
52. CROTTY, SH., CAMERON, CE., ANDINO, R. (2001) RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *PNAS* 98: 6895-6900
53. CROTTY, SH. & ANDINO, R. (2002) Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microb. Inf.* 4: 1301-1307
54. THOMPSON, JN. (1999). The evolution of species interactions. *Science*. 284: 2116-2118
55. EARN, DJD. & ROHANI, P. (1999). Complex dynamics in ecology. Section: news comment. *TREE* 14: 43-44
56. MAY RM, ANDERSON RM. (1983). Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 219(1216):281-313.
57. SIMMONDS, P., ZHANG, LQ., McOMISH, F., BALFE, P., LUDLAM, CA., LEIGH BROWN, AJ (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. *J. Virol.* 65: 6266-6276
58. LEIGH BROWN, AJ & CLELAND, A. (1996) Independent evolution of the env and pol genes of HIV-1 during zidovudine therapy. *AIDS*. 10: 1067-1073
59. FROST, SDW., GÜNHARD, HF., WONG, JK., HAVLIR., D., RICHMAN, DD., LEIGH BROWN, AJ. (2001). Evidence for positive selection driving the evolution of HIV-1 env under potent antiviral therapy *Virology*. 284:250-8.
60. EVANS DT., ET AL (1999). Virus-specific cytotoxic T- lymphocyte response select for amino acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med*. 5: 1270-1276