



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

### “ZARAGOZA”

“Fenotipo biológico en pacientes con VIH/SIDA en  
diferentes etapas de la enfermedad”

#### TESIS

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

#### PRESENTA

Karina Alicia Galarza Flores

#### ASESORES

Dr. Gustavo Reyes Terán  
Director de tesis

Dr. Rubén Marroquín Segura  
Asesor de tesis

México, D.F.

2005



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias **Padre Eterno**, por que cada día de mi vida, tu diestra de poder me ha sostenido, me ha fortalecido y dado aliento de vida. Es tu Amor Eterno la razón de mi vivir y el que me lleva de gloria en gloria y de triunfo en triunfo. La meta que hoy se cumple en mi vida es por Ti , gracias **Abba Padre**.

**Mamá** gracias por tu amor que se manifiesta en tu confianza, apoyo y palabras de aliento para continuar, pero sobre todo gracias por darme el mayor ejemplo de lucha y dedicación por lo que uno ama. Te amo.

**Papá** gracias porque siempre confiaste en mi y no importando las circunstancias de la vida, siempre me has apoyado, te amo.

**Erick, Mari**, gracias por ser los mejores hermanos, juntos hemos luchado y perseverado. Hoy logro una meta la cual juntos la obtenemos en amor. Gracias a toda mi familia por su amor y apoyo.

**Dr. Gustavo Reyes Terán** gracias por su confianza y la oportunidad que me dio de formar parte de su equipo de trabajo durante el desarrollo de esta tesis.

**Q.C. Klinty J Torres** gracias por compartir tus conocimientos y apoyarme en el desarrollo de este proyecto, a sí como la dedicación que pusiste en el mismo, el cual culmina con esta tesis de la que tu formas parte.

Gracias a todo el equipo de trabajo del servicio de infectología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Gracias a todos mis profesores que participaron en mi formación profesional, cada uno de ustedes es especial e importante.

## CONTENIDO

	Pag.
Agradecimientos . . . . .	2
Resumen . . . . .	5
I. Introducción . . . . .	6
II. Marco teórico . . . . .	11
2.1 Biología de la infección por VIH . . . . .	11
2.2 Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana .. . . . .	16
2.3 Ciclo de vida del virus de la inmunodeficiencia humana .. . . . .	19
2.4 Fenotipos biológicos de VIH. . . . .	22
2.5 Tratamiento antiretroviral. . . . .	28
III. Planteamiento del problema. . . . .	31
IV. Objetivos. . . . .	32
V. Hipótesis . . . . .	33
VI. Criterios de inclusión y exclusión. . . . .	33
VII. Especímenes, técnicas, materiales, equipos y reactivos. . . . .	34
7.1 Especímenes requeridos . . . . .	34
7.2 Separación de PBMC de donador . . . . .	35
7.3 Separación de PBMC de paciente . . . . .	36
7.4 Congelación y descongelación de muestras . . . . .	38
7.5 Cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). . . . .	40
7.6 Cultivo de células MT-2 . . . . .	41
7.7 Cultivo B de VIH . . . . .	41

7.8	Cultivo de VIH a partir de plasma con heparina . . . . .	42
7.9	Expansión de aislados primarios . . . . .	44
7.10	Ensayo de fenotipo biológico en células MT-2 . . . . .	44
7.11	Antígeno p 24 del VIH . . . . .	46
7.12	Preparación de medios de cultivo . . . . .	53
VIII.	Análisis estadístico . . . . .	55
IX.	Resultados . . . . .	56
X.	Discusión de resultados . . . . .	64
XI.	Conclusión . . . . .	66
XII.	Referencias . . . . .	67

## RESUMEN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida es causado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y se caracteriza por diversas manifestaciones clínicas, incluyendo la profunda inmuno-supresión con la asociación de infecciones oportunistas y degeneración del sistema nervioso central. Los aislados de VIH-1 se clasifican con base en las propiedades biológicas como: la capacidad de inducir sincicia en células MT-2, citotropismo (tropismo por macrófagos o por la línea de células -T) y rango de replicación (rápido crecimiento o lento crecimiento en cultivo). En la infección temprana la población es homogénea, generalmente con tropismo por los macrófagos y no inductores de sincicia; durante el curso de la enfermedad la población viral predominante es con tropismo por células-T CD4+ e inductores de sincicia. Considerándose ese cambio como el interruptor del estado asintomático al estado sintomático de la enfermedad. Por lo que el fenotipo biológico es un marcador importante en la progresión de la enfermedad y su determinación también lo es. En el presente trabajo se determinó el fenotipo biológico de 28 pacientes VIH positivos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, quienes cumplían criterios de inicio de tratamiento antiretroviral  $<500$  células T CD4+/ $\mu$ L y a quienes se les tomaron muestras basales antes del inicio del tratamiento antiretroviral. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a su estadio clínico en: etapa intermedia (con 200 a 500 células T CD4+/  $\mu$ L) y etapa tardía de la enfermedad ( $<200$  células T CD4+/  $\mu$ L). A ambos grupos se les determinó : carga viral en plasma, número de subpoblaciones de linfocitos, cultivo de VIH y fenotipo biológico. Dando como resultado una frecuencia de fenotipos biológicos inductor de sincicia de 41% en etapa tardía y de 9% en etapa intermedia (  $\text{Chi}^2=3.37$ ,  $p<0.06$ ), lo que muestra una clara tendencia a la significancia estadística, además se observó una mayor incidencia de infecciones oportunistas en los pacientes de etapa tardía (70%,  $\text{Chi}^2=13.5$ ,  $p<0.0005$ ). El estudio continuará para ampliar el número de pacientes y así establecer una diferencia estadística significativa.

## I. INTRODUCCIÓN

En 1981, aparece en la revista epidemiológica del Centro de Control de Enfermedades (CDC, EU), la Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) (1), la primera descripción de adultos jóvenes con *Pneumocystis carinii*, lo cual no había sido descrito y que además presentaban infecciones concomitantes con citomegalovirus (CMV) y candidiasis oral, surgiendo un gran interés por conocer el agente causal de esta nueva enfermedad (2).

A partir de entonces, se inician programas de investigación sobre esta enfermedad lográndose que en 1982 ya se contara con información epidemiológica donde se reconocía que se trataba de una enfermedad infecciosa transmisible por contacto sexual o parenteral con secreciones o sangre de individuos infectados, confirmado posteriormente (3;4), mediante técnicas de laboratorio. En 1983, el doctor Luc Montagnier del Instituto Pasteur (5) y en 1984, el doctor Jay A. Levy, de la Universidad de California en San Francisco (6) logran aislar retrovirus a partir de muestras ganglionares de pacientes con inmunodeficiencia, y que posteriormente se denominaron genéricamente como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Durante los siguientes años, se realizó una intensa investigación lográndose conocer la estructura molecular del virus, la caracterización completa de las proteínas de la envoltura que interaccionan con la célula huésped y de los elementos reguladores que controlan positiva o negativamente la transcripción del material genético. Se definieron las propiedades biológicas del virus y las

consecuencias que se derivan para el huésped, por ejemplo de la elevada frecuencia de mutaciones, o de la emergencia de cepas con un particular tropismo para diferentes tipos celulares(7-9).

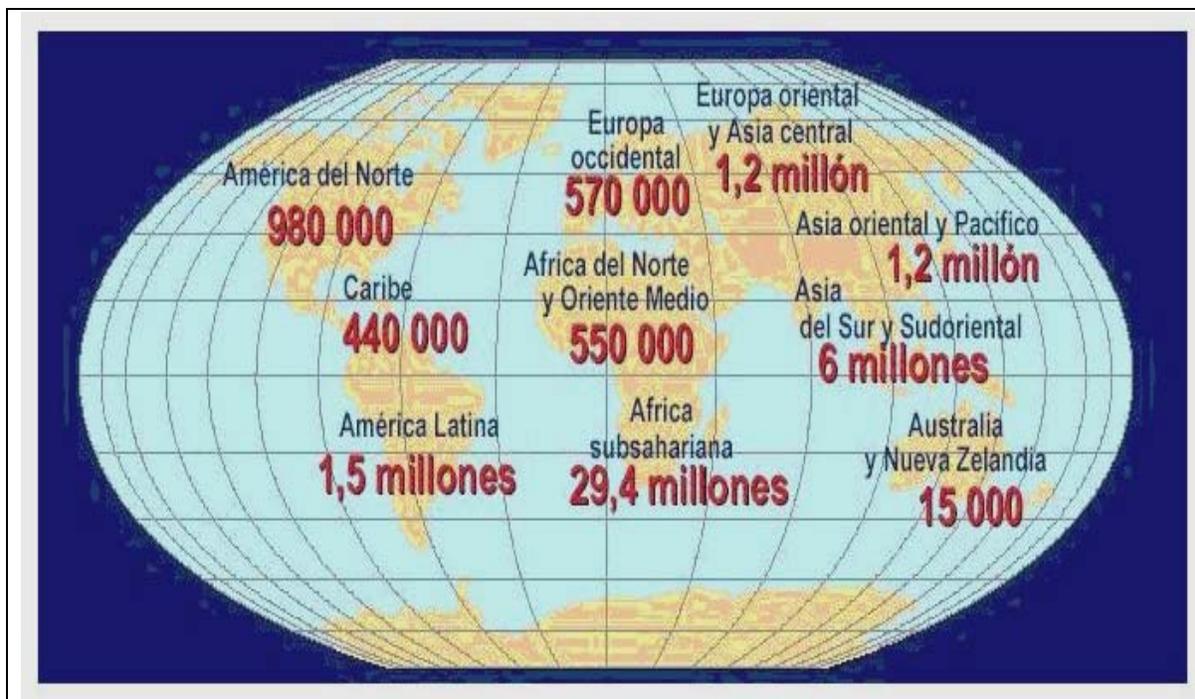
Han transcurrido 23 años desde el informe de los primeros casos de SIDA y la atención que se ha dirigido al problema ha sido proporcional a su magnitud y superado la de cualquier otra epidemia en la historia de la medicina, no obstante los grandes avances obtenidos en el conocimiento de la infección por VIH, dirigiéndose la investigación a determinar los diferentes mecanismos de entrada del virus a la célula del huésped e identificar a los co-receptores celulares que participan en el ingreso de VIH a la célula y establecer el tropismo viral (10-12), caracterizar la heterogenicidad del virus y sus diversas propiedades de virulencia y patogenicidad, identificar los sitios anatómicos y celulares del establecimiento y diseminación del VIH, revelar los principales reservorios celulares y anatómicos de las diversas formas moleculares del VIH (13;14), reconocer la gran capacidad de replicación del VIH en todo el curso de la infección como el centro de la patogénesis de la enfermedad, definir la intensidad y calidad de la respuesta inmune del huésped en contra del virus, en todas las etapas de la infección y descubrir los mecanismos de escape viral (15). En general estos acontecimientos han permitido desarrollar un mejor modelo de progresión de la infección, incrementar la comprensión de los mecanismos de patogénesis de la enfermedad.

Actualmente 42 millones de adultos y niños viven con el VIH /SIDA, se presentan 5 millones de nuevos casos por VIH /SIDA y hay 3.1 millones de defunciones por

causa del VIH /SIDA a finales de 2002. África es el que presenta mayor número de casos 29.4 millones, Australia presenta el menor número de casos 15,000 de infección por VIH /SIDA del total de 42 millones (16-18). Ver Tabla 1. y Fig. 1

Personas que viven con el VIH/SIDA	TOTAL	42 MILLONES
	Adultos	38.6 millones
	Mujeres	19.2 millones
	Menores de 15 años	3.2 millones
Nuevas infecciones por el VIH en 2002	TOTAL	5 Millones
	Adultos	4.2 millones
	Mujeres	2 millones
	Menores de 15 años	800,000
Defunciones causadas por el SIDA en el 2002	TOTAL	3.1 Millones
	Adultos	2.5 Millones
	Mujeres	1.2 Millones
	Menores de 15 años	610,000

**Tabla 1.** Resumen Mundial de la epidemia del VIH/SIDA (Resumen Mundial de la epidemia del VIH/SIDA, OMS, Diciembre 2002).



**Gráfico 1.** Número estimado de adultos y niños viviendo con el VIH/ SIDA a fines del 2002. (Resumen Mundial de la epidemia del VIH/SIDA, OMS, Diciembre 2002)

Actualmente el objetivo del tratamiento anti-VIH altamente activo (TAVAA), es mantener la supresión de la replicación de VIH-1, hasta niveles por debajo de los límites de detección con las técnicas actuales (<50 copias RNA VIH/ml) mediante el uso de la combinación de inhibidores de transcriptasa reversa e inhibidores de proteasa (19;20). A pesar de esto, no es posible hablar de erradicación viral debido a la presencia de un reservorio viral en células CD4+ T con larga vida, y que son refractarios al tratamiento antirretroviral (21).

Finalmente el conocimiento de la interacción dinámica de los factores del VIH con los del huésped es fundamental para comprender la patogénesis y como en todas, o casi todas las enfermedades, del grado de conocimiento de la patogénesis

dependerán de una manera directamente proporcional, la probabilidad de diseñar estrategias terapéuticas eficientes para curar o controlar significativamente a la enfermedad (22;23).

## **II. MARCO TEÓRICO**

El Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es causado por el VIH y se caracteriza por las diversas manifestaciones clínicas, incluyendo la profunda inmuno-supresión con la asociación de infecciones oportunistas y degeneración del sistema nervioso central [revisión en (23)].

El VIH pertenece a la familia Lentiviridae que originan enfermedades de larga evolución, que pertenecen a la subfamilia de retrovirus de tipo RNA, capaz de traducir su genoma a DNA en la célula huésped así como de un periodo largo latente de infección en las células y un periodo corto de efecto citopático. Se conocen dos tipos de VIH, asignados como VIH-1 y VIH-2 presentan diferencias en su estructura genómica y antigenicidad, causan un síndrome clínico similar [revisión en (23)].

### **2.1 BIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR VIH**

El VIH infecta a una variedad de células del sistema inmunológico, aquellas células que expresan CD4 tales como los macrófagos, células dendríticas, células de la microglia, células de Kuppfer, monocitos, etc. (24) y un segundo receptor celular durante la entrada en células susceptibles (25). Se sabe que existen factores restrictivos en las células de cada especie que restringen la infección a los humanos, y Trim5 es una de las proteínas relacionadas en este mecanismo (26;27). Otros estudios indican que las células PBMC (células mononucleares de

sangre periférica) activadas con mitógeno son las células de elección para aislar el virus desde personas infectadas (28;29). Algunos aislados de VIH-1 también son capaces de infectar continuamente a células T CD4+ de leucemia tal como CEM, VHTLV-1, MT-2 y MT-4 líneas celulares humanas que son claramente más tratables que PBMC, y su uso facilitó los estudios moleculares y genéticos del VIH-1 (30-32). La mayoría de las líneas de células T liberaron grandes cantidades de viriones mientras se experimentaba sobre la muerte celular e infección.

Muchos aislados de VIH-1 se clasificaron con base en su replicación, citopatocidad y propiedades de tropismo. La mayoría de los aislados primarios del virus se caracterizan por replicarse lentamente y genera cantidades pequeñas de partículas de la progenie, se marcaron lento /bajo para distinguir de los VIH-1 rápido /alto que se expone a una infección con cinética más rápida y libera altos niveles de virión(33).

Algunos aislados primarios, que frecuentemente se recuperan de individuos sintomáticos, indujeron la formación de sincicia en co-cultivo de virus de PBMC en células MT-2 (34;35). Estos aislados se distinguieron SI (inductor de sincicia) de los NSI (no inductores de sincicio). El tropismo es la tercera propiedad usada para clasificar a aislados primarios de VIH-1.

Aunque los cambios en el LTR pueden modular la eficiencia de replicación en una variedad de tipos de células-T, el principal determinante de rangos de VIH reside en la glicoproteína Env (36). Todos los VIH-1 pueden infectar productivamente PBMC activadas; algunos aislados son capaces de replicarse en cultivos con

monocitos derivados de macrófagos (MDM) y se clasifican como macrófago trópico (M-Tópico). Otros aislados, frecuentemente obtenido durante el curso de la enfermedad, puede establecer infecciones continuas en CD4+ en células-T humanas pero no en MDM, y se les ha designado línea celular-T o TCL-trópico. En estudios subsecuentes se informó que el aislado primario de VIH-1 es capaz de infectar ambos, tanto MDM como TCL; las cuales se han clasificado como tropismo dual.

Aunque existan excepciones, los aislados M-Trópicos, en general son NSI y lento/bajo, y considerando TCL-Trópico son frecuentemente SI y rápido/alto con base en su fenotipo y replicación. El pase forzado de aislados primarios en CD4+ en líneas celulares humanas da como resultado la adaptación del virus en líneas celular-T (TCLA), con propiedades alteradas de tropismo y aumenta la sensibilidad para neutralizar anticuerpos solubles en CD4+ (37). En los clones moleculares que corresponden a uno del original TCLA agota al VIH – 1IIIIB, con que se había propagado extensivamente en 78 células, de los marcos de lectura para los vpr, vpu y nef los genes no son abiertos, sugiriendo que estos tres genes no son requeridos para la repetición eficiente en líneas células –T humanas.

El descubrimiento de la función del receptor de quimiocina para la fusión y entrada del virus en las células CD4+ ha conducido a la revisión de la clasificación del VIH-1 (38). Los aislados se pueden agrupar con base en la utilización del receptor de quimiocina en los ensayos de fusión del VIH-1 gp120 y proteínas que expresan las células CD4+. Como se indica en la tabla 2, los aislados que usan el receptor CXCR4 (nueva designación; virus X4) son

usualmente SI, con tropismo –TCL; los que usan exclusivamente receptor CCR5 (nueva designación; virus R5) son predominantemente NSI y Tropismo-M (39;40). Los aislados de pacientes que presentan tropismo dual R5/X4 son frecuentemente SI. Sin embargo los niveles de expresión del receptor de quimiocina, CD4 o gp 120 pueden ser únicamente altos en la fusión de los ensayos por lo que no puede predecirse la utilización del co-receptor durante la infección real del virus.

Uno de los aspectos clínicos tempranos reconocidos, más destacados en el SIDA es el agotamiento selectivo de las células CD4+, una propiedad que se relaciona con el tropismo del VIH-1 y su citopacidad para el subconjunto de linfocitos de infecciones en cultivo de tejido (41). En estudios más detallados, usando VIH-1 X4 indicaron que las células CD4+ de memoria son preferentemente infectadas. Sin embargo la pérdida selectiva de células de memoria CD4+ generalmente no se observa en los individuos asintomáticos. El trabajo más reciente, empleando CD3/CD28 co-estimulados para activar los linfocitos-T CD4+ ha confirmado la susceptibilidad mayor de células de memoria al virus X4, pero ha mostrado también que las células CD4+ inmaduras son infectadas por VIH R5. Cuando los linfocitos de individuos infectados por VIH-1 fueron examinados y se detectó que el DNA integrado del virus podría recuperarse de ambas células-T CD4+ de memoria sin evidencia selectiva del uso del co-receptor de quimiocina o subconjunto linfocitario.

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno que capturan, transportan y presentan antígenos a linfocitos –T CD4+ y CD8+. Esto

incluye las células de Langerhans en el tejido epitelial intestinal en los nódulos linfoides intersticial y mucosa genital, y las células DCs que circulan. Actualmente se piensa que las DCs asociadas con la superficie mucosa pueden representar la primera línea de defensa contra el VIH-1 sexualmente, transportando partículas del virus recientemente inoculado desde la entrada a órganos linfoides secundarios (42;43).

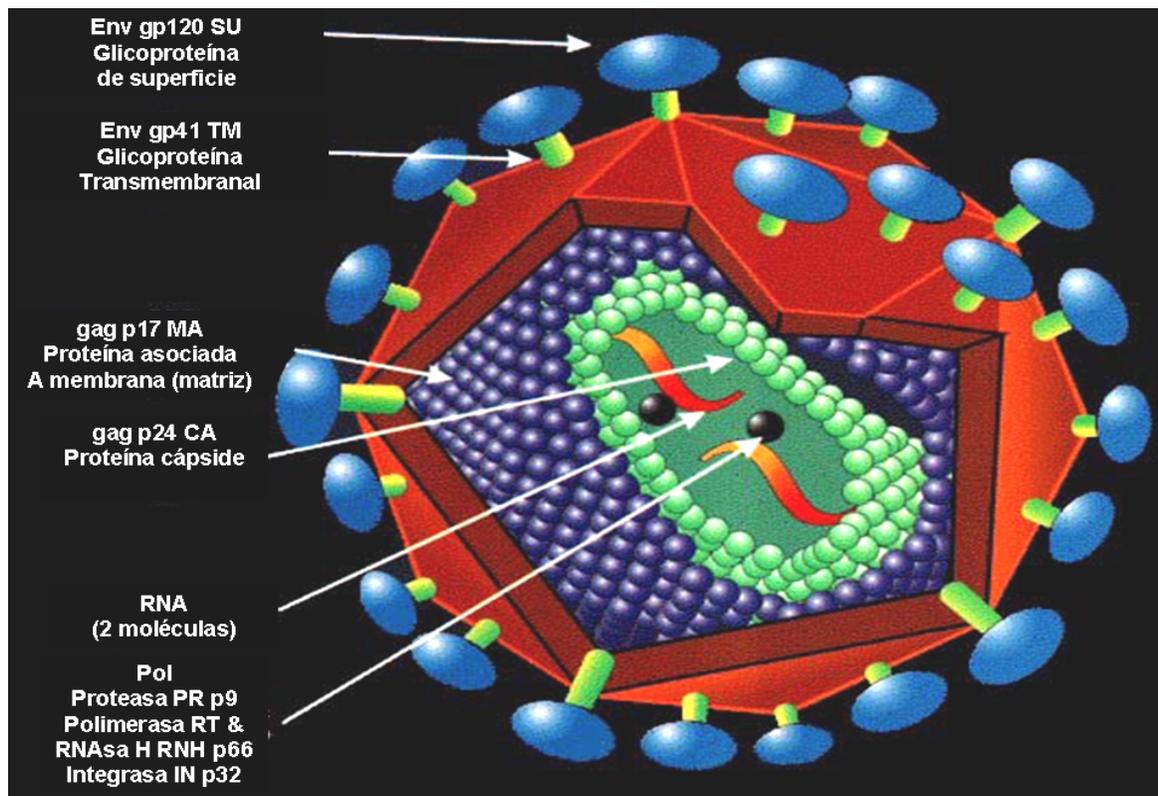
Recientemente se ha informado que los DCs expresan una lecitina tipo-C (nombrado DC-específico ICAM-3-conectado- no integrado o DC- SIGN ) que captura el VIH por el virión asociado con gp120 y transmite el virus a células –T que expresan CD4 y co-receptor de quimiocina apropiado. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para la transmisión y diseminación del VIH en vivo y puede ser un blanco novedoso para la terapia antiviral. Virtualmente todo lentivirus tiene la capacidad de replicarse y no proliferar, en tejido macrofagocítico terminalmente diferenciado. A diferencia de los oncoretrovirus que requieren mitosis; el VIH es capaz de infectar productivamente en células en  $G_1$ .

El VIH-1 ocasiona la pérdida selectiva de células CD4+ e induce agotamiento del mismo subconjunto de individuos infectados, los mecanismos responsables de este efecto citopático son todavía desconocidos. La muerte de células por el virus puede ocurrir por la lisis celular o la formación de sincicio y se asocia frecuentemente por la expresión de glicoproteínas.

## **2.2 ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

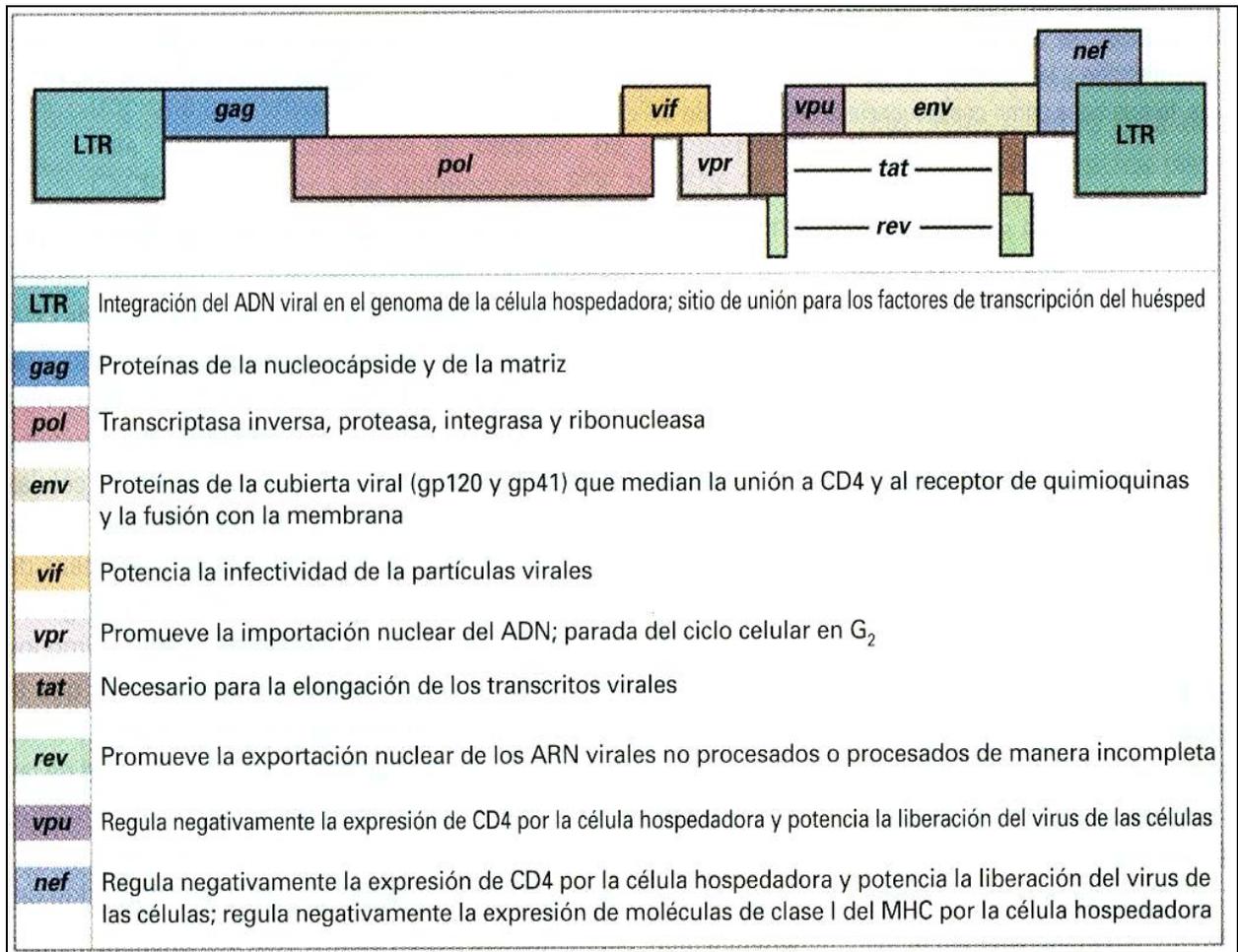
Las formas maduras de viri3n VIH son esferas icosa3dricas con 72 proyecciones formadas por las prote3nas de la envoltura gp 120 y gp 41, en su interior se encuentran dos cadenas id3nticas de RNA y las enzimas asociadas, como la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa, empaquetadas en un centro c3nico compuesto de la prote3na de la c3pside p24 con una matriz circundante de prote3na p17, todo ello rodeado de una envoltura de membrana fosfolip3dica derivada de la c3lula hospedadora (Figura 1).

El genoma del VIH tiene un arreglo b3sico (figura 2), secuencia caracter3stica de 3cidos nucleicos, con secuencias terminales LTRs de unos 634 pares de bases donde se encuentran secuencias que regulan la integraci3n viral dentro del genoma hospedador, la expresi3n del gen viral y la replicaci3n viral.



**Figura 1.** Estructura del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1).

Los genes estructurales del VIH se distribuyen en sentido 5'-3' en el orden siguiente: gen gag; codifica para proteínas del núcleo, el gen pol; codifica para la transcriptasa inversa, integrasa y otras enzimas que se requieren para la replicación viral y el gen env; codifica para las glicoproteínas gp 120 y gp 41, las cuales se requieren para la infección de la célula huésped. El VIH-1 incluye otros seis genes reguladores: tat transactivador, rev se une a RNAm permitiendo que las proteínas se produzcan en cualquier ciclo de la célula huésped, vif se encuentra en los viriones su ausencia inhibe la síntesis de DNA proviral, nef regula la expresión de CD4 y MHC-1 en la membrana modifica la activación de las células T, vpr se pega al precursor de gag; bloquea el ciclo de la célula en G<sub>2</sub> y vpu se transcribe junto con env; mejora la expulsión del virión [revisado en (23)].

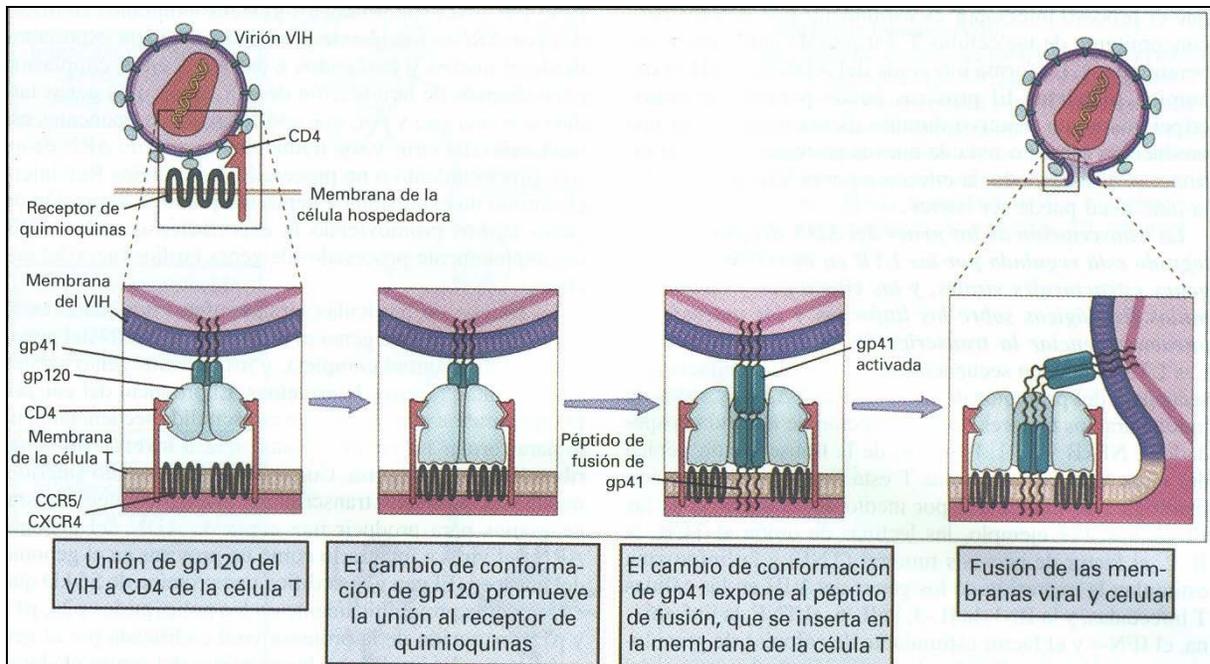


**Figura 2.** Organización genómica del VIH-1. Las posiciones verticales denotan cada uno de los tres marcos de lectura que codifican para las proteínas virales. Las terminaciones largas repetidas (LTR) contienen secuencias necesarias para el inicio y terminación de la transcripción. Adaptado de Greene, W. AIDS and the immune system. Copyright 1993 by Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.(44)

### **2.3 CICLO DE VIDA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.**

La infección por VIH comienza cuando la glucoproteína de envoltura interacciona con el receptor CD4 de membrana que pertenece a la familia de las quimiocinas. La partícula viral comienza la infección usualmente en la sangre, semen u otros fluidos de un individuo. Env es un compuesto complejo de la subunidad transmembrana gp41 y la subunidad gp120 unidas no covalentemente, estas subunidades se generan mediante escisión proteolítica de un precursor, gp 160. La unión de la envoltura viral con la membrana de la célula diana se realiza en varios pasos (figura 3), el primer paso es la unión de la subunidad gp120 y la molécula CD4, induciéndose un cambio conformacional promoviendo una unión secundaria de gp120 con el co-receptor de quimiocina. Esta última unión induce un cambio en gp41 en la región hidrofóbica y se inserta a la membrana celular llevándose a cabo una fusión con la membrana celular y viral.

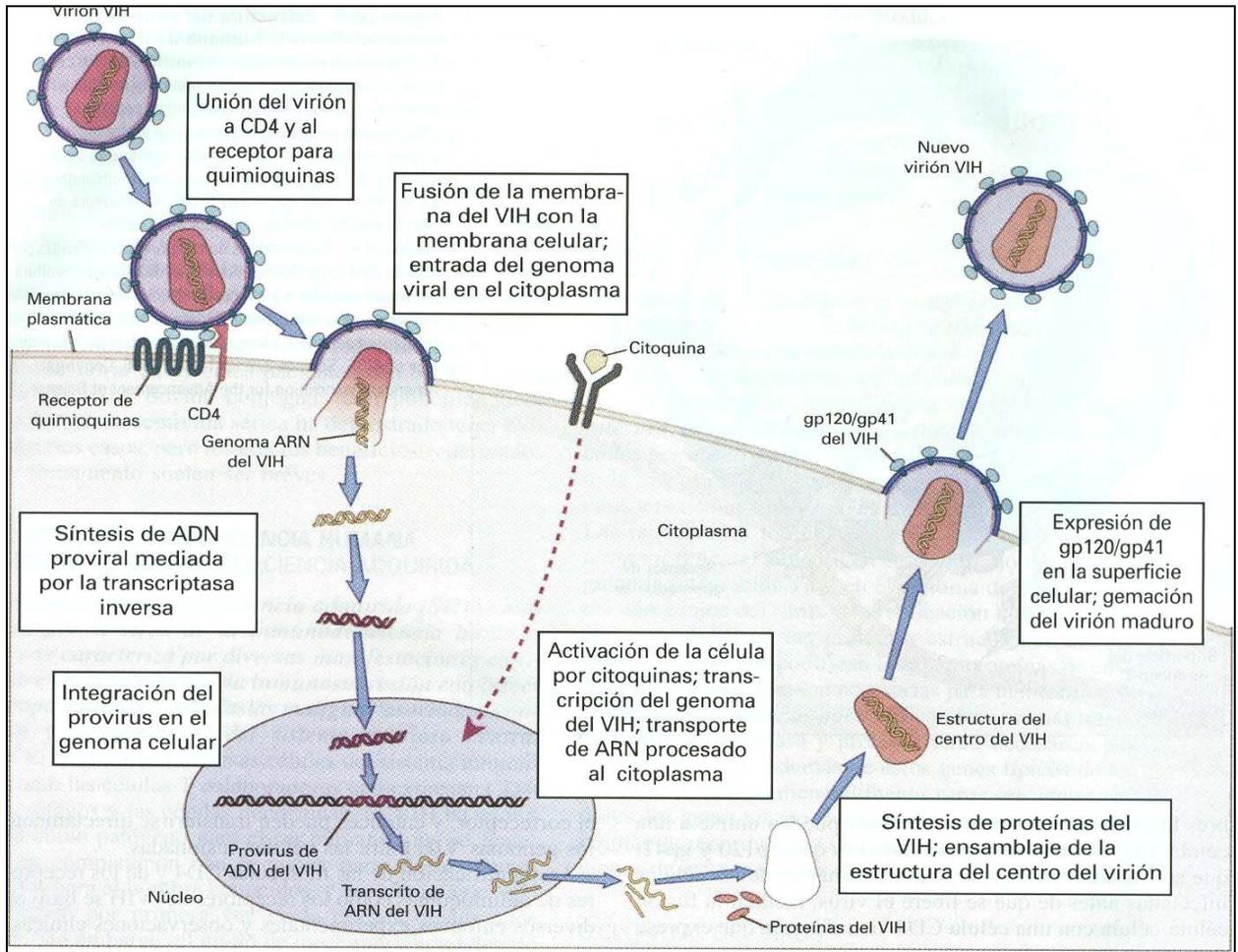
Entra el genoma viral al citoplasma, las nucleoproteínas se activan y comienza el ciclo de reproducción viral (figura 4). El genoma RNA viral es transcrito a doble hebra de DNA por la transcriptasa inversa RT, que es una polimerasa de DNA dependiente de RNA, además de su actividad de polimerización, RT tiene actividad de endonucleasa que degrada la tira de RNA del híbrido de RNA-DNA. El DNA sintetizado por la transcripción inversa, forma, junto con algunas proteínas de la cápside y vpr e integrasa, un complejo de integración que se dirige entonces al núcleo donde ocurre la siguiente etapa en el ciclo de replicación retroviral.



**Figura 3.** Mecanismo de entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una célula; se representan los cambios de conformación secuenciales de gp 120 y gp 41 promueven la fusión del VIH-1 y la membrana de la célula hospedadora.(44)

La integrasa viral entra también al núcleo y cataliza la integración del DNA viral al genoma de la célula huésped. Este es el mecanismo de integración exclusivo de los retrovirus y esencial para que las células produzcan viriones progenie. Para la replicación del VIH y la inducción de sus genes, se requiere de factores celulares y virales; los factores celulares son enzimas o factores de transcripción que son señales de activación, como antígenos mitógenos o citocinas. La transcripción del VIH es compleja por la codificación de sus proteínas reguladoras y accesorias: Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef (44).

Después de la activación de VIH por los factores celulares, Tat y Rev dos proteínas nucleares transactivadoras virales codificadas por los genes tat y rev, respectivamente, regulan eventos transcripcionales y postranscripcionales. La proteína Tat parece regular dos etapas de la expresión génica del VIH-1: acelera la síntesis de los RNAs transcritos en forma completa y controla de manera indirecta la expresión de Rev. La proteína Nef induce un estado latente de infección. Finalmente el ensamble de los viriones ocurre en varias etapas; primero, el RNA y los productos de los genes gag y pol del VIH-1 se integran en el citoplasma de la célula huésped, el centro del virus. Una vez ensamblado, el centro se dirige a la superficie y sale a través de la membrana celular de donde adquiere la membrana lipídica y se completa con los productos del gen env para formar las proteínas principales de envoltura. El VIH-1 completamente formado, es capaz de buscar e infectar otras células y comenzar un nuevo ciclo de replicación y posiblemente la inducción de muerte celular (45;46).



**Figura 4.** Ciclo vital del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Se muestra los pasos secuenciales de la reproducción del VIH, desde la infección inicial de una célula hospedadora hasta la liberación de un nuevo virión (44).

## 2.4 FENOTIPOS BIOLÓGICOS DEL VIH.

Varios estudios han demostrado diferencias en las propiedades biológicas en los aislados del VIH-1 como: capacidad de inducir sincicio en células MT-2, citotropismo (tropismo por macrófagos o tropismo por línea celular T) y rango de replicación (rápido crecimiento o lento crecimiento en cultivo) (Tabla 2).

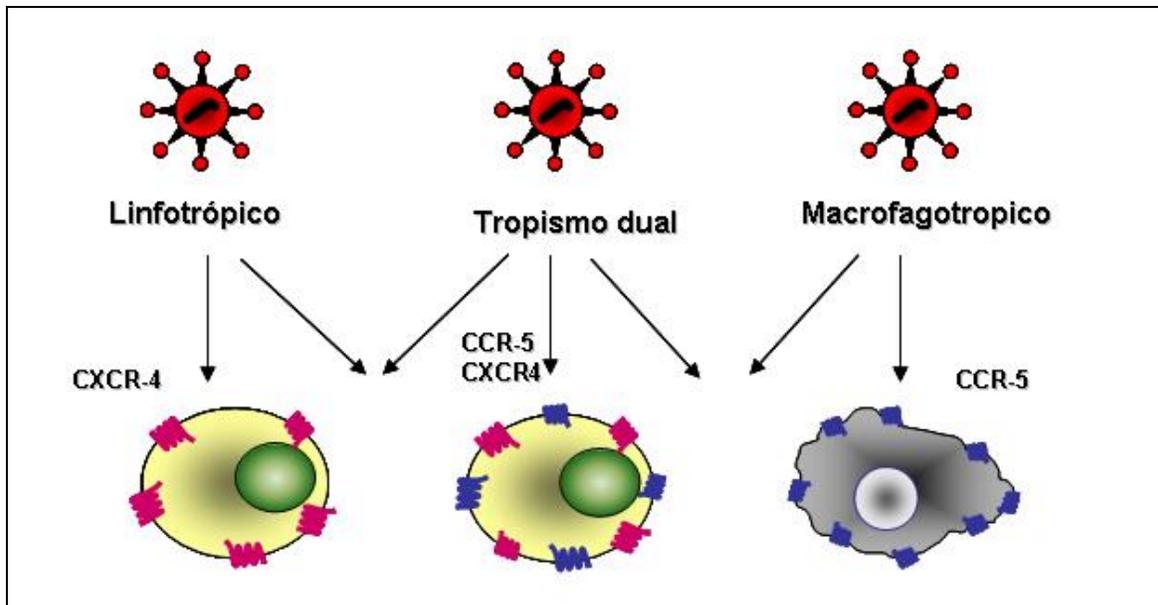
Co-receptor de quimiocina	Fenotipo biológico en células MT-2	Rango de replicación en PBMC	Tropismo celular
CXCR4	Inductor de sincicio (IS)	Rápido	Linfotrópico
CCR5	No inductor de sincicio (NO-IS)	Lento	Macrofagotrópico
CXCR4/CCR5	Inductor de sincicio (IS)	Rápido	Linfotrópico / Macrofagotrópico Dual

**Tabla 2.** Clasificación del VIH con base en su fenotipo biológico y tropismo celular.

Una de esas características es la capacidad de formar células gigantes multi-nucleadas a través la fusión de las células T CD4+, a dichas fusiones se les nombró sincicio. A partir de

la observación de las células gigantes se iniciaron diversos estudios para entender el mecanismo de fusión celular (47). Se ha mostrado que existen variantes de VIH-1 una de las cuales no induce sincicio (NIS) y otra que induce sincicio (IS).

La formación de sincicio depende de la interacción entre la proteína de envoltura del VIH-1 gp120 y el receptor de la célula CD4. La interacción de la molécula gp120 con los co-receptores identificados  $\alpha$  y  $\beta$  quimiocina (CXCR4 y CCR5). Se conocen cepas de VIH-1 que interaccionan con el co-receptor CCR5 otra con el co-receptor CXCR4 y hay cepas que se conocen como duales que utilizan tanto CCR5 como CXCR4, existen cepas que también usan CCR3 y CCR2 $\beta$ . El tropismo del VIH-1 se relaciona con el uso de los diferentes receptores de quimiocina, los aislados con tropismo por macrófagos utilizan CCR5, los aislados con tropismo por las células T utilizan CXCR4 y las cepas duales tienen tropismo por macrófagos y células T. También se sabe que los aislados macrofagotrópicos son no inductores de sincicia y los linfotrópicos son inductores de sincicia (Figura 5) (44;48-52).



**Figura 5.** Clasificación de VIH por su tropismo viral. Annu. Rev. Immunol. 1999;17:662.

Existen otras interacciones entre otros constituyentes celulares como LFA-1/ICAM-1, que en estudios realizados muestran ser importantes en la formación de sincicia para acercar un nivel de interacción entre gp120/CD4 (53). Sabemos que el virus en circulación en el cuerpo humano no es homogéneo, ya que existen cuasi-especies con características diferentes las cuales ya se han mencionado, dichas características son expresadas en diferentes etapas de la infección. En la infección temprana la población es homogénea, generalmente con tropismo por los macrófagos y variantes no inductores de sincicio; durante el curso de la infección la población viral predominante es la de tropismo por células T CD4+ e inductores de sincicia. Este cambio se considera como el interruptor del estado asintomático al sintomático de la enfermedad.

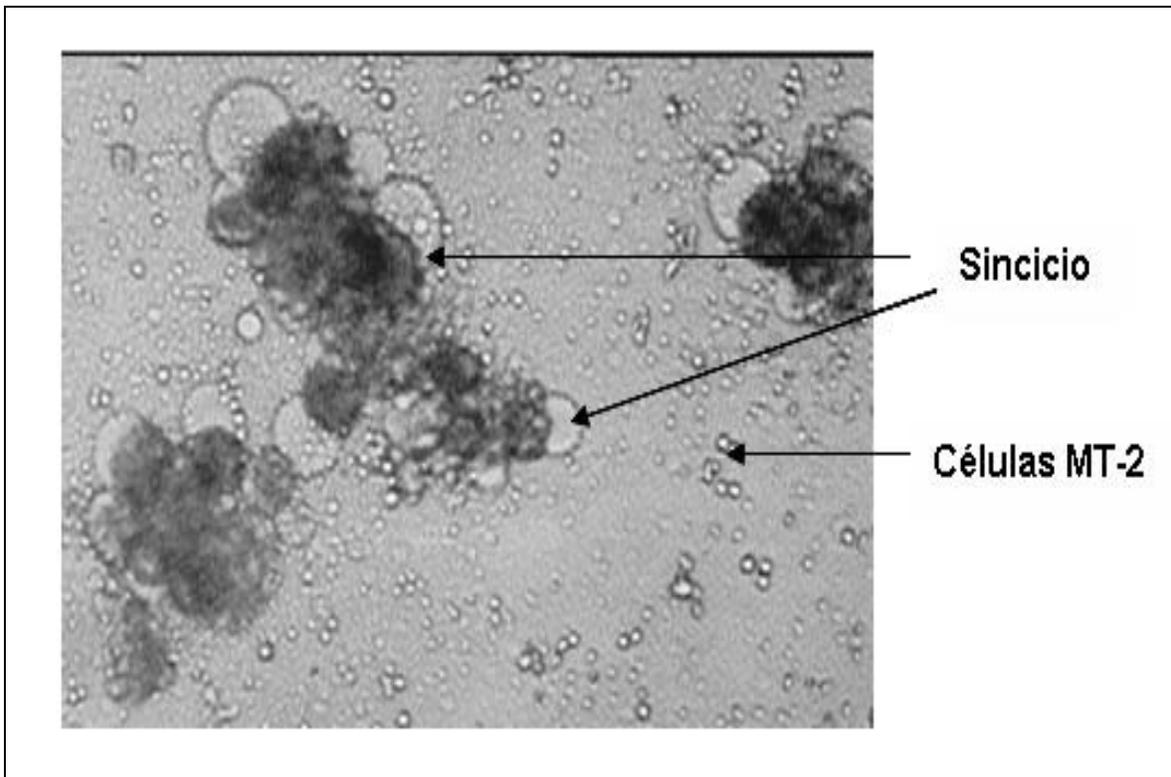
La emergencia de las variantes IS se relaciona con el deterioro inmunológico y clínico (54-56). Se piensa que en la infección son inoculadas tanto virus no inductores de sincicia como inductores de sincicia, pero, estos últimos, son suprimidos por la respuesta inmune y

así las variantes monocitotrópicos no inductores de sincicia son esenciales para la persistencia de la infección por VIH-1 en la etapa asintomática, funcionando como reservorio permitiendo que el virus se disemine en todo el cuerpo. La variante inductor de sincicia aparece en los primeros 6-18 meses después del diagnóstico del SIDA. Los aislados inductores de sincicia se presentan en aproximadamente el 50% de los pacientes con SIDA. La aparición de aislados inductores de sincicia durante la etapa asintomática es asociado con la rápida depleción de las células T CD4+ y con una rápida progresión de la enfermedad así que se considera como un marcador pronóstico (34;57-60).

La heterogenicidad del virus en cuanto al tropismo celular y cambio de fenotipo biológico se debe al gen env, en particular la región V3 de la glicoproteína gp 120. En diversos estudios se observa que el dominio localizado en V3 entre el aminoácido 296 y 331 del gp 120 ocurre una mutación en la posición 320 manifestando un cambio de fenotipo de no inductor de sincicia a inductor de sincicia así como la mutación ocurrida en 324 se considera como modulador del fenotipo viral incluyendo la neutralización del epítipo, capacidad de replicación y fenotipo biológico (61-63).

Existen diversas líneas celulares T en las que se puede observar el fenotipo biológico como: H9, SupT1, C8166, PBMC y MT-2, estudios realizados han demostrado que el cocultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con la línea celular MT-2 es sensible, específica y que es un método conveniente para detectar aislados inductores de sincicia (48). Las células MT-2 son una línea de células T immortalizadas por HTLV-I y se consideran susceptibles a la infección y formación de sincicia usando los fenotipos IS y No-IS (54). La infección de las células MT-2 es acompañada por la formación de sincicia,

reportándose que las variantes no inductores de sincicia no pueden replicar en células MT-2 a diferencia de los IS, permitiendo su observación microscópica, por la presencia de células gigantes (sincicio) por la fusión de las membranas celulares (Figura 6).



**Figura 6.** Microfotografía del ensayo de fenotipo biológico, que muestra la formación de Sincicio en células MT-2 inducidas por VIH.

En estudios realizados se observa principalmente en pacientes pediátricos que en el fenotipo no inductor de sincicio hay replicación viral, observándose esto por la medición del antígeno p24 (55;64;65).

Durante el desarrollo de la infección, en cada etapa de la enfermedad presenta diversas características el virus como la mutación en la región V3 antes mencionada que lleva a consecuencia un cambio de virus no inductor de sincicio a un virus inductor de sincicio, pasando de una etapa asintomática a una sintomática ocasionando la depleción de la cuenta de células CD4+ así como la progresión de la enfermedad, de ahí la importancia de que la determinación de fenotipo biológico se considere como un marcador de la progresión de la enfermedad.

## 2.5 TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL

El objetivo primario del tratamiento de la infección por VIH-1 es la supresión prolongada y sostenida de la replicación viral. Para lograrlo se requiere que se cumpla varios factores determinantes para la eficacia del tratamiento: tratamiento continuo (ya que la interrupción de la terapia antiretroviral ocasiona la pérdida de supresión de la replicación del VIH en poco tiempo), el apego del enfermo al tratamiento y la tolerancia.

Los medicamentos disponibles en la actualidad actúan en diferentes momentos del ciclo viral, impidiendo su replicación. Los tres grupos de fármacos con los que se cuenta actúan bloqueando enzimas virales importantes para su replicación.

1. Inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos actúan impidiendo la síntesis de DNA a partir del RNA, que se lleva a cabo gracias a la enzima transcriptasa reversa, compitiendo con los nucleósidos naturales para unirse con la enzima. Dentro de este grupo están la zidovudina (ZDV, AZT), didanosina (ddI), zalcitabina(ddC), lamivudina (3TC) y stavudina (d4T).
2. Los inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos son inhibidores no competitivos de la enzima, inducen resistencia viral rápidamente. En este grupo están la nevirapina, lovirida y delaviridina y no están aprobados en México aún.

3. Los inhibidores de proteasa son inhibidores potentes de la replicación viral. Actúan inhibiendo la enzima proteasa, la cual es responsable de madurar proteínas estructurales virales y enzimas (transcriptasa reversa, integrasa y proteasa); dentro de este grupo se encuentra el indinavir y nelfinavir. Otros, que se encuentran en investigación, como los inhibidores de fusión e inhibidores de integrasa.

El tratamiento debe iniciarse antes de que ocurra daño inmunológico irreversible, no hay un consenso sobre el momento preciso para iniciarlo, pero algunos investigadores proponen iniciar cuando los datos clínicos, virológicos (carga viral) o inmunológicos (cT CD4+) indiquen un riesgo de inminente progresión. En pacientes con cT CD4+ mayores de 500cel/ $\mu$ L no existen investigaciones que respalden la decisión de inicio de tratamiento si no que la decisión debe ser tomada cuidadosamente ya que el riesgo de inicio en esta etapa de la enfermedad puede condicionar problemas relacionados con toxicidad, tolerancia, aceptación, costos y la inducción de resistencia a drogas en el virus.

Los efectos adversos más importantes de estos medicamentos son: náuseas, vómito, malestar abdominal, anemia, cefalea, fatiga, pancreatitis, hiperglucemia, neuropatía periférica o parestesias, litiasis urinaria y anormalidades en las pruebas de funcionamiento hepático.

El tratamiento con dos inhibidores de la transcriptasa reversa análogos a nucleósidos, logra los objetivos ideales sólo en un número limitado de pacientes y por un tiempo mucho más corto que lo demostrado hasta la fecha para triples combinaciones 52 semanas. Cuando se utiliza una combinación de 2 análogos de nucleósidos y un inhibidor de proteasa conocido como terapia antiretroviral altamente activa (TAVAA) se obtienen beneficios: disminución significativa de enfermedades oportunistas, retarda la progresión a SIDA y ha producido una disminución significativa de la mortalidad y un incremento considerable de la calidad de vida. También aumenta el número de células T CD4+. A pesar de los resultados obtenidos con el TAVAA se observa que existen reservorios del VIH donde el tratamiento no tiene efecto, permaneciendo latente el virus (66-71).

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las características biológicas virales continúan evolucionando durante el curso de la infección del VIH-1, por lo que la interacción dinámica de los factores del VIH con los del huésped es fundamental para comprender la patogénesis y del grado de su conocimiento dependerá de manera directamente proporcional la manera de diseñar estrategias terapéuticas eficientes para el control de la enfermedad. El fenotipo biológico es un marcador importante en la progresión de la enfermedad, por lo que la determinación del mismo en las diversas etapas de la enfermedad es importante.

### **IV. OBJETIVOS**

**OBJETIVO GENERAL:** Determinar el fenotipo biológico del VIH-1 de pacientes en diversas etapas de la infección.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1) Determinar el fenotipo biológico del VIH-1 en pacientes en etapa intermedia de la infección.
- 2) Determinar el fenotipo biológico del VIH-1 en pacientes en etapa tardía de la infección.

## VI. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se emplearon muestras de plasma y células mononucleares de sangre periférica de pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, que acuden al Servicio de Infectología. Pacientes Inmunocomprometidos y que aceptaron donar muestras, mediante carta de consentimiento informado.

Se emplearon 28 individuos que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión:

- a) VIH positivos mediante prueba de ELISA.
- b) Sin tratamiento antirretroviral previo.
- c) Menos de 500 células T CD4+/ $\mu$ L.

Aquellos individuos que no reunieran alguno de los siguientes criterios de exclusión:

- a) Con enfermedad oportunista activa
- b) Con medicamentos moduladores de la respuesta inmune (interleucinas, interferones, talidomida).

Los pacientes que cumplieran estos requerimientos se integraron en alguno de los dos grupos de estudio de acuerdo al siguiente criterio:

- a) **Etapa intermedia**, menos de 500 células T CD4+/ $\mu$ L pero más de 200 células T CD4+/ $\mu$ L.
- b) **Etapa tardía**, menos de 200 células T CD4+/ $\mu$ L.

## VII. ESPECIMENES, TÉCNICAS, MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS



Fotografía del laboratorio nivel III de bioseguridad, donde se realizan los cultivos de VIH.

### 7.1 ESPECIMENES REQUERIDOS:

**A)** A los pacientes se les tomaron las siguientes muestras:

1. Sangre con EDTA para determinación de Carga Viral en plasma, de acuerdo al procedimiento del Instituto, Roche Cobas Amplicor (Método Estándar, Intervalo de detección 400-750,000 copias RNA VIH-1). Elaborado por personal del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Infectología.
2. Sangre con EDTA, para determinación de Subpoblaciones de linfocitos (Células T CD4+ y CD8+), mediante citometría de flujo según método del Instituto, Tritest Becton Dickinson. Elaborado por personal del Laboratorio de Citometría del Servicio de Infectología.
3. Sangre con heparina, para separación de plasma y células mononucleares.

Las muestras de plasma con Heparina (para cultivo de VIH) y con EDTA (para determinación de carga viral), se congelaron a -80 °C, hasta el momento de su uso.

**B)** PBMC DE DONADOR OBTENIDA DE MUESTRA BIOLÓGICA: Paquete leucocitario concentrado de donador VIH negativo de Banco de Sangre .

**C)** HIV SF<sub>33</sub> (HIV T-trópico = Control positivo).

**D)** HIV SF<sub>162</sub> (HIV M-trópico = control negativo )

**E)** HIV SF<sub>2</sub> ( control negativo lento, generalmente induce sincicia a los 7 días)

## **7.2 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) DE DONADOR**

**A)** MUESTRA BIOLÓGICA: Paquete leucocitario concentrado de donador VIH negativo de Banco de Sangre.

**B)** MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS:

- a. Tubos de polipropileno de 50 mL.
- b. Pipetas de 10 y 25 mL.
- c. Lymphoprep (Axis-Shield)
- d. Tubos de 1 mL.
- e. Pipetas de Aspiración.
- f. Medio HBSS a 37 °C.
- g. Gradillas
- h.** Centrífugas.

**C)** TÉCNICA

1. Colocar 10 mL de Lymphoprep en 4 tubos de polipropileno de 50 mL.
2. Limpiar la entrada de la bolsa y cortar con técnica aséptica, y colocar la sangre en 3 tubos limpios de 50 mL (aproximadamente 20-25 mL por tubo).
3. Resuspender con el mismo volumen de medio Hank (HBSS) a 37°C.

4. Realizar el gradiente en el tubo con Lymphoprep con 30-35 mL de la sangre diluída.
5. Centrifugar a 2000 rpm por 20 min, sin freno "brake out".
6. Colocar 20 mL de medio HBSS a 37 °C en tubos limpios de 50 mL
7. Aspirar la capa superior (medio HBSS), y recolectar la capa de células, cuidando de no llevarse eritrocitos, y colocarlo en los tubos con medio HBSS.
8. Centrifugar 20 minutos a 2000 rpm.
9. Aspirar el sobrenadante, y resuspender las células con 30 mL medio HBSS a 37 °C, y centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
10. Aspirar el sobrenadante, y resuspender las células con 30 mL medio HBSS a 37 °C y contar las células. Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
11. Congelar de  $90$  a  $110 \times 10^6$  PBMC en viales de 3 mL

### **7.3 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC) DE PACIENTE.**

**A) MUESTRA BIOLÓGICA:** Sangre total con anticoagulante ACD o heparina.

**B) MATERIAL Y REACTIVOS:**

- a. Tubos de polipropileno de 50 mL.

- b. Pipetas de 5, 10 y 25 mL.
- c. Lymphoprep (Axis-Shield).
- d. Tubos de 1 mL.
- e. Pipetas de Aspiración.
- f. Medio HBSS a 37 °C.
- g. Gradillas .
- h. Centrífugas.

**C) TÉCNICA:**

1. Colocar la muestra del paciente en 3 tubos de 50 mL (aproximadamente 40-45 mL por tubo).
2. Centrifugar 2000 rpm durante 20 minutos.
3. Separar 5 alícuotas de plasma y congelarlas a –80 °C.
4. Colocar 10 mL de Lymphoprep (Axis-Shield) en tubos de polipropileno de 50 mL.
5. Eliminar el plasma, y diluir la sangre con el mismo volumen de medio HBSS a 37 °C, y realizar el gradiente con 30 mL de la sangre diluida.
6. Centrifugar a 2000 rpm por 20 min, sin freno “brake out”.
7. Colocar 20 mL de medio HBSS a 37 °C en tubos de 50 mL.

8. Aspirar la capa superior (medio HBSS), y recolectar la capa de células, cuidando de no llevarse eritrocitos, y colocarlo en los tubos con medio HBSS.
9. Centrifugar 20 minutos a 2000 rpm.
10. Aspirar el sobrenadante, y resuspender las células con medio HBSS a 37 °C, y centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
11. Aspirar el sobrenadante, y resuspender las células con medio HBSS a 37 °C y contar las células. Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.
12. Congelar entre 25 y 30 x 10<sup>6</sup> PBMC por vial.

#### **7.4 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE MUESTRAS**

Todas las muestras de plasma y suero de pacientes deberán guardarse a -80 °C en crioviales de 2 mL. Cada tubo deberá contener: Nombre o clave del paciente, fecha de toma de muestra, y tipo de muestra. Cada muestra deberá de anotarse en la bitácora correspondiente. Para descongelarlas, basta colocarlas 5 minutos en baño de agua a 37°C, y utilizarlas durante los primeros 5 minutos posteriores a su descongelación. Los sobrenadantes de cultivos, se almacenarán de la misma forma.

**A) CONGELACIÓN:**

1. Congelar 25-30 millones de células de paciente por criovial en volumen final de 1.5 mL o 90-110 millones por vial de donador en 3 mL, determinar el número de tubos a emplear por separación. Ejemplo: 100 x 10<sup>6</sup>, usar 4 viales de 25 millones.
2. Calcular el volumen de medio de congelación a emplear. Ejemplo: 4 viales x 1.5 mL = 6.0 mL de medio de congelación.
3. Preparar el medio de congelación en la siguiente forma:
  - a. 90% SBF (suero bovino fetal) a 4°C
  - b. 10 % de DMSO a T° ambiente.
  - c. Colocar a 4°C (reacción exotérmica)
4. Realizar las mezclas con excedente, ejemplo
  - a. 6.3 mL de SBF (90%)
  - b. 0.7 mL de DMSO (10%)
5. Marcar los crioviales con la clave del paciente o donador, el número de células en el vial y la fecha de separación, y en caso requerido, tipo de muestra (ejem: GL, SP)
6. Centrifugar las células, eliminar el sobrenadante y resuspender las células en el volumen apropiado (ejem. 6 mL)

7. Colocar 1.5 mL en cada criovial, y colocar rápidamente en caja de unicel a 80°C (disminuir la rapidez de congelación).
8. Colocar las muestras al día siguiente en nitrógeno líquido.

**B) DESCONGELACIÓN:**

1. Retirar los tubos del tanque con nitrógeno líquido y colocarlos inmediatamente en baño de agua a 37°C
2. Colocar 10-20 mL de medio HUT por cada paciente descongelado (2-3 viales)
3. Tan pronto como se descongele, colocar las células en el medio y resuspender rápidamente.
4. Enjuagar los viales con medio HUT para asegurar que se recolectaron todas las células.
5. Lavar 3 veces con medio HUT a 37°C, contar y resuspender en medio HUT.
6. Dejar reposar toda la noche (o 6 horas mínimo).
7. Lavar una vez al día siguiente. Resuspender en el medio requerido.

## **7.5 CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC DE DONADOR P<sub>1</sub>).**

Todas las células que no requieren ser estimuladas podrán cultivarse en medio HUT a  $3 \times 10^6$  células/mL con recambio de medio cada 3-4 días. Si se requiere activación de estas células podrán cultivarse en medio IL-2 al 5 ó 10% con interleucina 2 natural, y 3  $\mu\text{g/mL}$  de PHA. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ purificados se cultivan de esta misma forma, excepto cuando la técnica empleada para un ensayo en particular indique otro método.

## **7.6 CULTIVO DE CÉLULAS MT-2**

Las células MT-2 provienen de un linfoma, por lo que no requieren de un medio de activación para propagarse. Se cultivan en medio HUT a  $1 \times 10^6$  con recambio diario de medio de 0.5mL, para un recambio cada 2 días. Su crecimiento es logarítmico, así que al día siguiente se espera encontrar un incremento en el número de células entre el 50-100%. La viabilidad esperada al cultivarlas de esta forma debe ser mayor al 85%.

## **7.7 CULTIVO B DE VIH**

Se requieren  $3 \times 10^6$  PBMC de paciente, y células P1 (PBMC de donador sano, estimuladas por 3 días con PHA-L en medio IL-2 5%).

1. Lavar las P<sub>1</sub> 3 veces con HBSS a 37 °C, a 1500 rpm por 10 minutos, y contar las células durante el segundo lavado. Resuspender a 3 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio IL-2 al 5% a 37 °C.
2. Contar las células del paciente, centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
3. Colocar 3 x 10<sup>6</sup> PBMC del paciente en un frasco de cultivo (T-25) con 3 x 10<sup>6</sup> P1 de donador (HIV negativo) en 4 mL de medio IL-2 al 5% a 37 °C.
4. Recolectar sobrenadantes los días 4, 7, 10, 14, 17 y 21 de cultivo, alimentando con P1 (de donadores HIV negativos) los días 7 y 14 del cultivo, y medio IL-2 al 5%.
5. Centrifugar los sobrenadantes y congelar al menos 3 alícuotas, y probar la producción de antígeno p24 ó Transcriptasa inversa.

## **7.8 CULTIVO DE VIH A PARTIR DE PLASMA CON HEPARINA.**

**A) Objetivo:** Aislar virus a partir de plasma con heparina de individuos infectados con VIH, sin tratamiento antirretroviral.

**B) Técnica:**

DIA 0:

1. Estimular PBMC de donador con PHA a 3 µg/mL, en medio IL-2 Al 5%, por 3 días.

DIA 3:

2. Lavar (1500 rpm, 10 min, 30 mL de HBSS en tubo de 50 mL) 3 veces y contar las células P<sub>1</sub> de donador sano.
3. Resuspender las P<sub>1</sub> a  $3 \times 10^6$  células/mL en medio IL-2 al 5%, incubar con 2 µg/mL de polibreno, durante 30 minutos a 37°C. Resuspendiendo cada 10 minutos.
4. Centrifugar 5 min a 1500 rpm.
5. Resuspender las células en medio IL-2 al 5%, a  $10 \times 10^6$  células /mL.
6. Colocar  $3 \times 10^6$  células por pozo (300 µL), en placa de 24 pozos, 3 pozos por muestra.
7. Descongelar el plasma y realizar diluciones 1:2 y 1:4, y marcar la placa como SD, 2 y 4 indicando muestra sin diluir, dilución 1:2 y 1:4.
8. Colocar 400 µL de plasma sin diluir y de cada una de las diluciones en cada uno de los pozos marcados.
9. Incubar toda la noche a 37 °C.
10. Al día siguiente, recolectar 500 µL de sobrenadantes y desecharlos, cuidadosamente para no recolectar células.
11. Transferir cada infección a frasco T-25 y agregar 4 mL de IL-2 al 5%.
12. Incubar a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 85% de humedad.

13. Recolectar 2.5 mL de sobrenadante por frasco, los días 4, 7, 10, 14, 18 y 21 de cultivo y agregar 3.0 mL de IL-2 5%. Alimentar con  $3 \times 10^6$  células los días 7 y 14.
14. Congelar 3 alícuotas (1000-500  $\mu$ L).
15. Medir Agp24 ó transcriptasa inversa los días 7, 14 y 21 de cultivo.

### **7.9 EXPANSIÓN VIRAL DE AISLADOS PRIMARIOS.**

1. Lavar y contar  $20 \times 10^6$  P<sub>1</sub> de donador sano.
2. Resuspender las P<sub>1</sub> a  $3 \times 10^6$  células /mL en medio IL-2 al 10%, con 2  $\mu$ g/mL de polibreno, durante 30 minutos. Resuspendiendo cada 10 minutos.
3. Centrifugar 5 min a 1500 rpm. Contar.
4. Resuspender con el cultivo primario y agregar medio IL-2 al 10% para obtener una concentración de  $10 \times 10^6$  células/mL.
5. Incubar 1 hr a 37 °C, resuspendiendo cada 15 minutos. Contar.
6. Resuspender a  $1.5 \times 10^6$  células/mL en medio IL-2 al 10%, y colocar 1.5 mL por pozo en placa de 24 pozos.
7. Recolectar 1.2 mL de sobrenadante por pozo, los días 4, 7 y 10 de cultivo.
8. Medir Agp24 ó transcriptasa inversa los días 7, 14 y 21 de la expansión.

## **7.10 ENSAYO DE FENOTIPO BIOLÓGICO EN CÉLULAS MT-2**

**A)** Objetivo: Determinar el fenotipo biológico de aislados primarios de VIH (no mayor a 3 pases con PBMC).

Para evaluar el efecto citopático de los aislados primarios, se utiliza como células blanco a la línea celular MT-2 (viabilidad mayor a 90%). La producción (replicación) de virus se mide mediante la detección de Agp24 o actividad de transcriptasa inversa en los sobrenadantes.

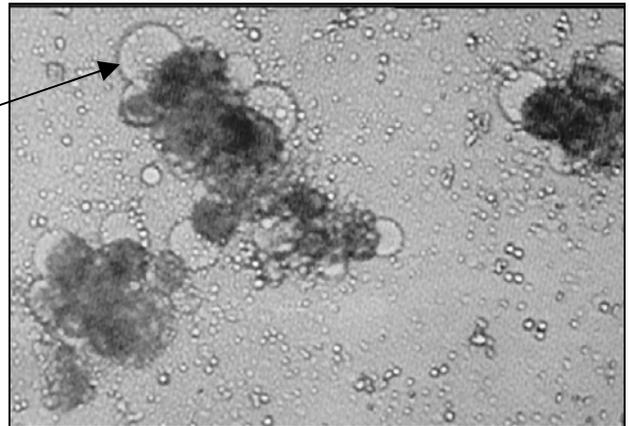
**B)** Técnica:

1. Colocar  $1 \times 10^6$  células MT-2 en medio HUT en cada pozo, en placas de 24 pozos.
2. Inocular los pozos por duplicado con el aislado primario (500  $\mu$ L con 500-1000 TCID<sub>50</sub> por pozo).
3. Incubar toda la noche (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 85% humedad).
4. Cambiar el medio cada 2 días. Determinar Agp24 o actividad de transcriptasa inversa en los sobrenadantes, los días 2, 6, 8 y 10.
5. Examinar las placas diariamente a partir del día 2 para identificar la presencia de sincicias (efecto citopático)
6. Usar como controles:

- a. HIV SF<sub>33</sub> (HIV T-trópico = Control positivo Induce sincicia en las primeras 48-72 hrs).
- b. HIV SF<sub>162</sub> (HIV M-trópico = control negativo primario)
- c. HIV SF<sub>2</sub> ( control negativo lento, generalmente induce sincicia a los 7 días)

Criterios que definen sincicia:

Células multinucleadas, con diámetro mayor a 5 diámetros del de las células normales.



## 7.11 ANTÍGENO p-24 DEL VIH-1 DE COULTER IN VITRO DIAGNOSTICUM.

### A) Introducción:

El análisis COULTER para antígeno p24 de HIV-1 es un inmuno-análisis enzimático o análisis de absorción ligado a enzimas (ELISA) cualitativo y cuantitativo in vitro para detectar la presencia del antígeno p24, no unido a complejo, del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) en plasma humano, suero humano.

**B) Fundamento:**

El ensayo de COULTER para antígeno p24 del VIH-1 usa un anticuerpo monoclonal murino contra el antígeno p24 del VIH-1 para revestir micro-pozos de titulación dispuestos en tiras sobre placas. El antígeno p24 del VIH-1, purificado y proveniente de una línea de linfocitos T humanos infectados con la cepa HTLV-II B del VIH-1 se usa como estándar de calibración cuantitativa. El tampón de lisis rompe las partículas de virus presentes en la muestra, y el antígeno p24 es liberado y capturado por el anticuerpo monoclonal, después de un paso de lavado se agrega una IgG humana biotinilada anti-VIH-1, ésta se une al antígeno p24 del VIH, posteriormente se agrega estreptavidina –peroxidasa de rábano que forma un complejo con los anticuerpos biotinilados. En un paso final se agrega tetrametilbenzidina y agua oxigenada (TMB) reaccionando con la peroxidasa formando un color azul. La reacción se detiene al agregar ácido (CSR-1).

**C) Interpretación:**

La absorbancia se mide en el espectrofotómetro. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno p24 del HIV-1, no unido a complejos, presente en el plasma, suero o medio de cultivo de tejidos. La presencia del antígeno p24 queda indicada cualitativamente si la absorbancia es mayor o igual al valor límite del análisis.

La cantidad de antígeno p24 del HIV-1 en una muestra puede determinarse mediante la comparación de su absorbancia con la de los estándares de calibración preparados con antígeno p24 purificado de VIH-1.

**D) Reactivos:**

1.- Microplaca de titulación recubierta con anticuerpo contra antígeno p24 del HIV-1	96 pozos
2.- Reactivo de antígeno p24 del HIV-1 (contiene azida de sodio al 0.1%)	2 viales x 0.5 mL
3.- Reactivo anti-VIH-1 (humano) –biotina (biotinilado, conservante timerosal al 0.2 %)	1 vial
4.- Control Negativo (humano)- (negativo para antígenos de HIV-1, anti.VIH-1, anti.VIH-2, HBsAg y anti-HCV; contiene azida de sodio al 0.1 %)	6 mL
5.- SA-HRPO (estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano; gentamicina al 0.01% y timerosal al 0.1%)	0.1 mL
6.- SA-Tampón (solución tampón Tris para SA-HRPO; conservantes gentamicina al 0.01% y timerosal al 0.1 %).	21 mL

7.- Reactivo TMB (en DMSO) tetrametil benzidina en dimetilsulfóxido	05 mL
8.- Diluyente para TMB (con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (contiene tampón citrato-fosfato al 0.0045%, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y 2-cloroacetamida al 0.1%).	21 mL
9.- Tampón de lisis (contiene tritón X-100. EDTA dipotásico, Tween-20; conservante timerosal al 0.05%).	4.5 mL
10.- Tampón de lavado (contiene solución tampón de fosfato de potasio, conc. 20X, Tween -20, y 2-cloroacetamida al 2.0%).	5 mL
11.- CSR-1 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4 N).	1 mL
12.- Tira no recubierta	1
13.- Tapas para microplacas.	4 hojas

**E) Preparación de Reactivos:**

Almacene los reactivos reconstituidos y los reactivos sin usar entre 2 y 8°C, excepto si se indica otra temperatura.

1. Tiras de microtitulación contra el p24 del HIV-1.

a) permita que las tiras alcancen la temperatura ambiente 15-30°C.

b) las tiras no usadas, almacenar entre 2 y 8°C.

2. Dilución de trabajo del tampón de lavado:

a) Para preparar 700 mL de dilución de trabajo del tampón de lavado, diluya 35 mL del tampón de lavado 20X con 665 mL de agua destilada.

3. Reconstitución del Reactivo de Biotina:

a) agregue 21 mL de agua al vial de reactivo de biotina.

b) invierta suavemente para mezclar el contenido.

c) si se almacena de 15-30°C es estable por 8 días.

4. Dilución de Trabajo de SA-HRPO:

a) prepare la dilución de trabajo dentro de las 8 horas de uso.

b) agregue 21  $\mu$ L de reactivo de SA-HRPO a 21 mL de SA tampón. Mezcle bien antes de usar.

5. Solución TMB-sustrato:

a) prepare la solución 1 hora antes de usarse.

b) agregue 21 mL del diluyente para TMB. Agregue 210  $\mu\text{L}$  del reactivo TMB.  
Mezcle bien antes de usar.

**F) Procedimiento:**

1. Identifique el primer micropozo como el blanco de sustrato.
2. Identifique los micropozos de control negativo, control positivo y muestras.
3. Coloque el número necesario de tiras (8 micropozos por tira).
4. Control Negativo: Prepare los controles negativos en triplicado en cada placa de 96 micropozos. Coloque 200  $\mu\text{L}$  de control negativo (humano) en tres micropozos de titulación recubiertos.
5. Control Positivo: Prepare los controles positivos en duplicado en cada placa. En dos micropozos de titulación recubiertos, coloque 200  $\mu\text{L}$  de control negativo (humano) y agregue 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de antígeno p24 del HIV-1
6. Muestras: Coloque con una pipeta 200  $\mu\text{L}$  de muestra por duplicado.
7. Tampón de lisis: Agregue 20  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis a todos los micropozos, excepto el blanco de sustrato. Incube la placa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora  $\pm 5$  minutos.
8. Lavado: Realizar 5 lavados con 300  $\mu\text{L}$  de la dilución de trabajo del tampón de lavado.

9. Reactivo de Biotina: Agregue 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de biotina reconstituido a todos los micropozos, excepto el del blanco de sustrato. Incube la placa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora  $\pm$  5 minutos.
10. Lavado: Realizar 6 lavados con 300  $\mu\text{L}$  de la dilución de trabajo del tampón de lavado.
11. SA-HRPO: Agregue 200  $\mu\text{L}$  de dilución de trabajo de SA-HRPO a todos los micropozos, excepto el del blanco de sustrato. Incube la placa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos  $\pm$  2 minutos.
12. Lavado: Realizar 6 lavados con 300  $\mu\text{L}$  de la dilución de trabajo del tampón de lavado.
13. TMB-SUBSTRATO: Agregue 200  $\mu\text{L}$  de solución TMB-sustrato a todos los micropozos Incube la placa a temperatura ambiente ( $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos  $\pm$  2 minutos.
14. CSR-1: Agregue 50 mL de CSR-1 a todos los micropozos.
15. Absorbancia a 450/570 nm: Dentro de 30 minutos de agregar CSR-1 a los micropozos, determine la absorbancia a 450/5720 nm.

**G) Punto de Corte:**

2 X (control negativo) + 0.050 + 4 SD (control negativo)

Donde:

2X: dos veces la media del control negativo.

0.050: constante.

4 SD: 4 veces la desviación estándar del control negativo.

## **7.12 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.**

### **A) Medio HUT**

1 frasco de RPMI – 1640 de 500mL

50 mL de SBF

5 mL de L-glutamina

5 mL de peniestreptomina de 10,000 U

### **B) IL - 2 natural al 5%**

1 frasco de RPMI – 1640 de 500mL

25 mL de IL -2

50 mL de SBF

5 mL de L-glutamina

5 mL de peniestreptomina de 10,000 U

**C) IL – 10 natural 10%**

1 frasco de RPMI – 1640 de 500mL

50 mL IL -2

50 mL de SBF

5 mL de L-glutamina

5 mL de peniestreptomina de 10,000 U

**D) PBS – SBF 2%**

1 frasco de PBS de 500 mL

10 mL de SBF

**E) IL – 2 recombinante humana (100 U/mL)**

1 frasco de 5 mL de IL-2 recombinante humana

Hacer alícuotas de 1 mL quedando a 10,000 U/mL

Resuspender 500  $\mu$ L en 50 mL de medio HUT.

**F) Polibreno 2  $\mu$ g/mL**

- a. 1 frasco de polibreno liofilizado 5 g/mL diluir en 50 mL de HBSS y alicuotar 50 viales con un 1 mL cada uno teniendo una concentración de 100 mg/mL.
- b. Diluir una de la alícuotas de 100 mg/mL en 100 mL de HBSS quedando una dilución en cada alícuota de 1 mg/mL de este vial, usar 2  $\mu$ L por cada mL de medio final (concentración 2  $\mu$ g/mL)

**G) PHA 3 mg/mL**

1 frasco de 5 mg

Diluir en 5 mL de HBSS quedando una concentración de 1mg/mL.

Usar 3 mL por cada mL de medio IL-2 (3 mg/mL)

## **VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se empleó análisis de varianza (ANOVA) para comparar la media de los valores de cada grupo. Cuando se observó diferencias significativas entre los grupos, la prueba post-hoc de Fisher se empleó para comparar pares de grupos. Se empleó la prueba de Chi cuadrada ( $\text{Chi}^2$ ) para comparar la prevalencia de los fenotipos biológicos en cada uno de los grupos. Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el programa StatView.

## IX RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio a 28 pacientes VIH positivos quienes cumplían criterios de inicio de tratamiento antirretroviral  $<500$  células-T CD4+/ $\mu$ l (Ver tabla de datos basales), y a quienes se les tomaron muestras basales antes del inicio del tratamiento antirretroviral. Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a su estadio clínico antes del inicio del tratamiento, en etapa intermedia (con 200 a 500 células-T CD4+/ $\mu$ l) y etapa tardía de la enfermedad ( $<200$  células-T CD4+/ $\mu$ l). La prueba de  $\text{Chi}^2$  mostró que existe mayor incidencia de infecciones oportunistas en los pacientes de etapa tardía (70%,  $\text{Chi}^2=13.5$ ,  $p<0.0005$ ), y debido a que el número de pacientes es muy pequeño se realizó prueba exacta de Fisher, mostrando una  $p<0.0005$ . Es importante aclarar que no se realizó estratificación por enfermedad oportunista, sino que sólo se tomaron en cuenta el antecedente de una o más de las siguientes condiciones:

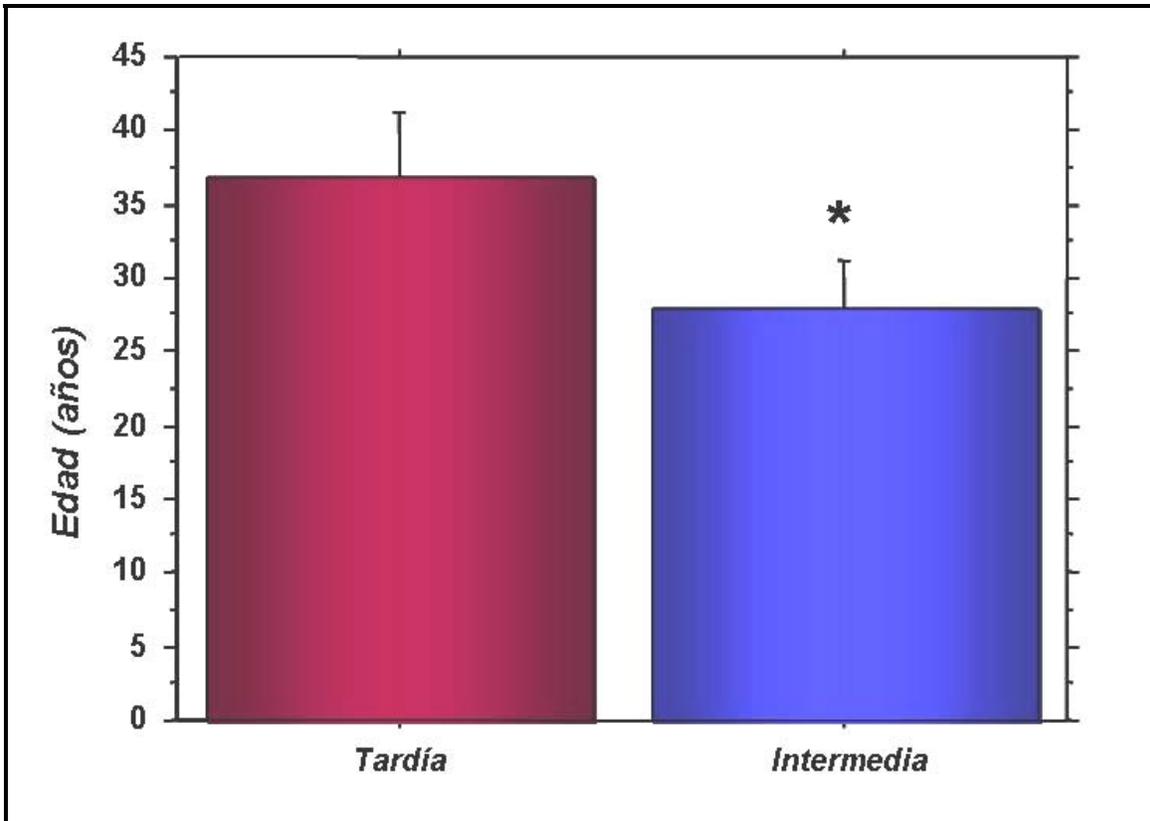
1. Candidiasis bucal (n=8).
2. Neumonía por *Pneumocistis carinii* (jeroveci) (PCP) (n=4).
3. Tuberculosis pulmonar (n=2) (TB).
4. Herpes zoster (n=1).

En dos casos se observó co-infección candidiasis con TB pulmonar, y en un caso candidiasis-PCP

**TABLA 3:** Datos basales. NS = No presenta diferencias estadísticamente significativas. EEM = Error estándar de la media.

	Etapa Intermedia	Etapa Tardía	p
N=	11	17	
Edad (media +/- EEM)	27.8 +/- 1.5	36.8 +/- 2.1	< 0.005
Hombres (%)	11 (100 %)	14 (82 %)	NS
Carga viral (media de copias RNA VIH/ml +/- Error estándar)	147,378 +/- 18,013	974,758 +/- 195,673	<0.005
Células T CD4+ (células/ $\mu$ l)	341.4 +/- 21.9	81.4 +/- 15.6	<0.0001
Infecciones oportunistas previas	0 (0 %)	12 (70 %)	<0.0005

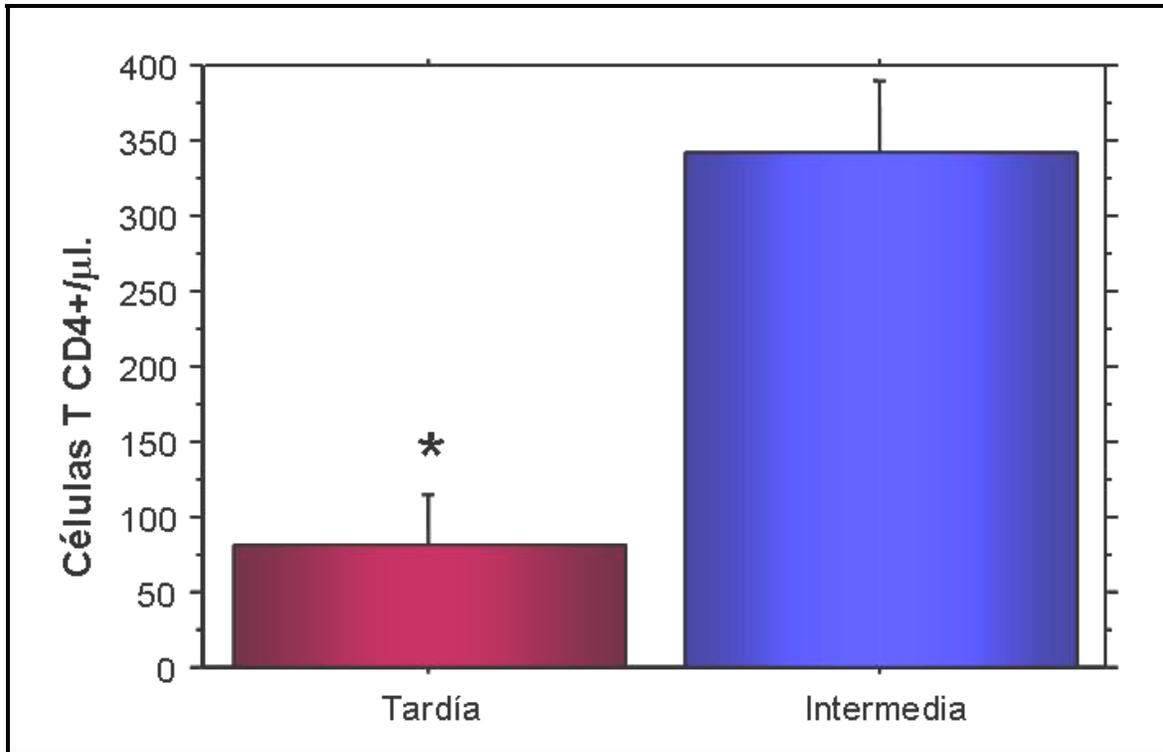
La prueba T no pareada mostró que los pacientes de etapa intermedia tuvieron una media de edad de 27.8 años (EEM +/- 1.5) estadísticamente menor que los pacientes de etapa tardía con una media de 36.8 años (EEM +/- 2.1) ( $p < 0.005$ ). No existe diferencia estadística en cuanto a la incidencia de hombres o mujeres en ninguno de los grupos.



**Gráfico 2.** Promedio de edades en pacientes por etapa de la infección por VIH.

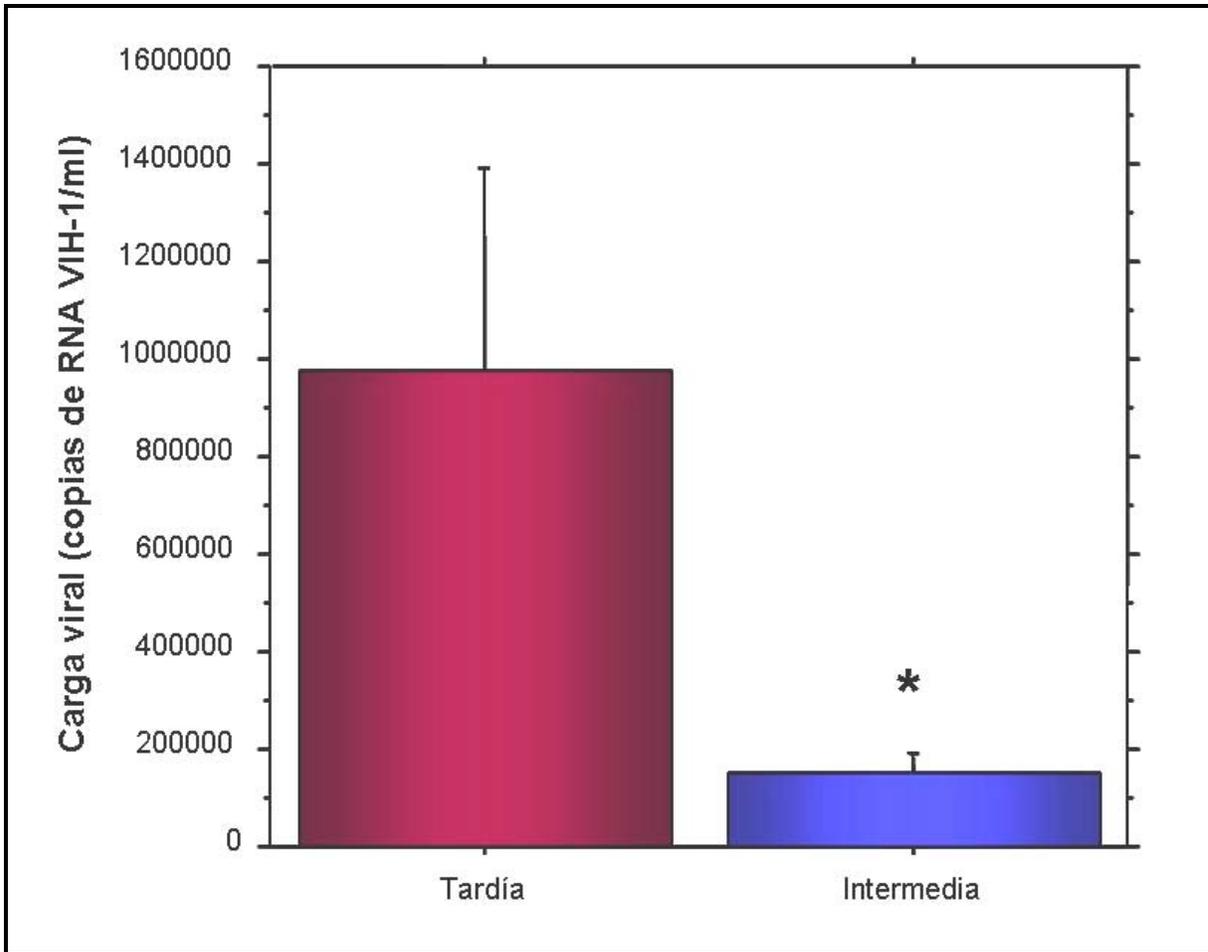
\* $p < 0.005$ .

Dado que los resultados de células T CD4+ fueron empleados para clasificar a los pacientes, se observó mediante la prueba T no pareada que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Los pacientes de etapa intermedia presentaron un valor medio mayor (341.4 células T CD4+/ $\mu\text{l}$  +/- EEM 21.9) que los pacientes de etapa tardía (81.4 células T CD4+/ $\mu\text{l}$  +/- EEM 15.6) ( $p < 0.0001$ ).



**Gráfico 3.** Determinación del número de células T CD4+ en los estadios Intermedio y Tardío de la Infección por VIH. \* $p < 0.0001$ .

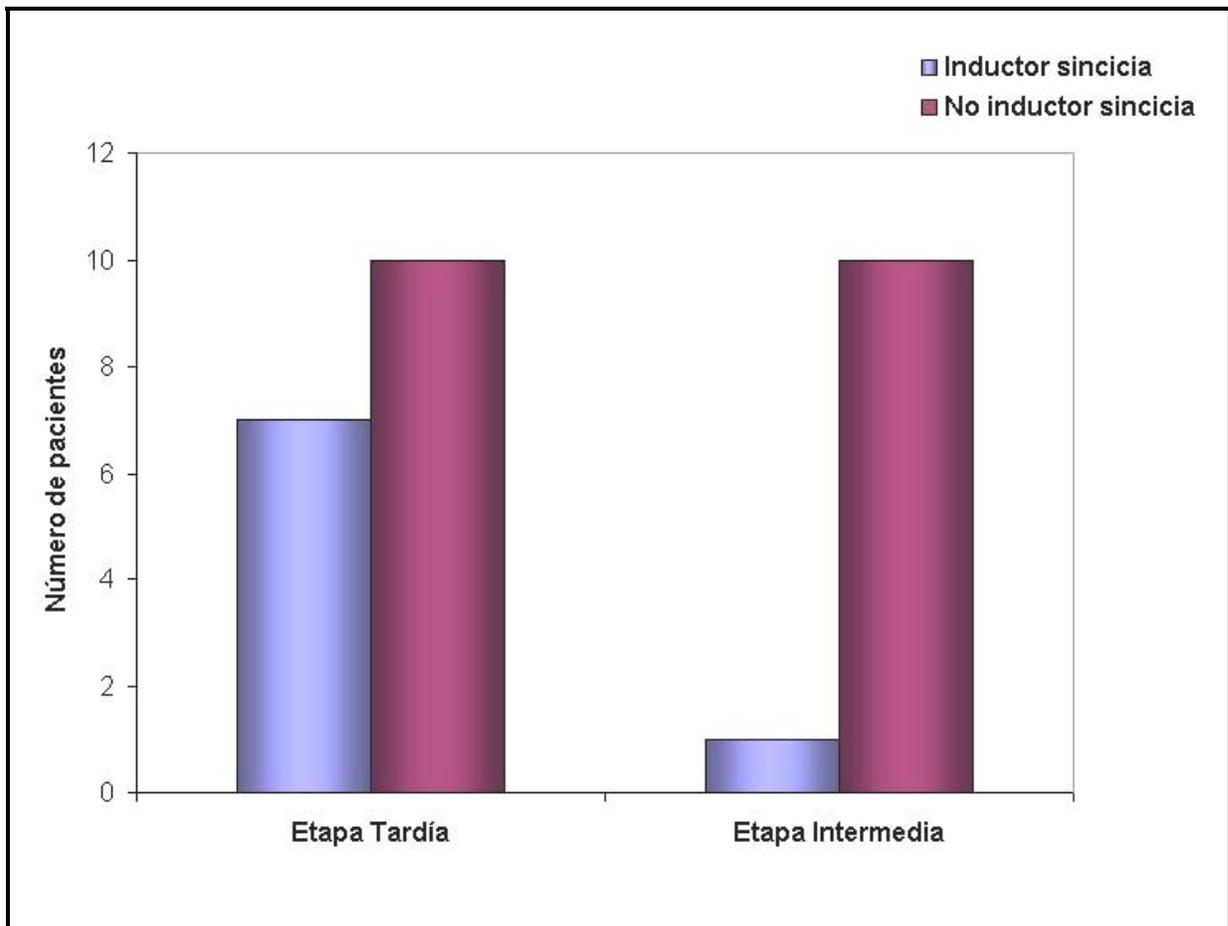
Los pacientes de etapa tardía tenían niveles significativamente mayores de carga viral (974,758 copias RNA/VIH-1/ml +/- EEM 195,673) que los pacientes de etapa intermedia (147,378 copias RNA/VIH-1/ml +/- EEM 18,013) ( $p < 0.005$ ).



**Gráfico 4.** Determinación del número de copias de RNA de VIH en plasma, en los estadios Intermedio y Tardío de la Infección por VIH. Prueba T no pareada. \* $p < 0.005$ .

Los fenotipos biológicos fueron determinados a partir de aislados primarios de VIH, mediante co-cultivo con células mononucleares de sangre periférica. Estos aislados fueron empleados para infectar células MT-2 y observados mediante microscopía la presencia de sincicia (fusión de 5 o más células) los cuales fueron comparados con cultivos de VIH control SF<sub>33</sub> (inductor de sincicia), SF<sub>2</sub> (no inductor de sincicia) y SF<sub>162</sub> (inductor lento).

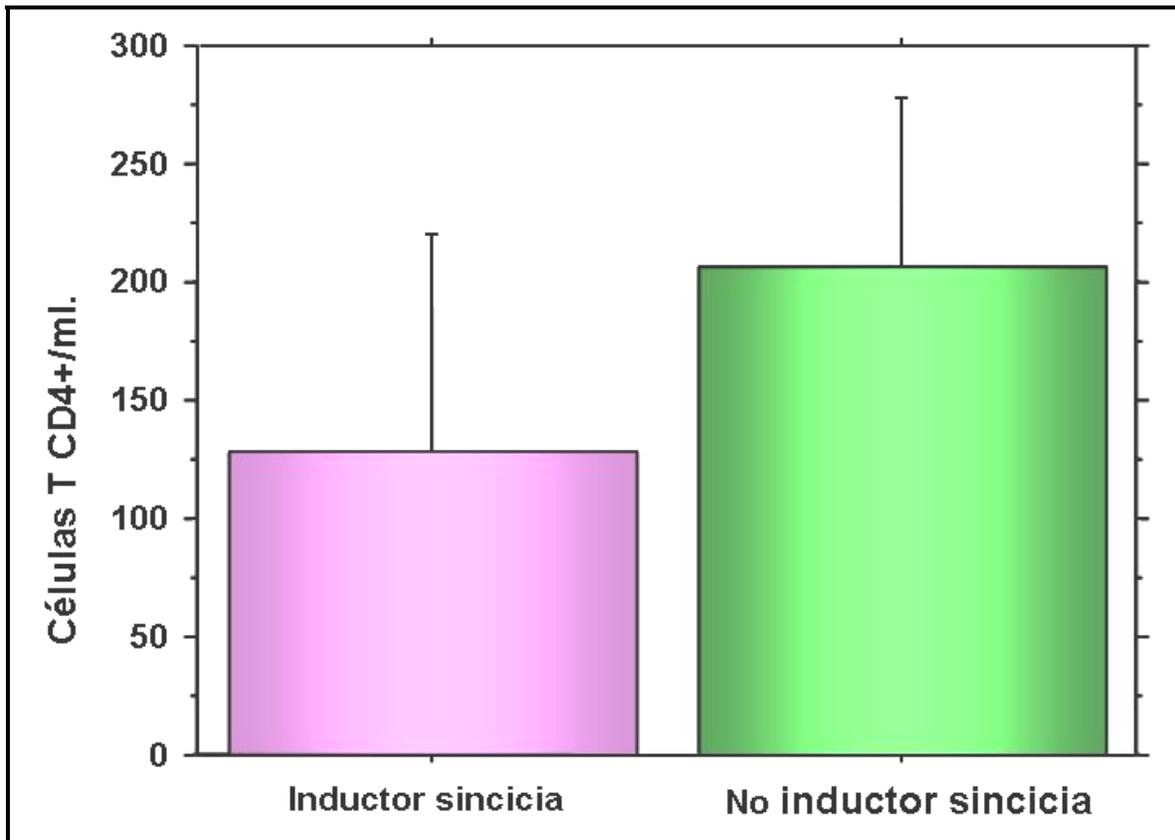
La frecuencia de fenotipos biológicos inductor de sincicia, fue de 41% (7/17) en etapa tardía y de 9% (1/11) en etapa intermedia ( $\text{Chi}^2=3.37$ ,  $p=0.06$ ), lo que nos muestra una clara tendencia a la significancia estadística, sin embargo en número de pacientes no fue suficiente. Al realizar la prueba exacta de Fisher ( $p=0.098$ ), nos mostró esta misma tendencia.



**Gráfico 5.** Frecuencia de fenotipos biológicos por etapa de la infección.  $\text{Chi}^2=3.37$ ,  $p= 0.06$ , Prueba exacta de Fisher= 0.098

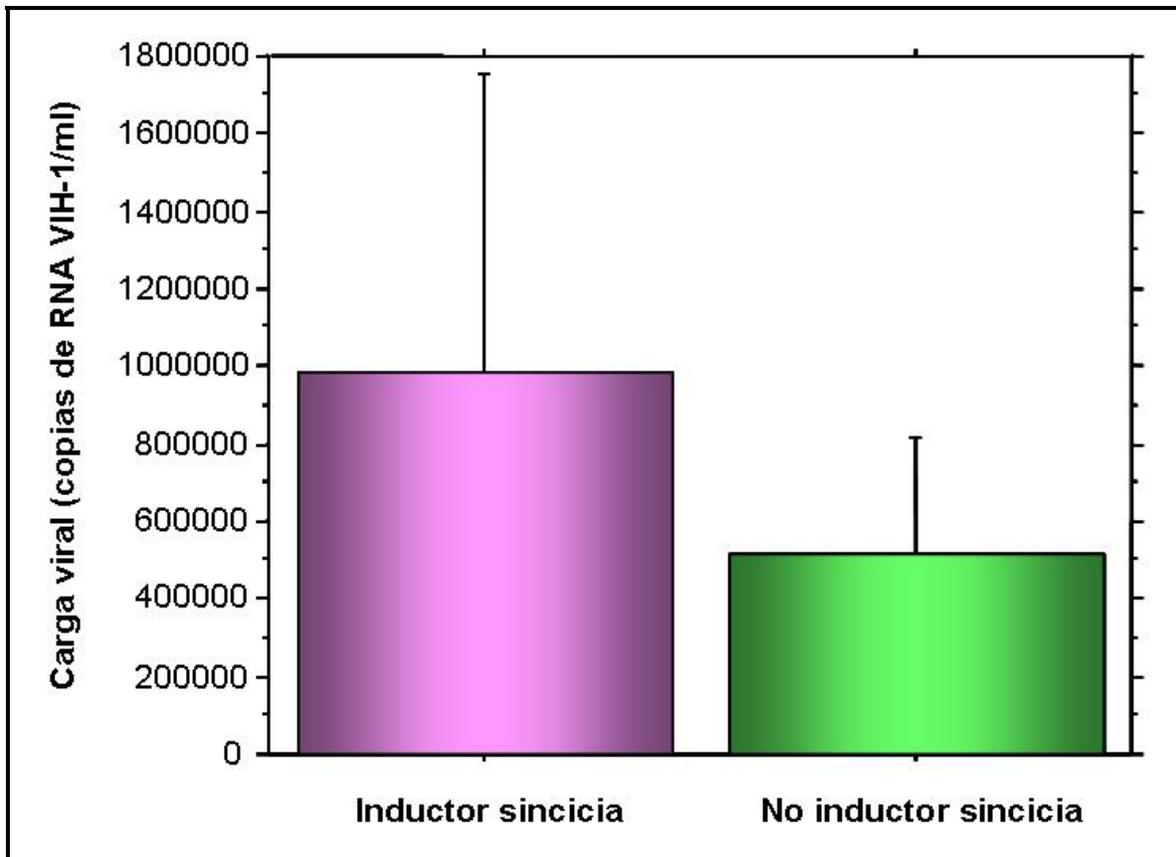
Para tratar de encontrar si existe una relación entre la cuenta de células T CD4+ y la prevalencia de un fenotipo biológico, los pacientes se estratificaron por en tipo

de fenotipo biológico, y se calculó la media en el número de células T CD4+ en cada grupo. Sin embargo, no se encontró diferencias estadísticamente significativas (n=28, p=0.2).



**Gráfico 6.** Promedio de células T CD4+ estratificados por fenotipo biológico. n=28, p=0.2.

Al agrupar a los pacientes por fenotipo biológico, no se observó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de carga viral (n=28, p=0.13).



**Gráfico 7.** Promedio de carga viral (copias RNA VIH-1/ml) estratificados por fenotipo biológico (n=28, p=0.13).

## **X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Estudios previos han mostrado que la prevalencia de fenotipos biológicos inductores de sincicia están relacionados con la presencia de síntomas asociados a SIDA (55;56), así como su rápida evolución. Se ha mostrado que los fenotipos biológicos están asociados al uso de los dos principales correceptores, fenotipo no inductor de sincicia asociado a CCR5 y fenotipo inductor de sincicia asociado a CXCR4 (59). La determinación de los fenotipos biológicos en células MT-2 ha sido ampliamente utilizada (48), dado que expresan el correceptor CXCR4 en su membrana, permitiendo el crecimiento de cepas inductoras de sincicia (64).

La clasificación por estadios clínicos de acuerdo a su estado inmunológico (número de células T CD4+) nos permite determinar la prevalencia de los fenotipos biológicos en cada uno de ellos. El presente trabajo muestra que existe una diferencia entre la prevalencia de los fenotipos biológicos en cada uno de los estadios, que en pacientes con menos de 200 células T Cd4+/ $\mu$ l existe una mayor prevalencia de fenotipo inductor de sincicia.

La diferencia de edades en los pacientes (ver tabla 3, datos basales) puede estar explicada por el hecho de que la infección por VIH es de progresión lenta (promedio 10 años). Es posible que los pacientes en etapa tardía tengan más tiempo de infección con respecto a los de etapa intermedia, sin embargo es difícil de establecer dado que se desconoce la fecha exacta de infección en todos los pacientes. Es importante mencionar que los fenotipos biológicos de los pacientes

están más relacionados con el estadio clínico de la infección, y por lo tanto con la cuenta de células T CD4+, que con edad de los pacientes.

La clasificación de los pacientes de acuerdo al número de células T CD4+, nos permitió establecer una diferencia entre los grupos. La mayor prevalencia de fenotipos inductores de sincicia en pacientes con menos de 200 células T CD4+, está relacionado a la evolución de la enfermedad. Sin embargo, el número de pacientes en este estudio, no es suficiente para establecer una diferencia estadísticamente significativa, aunque la prueba de Fisher, nos muestra una clara tendencia positiva. Es necesario incrementar el número de pacientes en cada uno de los grupos, para verificar estos datos. Cuando se clasificaron a los pacientes por fenotipo biológico, no se observó diferencias con respecto a los niveles de carga viral y CD4, lo cual puede estar relacionado con el bajo número de pacientes.

## **XI. CONCLUSIÓN**

El trabajo realizado presenta una tendencia a la significancia estadística entre la prevalencia de los fenotipos biológicos con respecto a las diferentes etapas de la enfermedad; con una frecuencia mayor del fenotipo biológico inductor de sincicia en la etapa tardía que en la intermedia.

El estudio se continuará para ampliar el número de población y así poder establecer una diferencia estadísticamente significativa .

## XI. REFERENCIAS

- (1) Gottlieb MS, Schanker HM, Fan PT, Saxon A, Weisman JD, Pozalski I. Pneumocystis Pneumonia --- Los Angeles. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1981;30(21):1-3.
- (2) Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med, 1981;305(24):1425-31.
- (3) Vilmer E, Fischer A, Griscelli C, Barre-Sinoussi F, Vie V, Chermann JC et al. Possible transmission of a human lymphotropic retrovirus (LAV) from mother to infant with AIDS. Lancet 1984;2(8396):229-30.
- (4) Melbye M, Biggar RJ, Chermann JC, Montagnier L, Stenbjerg S, Ebbesen P. High prevalence of lymphadenopathy virus (LAV) in European haemophiliacs. Lancet 1984;2(8393):40-1.
- (5) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, 1983;220(4599):868-71.

- (6) Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225(4664):840-2.
- (7) Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 1988;240(4848):80-2.
- (8) Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M. HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* 1988;333(6173):504.
- (9) Bahraoui E, Clerget-Raslain B, Chapuis F, Olivier R, Parravicini C, Yagello M et al. A molecular mechanism of inhibition of HIV-1 binding to CD4+ cells by monoclonal antibodies to gp110. *AIDS* 1988;2(3):165-9.
- (10) Poli G, Massari FE, Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Davey V, Lane HC et al. Efficient macrophage isolation of human immunodeficiency virus from peripheral blood leukocytes from healthy seropositive individuals: implications for cell tropism. *Trans Assoc Am Physicians* 1989;102:110-6.
- (11) Liu ZQ, Wood C, Levy JA, Cheng-Mayer C. The viral envelope gene is involved in macrophage tropism of a human immunodeficiency virus type 1 strain isolated from brain tissue. *J Virol* 1990;64(12):6148-53.
- (12) Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 1991;349(6305):167-9.

- (13) Wong JK, Ignacio CC, Torriani F, Havlir D, Fitch NJ, Richman DD. In vivo compartmentalization of human immunodeficiency virus: evidence from the examination of pol sequences from autopsy tissues. *J Virol* 1997;71(3):2059-71.
- (14) Wei Q, Javadian A, Lausen N, Fultz PN. Distribution and quantification of human immunodeficiency virus type 1, strain JC499, proviral DNA in tissues from an infected chimpanzee. *Virology* 2000;276(1):59-69.
- (15) Walker BD, Goulder PJ. AIDS. Escape from the immune system. *Nature* 2000;407(6802):313-4.
- (16) Cigielski JP. The epidemiology of AIDS in Africa. *Int Health News* 1988;9(2):9-10.
- (17) Glasner PD, Kaslow RA. The epidemiology of human immunodeficiency virus infection. *J Consult Clin Psychol* 1990;58(1):13-21.
- (18) Jain MK, John TJ, Keusch GT. Epidemiology of HIV and AIDS in India. *AIDS* 1994; 2:S61-S75.
- (19) Davey RT, Jr., Davey VJ, Metcalf JA, Zurlo JJ, Kovacs JA, Falloon J et al. A phase I/II trial of zidovudine, interferon-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1991;164(1):43-52.
- (20) French MA. Antiretroviral therapy. Immune restoration disease in HIV-infected patients on HAART. *AIDS Read* 1999;9(8):548-5, 559.

- (21) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(24):13193-7.
- (22) Reyes-Teran G, Alcocer VJ. [Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection]. *Rev Invest Clin* 1994;46(2):113-47.
- (23) Reyes-Teran G. Patogénesis de la enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana. In: Ponce de León SA, Rangel-Frausto S, editors. *SIDA*. 1 ed. México: Editorial Interamericana; 2000. p. 39-114.
- (24) Levy JA. Viral and cellular factors influencing HIV tropism. *Adv Exp Med Biol* 1991;300:1-15.
- (25) Weiss RA. HIV receptors and cellular tropism. *IUBMB Life* 2002;53(4-5):201-5.
- (26) Nisole S, Lynch C, Stoye JP, Yap MW. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(36):13324-8.
- (27) Yap MW, Nisole S, Lynch C, Stoye JP. Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):10786-91.
- (28) Alouf JE, Geoffroy C, Klatzmann D, Gluckman JC, Gruet J, Montagnier L. High production of the acquired immunodeficiency syndrome virus

- (lymphadenopathy-associated virus) by human T lymphocytes stimulated by streptococcal mitogenic toxins. *J Clin Microbiol* 1986; 24(4):639-41.
- (29) Castro BA, Weiss CD, Wiviott LD, Levy JA. Optimal conditions for recovery of the human immunodeficiency virus from peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol* 1988;26(11):2371-6.
- (30) Gyuris A, Vajda G, Foldes I. Establishment of an MT4 cell line persistently producing infective HIV-1 particles. *Acta Microbiol Hung* 1992;39(3-4):271-9.
- (31) Yelle J, Morisset R, Thibodeau L. Analysis of long-term viral expression in CEM cells persistently infected with non syncytium-inducing HIV-1 strains. *Arch Virol* 1994;139(1-2):155-72.
- (32) Peeters M, Vincent R, Perret JL, Lasky M, Patrel D, Liegeois F et al. Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20(2):115-21.
- (33) Saha K, Bentsman G, Chess L, Volsky DJ. Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. *J Virol* 1998;72(1):876-81.
- (34) Schuitemaker H, Kootstra NA, de Goede RE, de WF, Miedema F, Tersmette M. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants

detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol* 1991; 65(1):356-63.

- (35) Nielsen C, Pedersen C, Lundgren JD, Gerstoft J. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS* 1993;7(8):1035-40.
- (36) Mulligan MJ, Kumar P, Hui HX, Owens RJ, Ritter GD, Jr., Hahn BH et al. The env protein of an infectious noncytopathic HIV-2 is deficient in syncytium formation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990;6(6):707-20.
- (37) Nara PL, Hatch WC, Dunlop NM, Robey WG, Arthur LO, Gonda MA et al. Simple, rapid, quantitative, syncytium-forming microassay for the detection of human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1987;3(3):283-302.
- (38) Broder CC, Dimitrov DS. HIV and the 7-transmembrane domain receptors. *Pathobiology* 1996;64(4):171-9.
- (39) Broder CC, Collman RG. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biol* 1997;62(1):20-9.
- (40) Doranz BJ, Berson JF, Rucker J, Doms RW. Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol Res* 1997;16(1):15-28.

- (41) Cheng-Mayer C, Shioda T, Levy JA. Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in tat and gp120. *J Virol* 1991;65(12):6931-41.
- (42) Racz P, Tenner-Racz K, Schmidt H. Follicular dendritic cells in HIV-induced lymphadenopathy and AIDS. *APMIS Suppl* 1989;8:16-23.
- (43) von Stemm AM, Ramsauer J, Tenner-Racz K, Schmidt HF, Gigli I, Racz P. Langerhans cells and interdigitating cells in HIV-infection. *Adv Exp Med Biol* 1993;329:539-44.
- (44) Abbas KA, Lichtman HA, Jordan P. *Inmunología Celular y Molecular*. 4 ed. Saunders; 2000.
- (45) Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997;185(4):621-8.
- (46) Kotler M, Arad G, Hughes SH. Human immunodeficiency virus type 1 gag-protease fusion proteins are enzymatically active. *J Virol* 1992; 66(11):6781-3.
- (47) Lifson JD, Reyes GR, McGrath MS, Stein BS, Engleman EG. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* 1986;232(4754):1123-7.

- (48) Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG et al. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 1992;6(1):49-54.
- (49) Nokta MA, Li XD, Nichols J, Mallen M, Pou A, Asmuth D et al. Chemokine/CD4 receptor density ratios correlate with HIV replication in lymph node and peripheral blood of HIV-infected individuals. *AIDS* 2001;15(2):161-9.
- (50) Yi Y, Isaacs SN, Williams DA, Frank I, Schols D, De CE et al. Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains: two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J Virol* 1999;73(9):7117-25.
- (51) Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 2000;276(16):13433-41.
- (52) Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 1997;185(9):1681-91.
- (53) Barbeau B, Fortin JF, Genois N, Tremblay MJ. Modulation of human immunodeficiency virus type 1-induced syncytium formation by the

conformational state of LFA-1 determined by a new luciferase-based syncytium quantitative assay. *J Virol* 1998;72(9):7125-36.

- (54) Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997;185(4):621-8.
- (55) Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994;169(5):968-74.
- (56) Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT et al. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 1988;62(6):2026-32.
- (57) Van Rij RP, Blaak H, Visser JA, Brouwer M, Rientsma R, Broersen S et al. Differential coreceptor expression allows for independent evolution of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV-1. *J Clin Invest* 2000;106(12):1569.
- (58) Boucher CA, Lange JM, Miedema FF, Weverling GJ, Koot M, Mulder JW et al. HIV-1 biological phenotype and the development of zidovudine resistance in relation to disease progression in asymptomatic individuals during treatment. *AIDS* 1992;6(11):1259-64.

- (59) Auewarakul P, Sangsiriwut K, Suwanagool S, Wasi C. Target cell populations of human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood lymphocytes with different chemokine receptors at various stages of disease progression. *J Virol* 2001;75(14):6384-91.
- (60) Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP et al. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992;66(3):1354-60.
- (61) De Jong JJ, De RA, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1992;66(11):6777-80.
- (62) Grimaila RJ, Fuller BA, Rennert PD, Nelson MB, Hammarskjold ML, Potts B et al. Mutations in the principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics, and neutralization. *J Virol* 1992;66(4):1875-83.
- (63) Kuiken CL, De Jong JJ, Baan E, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J Virol* 1992 ;66(9):5704.

- (64) Forte SE, Byron KS, Sullivan JL, Somasundaran M. Non-syncytium-inducing HIV type 1 isolated from infected individuals replicates in MT-2 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10(12):1613-8.
- (65) Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG et al. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 1992;6(1):49-54.
- (66) Binley JM, Trkola A, Ketas T, Schiller D, Clas B, Little S et al. The effect of highly active antiretroviral therapy on binding and neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000;182(3):945-9.
- (67) Sterling TR, Chaisson RE, Moore RD. HIV-1 RNA, CD4 T-lymphocytes, and clinical response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001;15(17):2251-7.
- (68) Mocroft A, Youle M, Moore A, Sabin CA, Madge S, Lepri AC et al. Reasons for modification and discontinuation of antiretrovirals: results from a single treatment centre. *AIDS* 2001;15(2):185-94.
- (69) Mocroft A, Phillips AN, Miller V, Gatell J, van LJ, Parkin JM et al. The use of and response to second-line protease inhibitor regimens: results from the EuroSIDA study. *AIDS* 2001;15(2):201-9.

- (70) Gupta P, Balachandran R, Ho M, Enrico A, Rinaldo C. Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *J Virol* 1989;63(5):2361-5.
- (71) Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997;278(5341):1295-300.