



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TÍTULO DEL REPORTE

**INVESTIGACIÓN Y SUPERVISIÓN EN
LABORATORIOS DE BIOSEGURIDAD
NIVELES 2 Y 3**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

NOMBRE DEL ALUMNO

GONZALO SALGADO MONTES DE OCA

TUTOR(A)

M.S.P. GUSTAVO REYES TERÁN

2007





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.

**INVESTIGACIÓN Y SUPERVISIÓN EN LABORATORIOS
DE BIOSEGURIDAD NIVELES 2 Y 3**

TITULACIÓN POR TRABAJO PROFESIONAL

GONZALO SALGADO MONTES DE OCA

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Salgado
Montes de Oca
Gonzalo
52 43 00 20
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
097539252

2. Datos del tutor

M.S.P.
Gustavo
Reyes
Terán

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Héctor Enrique
Espinosa
Arciniega

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Candela
Iglesias
Chiesa

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Santiago
Ávila
Ríos

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Ricardo Stanley
Vega
Barrientos

7. Datos del Trabajo Escrito

Investigación y Supervisión en Laboratorios
de Bioseguridad Niveles 2 y 3
89p
2007

Dedicatorias

A MI MADRE Y HERMANOS

Índice	Página
I. Portada	1
II. Hoja de Datos del Jurado	3
III. Dedicatorias	4
IV. Experiencia Profesional. Actividades relacionadas con el INER	6
V. Índice	7
Actividades profesionales relacionadas con la carrera de Biología	10
A. Investigación Básica. Caracterización De Los Mecanismos Moleculares Que Participan En La Activación Del Reservorio De VIH-1 En Células T CD4+ De Memoria En Reposo.	11
<i>Subproyecto: Función De Los Factores De Transcripción En La Replicación Del VIH-1 En Células T CD4+ De Memoria En Reposo Y Su Relación con Citocinas</i>	
A1. Resumen	12
A2. Introducción	13
A2.1 Estructura y Ciclo de Replicación del VIH-1.	13
A2.2 Historia Natural de la Infección por VIH-1.	15
A2.3 Mecanismos de Respuesta Inmune.	17
A2.4 Respuesta Inmune Dirigida al VIH-1.	18
A2.5 Tratamiento anti-VIH	19
A2.6 Falla del Tratamiento anti-VIH-1	20
A2.7 Reservorio de VIH-1 en Linfocitos T CD4+ de Memoria en Reposo.	21
A3. Justificación	28
A4. Hipótesis	30
A5. Objetivo	30
A6. Métodos	32
A7. Criterios del Estudio	32
A7.1 Criterios de Inclusión	32
A7.2 Criterios de exclusión	33
A7.3 Criterios de eliminación	33
A7.4 Evaluaciones	33

A8. Definición y Descripción de las Técnicas	37
A8.1 Linfóferesis de flujo continuo	37
A8.2 Procesamiento de la sangre y del producto de linfóferesis del Paciente	37
A8.3 Obtención de células T CD4+ de memoria en reposo	37
A8.4 Ensayos con inhibidores y citocinas	38
A8.5 Cuantificación del reservorio viral de VIH-1	38
A8.6 Cambios en la movilidad electroforética para factores de transcripción (EMSA).	39
A8.7 Western Blot	39
A8.8 Cuantificación de Ag p24 del VIH por ELISA	39
A8.9 Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ de memoria en reposo	40
A9. Control de calidad y manejo de los datos	41
A10. Consideraciones éticas	41
B. Diseño y Supervisión de Laboratorios de Bioseguridad	43
Niveles 2 y 3. Centro de Investigación en Enfermedades Infeciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.	
B1. Participación	43
B2. Introducción	44
B2.1 Laboratorios de Bioseguridad	45
B2.2 Características Generales de Diseño	46
B.3 Bases de Diseño para Laboratorios de Bioseguridad	47
Niveles 2 y 3.	
B3.1 Laboratorios de Bioseguridad Nivel 2. Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Estados Unidos.	48
B3.2 Laboratorios de Bioseguridad Nivel 3. Centros de Control y Prevención de Enfermedades, Estados Unidos.	50

B3.3 Resumen de los Requisitos por Nivel de Bioseguridad. Organización Mundial de la Salud.	55
B.4 Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas	56
B4.1 Características Generales	57
B4.2 Características Particulares	66
B4.3 Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2	68
B4.4 Laboratorio de Biología Molecular	71
B4.5 Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3	74
B4.5.1 Características Generales	76
B4.5.2 Sistema de Ventilación	79
B4.5.3 Características "ENHANCED"	83
IV. Referencias	86

Introducción

Actividades profesionales relacionadas con la carrera de Biología.

Durante mi estancia en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), enero del 2006 a la fecha, he realizado las siguientes actividades:

- 1) Investigación básica relacionada con Biología e Inmunología Celular de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1.
- 2) Diseño y supervisión de laboratorios de bioseguridad niveles 2 y 3

Investigación Básica

Participación en el Proyecto “Caracterización de los Mecanismos Moleculares que Participan en la Activación del VIH-1 Latente Presente en el Reservorio de Células T CD4+ de Memoria en Reposo”, aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación con código B17-06

Diseño y Supervisión de Laboratorios de Bioseguridad Niveles 2 y 3

El área de laboratorios del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas cuenta con dos laboratorios de bioseguridad nivel 2 y un laboratorio de bioseguridad nivel 3.

Participación en el Diseño de laboratorios de bioseguridad:

Revisión y traducción de Guías Internacionales de Bioseguridad:

- Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos

Cuarta Edición, 1999. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades e Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos

- Guías de Bioseguridad en el Laboratorio
Tercera Edición, 2004. Ministerio de Salud, Canadá
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio
Tercera Edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2005

Interacción con arquitectos e ingenieros para desarrollar las bases de diseño. Supervisión para corroborar el cumplimiento de las normas internacionales de bioseguridad durante la construcción.

Supervisión de laboratorios de bioseguridad:

Supervisión del funcionamiento y mantenimiento cotidiano de equipos y sistemas de contención microbiológica: sistema de aire acondicionado (incluyendo filtración de alta eficiencia), acabados sanitarios, planta de emergencia, acceso por puertas automáticas, sistema de alarma contra incendios, circuito cerrado de televisión, autoclave de doble puerta, entre otros.

A continuación se describen las actividades relacionadas con la carrera de Biología realizadas en el CIENI del INER.

INVESTIGACIÓN BÁSICA:

CARACTERIZACION DE LOS MECANISMOS MOLECULARES QUE PARTICIPAN EN LA ACTIVACION DEL RESERVORIO DE VIH-1 EN CELULAS T CD4+ DE MEMORIA EN REPOSO

SUBPROYECTO:

Función de los Factores de Transcripción en la Replicación del VIH-1 en Células T CD4+ de Memoria en Reposo y su Relación de Citocinas

Resumen.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA, es una de las causas principales de mortalidad en personas jóvenes a nivel mundial. A pesar de los beneficios clínicos e inmunológicos que resultan de la combinación de fármacos antirretrovirales, no es posible erradicar el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) del organismo huésped. El principal obstáculo es la presencia de un reservorio de VIH latente en células T CD4+ de memoria en reposo. Este reservorio se forma al inicio de la infección y es refractario al tratamiento anti- VIH. Se ha propuesto en estudios in vitro que el reservorio puede ser mayor en los tejidos linfoides, principalmente en los ganglios linfáticos y que la producción constitutiva de citocinas proinflamatorias (e. g., IL-2, IL-6, TNF alfa) e IL-7 inducen la replicación a bajo nivel. Esto podría explicar el fenómeno de la replicación residual continua que se ha descrito en los pacientes que mantienen concentraciones indetectables de carga viral en plasma. Actualmente se desconocen los mecanismos celulares que median la activación de VIH latente en los reservorios. El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de factores de transcripción celular (NF-kB y NFAT) inducidos por citocinas en la replicación del reservorio de VIH latente de sangre periférica en personas infectadas por VIH con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable.

INTRODUCCIÓN.

Tras dos décadas documentadas de la infección por VIH/SIDA, la evidencia del impacto global es irrefutable. En la actualidad (Diciembre 2006), existen alrededor de 39.5 millones (34.1 – 47.1 millones) de personas portadoras del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Solo en 2006 se presentaron 4.3 millones de nuevas infecciones (3.6 – 6.6 millones) y 2.9 millones de defunciones (2.5 – 3.5 millones). Los pronósticos más optimistas estiman que al menos 45 millones de personas contraerán la infección para el 2010. Ante la contundencia de estos datos es claro que la pandemia, que a la fecha ha cobrado más de 25 millones de muertes, es un tema prioritario de salud pública mundial (1).

La investigación realizada desde el descubrimiento del VIH-1 ha permitido el desarrollo de potentes drogas antirretrovirales que logran reducir la carga viral en plasma a niveles indetectables, incrementando la supervivencia y mejorando la calidad de vida de los individuos infectados. Pese a esto, el éxito del tratamiento solo es parcial, el virus logra persistir en el organismo. La presencia de reservorios permite el surgimiento de variantes virales resistentes a los fármacos y el uso prologado de estos resulta en efectos adversos debido a su toxicidad. Estos virus latentes son entonces los principales obstáculos para la erradicación del VIH-1 (2).

Bajo este contexto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento que permitan controlar la infección por periodos prolongados.

Estructura y Ciclo de Replicación del VIH-1

El VIH-1, causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es un retrovirus del género *Lentiviridae* que infecta a las células que expresan la molécula de superficie CD4. El virión está compuesto por una envoltura lipídica que se origina de la membrana plasmática del huésped, una cápside que contiene

diversas proteínas virales y dos copias del genoma de RNA (9.8 kb aproximadamente). Cada hebra de RNA contiene el promotor viral denominado LTR (Long Terminal Repeats), los genes *gag*, *pol* y *env* característicos de los retrovirus y los genes *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, *vpu* y *vif* que participan en diversos pasos del ciclo de replicación (3).

El ciclo de replicación típico comienza con la fusión de las membranas viral y celular mediante la interacción de las proteínas de envoltura con el marcador de superficie CD4 y un co-receptor. La molécula CD4 se expresa principalmente en linfocitos T y diversas poblaciones de macrófagos. Los co-receptores que emplea el VIH son CXCR4 y CCR5 entre otros. La molécula CXCR4, receptor de α -quimiocinas, se expresa particularmente en linfocitos T CD4+(cT CD4+). A las cepas que tienen un tropismo por estas células se les denomina X4. El receptor de β -quimiocinas CCR5 es expresado por cT CD4+ efectoras. Los virus que infectan utilizando este co-receptor se les conoce como R5 (3).

Después de la fusión de las membranas viral y celular se libera la cápside, dando comienzo a la síntesis de DNA complementario a partir de RNA (transcripción inversa). Una vez retrotranscrito, el genoma del virus es integrado al genoma de la célula huésped. La transcripción y traducción de los genes virales son llevadas a cabo por la maquinaria celular. Los productos de *gag*, *pol* y *env* se expresan como poliproteínas resultantes del procesamiento de los RNA mensajeros completos que escapan del splicing con ayuda de la proteína Rev. Las proteínas de envoltura son transportadas a la membrana por vesículas (vía trans Golgi) mientras que los precursores Gag y Gag-Pol, que contienen secuencias de reconocimiento, encapsidan al genoma viral. Una vez que todos los componentes se encuentran en la membrana celular, se lleva a cabo la gemación del virión (3). (Figura 1).

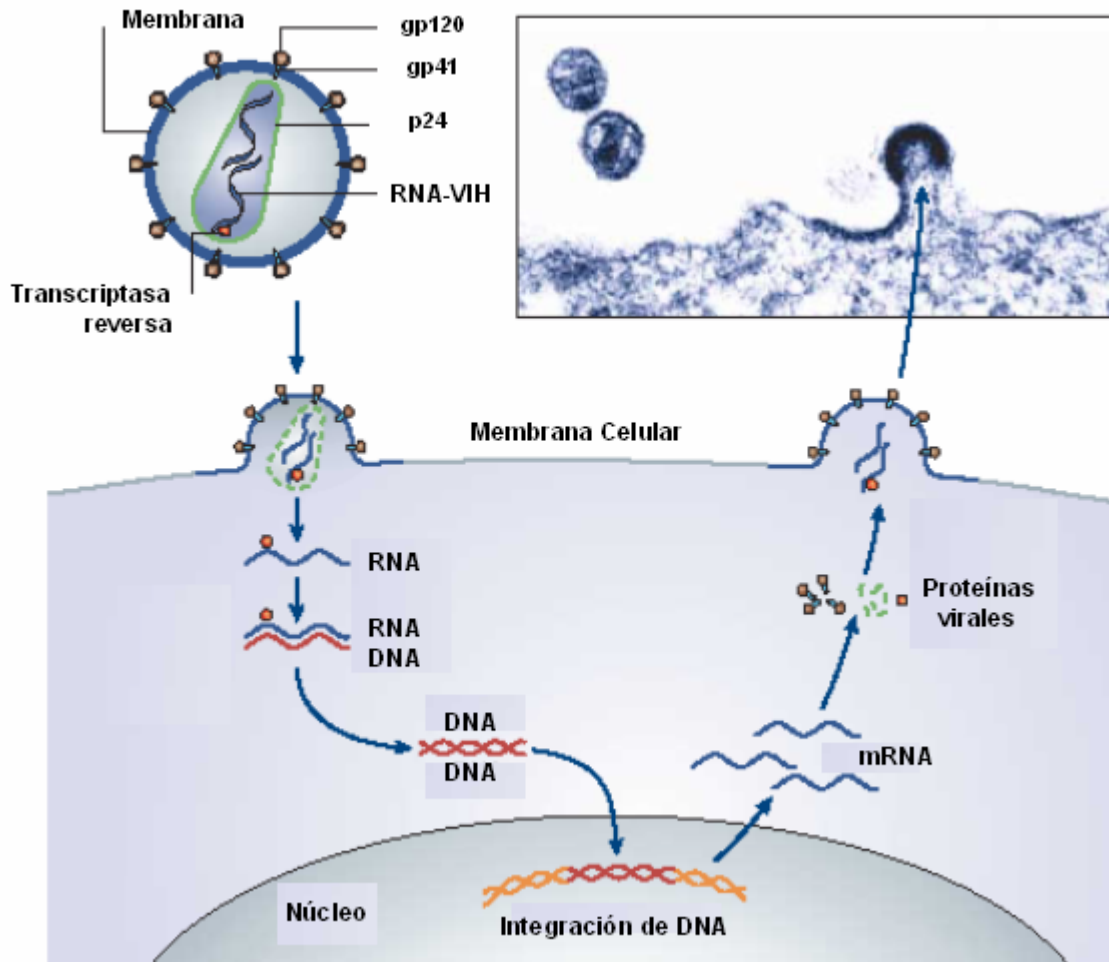


Figura 1. Estructura y ciclo de replicación del VIH-1.

Historia Natural de la Infección por VIH-1.

El desarrollo de procedimientos para determinar los niveles de RNA de VIH-1 en plasma (carga viral) aunado a la cuantificación de linfocitos T CD4+ por citometría de flujo ha permitido el estudio de la dinámica viral y la patogénesis de la enfermedad. El curso clínico de la infección por VIH refleja una compleja interacción entre los efectos del virus sobre las células inmunocompetentes y la respuesta inmune del huésped hacia el virus. Uno de los eventos principales en el avance de la enfermedad es la disminución de las células T CD4+ circulantes en sangre periférica. En individuos sanos se observa una concentración promedio de

1,000 por mm^3 mientras que en pacientes en etapas tardías es común encontrar menos de 100 por mm^3 (4).

Con base en parámetros inmunológicos y virológicos se han descrito tres etapas en la infección por VIH: temprana, intermedia y tardía.

La etapa temprana comienza con la entrada del virus al organismo huésped en donde se presenta un periodo de replicación aguda con niveles altos de viriones libres en sangre periférica y la diseminación a tejidos y células susceptibles a la infección en todo el organismo. En este periodo se presentan los niveles de carga viral más altos en toda la infección y el descenso gradual en el número de cT CD4+ (13). En algunos casos, se presenta un fenómeno conocido como síndrome de la infección aguda o síndrome retroviral agudo que se caracteriza por síntomas como fiebre, dolor de cabeza, faringitis y linfadenopatía entre otros. Una vez que el sistema inmune monta una respuesta específica se observa la disminución en el número de copias de RNA del VIH en sangre. (4, 5)

La etapa intermedia comienza cuando el sistema inmune logra mantener los niveles de RNA viral y cT CD4+ estables durante por lo menos seis meses. Esta fase se caracteriza por un periodo asintomático en el que los pacientes permanecen durante varios años (4). A pesar de que no se presentan manifestaciones clínicas claras, existe una alta tasa de replicación del virus y un descenso progresivo en el número de cT CD4+. Al final de esta etapa, la población viral se ha vuelto resistente al sistema inmune y en muchos casos, muestra un fenotipo X4o mixto (5).

En la etapa tardía se observa un incremento en la carga viral y la disminución de cT CD4+ en sangre periférica por debajo de 200 células por mm^3 . En este punto, la destrucción del sistema inmune regulado por linfocitos T CD4+ es muy amplia por lo que se facilita la infección por agentes oportunistas causantes de diversas enfermedades. La presencia de estos patógenos caracteriza al evento final de la infección por VIH, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que culmina con la muerte del paciente, en ausencia del tratamiento antirretroviral (4, 5).

La duración de cada fase varía de individuo a individuo, sin embargo pueden distinguirse tres modelos de historia natural con base en el tiempo de evolución a SIDA: evolución rápida de 0 a 5 años, evolución promedio de 5 a 10 años y evolución lenta más de 10 años. (4, 5) (Figura 2)

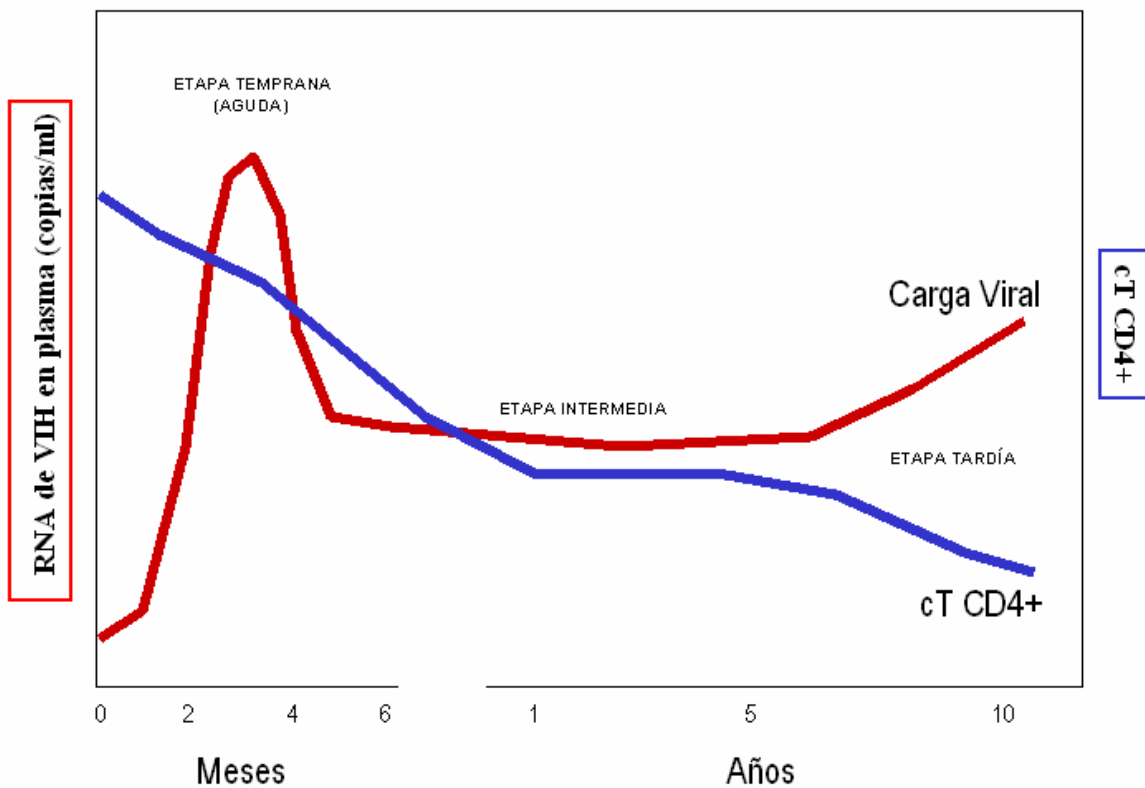


Figura 2. Historia Natural de la infección por VIH-1. Carga viral (rojo), expresada en copias de RNA-VIH-1 por ml de plasma. Número de células T CD4+ por mm^3 de sangre (Azul).

Mecanismos de Respuesta Inmune.

Los individuos sanos se encuentran protegidos contra organismos patógenos por los sistemas de inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La inmunidad innata está compuesta por barreras físicas y químicas como epitelios, proteínas sanguíneas entre las que se incluye el sistema del complemento, mediadores de

la inflamación y células fagocíticas. Aunque estos mecanismos son los primeros en aparecer en presencia de un antígeno, se caracterizan por su baja especificidad, diversidad limitada y por carecer de memoria inmunológica. La inmunidad adquirida está compuesta por mecanismos de defensa estimulados tras el encuentro con un antígeno determinado y cuya capacidad, especificidad e intensidad defensiva aumentan después de la exposición repetida. Estas características le confieren la capacidad de reconocer de forma individual a los agentes con los que ha estado en contacto y mantener una memoria inmunológica. La inmunidad adaptativa se subdivide en dos tipos: 1) Inmunidad humoral, compuesta de moléculas como los anticuerpos, generados por los linfocitos B, 2) Inmunidad celular, en la que participan los linfocitos T, células NK y células presentadoras de antígenos (6).

Respuesta Inmune Dirigida al VIH-1

Como es común en la mayoría de las infecciones humanas, los individuos con infección por VIH desarrollan una respuesta inmune humoral y celular.

La respuesta inmune celular incluye a las células NK que reconocen y lisan a células infectadas, los linfocitos T CD8+ que actúa por medio de mecanismos supresores de la replicación y mecanismos citotóxicos, y los linfocitos T CD4+ cooperadores, que participan en la respuesta mediante la secreción de citocinas dirigiendo la respuesta hacia los tipos Th1 o Th2. La respuesta inmune humoral se lleva a cabo por anticuerpos neutralizantes, complemento y citotoxicidad mediada por anticuerpos. Diversos estudios han demostrado un papel antiviral predominante de los linfocitos T en el control de la replicación en comparación con la respuesta humoral, particularmente, la mediada por los anticuerpos neutralizantes (7).

Tratamiento anti VIH-1.

Actualmente existen cerca de 22 fármacos aprobados para el tratamiento de la infección por VIH. Estos pueden agruparse en cinco tipos: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la integrasa e inhibidores de la fusión. Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido son nucleósidos modificados que carecen del OH- 3' y que son procesados por enzimas celulares que promueven la fosforilación anabólica para generar trifosfatos 5'. Este mecanismo previene la formación del enlace fosfodiéster en la elongación de la cadena de DNA por lo que actúan como terminadores de cadena cuando son incorporados a los transcritos. Entre estos se encuentran abacavir, didanosina, lamivudina, stavudina, zalcitabina y zidovudina. Los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido representan diversas variantes químicas de compuestos policíclicos que tienen afinidad por sitios cercanos al dominio catalítico de la enzima viral transcriptasa inversa. Entre estos se encuentran efavirenz, delavirdine y nevirapine. Los inhibidores de la proteasa son moléculas que mimetizan a los sustratos peptídicos virales. Tienen la capacidad de unirse al sitio de corte de la proteasa viral por lo que impiden su acción. Los inhibidores de la proteasa son amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir (8, 9).

La mezcla de dos o más de estos fármacos se conoce como Tratamiento anti-VIH altamente activo, TAAA (HAART por sus siglas en inglés Highly Active Antirretroviral Therapy), cuyo objetivo es suprimir de forma profunda y sostenida la replicación viral. La combinación de estos fármacos es capaz de disminuir y mantener la carga viral en niveles indetectables por las técnicas actuales de manera prolongada (menos de 50 copias de RNA viral por mililitro de plasma). El esquema que se prescribe con mayor frecuencia incluye la combinación de dos inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa y un inhibidor de la proteasa. (8, 9)

El número de cT CD4+ y la carga viral son utilizados como parámetros clínicos para establecer el inicio de tratamiento ya que el número de cT CD4+ determina el riesgo de desarrollar enfermedades oportunistas y la carga viral determina la velocidad en el descenso del número de cT CD4+ (8). Al iniciar el TAVAA se observa una primera fase de caída en la carga viral que se atribuye a la muerte de las cT CD4 activadas e infectadas y a la prevención de nuevas infecciones. La segunda fase es más lenta y es causada por la eliminación de macrófagos infectados y viriones unidos a células dendríticas en nódulos linfoides. (9)

Las consecuencias inmunológicas de la supresión de la replicación viral debida al tratamiento anti-VIH son pronunciadas. Entre los efectos más notorios se encuentran:

- Aumento del número de cT CD4+ circulantes en diversos grados.
- Disminución del nivel de activación inmunológica.
- Distribución normal de linfocitos en sangre periférica y nódulos linfoides
- Producción de células T vírgenes por el timo
- Redistribución de células T de memoria a la circulación

Estos fenómenos promueven la recuperación de las funciones del sistema inmune a partir de la presentación de antígenos a cT CD4+ y cT CD8+. La mayoría de los pacientes logra controlar las infecciones oportunistas existentes aunque en ocasiones requieren de tratamientos profilácticos. (10)

Falla del Tratamiento anti-VIH-1

Aunque en muchos casos se logra la disminución de la carga viral a niveles indetectables, existe evidencia que demuestra replicación viral a baja escala en cT CD4+ de memoria en reposo. Aun los pacientes una respuesta óptima al tratamiento no logran suprimir la replicación viral por completo. Es común que el tratamiento disminuya su efectividad después de varios meses. Aunque las cepas

resistentes no son necesariamente más virulentas, puede presentarse un rebote en la carga viral que inicia una nueva fase de infección de células CD4+ lo que reactiva el curso clínico de la enfermedad (11).

Reservorio de VIH-1 en Linfocitos T CD4+ de Memoria en Reposo

Aunque el VIH-1 se replica continuamente durante el curso de la infección en individuos sin tratamiento, el virus puede paralelamente establecer un estado de latencia a nivel celular. El VIH-1 latente ha sido encontrado *in vivo* en células T CD4+ en reposo (13, 15). Las células latentemente infectadas son raras (una en un millón de células T CD4+ en reposo), sin embargo, son de gran importancia ya que persisten aun cuando se inhibe la replicación viral con la combinación de fármacos antirretrovirales (14). Esta pequeña poza de células latentemente infectadas presente en todos los pacientes funciona como reservorio para el virus. Debido a su baja tasa de disminución, el reservorio es considerado como el principal obstáculo para la erradicación del virus con la terapia antirretroviral. La formación del reservorio es continua aun en pacientes con 9 años de terapia (44). La presencia de un reservorio estable ha cambiado de forma significativa las estrategias generales de tratamiento. En un principio, la terapia se avocó a la posibilidad de erradicar la infección. Sin embargo, una vez que se estableció la persistencia del reservorio en pacientes con cargas virales indetectables, las guías de tratamiento optaron por un abordaje conservador, enfocado a controlar la viremia en vez de controlar al virus (45). El reservorio latente se establece durante la etapa de infección aguda por lo que aún el tratamiento temprano con antirretrovirales no permite la erradicación (15, 16).

Actualmente se reconoce que la erradicación solo podrá ser lograda si el reservorio latente en células T CD4+ en reposo es atacado de forma directa. Por esto, un número importante de investigadores tienen como objetivo el desarrollo de estrategias para alcanzar este fin.

La presencia del reservorio ha impactado al tratamiento de otra manera (17). Las variantes virales resistentes a diversos fármacos que surgen como consecuencia de una terapia ineficiente, con supresión viral incompleta, pueden ser depositadas en el reservorio y persistir en células latentemente infectadas de manera permanente, limitando las opciones de tratamiento. (18, 46)

Por definición, las células latentemente infectadas se encuentran en un estado de infección no productivo y por lo tanto no generan viriones. En el caso del VIH-1, las células latentemente infectadas producen cantidades bajas de mRNA viral, sin embargo, estos productos son terminados de forma prematura o no tiene la localización celular adecuada (47). Por lo tanto, las células latentemente infectadas probablemente no producen proteínas virales y son prácticamente indistinguibles de las células no infectadas. Esta característica, junto con su baja frecuencia, complica la detección y cuantificación del reservorio. El estudio de la latencia de VIH-1 se encuentra aún más restringido por la ausencia de un modelo *in vitro* que capture las características clave de las células latentemente infectadas. (45)

El establecimiento del reservorio puede ser visto como una consecuencia secundaria del tropismo del VIH-1 por las células T CD4+. Estas células pasan por cambios profundos durante su estado de activación lo que afecta la permisividad para la replicación viral (21). Estas transiciones reflejan la fisiología normal de las cT CD4+. Cuando las cT CD4+ encuentran su antígeno, experimentan transformaciones significativas y entran al ciclo celular. Las series rápidas de división celular dan lugar a una clona de células efectoras activadas (linfoblastos). Algunas de estas células revierten eventualmente al estado quiescente G0 y persisten como células de memoria permitiendo una rápida respuesta contra futuros retos del mismo antígeno. (22)

El VIH-1 se replica preferentemente en cT CD4+ activadas, sin embargo, estas células sobreviven sólo por algunos días después de la infección (3). De hecho, es

raro que los linfoblastos CD4+ sobrevivan lo suficiente como para revertir al estado de memoria en reposo (27). Es importante notar que la expresión de genes de VIH-1 disminuye de manera considerable mientras las células pasan por esta transición (28). En parte, este fenómeno se da por la dependencia del promotor LTR de los factores transcripción inducibles de la célula huésped como NF- κ B (Nuclear Factor – κ B) y NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) que son excluidos del núcleo en las células en reposo.(24, 25, 29)

El resultado es un provirus integrado estable pero transcripcionalmente inactivo en una célula T de memoria, célula cuya función es sobrevivir por periodos largos. Si la célula encuentra su antígeno o es activada por citocinas u otro estímulo, puede comenzar a producir virus nuevamente (26, 36, 37). Mientras tanto, el virus sobrevive como DNA integrado sin ser afectado por las drogas antirretrovirales ni por el sistema inmune. Por tanto, el VIH-1 explota la característica fundamental de la respuesta inmune adaptativa, la memoria inmunológica definida por los linfocitos en reposo con una larga vida media (38). Algunos estudios han predicho que se requerirían más de 60 años de tratamiento antirretroviral eficaz y continuo para eliminar el reservorio (17).

La latencia de VIH-1 está relacionada con diversos factores a nivel transcripcional. Entre los mecanismos propuestos se encuentran la estructura de la cromatina, efectos de metilación y acetilación del promotor, falla en la elongación por ausencia de factores virales como Tat y Rev y la ausencia de formas activas de factores de transcripción celulares. Cada vez es mas claro que la latencia de VIH-1 es un fenómeno complejo y multifactorial que resulta de las diferencias entre los linfocitos T CD4+ de memoria en reposo y los activados. (28, 33)

La expresión de genes de VIH-1 es controlada por el promotor viral denominado LTR (Long Terminal Repeat). El LTR tiene diversos sitios de unión para factores de transcripción celulares (29). La transcripción de VIH-1 es regulada particularmente por NF- κ B y NFAT y por la proteína viral Tat (30, 33). NFAT y

NF- κ B son reclutados en el núcleo por la activación del TCR (receptor de la célula T) y/o por la señalización mediada por citocinas. De esta manera, la expresión de genes de VIH-1 está acoplada al estado de activación de la célula huésped. (34)

NFAT es activado en respuesta a la liberación de Ca^{2+} inducida por TCR mediante la vía de la fosfolipasa C. El NFAT citoplásmico es defosforilado rápidamente por la calcineurina. Posteriormente transloca al núcleo y activa genes importantes para el funcionamiento de las células T (25, 48). (Figura 3) NFAT interactúa con el LTR en sitios de unión que se traslapan con NF- κ B, además puede actuar en sinergia con Tat y NF- κ B en la activación del LTR. (30)

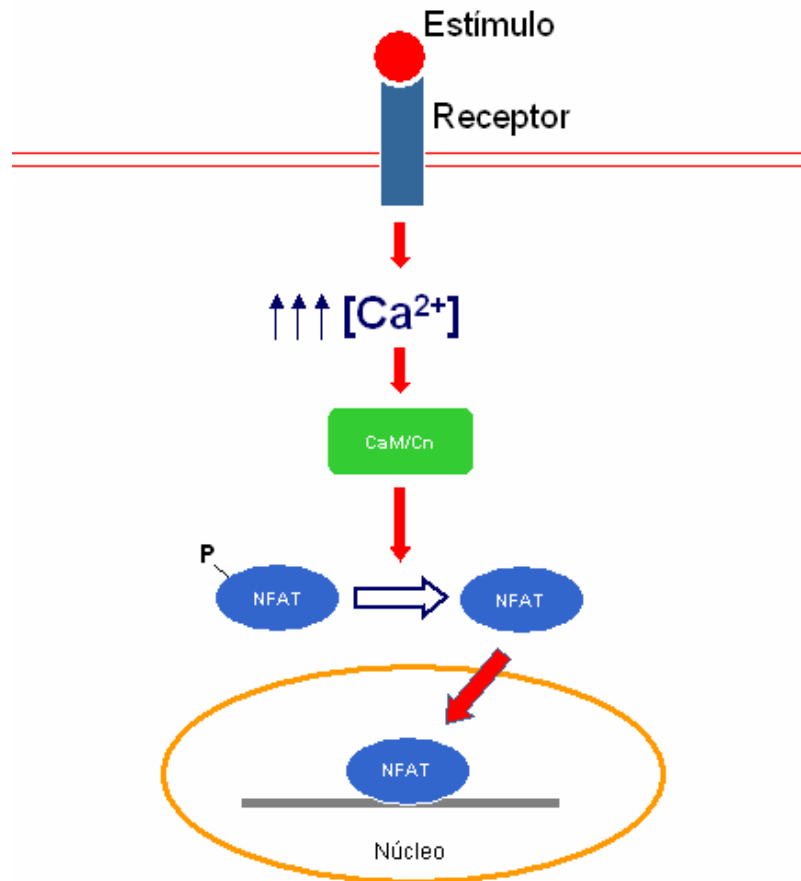


Figura 3. Señalización para la activación del factor de transcripción NFAT. (Ver detalles en el texto).

NF-κB permanece secuestrado en el citoplasma de las células en reposo en asociación con el inhibidor IκB. NF-κB es activado por la vía de PKC en respuesta a la unión de TCR o la estimulación con IL-2 y TNF-α. Tras la activación celular, la cinasa de IκB (IKK) es activada y fosforila a IκB lo que promueve su degradación a través de la vía ubiquitina-nucleosoma y la liberación de NF-κB. NF-κB se acumula en el núcleo en donde promueve y activa los genes blanco (31) (Figura 4). La interacción de NF-κB nuclear con los dos sitios κB en el LTR tiene un papel importante en la regulación positiva de la expresión de genes de VIH-1. (32)

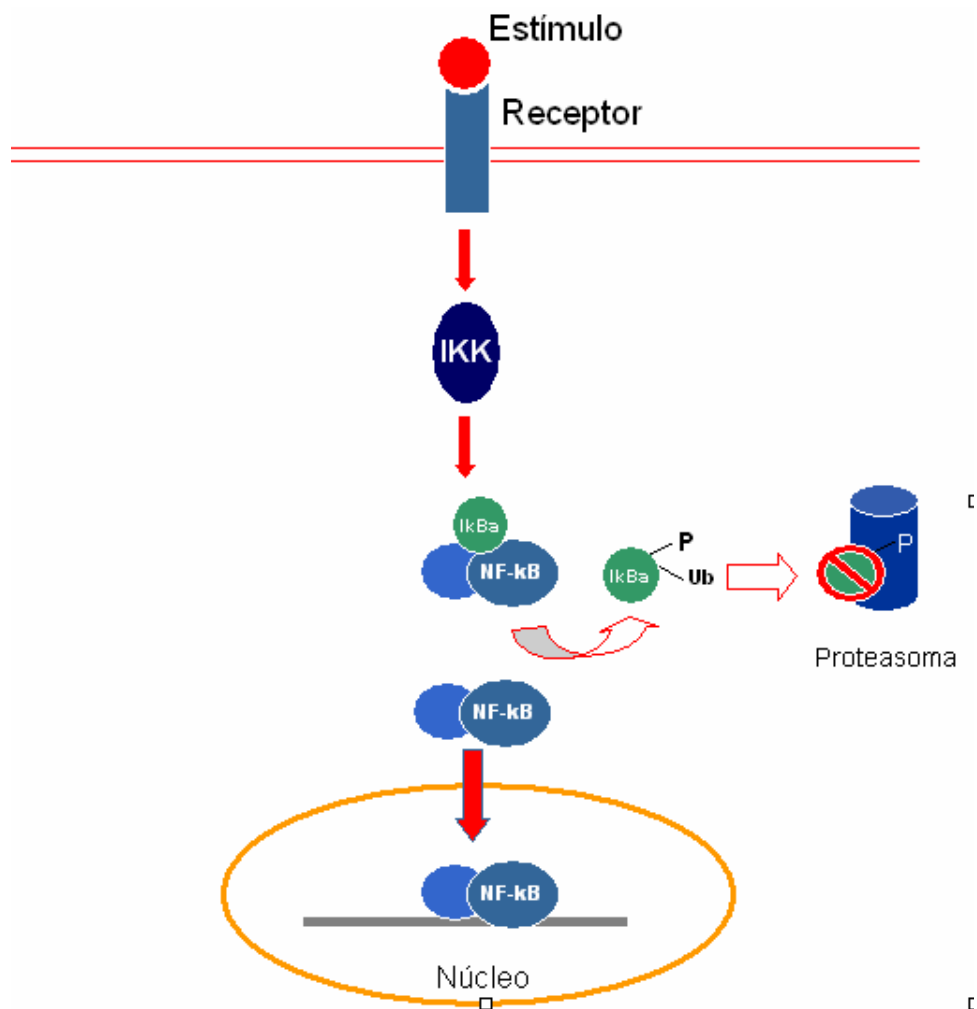


Figura 4. Señalización para la activación del factor de transcripción NF-κB. (Ver detalles en el texto).

La proteína viral Tat está vinculada con la actividad transcripcional de VIH-1. Tat es un transactivador que se une al primer fragmento de RNA viral nascente. Este fragmento forma un asa denominada TAR (elemento de respuesta a Tat, por sus siglas en inglés, Tat responsive element). A través de la interacción Tat/TAR, Tat promueve la transcripción de VIH-1 favoreciendo el ensamblaje de complejos transcripcionalmente activos en el LTR por medio de interacciones proteína-RNA y proteína-proteína (33). Se han definido tres interacciones reguladas por Tat: 1) Interacción con factores de transcripción generales (TBP, TAFII250, y RNA pol II), 2) Interacción con complejos de cinasas que fosforilan el dominio C-terminal de la RNA pol II (en particular, el complejo ciclina T1/CDK9) y 3) complejos con proteínas acetilasas de histonas (HATs) que remodelan la conformación de la cromatina. Tat interactúa con tres HATs a) coactivador transcripcional p300 y CBP (Proteína de unión a CREB [proteína de unión sensible a cAMP]) b) P/CAF (p300/CBP-associated factor y c) GCN5 (general control non-derepresible). El reclutamiento de HATs por Tat explica los cambios en la conformación de la cromatina observados en el LTR durante la transactivación (33, 34).

La estructura de la cromatina forma parte del proceso de persistencia del reservorio integrado. La acetilación de secuencias moduladoras promueve la expresión de genes. Por otro lado, la desacetilación de histonas induce la compactación de la cromatina y, en consecuencia, la inhibición de la transcripción.

La remodelación de la cromatina mediada por la histona desacetilasa 1 (HDAC1) reprime la expresión de genes virales en células T CD4+ en reposo latentemente infectadas. En estudios *ex vivo* se ha demostrado que el ácido valproico, inhibidor de HDAC induce la expresión de VIH-1 a partir del reservorio de células T CD4+ en reposo de pacientes avirémicos con HAART (35).

La reactivación del reservorio está relacionada con la inducción a través de diversos estímulos, particularmente, citocinas. La combinación de IL-2, IL-6, y TNF- α induce la replicación *in vitro* a partir de células T CD4+ de memoria en reposo de pacientes bajo tratamiento antirretroviral con cargas virales indetectables. Cabe destacar que estas citocinas no son capaces de inducir la replicación si son administradas al cultivo de forma individual (36). En otro estudio, Wang et al demostraron que el tratamiento con IL-7 induce la reactivación del reservorio por sí mismo. Estímulos como PHA y anticuerpos dirigidos contra CD3 (OKT3) y CD28 logran reactivar la replicación del reservorio (37). La señalización por los estímulos mencionados está relacionada con la activación de los factores de transcripción NF-kB y NFAT (38).

Pese a la importancia clínica del reservorio, aún no existen métodos simples para medir los niveles de células latentemente infectadas ni la presencia de virus resistentes a fármacos en el reservorio. Uno de los principales obstáculos en el estudio del reservorio de VIH-1, radica en la baja frecuencia de células latentemente infectadas *in vivo*, (CD45RO+ y negativas para marcadores de activación como CD25, CD69 y HLA-DR), que representan el 2-3 % de la cuenta total de linfocitos T CD4+, y de los cuales solamente el 1% contiene el provirus (45). Actualmente se carece de un modelo *in vitro* que permita realizar estudios relacionados con las cT CD4+ en reposo con DNA proviral integrado y aunque se han realizado estudios en líneas celulares (linfocitos y monocitos) transformadas o transfectadas con plásmidos conteniendo regiones del LTR mutadas, la latencia a la que son forzadas no refleja el verdadero estado transcripcional en que se encuentran las células que forman el reservorio *in vivo* (49). Recientemente se han desarrollado nuevos modelos de latencia de VIH-1 *in vivo*, un modelo de SIV en macacos y un modelo en ratones SCID-hu (Thy/Liv) (10). En este último, se emplearon diversos inhibidores para demostrar que las vías de PKC y NFAT tienen un papel en la reactivación de VIH-1 latente. Sin embargo, ninguno de los modelos representa realmente el estado de diferenciación del reservorio (38, 2).

El estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la reactivación del reservorio de VIH-1 requiere de un sistema *ex vivo* que refleje adecuadamente el estado del reservorio en el paciente. Se sabe que el procedimiento de linfótesis de flujo continuo permite obtener un número alto de células T CD4+ de memoria en reposo. Existe un estudio en el que se realizó el procedimiento recirculando 12 litros de sangre periférica obteniendo 200 - 1,200 millones de células T CD4+ de memoria en reposo a partir de pacientes con mas de 2 años de terapia antirretroviral y carga viral indetectable (35). El procedimiento de linfótesis no provoca efectos secundarios adversos en el donador, facilita la obtención de un número alto de células T CD4+ de memoria en reposo *ex vivo* y podría permitir el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la reactivación del reservorio. En particular la activación de factores de transcripción inducida por citocinas y la remodelación de la cromatina determinada por la inhibición de acetilasas de histonas y metilasas de DNA, que podrían a su vez, determinar la activación de los factores transcripcionales.

La reactivación de la replicación viral en las células T CD4+ de memoria en reposo *in vivo*, se ha considerado ya por algunos autores, como una estrategia que podría funcionar para purgar y eliminar el reservorio de VIH-1, por esta razón, la latencia se ha convertido en un reto terapéutico en el tratamiento de la infección por VIH-1. (35)

JUSTIFICACIÓN.

1. El reservorio de VIH integrado en linfocitos T CD4+ de memoria en reposo es considerado el principal obstáculo para la erradicación de la infección. Por esta razón, es necesario el desarrollo de estrategias de tratamiento que permitan erradicar el reservorio viral, para lo cual es preciso conocer los mecanismos celulares y moleculares de establecimiento, conservación y reactivación del mismo.
2. El bajo número de células latentemente infectadas con VIH-1 in vivo (1 % de las células de memoria en reposo contienen provirus, mismas que equivalen a 2-3% de células mononucleares de sangre periférica) ha dificultado el estudio del reservorio y de los mecanismos moleculares involucrados en su reactivación.
3. No se dispone de un modelo adecuado *in vitro* que permita realizar estudios relacionados con las cT CD4+ en reposo con DNA proviral integrado. Los estudios en líneas celulares (linfocitos y monocitos) transformadas o transfectadas con plásmidos conteniendo regiones del LTR mutadas inducidas a latencia no reflejan el verdadero estado transcripcional de las células del reservorio *in vivo*. Por ejemplo, las líneas celulares modelo de reservorio U1 y ACH-2, presentan mutaciones en Tat o en TAR (trans-acting response element) respectivamente, lo que induce la latencia del provirus. Es importante notar que se puede inducir la replicación en ambas líneas celulares a partir de diversos agentes que activan NF-kB, lo que indica que estos complejos celulares pueden imitar algunos de los efectos de Tat aunque con menor eficiencia (50, 51). Mas aún, los agentes que estimulan al replicación en estas líneas celulares,

particularmente TNF- α , no logran inducir la replicación por sí solo a partir de células memoria en reposo de pacientes (36).

4. Lo anterior justifica la necesidad de un modelo *ex vivo* que refleje el mecanismo de regulación de los reservorios de VIH-1. El procedimiento de leucoféresis de flujo continuo permite la obtención de un número alto de células T CD4 de memoria en reposo (200 - 1,200 millones) proveyendo de esta manera, células en cantidad suficiente para los estudios que permitan una aproximación más cercana al estudio del reservorio y sus mecanismos de regulación, así como el desarrollo de nuevas estrategias que permitan su erradicación.

5. La estimulación por citocinas (IL-2, IL-6 y TNF- α en conjunto e IL-7 de manera independiente) permite reactivar el reservorio *in vitro*, sin embargo, se desconoce la inducción de factores de transcripción por esta vía en células de memoria en reposo. El papel de NF- κ B y NFAT ha demostrado ser fundamental en el control inicial de la transcripción del promotor viral. Determinar la participación de ambos mecanismos en el control río arriba de la transcripción viral será de importancia para caracterizar los mecanismos moleculares en la reactivación del reservorio.

HIPÓTESIS.

Las citocinas TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-7, activarán a los factores de transcripción NF- κ B y NFAT, induciendo la reactivación del reservorio viral de VIH-1 en cT CD4+ de memoria en reposo.

OBJETIVO.

- Evaluar la participación de NF- κ B, y NFAT inducidos por citocinas (IL-2, IL-6 y TNF- α , e IL-7) en la activación del reservorio de VIH-1 en cT CD4+ de memoria en reposo *in vitro*.

MÉTODOS.

Este es un estudio experimental transversal que se realizará en los laboratorios del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). El procedimiento de linoféresis se llevará a cabo en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Las personas elegibles que cumplan los criterios de inclusión y superen los de exclusión, serán invitadas a participar como voluntarios en este estudio. Se realizarán evaluaciones clínicas antes y después del procedimiento de leucoféresis de flujo continuo. Los voluntarios podrán recibir un seguimiento clínico en caso de observarse efectos adversos asociados al procedimiento.

El método de establecimiento del contacto inicial con los potenciales participantes, será mediante invitación directa a pacientes con infección por VIH que ya acuden al Servicio de Infectología en el CIENI.

CRITERIOS DEL ESTUDIO

Criterios de inclusión

- Pacientes con infección documentada por VIH
- Con tratamiento anti-VIH por más de dos años
- Carga viral indetectable \leq a 50 copias de RNA / de VIH por ml de plasma y que hayan permanecido indetectables durante un año antes de ingresar al protocolo
- Linfocitos T CD4+ circulantes \geq a 500 células/ μ l
- Ausencia de infecciones oportunistas activas
- Que no estén bajo tratamiento con inmunomoduladores
- Estado clínico estable.
- Carta de consentimiento informado firmada
- Pruebas de coagulación normales

Criterios de exclusión

- Carga viral \geq a 50 copias de RNA/VIH por ml de plasma
- Linfocitos T CD4+ circulantes \leq a 500 células/ μ l
- Con infecciones oportunistas activas
- Con tratamiento con inmunomoduladores
- Participación en otro protocolo de investigación
- No consentimiento
- Intolerancia al anticoagulante ACD (adenina-Citrato-Dextrosa)
- Diabetes, hipertensión

Criterios de eliminación:

- Retiro voluntario
- Pruebas de coagulación alteradas
- Efectos secundarios durante la linfótesis

Evaluaciones:

A los pacientes elegibles y seleccionados que por su voluntad acepten participar en este estudio de investigación, se les realizará un interrogatorio detallado y un examen físico completo antes del procedimiento de linfótesis para integrarlos a la población de estudio de este protocolo. A continuación se describen los procedimientos que serán realizados de manera basal y en el seguimiento del estado clínico.

1. Visita inicial.

1.1. *En esta visita, se explicarán al paciente los detalles de cada uno de los procedimientos que serán realizados, con énfasis en las molestias e*

inconveniencias de la linfóferesis. Se le reiterará que su participación es voluntaria, confidencial y que no obtendrá beneficio alguno de su participación en este estudio. Se le entregará la carta de consentimiento por escrito, para que estudie, analice y decida su participación como voluntario y en caso de aceptar se presente a la siguiente visita.

1.2. Se registrarán los siguientes datos, en un formato de informe de los casos:

- Iniciales del paciente y código.
- Sexo al nacer.
- Datos demográficos.
- Sitio del estudio.
- Estado clínico.
- Niveles de células T CD4+ periféricas.
- Niveles de carga viral de VIH.
- Nombre de quien realizó la entrevista.

2. *Visita para valoración*

2.1. En esta visita los (las) pacientes elegibles que hayan aceptado participar voluntariamente en el estudio, firmarán y entregarán su consentimiento informado por escrito en presencia de dos testigos. Se les programará para el procedimiento de linfóferesis que se realizará en el INNCMSZ, en un periodo no mayor a 1 semana (visita 3). Se le explicarán los detalles respecto a las condiciones y el sitio en el que deberá presentarse para realizar el procedimiento.

2.2. Se determinará peso corporal

2.3. Se solicitarán los siguientes estudios:

- Serología para hepatitis B y C, enfermedad de chagas, HLTV1 y VIH.
- Biometría hemática
- Química sanguínea
- Tiempos de coagulación
- Pruebas de función hepática.

3. *Visita Basal (En caso de superar las pruebas anteriores)*

3.1. En esta visita se realizará el procedimiento de linfóferesis y se obtendrán muestras de sangre periférica para realizar las siguientes pruebas:

- Determinación de carga viral
- Cuenta de linfocitos T CD4+ antes y después del procedimiento

3.2. La muestra obtenida por linfóferesis se procesará por gradiente de ficoll para obtener células mononucleares de sangre periférica para realizar los siguientes ensayos:

3.3. A partir de células mononucleares se obtendrán células T CD4+ de memoria en reposo que constituyen el reservorio viral por selección negativa con nanopartículas magnéticas, seguida de sorting en un citómetro de flujo.

3.4. Determinación por citometría de la pureza y fenotipo de la subpoblación obtenida de células T CD4+ de memoria en reposo.

3.5. Determinación de la activación de factores de transcripción en respuesta a citocinas en células del reservorio, es decir TCD4+ de memoria en reposo.

3.6. Determinación de la replicación viral por cuantificación de antígeno p24 en células T CD4+ de memoria en reposo en respuesta a citocinas, inhibidores de la activación de factores de transcripción, inhibidores de la acetilación de histonas y de la metilación de DNA.

3.7. Cuantificación del reservorio viral de VIH1 en células TCD4+ de memoria en reposo por PCR tiempo real anidada.

4. *Visita control*

4.1. En esta visita, al día siguiente de la linfóferesis se vigilará y se corroborará que el procedimiento no haya generado complicaciones. En el caso de que se presentaran complicaciones por la linfóferesis, el tratamiento requerido y sus costos serán proporcionados por el INER.

4.2. Se obtendrán muestras de sangre periférica para realizar las siguientes pruebas

- 4.2.1.1. Tiempos de coagulación
- 4.2.1.2. Biometría hemática.

5. *Visita 1 mes*

5.1. En esta visita se tomarán muestras sanguíneas para descartar que se hayan presentado efectos adversos tardíos como consecuencia del procedimiento de linfótesis. Se realizarán las siguientes determinaciones:

- Biometría hemática
- Química sanguínea
- Tiempos de coagulación
- Pruebas de función hepática
- Determinación de carga viral
- Cuenta de linfocitos T CD4+

6. *Visita 3 meses*

6.1. A los tres meses después del linfótesis se realizará nuevamente una valoración de laboratorio y clínica para descartar la presencia de efectos adversos tardíos derivados del procedimiento. Se obtendrán muestras de sangre periférica para realizar las siguientes pruebas:

- Determinación de carga viral
- Cuenta de linfocitos T CD4+.

Definición y Descripción de las Técnicas de Laboratorio

1. *Linfoféresis de flujo continuo.* El procedimiento consiste en canalizar una vena en cada brazo del donador que funcionarán, una como salida y la otra como retorno. La sangre extraída por la vía de salida es procesada por centrifugación para separar los componentes sanguíneos por gravedad específica. El paquete obtenido (aproximadamente 75 ml) está enriquecido con células mononucleares de sangre periférica, en particular linfocitos. El resto de los componentes sanguíneos (plasma, eritrocitos, plaquetas y granulocitos) regresan a la circulación sanguínea del donante por la vía de retorno. En total se recircularán aproximadamente 7 litros de sangre venosa y el volumen extracorpóreo no es mayor a 160 ml en ningún momento durante el procedimiento,. Por lo anterior, no se presentan efectos adversos debido al volumen de trabajo.
2. *Procesamiento de la sangre y del producto de linfoféresis del paciente.* La sangre se obtendrá mediante la punción de una vena del antebrazo. Se obtendrán muestras sin anticoagulantes, con EDTA, con heparina y con ACD. Todas las muestras se centrifugarán y el plasma y suero se almacenarán a -80 °C para la determinación posterior de la carga viral en plasma. Se obtendrán las PBMC de la sangre con heparina y ACD por el método de gradientes de densidad (Lymphoprep, AxisShield, Oslo Noruega) de acuerdo con los métodos descritos por el proveedor, y se cuantificarán los linfocitos T CD4+. El producto de la linfoféresis es lavado tres veces con medio HBSS 15 minutos a 1,500 r.p.m. para remover el exceso de plaquetas.
3. *Obtención de células T CD4+ de memoria en reposo.* Estas células son obtenidas por selección negativa con anticuerpos dirigidos a las subpoblaciones celulares no deseadas (cB, cT CD8+, monocitos / macrófagos, células NK, linfocitos activados, eritrocitos, plaquetas) con el kit EasySep (Stem Cell, Vancouver, Columbia Británica). Los anticuerpos son marcados posteriormente con nanopartículas magnéticas y después del

tiempo requerido de contacto entre las células y las nanopartículas, la suspensión es pasada a través de un campo magnético. Las células no deseadas permanecen unidas al campo magnético y las células de memoria en reposo con fenotipo CD4+, CD45RO+, CD25-, HLA-DR-, CD69-, son obtenidas decantando la suspensión. La población obtenida se someterá a una separación adicional mediante “sorting” por citometría de flujo con anticuerpos contra CD8, CD69, CD25 y HLA-DR. (Pharmingen, San José Ca.). De esta forma, se asegura el mantenimiento del reservorio en un estado no activado, puesto que no han entrado en contacto con ningún anticuerpo específico.

4. Ensayos con inhibidores y citocinas. Las células T CD4+ de memoria en reposo con pureza de 99% se cultivarán en las siguientes condiciones: Condición 1) IL-2 (Roche, Indianápolis, E.U.) + IL-6 + TNF- α (R&D Systems); Condición 2) IL-7 (R&D Systems), Condición 3) IL-2 + IL-6 + TNF- α e inhibidores de factores de transcripción, Condición 4) IL-7 e inhibidores de factores de transcripción; Condición 5) inhibidores de acetilasas de histonas; Condición 6) Inhibidores de metilación de DNA. Todos los ensayos serán realizados por triplicado en medio de cultivo HUT (RPMI-1640, 10% Suero Bovino Fetal (SBF), 1% Penicilina/Estreptomicina, 1% Glutamina, Cambrex Walkersville M.O.). Se determinará la replicación viral mediante ensayos de ELISA para proteína viral p24, activación de factores de Transcripción por ensayos de retardo en la movilidad electroforética, cuantificación del reservorio por PCR anidado en tiempo real.
5. Cuantificación del reservorio viral de VIH-1. El reservorio se cuantificará por PCR tiempo real anidado. Se obtiene DNA de células T CD4+ de memoria en reposo con pureza >99%. La primera ronda se realizará un primer forward que se une al promotor del VIH (LTR) y con un primer reverso que se une a secuencias altamente repetidas en el genoma humano (secuencias ALU). La segunda ronda de amplificación se realizará con

primers que se unen dos secuencias presentes en el genoma viral (LTR). Esta técnica permite cuantificar los provirus presentes en el genoma de la célula huésped.

6. Cambios en la movilidad electroforética para factores de transcripción (EMSA). Preparación de Núcleos y extracción de proteínas nucleares. Todo el procedimiento se lleva a cabo a 4° C de acuerdo a las indicaciones del BD TransFactor Extraction kit de Becton Dickinson, Palo Alto Ca. La concentración de proteínas se cuantifica por el método de Bradford (BioRad, Hércules, Ca.) y se almacenará a -170° C hasta el momento de realizar el ensayo de retardo. El ensayo de retardo requiere el marcaje de los oligonucleótidos específicos con fósforo 32. Posteriormente se realiza electroforesis en geles de acrilamida, durante 3 horas a 100 volts. Se secan los geles y se exponen en película autoradiográfica (Kodak, Rocherter, N.Y.).
7. Western Blot. La fracción citoplásmica obtenida en la extracción de proteína nuclear para EMSA o extractos totales se cuantifican para contenido de proteína mediante el método de Bradford. Se realiza electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida durante 2 horas a 40 volts. Se transfieren a membrana de nitrocelulosa y se incuba dos horas con el anticuerpo primario diluido a la concentración adecuada con Tween 0.1% (Sigma San Luis Mi.), BSA 1% (Calbiochem, La Joya Ca.) en TBS. Se lava con la solución de bloqueo (leche 5% en tween 20 1%) 3 veces durante 10 minutos. Se incuba el tiempo estipulado con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano a la dilución recomendada por el fabricante en Tween 0.1%, BSA 1% en TBS. Se revela para quimioluminiscencia y se expone en película autoradiográfica (Kodak).
8. Cuantificación de Ag p24 del VIH por ELISA. Se utilizará el ensayo de Coulter in Vitro Diagnosticum (Miami, Fl.) para detectar la presencia del antígeno p24, del VIH-1 en plasma humano, suero humano o sobrenadantes de tejidos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utiliza un anticuerpo monoclonal murino contra el antígeno p24 del VIH-1

para revestir micropozos de titulación dispuestos en tiras sobre placas. El antígeno p24 del HIV-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. Se lisan las partículas virales presentes en la muestra con el amortiguador incluido en el kit, el antígeno p24 es liberado y capturado por el anticuerpo monoclonal, después de un paso de lavado se agrega una IgG humana anti-VIH-1 biotinilada, 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) que reacciona con la peroxidasa formando un color azul. La reacción se detiene al agregar ácido (CSR-1) y la intensidad de color se considera directamente proporcional a la cantidad de Ag 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 se determina por comparación de su absorbancia con la de los estándares de calibración preparados con antígeno p24 purificado de VIH-1 incluidos en el kit.

9. Determinación de la pureza de los linfocitos T CD4+ de memoria en reposo. Se determinará la pureza de la subpoblación obtenida detectando la expresión de marcadores de superficie mediante anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos por citometría de flujo. La población deberá expresar el fenotipo CD4+, CD3+, CD45RO+, CD25-, CD62L-, HLA DR- (Pharmingen, San José Ca.). Se utilizarán 1×10^6 células que se tiñen con los anticuerpos y se leen en citómetro de flujo FACSAria (Beckton Dickinson).

Control de calidad y manejo de los datos

1. *Control de calidad:*
 - a. Las mediciones y determinaciones que se llevarán a cabo antes del estudio son:
 - i. Manual de operaciones.
 - ii. Instrucción (técnica y no técnica) al equipo de investigación.
 - iii. Concordancia inter e intra examinadores.
 - b. Las medidas que se adoptarán y efectuarán durante el estudio incluyen:
 - i. Reuniones regulares con el grupo (personal que participa en el estudio).
 - ii. Revisión de los procedimientos clínicos y de laboratorio.
 - iii. Manejo de los datos de las evaluaciones y los procedimientos.
2. *Manejo de los datos:* Las formas (libretas, libros) de los datos serán precodificadas. Una vez que se haya recolectado el total de los informes de cada paciente, los datos de las formas se vaciarán a una base de datos en computadora. Se utilizará un programa Stat View, para el análisis estadístico de los datos.

Consideraciones éticas

1. *Aprobación por el Comité de Ciencia y Ética en la Investigación en humanos del INER:* Este protocolo deberá recibir la aprobación del Comité de Ciencia y Bioética antes de su implementación.

“Caracterización de los Mecanismos Moleculares que Participan en la Activación del VIH-1 Latente Presente en el Reservorio de Células T CD4+ de Memoria en Reposo”, aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética en Investigación con código B17-06

2. *Consentimiento informado.* Todos los participantes deberán firmar una forma de consentimiento informado. Las personas participantes recibirán una copia de dicho consentimiento.
3. *Confidencialidad.* Todos los registros, las formas de evaluación, y los informes serán identificados por un número-código para mantener la confidencialidad de los participantes.
4. *Riesgos y molestias.* En la forma de consentimiento informado se establecerá, con todo detalle y con el uso de palabras sencillas, todos los riesgos que este estudio conlleva para los participantes. Particularmente se enfatizarán los riesgos y molestias producidos o asociados al procedimiento de linfóferesis de flujo continuo.

DISEÑO Y SUPERVISIÓN DE LABORATORIOS DE BIOSEGURIDAD NIVELES 2 Y 3

Diseño y Supervisión de Laboratorios de Bioseguridad Niveles 2 y 3

**Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.**

PARTICIPACIÓN PERSONAL:

A continuación se describen las actividades realizadas en el diseño y supervisión de los Laboratorios de Bioseguridad Niveles 2 y 3 del CIENI, así como una revisión bibliográfica de los parámetros generales de diseño en áreas de bioseguridad que sirvió para sentar las bases de diseño y funcionalidad de los laboratorios.

INTRODUCCIÓN.

El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se construye como respuesta a la necesidad institucional, nacional e internacional para hacer frente a las enfermedades infecciosas con impacto en la salud pública. Ejemplos de estas enfermedades son el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la tuberculosis (MTB), y las enfermedades virales emergentes como la Influenza H5N1 y el Coronavirus que causa el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS).

Para un Instituto Nacional de Salud como el de Enfermedades Respiratorias, es una prioridad contar con la infraestructura necesaria para el manejo apropiado de tales agentes infecciosos y poder cumplir los objetivos consecuentes: establecer diagnósticos correctos, ayudar en la vigilancia epidemiológica nacional e internacional, llevar a cabo investigación básica y clínica, y capacitar al personal de salud con el propósito de contribuir en el conocimiento, la prevención y el control de las enfermedades infecciosas conocidas y emergentes.

La Organización Mundial de la Salud establece la clasificación del trabajo con agentes infecciosos en cuatro niveles con base en el riesgo potencial en el que incurre el personal dentro y fuera de los laboratorios y en el riesgo al ambiente externo (43). En México, el rezago al respecto es evidente. No hay aún una red de laboratorios de bioseguridad niveles 2 y 3 que permita la manipulación adecuada de agentes infecciosos sin riesgos para la salud de los trabajadores y de la población en general. En el INER son de particular importancia la MTB y el VIH. Sin embargo, ante la amenaza mundial del SARS y el subtipo H5N1 del virus de la influenza, dos enfermedades del aparato respiratorio, el INER ha sido elegido por la Secretaría de Salud como uno de los centros de atención clínica y diagnóstica de estas enfermedades. Uno de los requerimientos para cumplir con estos

objetivos, es la manipulación correcta de líquidos corporales y muestras de tejidos que contienen a los agentes etiológicos infecciosos. Los riesgos primarios del personal que trabaja con estos agentes se asocian con la auto inoculación, ingestión o exposición a los aerosoles infecciosos. Cuando se identifica una enfermedad emergente (nueva) o re-emergente que pueda poner en riesgo la salud humana, la región o país afectados debe activar los sistemas de alerta y vigilancia epidemiológicas a nivel nacional e internacional (41, 43).

Laboratorios de Bioseguridad

Los laboratorios de bioseguridad representan las estructuras físicas que cumplen con las condiciones de seguridad bajo las cuales se manipulan los agentes infecciosos. Se establecen tomando en cuenta las vías de transmisión documentada o sospechada del microorganismo, su virulencia, patogenicidad, resistencia a los antibióticos y la disponibilidad de vacunas o tratamiento en su contra. El diseño e ingeniería, orientados a minimizar la liberación de aerosoles infecciosos en el laboratorio, requiere de sistemas especiales de inyección y extracción del aire que permitan una presión negativa y recambio frecuente del volumen y de un mantenimiento constante de la temperatura y la humedad relativa. El diseño requiere también una alta eficiencia de filtración del aire al interior y al exterior del laboratorio.

La asignación de un agente a un nivel de bioseguridad para el trabajo de laboratorio se determina con base en una evaluación del riesgo. Esa evaluación tendrá en cuenta el grupo de riesgo, además de otros factores, con el fin de determinar el nivel de bioseguridad más apropiado. Por ejemplo, un agente patógeno asignado al grupo de riesgo 2 en general requerirá instalaciones, equipo, prácticas y procedimientos del nivel de bioseguridad 2 para trabajar sin riesgo. No obstante, si ciertos experimentos involucran la generación de aerosoles con

elevadas concentraciones, será más apropiado el nivel de bioseguridad 3 para proporcionar el grado necesario de precaución, pues garantiza una mayor contención de los aerosoles en el entorno de trabajo del laboratorio. Por consiguiente, el nivel de bioseguridad asignado a un trabajo concreto dependerá del juicio profesional basado en la evaluación del riesgo, y no en la asignación automática de un nivel de bioseguridad basada en el grupo de riesgo particular al que pertenezca el agente patógeno con el que se va a trabajar (43).

De este modo, la asignación de un nivel de bioseguridad tiene en consideración el microorganismo (agente patógeno) utilizado, las instalaciones disponibles y el equipo, las prácticas y los procedimientos necesarios para trabajar con seguridad en el laboratorio. (43)

El diseño de laboratorios considera diversas actividades y condiciones que plantean problemas de seguridad entre ellas:

- La formación de aerosoles.
- El trabajo con grandes cantidades o altas concentraciones de microorganismos.
- El exceso de personal o de material.
- Las plagas de roedores y artrópodos.
- La entrada de personas no autorizadas.
- El circuito de trabajo: utilización de muestras y reactivos concretos.

Características generales de Diseño

PARTICIPACIÓN PERSONAL:

Revisión y traducción de las siguientes Guías Internacionales de Bioseguridad:

- Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos
Cuarta Edición, 1999. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades e Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos

- Guías de Bioseguridad en el Laboratorio
Tercera Edición, 2004. Ministerio de Salud, Canadá
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio
Tercera Edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2005

Establecimiento de las bases de diseño para la manipulación de agentes infecciosos, particularmente:

- 1) Cultivos del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo1, considerando la manipulación de cepas altamente patogénicas (e.g. SF33)
- 2) *Mycobacterium tuberculosis*. Manipulación de células mononucleares de sangre periférica y otros derivados sanguíneos de personas diagnosticadas o con sospecha de infección.

Bases de diseño para laboratorios de Bioseguridad Niveles 2 y 3.

Traducidos de:

Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos

Quinta Edición, 2007

Centros para el Control y Prevención de Enfermedades e

Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos

Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2

Los laboratorios de Bioseguridad Nivel 2 son aptos para trabajar con agentes que representan un riesgo moderado al personal y al ambiente. A diferencia del Laboratorio de Bioseguridad Nivel 1, el personal debe: 1) tener entrenamiento específico para manipular agentes patogénicos y debe ser supervisado por un científico competente en el manejo de agentes infecciosos y procedimientos asociados; 2) el acceso del laboratorio es restringido mientras hay trabajo en curso; 3) todos los procedimientos en los que se generan aerosoles infecciosos y salpicaduras son conducidos en gabinetes de seguridad biológica u otro equipo de contención física adecuado.

Los siguientes requerimientos de diseño se aplican a los laboratorios de bioseguridad nivel 2:

1. Puertas. El laboratorio debe tener puertas con cerrado automático y cerraduras de acuerdo a las políticas institucionales.
2. Tarja para lavado de manos. La tarja puede ser operada de forma manual, manos libre, o automática. Debe ser colocada cerca de la puerta de salida.
3. Limpieza. El diseño del laboratorio debe permitir los protocolos de limpieza y descontaminación de manera sencilla. Está prohibido el uso de alfombras.
4. Mobiliario. El mobiliario del laboratorio debe soportar el uso y las cargas anticipadas. El espacio entre las mesas, los gabinetes de seguridad y el equipo deben ser accesibles para la limpieza.
 - a) Las cubiertas de las mesas deben ser impermeables al agua y resistentes al calor, los solventes orgánicos ácidos, álcalis y otros químicos.

- b) Las sillas del laboratorio deben estar cubiertas con materiales no porosos que puedan ser limpiados y descontaminados con los desinfectantes apropiados.

5. Ventanas. No se recomienda las ventanas del laboratorio que abren hacia el exterior. De existir ventanas deben tener mosquiteros.

6. Gabinetes de seguridad biológica. Los gabinetes de seguridad biológica deben ser instalados en sitios donde las fluctuaciones provocadas por la inyección y extracción de aire en el laboratorio no interfieran su funcionamiento. Los gabinetes de seguridad biológica deben ser instalados en sitios alejados de las puertas, ventanas que puedan abrirse, áreas de tráfico pesado dentro del laboratorio y potenciales interrupciones en el flujo de aire.

7. Vacío. Las líneas de vacío deben estar protegidas por filtros HEPA o equivalentes. Los filtros deben ser reemplazados tanto como sea necesario. Se requiere el uso de trampas con desinfectantes líquidos.

8. Estación de lavado de ojos disponible.

9. Ventilación. No existen requerimientos específicos para el sistema de ventilación. Sin embargo, la planeación de laboratorios nuevos debe considerar un sistema de ventilación mecánico que provea aire direccional hacia el interior sin recirculación hacia otros espacios fuera del laboratorio.

10. Filtración. El aire proveniente de la extracción de las campanas de seguridad biológica clase II filtrado por HEPA puede ser recirculado con seguridad hacia el ambiente del laboratorio si las campanas son probadas y certificadas al menos una vez al año y operadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las campanas de seguridad biológica pueden estar conectadas al sistema de extracción de aire del laboratorio a través de conexiones tipo “dedal” (toldo) o

conexiones directas (permanentes). Es importante verificar el correcto desempeño de las campanas de seguridad biológica y el sistema de aire.

11. Descontaminación. El laboratorio debe contar con un método para descontaminar todos los desechos (e. g. Autoclave, desinfección química, incineración u otro método validado).

Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3

Los Laboratorios de Bioseguridad Nivel 3 (BSL3) se aplican a instalaciones clínicas, de diagnóstico, enseñanza, investigación o producción donde se trabaje con agentes indígenas o exóticos que causen enfermedades serias o potencialmente letales por la ruta de inhalación. El personal del laboratorio debe recibir entrenamiento específico para la manipulación de agentes patogénicos y potencialmente letales y debe estar ser supervisado por científicos competentes para la manipulación de agentes infecciosos y procedimientos asociados. Todos los procedimientos que involucran la manipulación de materiales infecciosos deben ser conducidos en gabinetes de seguridad biológica u otro dispositivo de contención física y por trabajadores portando equipo de protección personal adecuado. Algunos ejemplos de los agentes manipulados en los BSL-3 son *M. tuberculosis*, SARS Coronavirus, virus de la Influenza, *B. Anthracis* (Ántrax), *Coxiella burnetii* y otros agentes incurables como VIH o HCV altamente patogénicos cuando son manipulados en grandes concentraciones.

A continuación se describen requerimientos especiales de ingeniería y diseño de los laboratorios de Bioseguridad Nivel 3:

1. Puertas. Las puertas del laboratorio deben ser de cerrado automático y tener cerraduras de acuerdo con las políticas institucionales.

El laboratorio debe estar separado de áreas que se encuentran abiertas al tráfico libre de personal dentro de edificio.

El acceso al laboratorio está restringido por una serie de dos puertas de cerrado automático.

La esclusa entre las dos puertas puede contar con un vestidor.

2. Tarjas. Los laboratorios deben contar con una tarja para el lavado de manos. La tarja debe ser operada por mecanismos “manos libres” o automáticos. La tarja debe localizarse cerca de la puerta de salida. Si el laboratorio está dividido en diferentes áreas, cada una debe contar con una tarja para el lavado de manos. La evaluación de riegos determinará si se requieren tarjas adicionales.

3. Limpieza. El diseño del laboratorio debe permitir la limpieza y descontaminación de manera sencilla. Las alfombras no están permitidas. Las superficies de los techos, los pisos, las paredes y las juntas deben estar selladas. Los espacios alrededor de las puertas y las rejillas de ventilación podrán ser selladas para facilitar la descontaminación del área.

- a) Los pisos deben ser antiderrapantes, impermeables a líquidos y resistentes a los químicos. Se debe considerar la instalación de pisos sin juntas o uniones, sellados, y monolíticos, con curva sanitaria integrada.
- b) Los muros deben ser construidos para producir un acabado liso y continuo que pueda ser limpiado y descontaminado con facilidad.
- c) Los techos deben tener los mismos acabados y características que los muros.

Se debe considerar la descontaminación del laboratorio cuando ocurran eventos como contaminaciones amplias, cambios significativos en el uso del laboratorio, remodelaciones mayores y procedimientos de mantenimiento donde el laboratorio

deje de funcionar. La evaluación de riesgo determinará los métodos y materiales utilizados para descontaminar el laboratorio con base en los agentes empleados.

4. Mobiliario. El mobiliario del laboratorio debe ser capaz de soportar las cargas y usos anticipados. El espacio entre las mesas, las campanas de seguridad biológica y el equipo, debe ser accesible para la limpieza.

a) Las cubiertas de las mesas deben ser impermeables al agua y resistentes al calor, los solventes orgánicos, los ácidos, los álcalis y otros químicos.

b) Las sillas en el laboratorio deben estar cubiertas con materiales no porosos, que puedan ser limpiados y descontaminados con facilidad.

5. Sellos. Todas las penetraciones del laboratorio deben estar selladas.

6. Gabinetes de seguridad. Las campanas de seguridad biológica deben ser instaladas en sitios donde las fluctuaciones de aire en la inyección y extracción de laboratorio no interfieran con la operación apropiada. Las campanas de seguridad biológica deben ser instaladas en sitios alejados de las puertas, áreas de tráfico pesado dentro del laboratorio, u otros sitios donde se interrumpa el flujo de aire.

7. Vacío. Las líneas de vacío deben estar protegidas con filtros HEPA o equivalente. Los filtros deben ser remplazados tanto como sea necesario. Se requiere el uso de trampas con desinfectantes líquidos.

8. El laboratorio debe contar con una estación de lavado de ojos.

9. Ventilación. Se requiere un sistema de ventilación manejado con conductos. Este sistema debe de proveer un flujo de aire direccional continuo circulando de áreas "limpias" hacia áreas "potencialmente contaminadas". El diseño del laboratorio debe considerar que bajo condiciones de falla el flujo de aire no se revierta.

- a. El personal debe ser capaz de verificar el flujo de aire a la entrada del laboratorio. Se debe instalar un dispositivo de monitoreo visual que confirme el flujo direccional a la entrada del laboratorio. Se deben considerar alarmas audibles para notificar al personal de las interrupciones en el flujo de aire.
- b. El aire extraído del laboratorio NO debe recircular a otras áreas del edificio.
- c. El aire extraído del laboratorio debe ser dispersado en zonas alejadas de áreas ocupadas y de sitios en donde se encuentren las entradas de aire del edificio. O bien, el aire extraído del laboratorio debe tener filtración HEPA.

10. Filtración. El aire proveniente de la extracción de las campanas de seguridad biológica clase II filtrado por HEPA puede ser recirculado con seguridad hacia el ambiente del laboratorio si las campanas son probadas y certificadas al menos una vez al año y operadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las campanas de seguridad biológica pueden estar conectadas al sistema de extracción de aire del laboratorio a través de conexiones tipo “dedal” (toldo) o conexiones directas (permanentes). Es importante verificar el correcto desempeño de las campanas de seguridad biológica y el sistema de aire. Las campanas de seguridad biológica clase III deben estar conectadas de forma directa (conductos permanentes) hacia otros sistema de filtración HEPA secundario. El aire de inyección debe ser provisto de forma que prevenga la presurización positiva en la campana.

11. Descontaminación. El laboratorio debe contar con un método de descontaminación de desechos preferentemente dentro del área. (e.g. autoclave, desinfección química, incineración u otro método de descontaminación validado),

12. Aerosoles. Los equipos que produzcan aerosoles deben permanecer contenidos en dispositivos con filtración HEPA en la extracción de aire o con tecnologías equivalentes antes de sacar el aire hacia el laboratorio. Estos filtros HEPA deben ser probados y remplazados al menos una vez al año.

13. El diseño debe considerar áreas para la descontaminación de equipos grandes antes de ser retirados del laboratorio.

14. Adicionales. La protección mejorada del ambiente y el personal puede ser necesaria dependiendo de la evaluación de riesgo, el resumen de la declaración del agente y las regulaciones locales y federales. Estas mejoras pueden incluir una o más de las siguientes características: esclusa para almacenar equipo y materiales limpios con vestidor y regadera, válvulas de gas para facilitar el aislamiento del laboratorio, filtración HEPA final en el sistema de extracción del laboratorio, descontaminación de efluentes provenientes del laboratorio y dispositivos avanzados para el control del acceso. Los contenedores de filtros HEPA deben tener válvulas de aislamiento, puertos de descontaminación y el dispositivo “bolsa adentro / bolsa afuera” (con procedimientos apropiados de descontaminación). El contenedor de filtros HEPA debe permitir pruebas de fugas en cada filtro y ensamble. Los filtros y contenedores deben ser certificados al menos una vez al año.

15. Verificación. El diseño, parámetros operacionales y procedimientos del BSL-3 deben ser verificados y documentados antes de la operación. Las instalaciones deben ser verificadas y documentadas al menos una vez al año.

Resumen de los Requisitos por Nivel de Bioseguridad

MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO TERCERA EDICIÓN

Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2005

Cuadro 3. Resumen de los requisitos por nivel de bioseguridad

	NIVEL DE BIOSEGURIDAD			
	1	2	3	4
Aislamiento ^a del laboratorio	No	No	Sí	Sí
Sala que pueda precintarse para ser descontaminada	No	No	Sí	Sí
Ventilación:				
— Flujo de aire hacia el interior	No	Conveniente	Sí	Sí
— Sistema de ventilación controlada	No	Conveniente	Sí	Sí
— Salida de aire con HEPA	No	No	Sí/No ^b	Sí
Entrada de doble puerta	No	No	Sí	Sí
Cámara de cierre hermético	No	No	No	Sí
Cámara de cierre hermético con ducha	No	No	No	Sí
Antesala	No	No	Sí	—
Antesala con ducha	No	No	Sí/No ^c	No
Tratamiento de efluentes	No	No	Sí/No ^c	Sí
Autoclave:				
— En el local	No	Conveniente	Sí	Sí
— En la sala de trabajo	No	No	Conveniente	Sí
— De doble puerta	No	No	Conveniente	Sí
CSB	No	Conveniente	Sí	Sí
Capacidad de vigilancia de la seguridad del personal ^d	No	No	Conveniente	Sí

^a Aislamiento ambiental y funcional respecto del tráfico general.

^b Según la localización de la salida de aire (véase el capítulo 4).

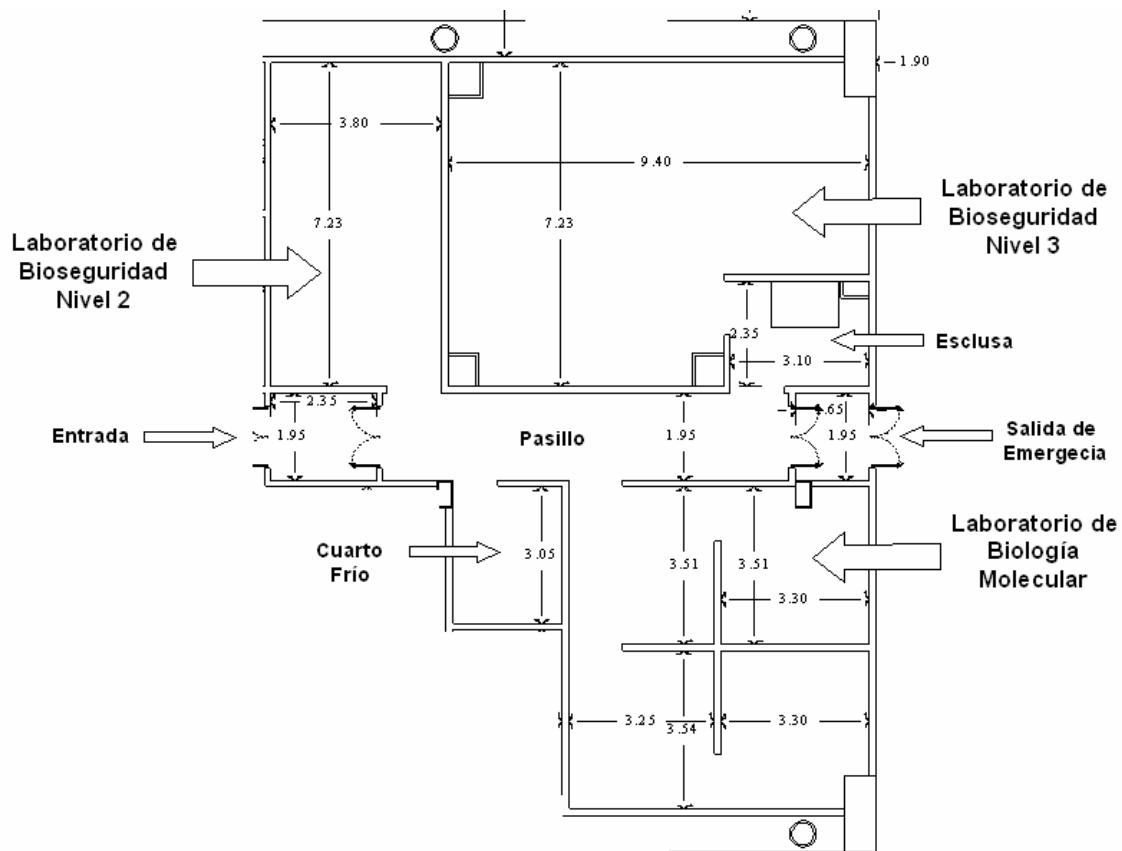
^c Según cuáles sean los agentes empleados en el laboratorio.

^d Por ejemplo, ventana, sistema de televisión en circuito cerrado, comunicación en dos sentidos.

HEPA: filtración de partículas aéreas de gran eficiencia (del inglés *High-Efficiency Particulate Air*). CSB: cámara de seguridad biológica.

Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas

El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) cuenta con un área de laboratorios de seguridad biológica. Esta incluye un laboratorio de bioseguridad nivel 2, un laboratorio de Biología Molecular con funciones de bioseguridad nivel 2 (mencionado a partir de este punto como **Laboratorio de Biología Molecular**) y un laboratorio de bioseguridad nivel 3, así como un corredor entre ellos. El área cuenta con cuarto frío. (Plano 1).



Plano 1. Área de Laboratorios de Bioseguridad,

El diseño, construcción y valoración final de los laboratorios fue realizada con base en las Guías Internacionales de Bioseguridad, particularmente las que se mencionan a continuación:

- Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos
Cuarta Edición, 1999. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades e Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos
- Guías de Bioseguridad en el Laboratorio
Tercera Edición, 2004. Ministerio de Salud, Canadá
- Manual De Bioseguridad en el Laboratorio
Tercera Edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2005

Características Generales

A continuación se describen características comunes en el diseño en el área de laboratorios del CIENI.

Sistema de puertas:

Participación personal: Selección del sistema de puertas automáticas Stanley, incluyendo el sistema biométrico de acceso con huella digital y clave numérica.

Este sistema cuenta con las siguientes características:

(Fotografías 1 y 2)

- Cerrado automático
- Acero inoxidable que facilita la descontaminación
- Materiales a prueba de incendios y resistentes a químicos
- Ventana en la parte superior que permite la visión hacia el interior de las áreas.



Fotografía 1. Sistema de puertas automáticas

- Apertura accionada por sistema de acceso a través de clave numérica y huella digital o bien, por botones de acero inoxidable “tipo plato” accionados por los codos para reducir el contacto con las manos minimizando el riesgo de contaminación.



Fotografía 2. Acceso por clave numérica y huella digital

Tarjas:

Participación personal: Elección de tarjas marca Fisher Hamilton. Estas tarjas presentan las siguientes características:

(Fotografía 3)

- Tarjas de resina epóxica resistente a químicos y desinfectantes
- Operación automática a través de sensor de presencia
- Ubicación cercana a la salida
- Diseño con cuello de ganso



Fotografía 3. Tarjas con sensor de presencia.

Limpieza y descontaminación:

Participación personal: Ubicación y diseño de mesas de trabajo con base en el flujo de personal y el equipo contemplado al inicio del proyecto. El mobiliario permite ejecutar con facilidad los protocolos de limpieza y descontaminación rutinaria con espacio suficiente entre el mobiliario y equipo. No existen alfombras ni materiales orgánicos dentro del área de laboratorios.

Mobiliario:

Participación personal: Elección del mobiliario marca Fisher Hamilton. Ubicación y diseño del mobiliario contemplando los siguientes puntos:

- El mobiliario fue diseñado para soportar las cargas del equipo considerado al inicio del proyecto mas un excedente para equipos futuros.
- El espacio entre las mesas de trabajo y las campanas de seguridad permite el trabajo cómodo, así como el flujo constante de personal.
- La ubicación del mobiliario no impide los protocolos de limpieza y descontaminación.
- Las cubiertas de las mesas de trabajo son de materiales epóxicos resistentes a químicos y al calor. Además, tienen continuidad con los acabados de los muros. Las puertas, vitrinas y anaqueles son de acero inoxidable con acabado de pintura epóxica
- Las vitrinas de los laboratorios de bioseguridad nivel 2 son de vidrio templado que impide que se rompan con contactos moderados
- Las sillas de laboratorio tienen diseño ergonómico y cubiertas de espuma rígida de poliuretano que retarda la flama y facilita la limpieza, ajustes de altura y posición.

Ventanas:

Participación personal: Elección de las características de la ventana.

- El laboratorio de Biología Molecular tiene una ventana que no puede abrir. La ventana es blindada a prueba de balas (Fotografía 4)
- El laboratorio de bioseguridad nivel 2 y el laboratorio de bioseguridad nivel 3 no tienen ventanas.



Fotografía 4. Ventana blindada. Laboratorio de Biología Molecular.

Ubicación de los gabinetes de seguridad biológica:

Participación personal: Diseño y ubicación del equipo del laboratorio, incluyendo las campanas de seguridad biológica.

- Todas las campanas de seguridad biológica se encuentran del lado opuesto del acceso de los laboratorios y no obstaculizan el tránsito dentro del área.
- El flujo de la inyección y extracción del sistema de aire acondicionado no obstaculizan el funcionamiento de los gabinetes de bioseguridad.

Líneas de vacío:

- El sistema de vacío conectado a las campanas de seguridad biológica está protegido con dos trampas con desinfectantes químicos interconectadas.(Fotografía 5).
- Además, contienen filtros de 0.4 micras.



Fotografía 5. Sistema de vacío. Trampas con desinfectantes químicos

Estación de lavado de ojos:

Participación personal: Elección de la estación de lavado de ojos Marca Fisher Hamilton. Ubicación de las estaciones en las tarjas. (Fotografía 6).

- Todas las tarjas cuentan con estación de lavado de ojos con agua corriente



Fotografía 6. Estación de lavado de ojos

Sistema de ventilación:

Participación personal: Ubicación de las rejillas de inyección y extracción de aire con base en la localización del mobiliario, el equipamiento y el flujo del personal dentro del laboratorio. Elección del sistema de filtros en los conductos de extracción de aire marca McQuay . El sistema cuenta con las siguientes características:

- El área de laboratorios cuenta con flujo direccional de aire a través de un sistema de ventilación mecánico.

- El aire proveniente del laboratorio no recircula hacia otras áreas del edificio ni áreas contiguas sin pasar por filtración HEPA

Campanas de seguridad biológica:

Participación personal: Elección de las campanas de seguridad biológica marca Termo Forma.

- Todas las campanas de seguridad biológica son de Clase II A2 (A2B3) (Fotografía 7)
- El aire proveniente de las campanas es filtrado a través de un filtro HEPA antes de salir al ambiente del laboratorio. Aproximadamente el 30% del aire total de la campana es recirculado al exterior.
- Todas las campanas cuentan con certificación anual.
- Ninguna de las campanas está conectada a un sistema externo de ventilación.



Fotografía 7. Campanas de seguridad biológica.

Descontaminación.

Participación personal: Elección de la autoclave de doble puerta marca Tuttnauer.
(Fotografía 8)

- Todos los laboratorios tienen acceso a la descontaminación por calor.
- El área cuenta con una autoclave para esterilizar desechos potencialmente peligrosos.



Fotografía 8. Descontaminación. Autoclave de doble puerta.

CARACTERÍSTICAS PARTICULARES

Acceso al área de laboratorios.

Participación personal: Planeación de la secuencia de entrada y salida al área de laboratorios. El acceso al área de laboratorios está controlado por un sistema biométrico de lectura de huella digital y clave numérica. La entrada cuenta con la señalización requerida por la Organización Mundial de la Salud, incluyendo el símbolo internacional de seguridad biológica, los agentes potencialmente manipulados, inmunizaciones requeridas y responsable del área. La entrada está controlada por una esclusa con dos puertas interconectadas que impiden la apertura de ambas al mismo tiempo. Las puertas tienen apertura automática. La esclusa genera un sello de aire (air lock) con presión positiva lo que impide la salida de aire potencialmente contaminado proveniente del área de laboratorios, así como la entrada de aire proveniente del exterior. La esclusa cuenta con una tarja y equipo de protección personal.



Fotografía 9. Señalización en el acceso al área de laboratorios de bioseguridad.

Corredor y salida de emergencia

Participación personal: diseño de la esclusa en la salida de emergencia con “airlock”. Al pasar la esclusa existe un corredor que permite el acceso a los laboratorios. El corredor cuenta con flujo direccional de aire. Al final del corredor se encuentra una salida de emergencia con dos puertas que generan una esclusa similar a la del acceso al laboratorio. La puerta de emergencia tiene una barra de pánico conectada al sistema de alarmas. (Fotografía 10)



Fotografía 10. Corredor y salida de emergencia.

Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2

(Fotografía 11).

En el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2 del CIENI se realizan las siguientes actividades:

1. Separación de muestras provenientes de sangre de pacientes con infección documentada por VIH-1 y donadores sanos (plasma, suero, células mononucleares de sangre periférica)
2. Diagnóstico virológico por serología
3. Investigación en Biología celular
4. Detección de la replicación viral por el ensayo de transcripción inversa (tritio)
5. Manipulación de sustancias radiactivas con fines de investigación

Con base en las actividades y la potencial manipulación de agentes infecciosos que se transmiten por la vía respiratoria presentes en las muestras de pacientes inmunocomprometidos (VIH+), se estableció la necesidad de contar con características que mejoran la seguridad y el ambiente de trabajo.

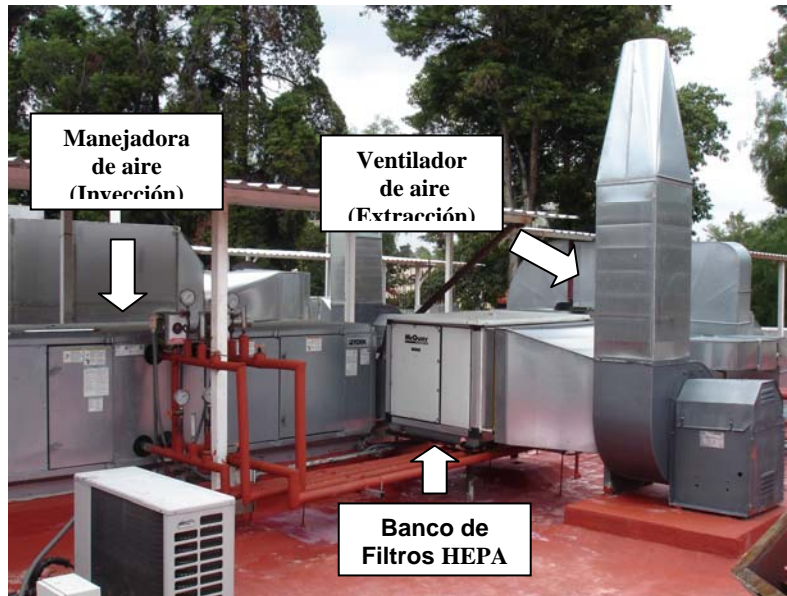


Fotografía 11. Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2.

Participación personal: Con base en lo anterior, determiné las características necesarias para el trabajo en un área de bioseguridad nivel 2 “enhanced” con las siguientes características:

- Flujo direccional de aire con presión negativa y 12 recambios del volumen total del aire por hora.

- Sistemas de inyección y extracción de aire independientes.
- Sistema de extracción con filtración HEPA a través de un gabinete que obliga el paso del 100% del aire proveniente del laboratorio a través de este. (Fotografía 12).



Fotografía 12. Sistema de Aire Acondicionado.

Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2.

- Control de temperatura y monitoreo de la humedad
- Censores de presión y direccional de aire interconectados con un sistema de alarmas.
- Ubicación de las rejillas de inyección de aire en el plafón (techo). Las rejillas cuentan con filtración HEPA en la entrada lo que previene la recirculación de aire

potencialmente contaminados a los conductos de inyección

- Ubicación de las rejillas de extracción a 10 centímetros del piso y en las esquinas del cuarto lo que genera flujo laminar en el área.
- Circuito cerrado de televisión las 24 horas con grabación continua
- Campanas de seguridad biológica (dos) clase 2 A2

Laboratorio de Biología Molecular

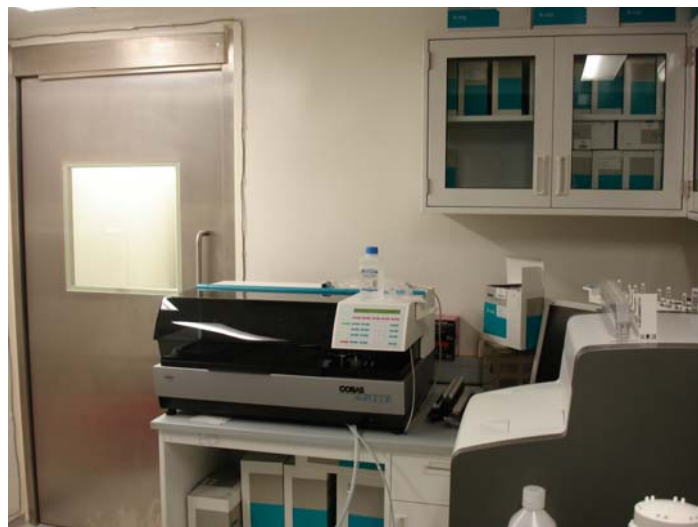
El Laboratorio de Biología Molecular cumple con las características requeridas para los Laboratorios de Bioseguridad Nivel 2. Este laboratorio está dividido en cuatro áreas para disminuir el riesgo en la contaminación de los productos de amplificación de ácidos nucleicos. A continuación se mencionan estas áreas:

- 1) Área de extracción de ácidos nucleicos. Equipada con una campana de seguridad biológica clase 2 A2 y campana de extracción de ácidos nucleicos. (Fotografía 13)



Fotografía 13. Área de extracción de ácidos nucleicos.

- 2) Área de carga viral. Extracción de ácidos nucleicos virales por sistemas automatizados para la cuantificación de partículas virales en el plasma. (Fotografía 14).



Fotografía 14. Área de carga viral.

- 3) Área de secuenciación. Secuenciación de ácidos nucleicos y amplificación por PCR y PCR tiempo real. (Fotografía 15).



Fotografía 15. Área de secuenciación.

- 4) Área sucia. Destinada para procedimientos de electroforesis, preparación de soluciones y reactivos. Cuenta con una campana de extracción para químicos. (Fotografía 16).



Fotografía 16. Área sucia

Participación personal: Diseño de los cuartos del Laboratorio de Biología Molecular, los cuales cuentan con presión negativa, a excepción del que está contiguo al corredor. Este cuarto tiene presión positiva para impedir contaminaciones en el área. Las características de diseño son similares a las que se describen en el apartado del Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2.

Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3.

Participación personal: Consideraciones para el diseño. El diseño del Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 del CIENI fue generado tomando en cuenta las siguientes necesidades con fines de investigación y diagnóstico:

- 1) Capacidad para manipular cultivos virales en altas concentraciones
- 2) Capacidad para manipular muestras que contengan microorganismos que se transmitan por la vía respiratoria, particularmente *M. tuberculosis*.

A continuación se describen requerimientos especiales de ingeniería y diseño presentes en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 del CIENI. Cabe mencionar que el laboratorio cumple con las recomendaciones de diseño generales para el nivel 2 de bioseguridad mencionadas anteriormente.

Acceso:

Participación: Planeación del protocolo de entrada manejado de la siguiente manera:

- El acceso al laboratorio está controlado por un sistema biométrico de huella digital y clave numérica. Las puertas son de cerrado automático. Este sistema impide el acceso a personal ajeno al área.
- La entrada cuenta con una esclusa generada por dos puertas de cerrado interconectadas que impiden que ambas abran al mismo tiempo. (Fotografía 17).



Fotografía 17. Esclusa en el Laboratorios de Bioseguridad Nivel 3.

Vista desde el interior del laboratorio

- El espacio en la esclusa sirve como vestidor para portar el equipo de protección personal. (Fotografía 18).



Fotografía 18. Esclusa BSL3.

- La esclusa cuenta con una tarja para el lavado de manos y una regadera de emergencia.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LABORATORIO DE BIOSEGURIDAD NIVEL 3

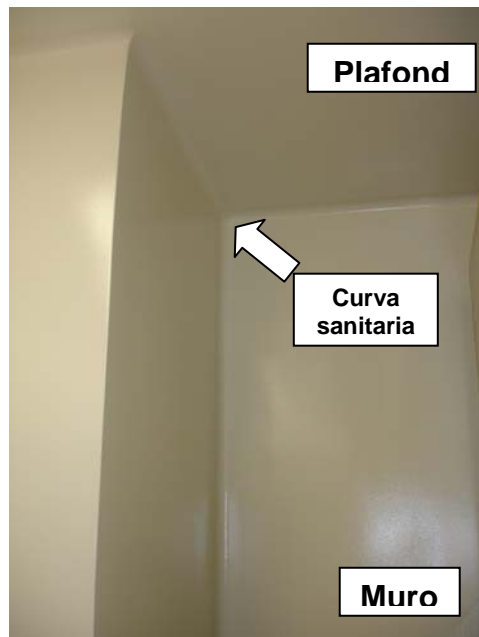
Participación personal: Selección de tarjas, mobiliario, acabados, dispositivos de descontaminación y equipos de contención de aerosoles potencialmente infecciosos que a continuación se describen:

Tarjas

- Existen dos tarjas dentro del laboratorio operadas automáticamente y “manos “libres” a través de un sensor de presencia
- Existe una tarja en la esclusa, cerca de la salida del laboratorio.

Acabados

- Las superficies de los techos y paredes están recubiertos con pintura epóxica con acabado liso y continuo. (Fotografía 19)



Fotografía 19. Acabados sanitario, BSL3.

- Los pisos son monolíticos, epóxicos y conductivos. El acabado es antiderrapante, impermeable al agua y resistentes a químicos y desinfectantes.
- Las rejillas de ventilación, las lámparas, gabinetes de ventilación, puertas y otras penetraciones están selladas con silicón para permitir la descontaminación e impedir la salida de aire potencialmente contaminado.
- Los acabados cuentan con curva sanitaria entre el piso y los muros y entre el muro y el techo.

Descontaminación.

- El laboratorio cuenta con una autoclave de doble puerta que permite descontaminar los desechos biológico infecciosos.
- El autoclave cuenta con un sistema que impide que ambas puertas se encuentren abiertas al mismo tiempo, lo que impide la salida de aire potencialmente contaminado del laboratorio. (Fotografía 20)



Fotografía 20. Autoclave de doble puerta, BSL3.

Aerosoles

- Todos los procedimientos que generan aerosoles son conducidos en dispositivos que evitan la dispersión aérea como campanas de seguridad biológica o bien centrífugas con contenedores de aerosoles.

Sistema de Ventilación, BSL3

El sistema de aire acondicionado es la base para el correcto funcionamiento de los Laboratorio de Seguridad Biológica Nivel 3. La manipulación de agentes de transmisión aérea obliga al manejo direccional del aire por presión negativa para impedir la salida de microorganismos del área de contención.

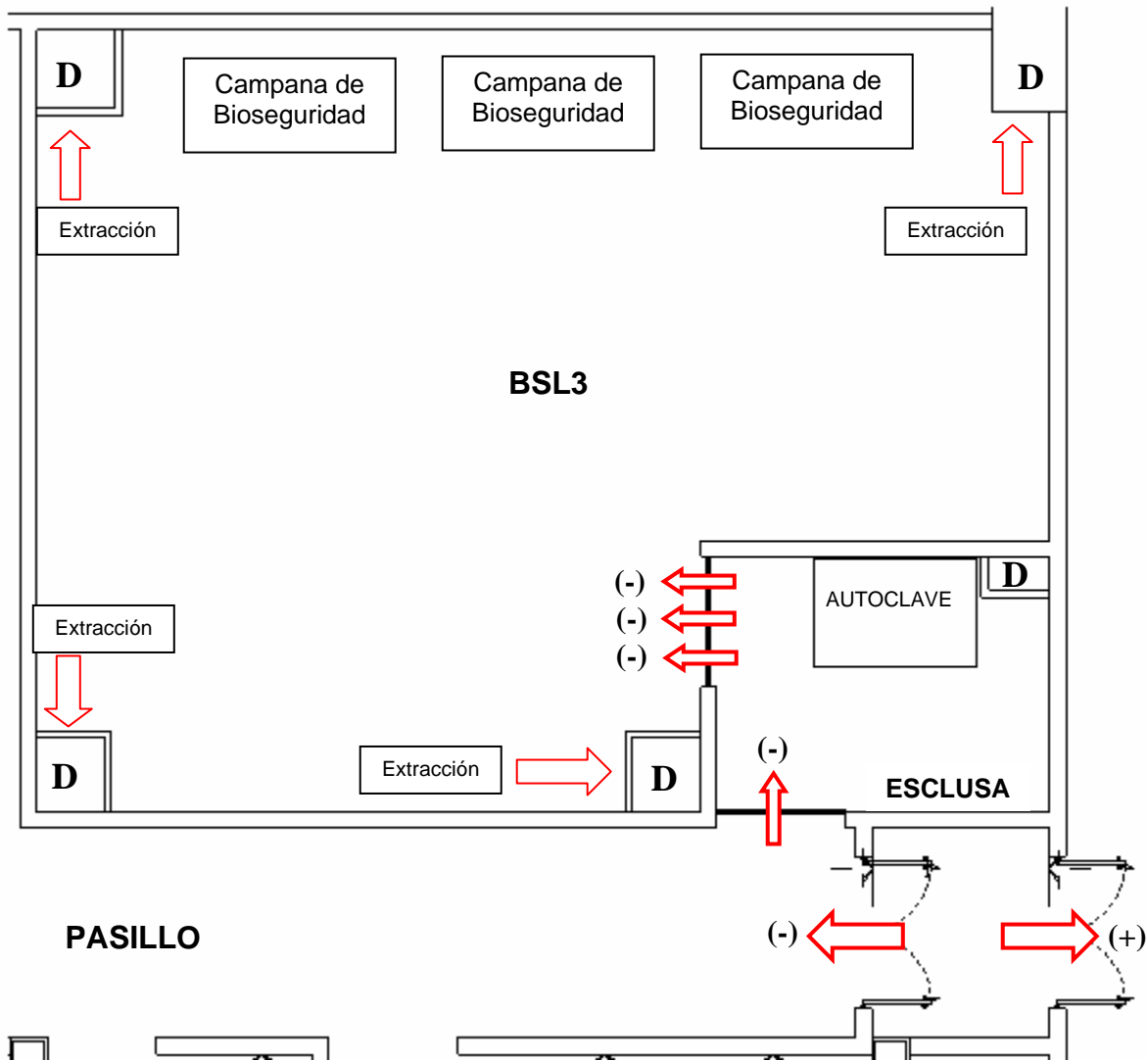
Participación personal: Diseño y selección de los equipos, la dinámica, los flujos y la dirección del sistema de ventilación del BSL-3 con las siguientes características:

- 1) El sistema de aire acondicionado es manejado por conductos. Existen conductos independientes para el sistema de inyección y extracción. (Fotografía 22).



*Fotografía 21. Rejillas de inyección y extracción de aire.
Conductos independientes.*

- 2) El flujo de aire genera un ambiente de presión negativa continuo en el laboratorio y diferencial con respecto a la esclusa y con respecto al corredor. Es decir, de áreas limpias hacia áreas potencialmente contaminadas. (Plano 2)



D = Ducto de extracción

(-) = Presión Negativa

(+) = Presión Positiva

Plano 2. Presión diferencial y dirección del sistema de aire acondicionado. Ubicación de campanas de bioseguridad. Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3.

- 3) En condiciones de falla (e.g. falla en el suministro de energía eléctrica, falla en las unidades manejadoras de aire o ventiladores) el diseño minimiza el riesgo de que el flujo de aire revierta. Los motores de extracción e inyección de aire están interconectados. En caso de falla de alguno de los

sistemas ambos se detienen para impedir la presurización positiva (falla en la extracción) o presurización negativa (falla en la inyección). En caso de interrupción del suministro eléctrico el tiempo de reacción de la planta de emergencia es de 15 segundos. Al accionarse el generador de emergencia los ventiladores de extracción entran en primer lugar para generar presión negativa.

- 4) El personal puede verificar el flujo de aire antes de entrar a la esclusa y al laboratorio. El corredor y la esclusa cuentan con manómetros que indican la presión dentro de cada área. En caso de caída o aumento de presión, los manómetros mandan una señal que acciona alarmas audibles y visibles dentro y fuera del laboratorio. (Fotografía 23)



Figura 22. Manómetro digital. BSL3

- 5) El aire extraído del BSL3 pasa una sola vez a través de los conductos, no recircula hacia otras áreas del edificio
- 6) El aire extraído del BSL3 desemboca en sitios libre de tránsito y alejados de zonas ocupadas
- 7) El aire potencialmente contaminado pasa a través de un sistema de filtración HEPA (High Efficiency Particulated Air) antes de salir al ambiente.

- 8) El sistema de aire acondicionado genera más de 20 recambios del volumen total del cuarto por hora.

Características “ENHACED” en el laboratorio de Bioseguridad Nivel 3.

Participación personal: Ejecución de la evaluación de riesgo del laboratorio. Selección de los requerimientos para mejorar la protección al personal y al ambiente. A continuación se mencionan las características del BSL3 del CIENI que mejoran (enhanced) las condiciones de contención a partir del sistema de aire acondicionado.

Filtración HEPA en el sistema de extracción de aire acondicionado. Este sistema de filtración cuenta con un contenedor de filtros (housing) tipo bolsa adentro / bolsa afuera (Bag-In / Bag – Out) de acero inoxidable. El dispositivo permite la descontaminación de los filtros con los desinfectantes apropiados (formaldehído o vapor de peróxido de hidrógeno) antes de que el personal de mantenimiento y el ambiente entren en contacto con ellos. Para esto, el contenedor cuenta con válvulas que permiten aislar los filtros HEPA y puertos de descontaminación para inyectar y extraer los agentes desinfectantes. Los filtros descontaminados salen en bolsas cerradas herméticamente. El contenedor de los filtros permite realizar pruebas de fugas en los diversos bancos de filtros así como el monitoreo de la presión para verificar el tiempo de vida media del filtro y la funcionalidad del equipo. (Fotografías 24 y 25)



Fotografía 23. Sistema de extracción, contención de filtros HEPA Bag-In / Bag Out, BSL3.



Fotografía 24. Sistema de extracción, contención de filtros HEPA Bag-In / Bag Out, BSL3.

Interacción con arquitectos e ingenieros para desarrollar las bases de diseño. Supervisión para corroborar el cumplimiento de las normas internacionales de bioseguridad durante la construcción.

Supervisión del funcionamiento del área de laboratorios de bioseguridad del CIENI:

Participación personal: Supervisión del funcionamiento y mantenimiento cotidiano de equipos y sistemas de contención microbiológica: sistema de aire acondicionado (incluyendo filtración de alta eficiencia), acabados sanitarios, planta de emergencia, acceso por puertas automáticas, sistema de alarma contra incendios, circuito cerrado de televisión, autoclave de doble puerta, entre otros.

Referencias

1. AIDS Epidemic Update, Diciembre 2006. UNAIDS, World Health Organization.
2. Siliciano R.F. 2007 Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nature Rev Microb* Vol 5 Feb. 95-102
3. Peterlin BM, Trono D. 2003 Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* Feb;3(2):97-107.
4. Walker B.D. 2003. Immunopathogenesis and immnotherapy in AIDS virus infections. *Nat. Imm.* Jul ; 9 (7): 861-866
5. Paranjape R.S. 2005. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res* 121, April: 240-255
6. Mackay I. 2000. The Immune System 1. *N.E.J.M.* 343(1): 37-49
7. Koup R.A. 2004. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nature Med.* August 10 (8): 807-810
8. Richman D.D. 2001 HIV chemotherapy. *Nature* April 410: 995-1001
9. Meadows D.C. 2006 Current developments in HIV chemotherapy. *ChemMedChem.* Jan;1(1):16-29.
10. Cooper DA. 1998. Immunological effects of antiretroviral therapy. *Antivir Ther.*;3 Suppl 4:19-23.
11. Aiuti F, Mezzaroma I. 2006. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS Rev.* Apr-Jun;8(2):88-97.
12. Piatak, M. 1993 High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749–1754
13. Chun, T. W. 1995 In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nature Med.* 1, 1284–1290
14. Chun, T. W. 1997 Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183–188

15. Finzi, D. 1997 Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278, 1295–1300
16. Chun, T. W. 1997 Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 13193–13197
17. Finzi, D. 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Med.* 5, 512–517
18. Zhang, L. et al. 1999 Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* 340, 1605–1613.
19. Ramratnam, B. 2000. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nature Med.* 6, 82–85
20. Siliciano, J. D. 2003 Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Med.* 9, 727–728
21. Strain, M. C. 2002. Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 4819–4824
22. Chun, T.-W. 1998 Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 8869–8873
23. Strain, M. C. 2005 Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 191, 1410–1418
24. Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S. & Rabson, A. B. 1989 Tumor necrosis factor α activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF- κ B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 5974–5978
25. Kinoshita, S. 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* 6, 235–244

26. Persaud, D. 2000. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T lymphocytes in infected children. *J. Clin. Invest* 105, 995–1003
27. Dooms, H. & Abbas, A. K. 2006 Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators. *Immunol. Rev.* 211, 23–38
28. Hermankova, M. 2003. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J. Virol.* 77, 7383–7392
29. Pereira L.A. 2000 A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nuc. Acid Res.* 28(3) 663-668
30. Giffin M. 2003 Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kB element. *Nat Struc. Biol.* October 10(10): 801-806
31. Verma I.M. 2002 NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Imm.* October 2 : 726- 734
32. West M.J. Karn J. 2001 Activation of Human Immunodeficiency Virus Transcription in T Cells Revisited: NF- κ B p65 Stimulates Transcriptional Elongation. *J. Virol* Sept. 8524-8537
33. Marzio G, Giacca M. 1999 Chromatin control of HIV-1 gene expression. *Genetica.*106(1-2):125-30.
34. Marcello A, Lusic M, Pegoraro G, Pellegrini V, Beltram F, Giacca M. 2004 Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene.* Feb 4;326:1-11.
35. Lehrman G. Margolis D. 2005 Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study *The Lancet* Vol. 366: 549-555
36. Chun T.W. Fauci S. 1998 Induction of HIV-1 Replication in Latently Infected CD4 T Cells Using a Combination of Cytokines *J. Exp. Med.* 188 (1): 83-91
37. Feng-Xiang Wang 2005 IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART *J. Clin. Inv.* 115(1): 129-137
38. Brooks, D. G. 2003 Molecular characterization, reactivation, and depletion of latent HIV. *Immunity* 19, 413–423

39. Pomerantz, R. J., Trono, D., Feinberg, M. B. & Baltimore, D. 1990 Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell* 61, 1271–1276
40. Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos Cuarta Edición, 1999. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades e Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos
41. Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos Quinta Edición, 2007. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades e Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos
42. Guías de Bioseguridad en el Laboratorio Tercera Edición, 2004. Ministerio de Salud, Canadá
43. Manual De Bioseguridad en el Laboratorio Tercera Edición, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2005
44. Chun TW, Fauci AS. 2005 HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3250-5.
45. Han Y, Wind-Rotolo M, Yang HC, Siliciano JD, Siliciano RF. 2007 Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Feb;5(2):95-106. Review.
46. Ghosn J, Pellegrin I, Chaix ML; French PRIMO Cohort Study Group (ANRS CO 06). 2006. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS*. 2006 Jan 9;20(2):159-70.
47. Lassen KG, Ramyar KX, Bailey JR, Zhou Y, Siliciano RF. 2006. Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog*. 2006 Jul;2(7):e68.
48. Lee M, Park J. 2006 Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol Cells*. 2006 Aug 31;22(1):1-7. Review.
49. Williams SA, Kwon H, Chen LF, Greene WC. 2007 Sustained induction of NF-kappa B is required for efficient expression of latent human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):6043-56.

50. Emiliani, S., E. Verdin. 1998. Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line. *J. Virol.* 72:1666–1670.
51. Emiliani, S., E. Verdin. 1996. A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6377– 6381.