



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CORRELACION DE LA CARGA VIRAL EN PLASMA Y LAS CONCENTRACIONES DE CELULAS T CD4+ CIRCULANTES, EN LA COHORTE DE PACIENTES INFECTADOS POR VIH DEL INER, SIN TRATAMIENTO PREVIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALFREDO CRUZ LAGUNAS



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUSTAVO REYES TERAN

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m.342013



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:  
Correlación de la carga viral en plasma y las concentraciones de  
células T CD4+ circulantes, en la cohorte de pacientes infectados  
por VIH del INER, sin tratamiento previo.  
realizado por Alfredo Cruz Lagunas

con número de cuenta 09522777-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario Dr. Gustavo Reyes Terán

Propietario Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

Propietario QFB. Joel Armando Vázquez Pérez

Suplente Dr. Justino Regalado Pineda

Suplente Dr. Javier Romo Garcia

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature: Héctor Espinosa A.]*

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

*[Handwritten signature]*  
M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHÁVEZ



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

*Esto ni nada hubiera sido posible sin el apoyo de mi mamá maría que siempre me ha ayudado de forma incansable, creo que nunca podré pagarte todo lo que has hecho por mí, sinceramente mil gracias. De mis hermanos quesia, andres y enrique gracias por su cariño que siempre es una fuente de estímulo, gracias... y de ti que eres mi vida, que siempre me das más de lo que pido o aún sin pedirlo, natalia, gracias por enseñarme la parte linda de la vida...*

*A ustedes se los dedico.*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS SINODALES**

Al Dr. Gustavo Reyes Terán: gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, por sus enseñanzas, su paciencia y todo su apoyo.

A Enrique Espinosa: gracias por todo el tiempo que me brindaste. Y por el apoyo con tus conocimientos. Gracias por todo.

A Joel Vázquez: gracias por ayudarme siempre que lo necesite y por el apoyo.

Al Dr. Justino Regalado: gracias por resolver siempre mis dudas y por el tiempo que me brindó.

Al Dr. Javier Romo: gracias por el tiempo dedicado a la revisión de este manuscrito.

Quiero agradecer especialmente a Joaquín por ser un excelente amigo y por guiarme y acercarme al mundo de la investigación, gracias por todo viejo.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
Estructura del VIH.....	10
Organización del genoma del VIH.....	11
Proteínas estructurales.....	12
Proteínas reguladoras.....	13
Proteínas accesorias.....	14
Ciclo de replicación.....	15
Historia natural de la enfermedad.....	16
Carga viral del VIH.....	20
Cuantificación de linfocitos T.....	21
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
Carga viral y cT CD4 <sup>+</sup> como marcadores de evolución a SIDA.....	23
Efecto de las infecciones oportunistas sobre la carga viral.....	25
Tratamiento anti-VIH altamente activo (TAVAA).....	25
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
General.....	30

Específicos.....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
Diseño del estudio.....	31
Población de estudio.....	31
Criterios de selección.....	32
Criterios de inclusión.....	32
Criterios de exclusión.....	32
Medición de los marcadores.....	33
Carga viral en plasma por el método Amplicor HIV-1 Monitor (RT-PCR).....	33
Cuantificación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de sangre periférica por citometría de flujo con el equipo FACScan.....	36
Análisis estadístico.....	37
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO METODOLOGÍAS.....</b>	<b>67</b>
I.    Carga viral en plasma.....	67
II.   Cuantificación de subpoblaciones de cT por citometría de flujo.....	74

## INTRODUCCIÓN

Hace veinte años se identificó al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El blanco principal del VIH son células que expresan en la superficie la molécula CD4, principalmente linfocitos T y sus precursores. También monocitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y de la microglia en el sistema nervioso central [1, 2]. La infección por el VIH provoca un deterioro progresivo del sistema inmune y finalmente las manifestaciones clínicas del SIDA.

El VIH es un retrovirus de la subfamilia *Lentiviridae* que, como todos los miembros de la familia *Retroviridae*, presenta un genoma diploide de RNA y una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA y DNA llamada transcriptasa inversa [3]. El análisis de las secuencias del VIH permitió distinguir siete series taxonómicas (de A hasta G), asociadas a distribuciones geográficas propias, las secuencias específicas de cada clase han permitido establecer relaciones filogenéticas [4]. Según una tasa calculada de  $10^{-3}$  sustituciones de nucleótidos por sitio por año, se conjetura que los lentivirus, incluyendo al VIH, se separaron hace solo varios cientos de años [5].

La primera evidencia de que el SIDA es causado por un retrovirus surgió en 1983, cuando Barré-Sinoussi, Chermann y Montaigner, en el Instituto Pasteur, recuperaron un virus que contenía una enzima transcriptasa inversa de un

ganglio linfático de un hombre con linfadenopatía persistente [1]. Levy y sus colaboradores confirmaron esta hipótesis al describir un retrovirus asociado al SIDA [6]. Fue hasta el año 1986 que el Comité Internacional para Taxonomía de los Virus recomendó dar el nombre Virus de la Inmunodeficiencia Humana o VIH al agente causal del SIDA [7].

La propagación y replicación persistente del VIH conduce a una inmunodeficiencia grave ocasionada por una reducción gradual del número de células T (cT) CD4<sup>+</sup>. Esto resulta en la aparición de múltiples infecciones oportunistas y tumores malignos [8]. La gravedad de la enfermedad está determinada por el balance entre la virulencia del microorganismo y la resistencia del hospedero [9].

En la mayoría de los casos, durante las primeras seis semanas después de la exposición, los individuos infectados desarrollan un síndrome agudo, caracterizado por valores elevados de viremia (carga viral) en la sangre periférica y síntomas de tipo gripal [10]. Posteriormente se monta una respuesta inmune específica contra el VIH que provoca un descenso importante en la viremia plasmática [11]. A continuación los individuos entran en una etapa asintomática clínicamente estable que, dependiendo de factores inmunológicos, virológicos y genéticos, puede durar un número variable de años. En esta etapa las concentraciones del virus en la sangre periférica son relativamente bajas, sin embargo, la replicación del virus e infección de cT CD4<sup>+</sup> son procesos dinámicos, que son equilibrados por una tasa igualmente



dinámica de depuración viral, muerte de células infectadas y abastecimiento de nuevas cT CD4<sup>+</sup>, este equilibrio mantiene niveles plasmáticos relativamente estables de viremia y de cT CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, esta viremia plasmática reducida pero persistente provoca la reducción gradual de las cT CD4<sup>+</sup>, que invariablemente, en poco o mucho tiempo, conduce a SIDA y la muerte.

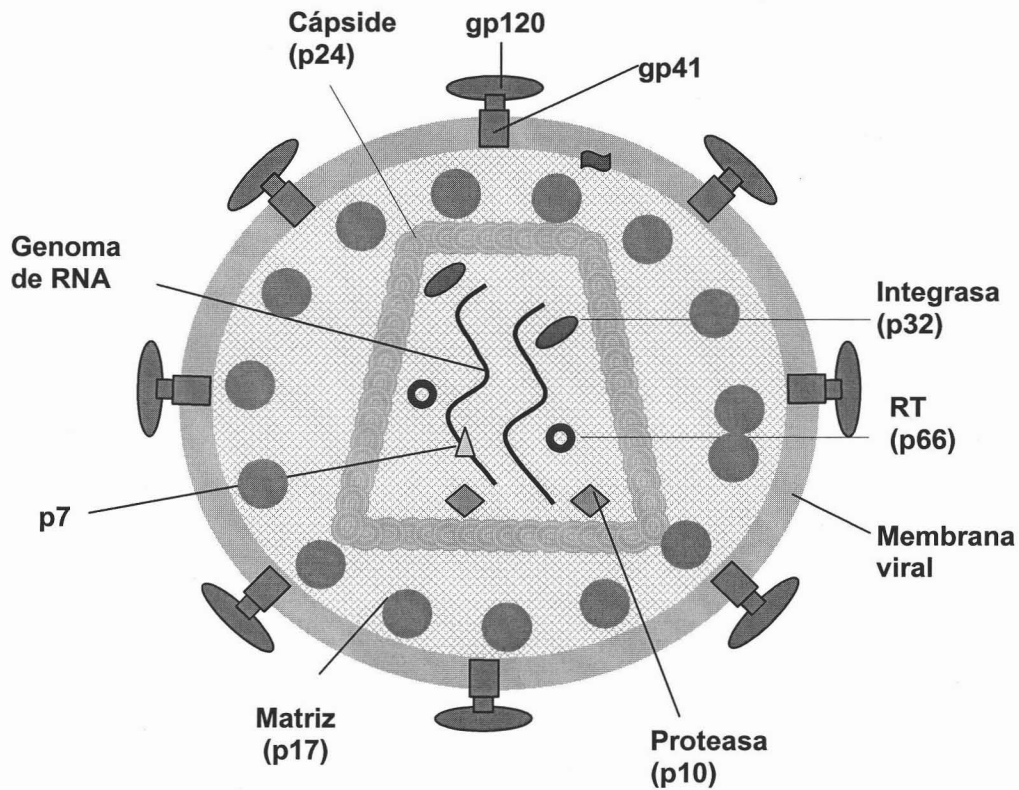
Se han estudiado varios marcadores que podrían determinar la evolución de la infección por el VIH. Fahey y cols., en 1990, con estudios comparativos, evaluó ocho marcadores serológicos y celulares. Concluyó que la cuenta absoluta y el porcentaje de cT CD4<sup>+</sup> en circulación eran el mejor marcador para predecir la evolución a SIDA [12]. Posteriormente, con el desarrollo de nuevos métodos para cuantificar la carga viral en plasma, se tuvo acceso a información de pronóstico independiente de las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>. Los estudios de dinámica de la replicación viral muestran que el curso de la infección por VIH se caracteriza por un incremento gradual y variable de la carga viral, y una disminución lenta pero continua de las concentraciones en circulación de cT CD4<sup>+</sup> [13]. Algunos estudios sugieren que mediante la carga viral es posible predecir la tasa de disminución o de aumento de las cT CD4<sup>+</sup> [9] y que el número de partículas virales en plasma es proporcional al total de cT CD4<sup>+</sup> productivas infectadas [14].

En el presente, el mejor pronóstico de la evolución a SIDA lo constituye el análisis simultáneo de la carga viral en plasma y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en circulación [15]. Este trabajo muestra los resultados de correlación

entre estos dos marcadores en la cohorte de pacientes infectados por VIH del INER sin tratamiento previo.

## **Estructura del VIH**

Imágenes por microscopía electrónica han revelado que las partículas del VIH tienen forma esférica con un diámetro aproximado de 100 nm (Fig.1). Presenta una matriz (p17) icosaédrica cubierta por una bicapa lipídica, que obtiene de la membrana plasmática de las células que infecta, a la que están asociados complejos de glicoproteínas, gp120 en el exterior y un dominio transmembranal gp41. Dentro de la matriz hay un núcleo o cápside (p24) de forma cónica que contiene dos copias del genoma viral de RNA acoplados a la nucleoproteína p7. También contiene las enzimas necesarias para replicarse: transcriptasa inversa (p66), integrasa (p32) y proteasa (p10). Para completar la replicación y la expresión de sus genes, el VIH requiere las proteínas reguladoras Tat y Rev. Además, durante el ciclo de replicación del VIH-1 aparecen cuatro proteínas accesorias llamadas: nef, vif, vpr y vpu, que son determinantes para la virulencia (Fig. 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura del VIH.

### Organización del genoma del VIH

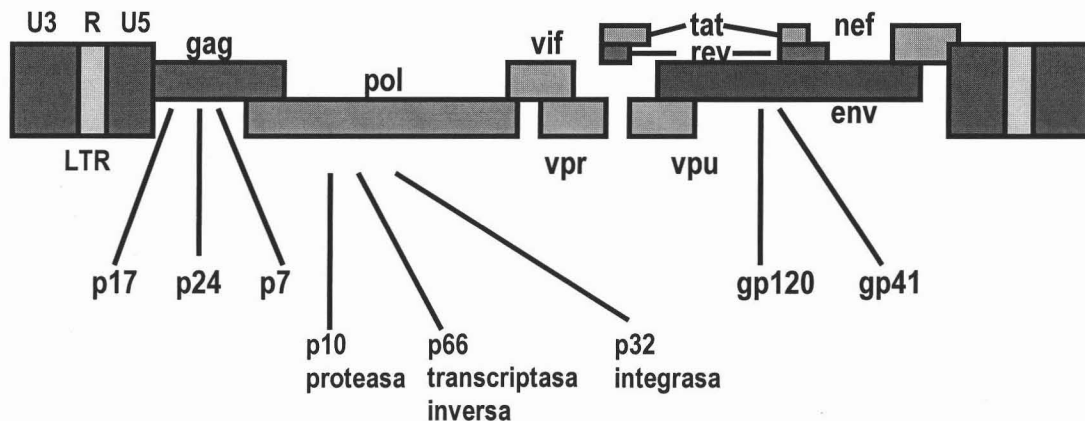
Para la expresión de sus genes, el VIH debe integrar su genoma en el de la célula que infecta. La forma integrada del VIH, conocida como provirus, tiene una longitud aproximada de 9.8 kilobases (Kb) (Fig. 2). El esquema clásico del genoma de los retrovirus es: 5'-LTR-gag-pol-env-LTR-3'. Los LTR (del inglés: *long terminal repeat*) son secuencias repetitivas que representan los extremos de terminación del genoma del virus y donde se enlaza con el del hospedero. Los

genes del VIH codifican para las siguientes proteínas clasificadas como estructurales, reguladoras y accesorias.

### **Proteínas estructurales**

El gen *gag* codifica para un precursor de 55 kD llamado p55, que es digerido por la proteasa viral, en cuatro proteínas: p17 (Matriz, MA), p24 (Cápside, CA), p7 (Nucleocápside, NC) y p6. La MA se localiza en la superficie interna de la bicapa lipídica y es responsable de la estabilidad del virus [16]. La CA constituye el núcleo cónico del virus [17]. La NC facilita la transcripción inversa y es necesaria para el empaquetamiento del genoma del virión [18]. p6 favorece la liberación de los viriones [19]. El gen *pol* se transcribe junto con *gag* y expresan un precursor Gag-Pol (p160). Los precursores Gag y Gag-Pol se producen a una tasa aproximada de 20:1 [20]. La proteasa viral hidroliza al polipéptido Pol y lo digiere para formar las proteínas enzimáticas del VIH: p10 (Proteasa, Pro), p32 (Integrasa, IN), p15 (RNasa H) y p51 (Transcriptasa inversa, RT), en la mayoría de los casos estas dos últimas permanecen unidas formando un complejo (p66). La RT es un heterodímero con actividad de DNA polimerasa dependiente de RNA y DNA, transcribe el genoma viral RNA a DNA [21]. La IN es una enzima con actividad de exonucleasa, endonucleasa y ligasa, inserta el genoma viral en el de la célula hospedera [22]. La Pro es un homodímero con dos aspartatos en su sitio activo. Actúa durante la maduración viral sobre los precursores polipeptídicos de las proteínas estructurales en *gag* y *pol* [23]. El gen *env* codifica

un precursor de 160 kD (gp160). Mediante una proteasa celular es digerido en: gp120 y gp41. La gp120 es una proteína glicosilada que se localiza en la superficie viral, presenta un sitio de unión a la molécula CD4 y dos sitios de unión a los llamados co-receptores del VIH. Es sujeta mediante interacciones no covalentes, por el dominio transmembranal gp41 [24].



**Figura 2.** Organización del genoma del VIH. Se muestran las proteínas expresadas por sus genes. El provirus tiene una extensión aproximada de 9.8 kb.

### Proteínas reguladoras

Tat es un transactivador transcripcional requerido para el inicio de la transcripción inversa y es promotor de la fase de elongación durante la transcripción del VIH. Se une a una pequeña asa del genoma RNA viral (*stem-*

*loop*) localizada en el extremo 5' llamada elemento TAR (elemento de respuesta a la transactivación) [25]. Rev es un homo-tetrámero de 13 kD necesario para la transición de la fase temprana a la tardía en la expresión de los genes del VIH. Facilita el transporte de RNA del núcleo hacia el citoplasma. Se une a una secuencia específica del genoma en una región llamada elemento RER (elemento de respuesta a rev). En provirus que carecen de *rev* se ha observado que no se expresan algunos genes y no hay producción de viriones [26].

### **Proteínas accesorias**

Las proteínas accesorias: *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* son exclusivas del VIH, no son codificadas por los todos los retrovirus. En sistemas *in vitro* no son absolutamente requeridas para la replicación viral; sin embargo, *in vivo* son factores determinantes de la virulencia. *Nef* es la primera proteína que se acumula a niveles detectables después de la infección, tiene un peso de 27 kD y es codificada por una región localizada dentro del LTR del extremo 3' del genoma [27]. Disminuye la expresión de CD4 en la superficie de células infectadas y favorece la endocitosis y degradación de esta molécula [28]. Favorece la infectividad del VIH, en ausencia de *Nef* la capacidad de infección de los viriones disminuye hasta diez veces [29]. *Vpr* está presente en un complejo de preintegración (CPI) en el núcleo celular [30]. Interactúa con los componentes del complejo del poro nuclear y actúa como un factor de transporte núcleo-citoplasma. Detiene la división celular en la fase G2 [31, 32].

Vpu es un polipéptido de 16kD, se localiza en la membrana interna de la célula después de la infección, induce la degradación de la molécula CD4 [33]. Favorece la liberación de los viriones, en su ausencia muchos viriones permanecen unidos a la superficie celular [34]. Vif es un polipéptido de 23kD necesario para la replicación del VIH en linfocitos de sangre periférica y en macrófagos. Algunos estudios indican que es importante para el adecuado empaquetamiento de las proteínas virales [35].

### **Ciclo de replicación**

El ciclo de replicación comienza con la interacción entre la gp120, presente en la membrana viral, con la molécula CD4, presente principalmente en la membrana celular de linfocitos T cooperadores y en diversas poblaciones de macrófagos. Se requiere además la participación de receptores de quimiocinas. Aunque se ha reportado que una gran variedad de ellos pueden ser utilizados *in Vitro*, las moléculas CCR5 (receptor de  $\beta$ -quimiocinas) y CXCR4 (receptor de  $\alpha$ -quimiocinas) son los receptores secundarios del VIH más usados *in vivo* [36]. En la mayoría de los casos, al principio de la infección predominan los virus que utilizan como co-receptor a CCR5, estos virus se conocen como R5 y no inducen sincicia (NSI). En etapas posteriores de la infección predominan virus con tropismo a CXCR4, a estos se les llama X4 y son inductores de sincicia (SI) [36, 37]. Después de estas interacciones, gp41 favorece la fusión de las membranas celular y viral [38], con lo que la cápside se introduce en el

citoplasma. A continuación, el RNA del genoma viral se transcribe a DNA mediante la RT [21]. Mediante un complejo de integración formado por proteínas virales, el DNA viral llega al núcleo celular para ser integrado, mediante la IN, en el genoma de la célula. Al DNA viral insertado en el genoma de la célula se le conoce como provirus y funciona a manera de un gen celular durante el tiempo de vida de la célula infectada [39]. Para la inducción de los genes del VIH, se requieren factores de transcripción celulares y las proteínas reguladoras y accesorias del virus [40]. Las proteínas virales Tat y Rev regulan los eventos transcripcionales y postranscripcionales [41]. Posteriormente ocurre el ensamblaje de los viriones. Se procesan los productos del gen *env* para formar las proteínas principales de la envoltura. Los precursores Gag, Pol y el nuevo genoma de RNA se dirigen a la superficie celular. Finalmente, la proteasa viral corta, de forma específica, a los precursores para formar las proteínas virales funcionales. El virión completamente formado, es capaz entonces de infectar a otra célula y comenzar nuevamente el ciclo de replicación [40] (Fig. 3).

### **Historia natural de la enfermedad**

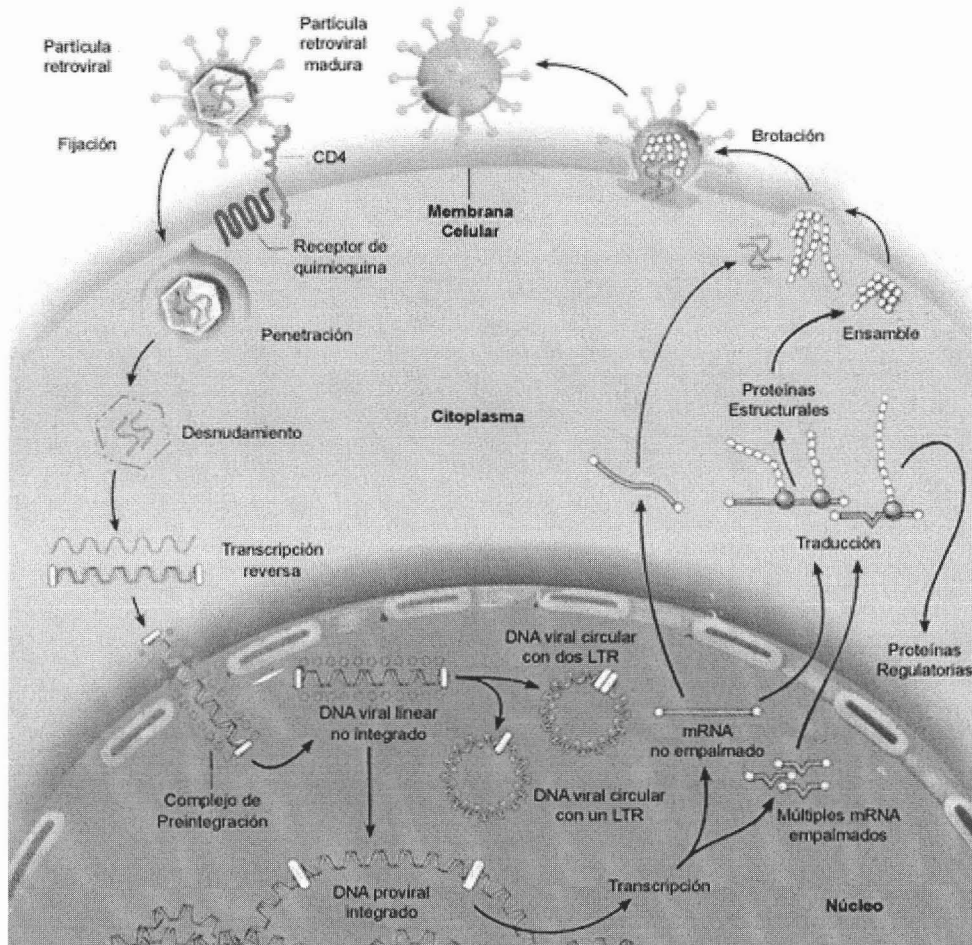
Durante la infección por el VIH se distinguen diversas fases o etapas, inducidas por la interacción entre el virus y la respuesta inmune del hospedero [42]. La historia natural de la enfermedad se divide en las siguientes etapas sucesivas. Etapa de infección primaria caracterizada por concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> mayores a 500/ $\mu$ l. Etapa intermedia o de latencia clínica con concentraciones



entre 200 a 500 células T CD4<sup>+</sup>/μl. Etapa tardía donde los pacientes presentan concentraciones por debajo de 200 y hasta 50 cT CD4<sup>+</sup>/μl. Finalmente la etapa avanzada caracterizada por concentraciones por debajo de 50 cT CD4<sup>+</sup>/μl. En la fase final aparece el SIDA que resulta en el último evento de la interacción con la muerte del hospedero [43].

En la etapa de infección primaria y pocos días después de la infección, la viremia se detecta en plasma alcanzando valores elevados. La fuente principal de viremia parece ser las cT CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> de memoria, distribuidas principalmente en la mucosa intestinal y en el tracto respiratorio y reproductivo [44, 36]. Al mismo tiempo ocurre una notable reducción de las cT CD4<sup>+</sup> en circulación; pero no es tan acentuada como sucede en las mucosas. Clínicamente los síntomas son inespecíficos y con estado de gravedad variable [45]. Sin embargo, en un período de tiempo en general corto, ocurre una extraordinaria contra-regulación de los niveles de replicación viral que disminuye considerablemente la viremia y aumentan los niveles circulantes de cT CD4<sup>+</sup> (aunque pocas veces a los niveles de referencia), con lo que se resuelve el cuadro clínico [46]. Esto sugiere que se desarrolla una eficiente respuesta inmune, como sucede en otras infecciones virales, durante el período de infección aguda, que es capaz de contener momentánea y parcialmente la infección [47, 48]. El descenso en la viremia puede observarse durante los primeros 4 meses de infección, hasta llegar a lo que se conoce como el punto de equilibrio (*set point*) de la carga viral, que varía de persona a persona. El nivel del punto de equilibrio determina el pronóstico del

curso de la enfermedad. A menor carga viral, menor el tiempo de evolución a SIDA y muerte [44, 49].



**Figura 3.** Descripción esquemática de los eventos que ocurren durante el ciclo de replicación del VIH. Interacción entre gp120, CD4 y el receptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4). Fusión de membranas, desnudamiento del virión, transcripción inversa del genoma viral, formación del provirus, expresión de proteínas virales, ensamblaje y liberación de nuevos viriones.

La etapa intermedia se caracteriza por niveles bajos o ausencia de viremia en sangre. Sin embargo, a partir de ese momento se observa un incremento gradual de la carga viral y disminución progresiva del número de las cT CD4<sup>+</sup> [13]. Esta relación determina la progresión de la enfermedad. Aunque la replicación viral es contenida, en mayor o menor grado, por la respuesta inmune del hospedero, el virus ha desarrollado diversas estrategias que le permiten burlar los mecanismos de la respuesta inmune: formación de reservorios de VIH latentes, gran capacidad de variación y desarrollo de mutantes, cambio de fenotipo biológico durante el curso de la enfermedad y su extraordinaria capacidad de replicación, que invariablemente, en la gran mayoría de los individuos infectados, resultará en la destrucción del sistema inmune y finalmente el desarrollo del SIDA [50]. Con el objetivo de perturbar la replicación del HIV, en la actualidad se utilizan, de manera extendida, fármacos inhibidores de las enzimas virales RT y Pro, en las etapas avanzadas de la enfermedad. Durante estas etapas las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> circulantes son muy bajas y la carga viral se dispara por encima de los límites superiores detectables, provocando la destrucción completa del sistema inmune [42].

De acuerdo a la duración de la historia natural de la enfermedad, se ha clasificado en dos grandes grupos a los individuos infectados por el VIH. Un grupo denominado no progresores (*Long term non-progressors*) en quienes por lo menos durante 10 años de infección y sin tratamiento permanecen sin síntomas, con niveles circulantes de cT CD4<sup>+</sup> dentro de los límites de referencia y carga viral baja. A este grupo pertenece el 5 al 10% del total de

infectados [51]. El otro grupo se denomina progresores (*progressors*) y en contraste, esta constituido por más del 95% de la población infectada por el VIH. Este a su vez se divide en dos subgrupos: progresores promedio y progresores rápidos. Los progresores promedio, tienen una media de supervivencia de 10 años. En este se clasifica un 60 a 70% del total de infectados. El subgrupo de los progresores rápidos engloba al 30% de la población infectada y se caracteriza por un curso acelerado de la enfermedad, menos de 5 años, entre la infección y la muerte [52].

### **Carga viral del VIH**

La carga viral es una prueba de amplificación *in Vitro* de ácido nucleico del VIH para la determinación cuantitativa del RNA del virus en sangre periférica u otros fluidos y tejidos. Actualmente las técnicas para cuantificar el DNA y RNA con este propósito se han convertido en una herramienta esencial para el estudio de la patogénesis del VIH. Las técnicas más comúnmente usadas son Quantiplex (bDNA) para VIH-1, con límites de detección confiables entre 50 y 500,000 copias de RNA-VIH/mL, AMPLICOR HIV-1 MONITOR para cuantificar entre 50 a 750,000 copias de RNA-VIH/mL y NucliSens con sensibilidad entre 80 a  $1 \times 10^6$  copias de RNA-VIH/mL [53]. La carga viral en plasma puede medirse en casi todas las personas infectadas con cualquiera de las técnicas disponibles [54].

El nivel absoluto de la viremia en plasma, copias del RNA-VIH/mL de plasma, ha tenido gran importancia en estudios de la dinámica de la replicación viral y de la respuesta a fármacos. En el contexto clínico es importante para tomar decisiones en cuanto al inicio del tratamiento antirretroviral altamente activo (TAVAA) y para monitorear cambios en la viremia durante el tratamiento, es un marcador para evaluar la eficacia del tratamiento para cada individuo y para predecir los cambios en las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> [15, 49, 55, 56].

### **Cuantificación de linfocitos T**

Los linfocitos humanos se clasifican en tres principales poblaciones de acuerdo a su función biológica y la expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos asesinos naturales (NK, del inglés: natural killers). Estos marcadores de superficie celular se denominan “marcadores de diferenciación” conocidos en la literatura como “CD” (del inglés: *cluster designation*). Los linfocitos colaboradores/inductores son una subpoblación de los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) que expresan en la superficie celular el marcador CD4. La cuantificación de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> se utiliza para caracterizar y hacer el seguimiento de inmunodeficiencias [57, 58]. Los recuentos de los linfocitos T colaboradores/inductores son útiles en el seguimiento de los individuos infectados con el VIH [59]. Estos individuos típicamente presentan una disminución constante del recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> conforme progresa la infección [60]. Los linfocitos supresores/citotóxicos son una subpoblación de

linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) que expresan el marcador CD8 en la superficie celular. Los recuentos de estos son útiles en la caracterización y seguimiento de ciertas inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes. La subpoblación CD8<sup>+</sup> se encuentra elevada en pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas como en el SIDA [59].

Mediante la citometría de flujo se pueden detectar de forma sistemática distintas subpoblaciones de linfocitos. Se usan anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo que reconocen de forma específica a las moléculas de superficie que las caracterizan. Al someter a las células a un láser emiten distintas fluorescencias que son reconocidas por un detector que discrimina entre los distintos tipos de fluorocromos utilizados. A partir de esto se determina la cantidad de células que expresan el marcador de superficie buscado.

Los Centros para el Control de las Enfermedades (CDC) recomiendan el uso de combinaciones de reactivos que contengan anticuerpos anti-CD3 para determinar los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes infectados con el VIH [61].

## ANTECEDENTES

### **Carga viral y cT CD4<sup>+</sup> como marcadores de evolución a SIDA**

Se han publicado estudios que demuestran la capacidad de la carga viral para predecir la evolución a SIDA. Altas concentraciones de virus se relacionan con un riesgo mayor de evolución a SIDA [62]. Henrad y cols., en 1995 estudiaron una cohorte de 42 pacientes durante 11 años después de la seroconversión. Analizaron la carga viral en suero, antígeno p24 y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> anualmente. Concluyeron que bajas concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y niveles altos de carga viral están asociados a mayor riesgo de desarrollar SIDA [63].

En ese mismo año John W. Mellors y cols., determinaron la capacidad de la carga viral en plasma y en suero para predecir la evolución a SIDA, analizaron 62 muestras con la primera generación de ensayos para carga viral Quantiplex (bDNA). Los niveles de RNA del VIH en plasma en la primera visita fueron significativamente mayores en paciente que evolucionaron a SIDA [64]. Dos años después, compararon la eficacia de varios marcadores para predecir la evolución a SIDA y muerte en una cohorte de 1604 individuos durante un periodo de 10 años. Midiaron marcadores clínicos (candidiasis oral y fiebre), serológicos (niveles en suero de neopterin y microglobulina  $\beta_2$ ), celulares (número y porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y virológicos (carga viral en plasma). Los marcadores con mayor significancia estadística fueron la carga

viral y las concentraciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Formaron grupos con intervalos ascendentes de carga viral y observaron riesgo de evolución a SIDA mayor en los grupos con valores más altos de carga viral. Observaron los mismos resultados en grupos con concentraciones bajas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En este trabajo se concluyó que los mejores marcadores para predecir la evolución a SIDA son la carga viral y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> [15].

En 1998, A. J. Saah y cols., como parte de un estudio, examinaron la asociación entre la carga viral y las cT CD4<sup>+</sup>, en una cohorte de 139 individuos del *Multicenter AIDS Cohort Study*, donde observaron un coeficiente de correlación negativo. El riesgo relativo de evolución a SIDA fue proporcional al incremento de la carga viral e inversamente proporcional a los niveles de cT CD4<sup>+</sup> [9].

Nakota y cols., presentaron un trabajo donde se analizó la relación de marcadores inmunológicos y el índice tímico con las cT CD4<sup>+</sup> y la carga viral en pacientes sin tratamiento previo. Encontraron que las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> vírgenes correlacionan positivamente con las de cT CD4<sup>+</sup> totales y son inversamente proporcionales a los niveles de cT CD4<sup>+</sup> activadas. La carga viral correlacionó inversamente con las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> vírgenes, y por el contrario, se encontró una correlación positiva con las cT CD4<sup>+</sup> activadas. El índice tímico correlacionó positivamente con las cT CD4<sup>+</sup> vírgenes y con las cuentas totales, e inversamente con la carga viral y las CD4<sup>+</sup> activadas. Ellos concluyeron que la reducción en el índice tímico y/o la activación, contribuye a



la disminución de las células CD4<sup>+</sup> como consecuencia de niveles elevados de viremia [65].

### **Efecto de las infecciones oportunistas sobre la carga viral**

La estimulación inmune asociada a infecciones oportunistas en individuos infectados con el VIH provoca aumento de la carga viral. Un reporte demostró el incremento de la carga viral en plasma durante un brote de herpes simple en ocho individuos [66]. De igual forma, se registraron niveles altos de carga viral durante la fase aguda de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* [67].

Donovan y cols., reportaron un incremento del 360% en la media de la carga viral en 13 individuos durante una infección oportunista aguda. La carga viral fue descendiendo progresivamente después de la recuperación (2 meses después), a estos pacientes en ningún momento se les suspendió el tratamiento antirretroviral [68].

### **Tratamiento anti-VIH altamente activo (TAVAA)**

El TAVAA es una combinación de tres o más fármacos que actúan sobre enzimas esenciales del ciclo de replicación del VIH. La combinación más usada es de dos inhibidores de la enzima transcriptasa inversa, y un inhibidor de la

enzima proteasa. Este tratamiento provoca la disminución de la carga viral a niveles no detectables por las técnicas actuales (menos de 50 copias de RNA-VIH/mL) y su efecto puede sostenerse durante 2 a 3 años en promedio. Desde el punto de vista inmunológico, se observa un aumento en los niveles de cT CD4<sup>+</sup>. El resultado clínico del uso apropiado del TAVAA en los pacientes es la disminución de la incidencia de enfermedades oportunistas, mejoría en la calidad de vida y por tanto, una mayor supervivencia.

Un trabajo de David Ho, en 1995, demostró que los niveles de carga viral disminuyen exponencialmente al tratar a los pacientes con un inhibidor de la proteasa, en consecuencia las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> se incrementan. Esta relación se da de manera proporcionada y se concluyó que la cantidad de partículas virales son proporcionales al número de cT CD4<sup>+</sup> infectadas productivas y que mediante la carga viral es posible predecir la tasa de disminución o de aumento de las cT CD4<sup>+</sup> [14].

Estudios de la dinámica de la replicación viral en individuos que reciben TAVAA han mostrado que durante todos los estadios de la infección ocurre producción viral y destrucción de las cT CD4<sup>+</sup> de forma continua, rápida y elevada [69, 70]. La elevada tasa de replicación del VIH esta implicada en la resistencia a fármacos. La producción total promedio del VIH ha sido estimada en  $10.3 \times 10^9$  viriones por día, independientemente de la etapa de la enfermedad. La tasa de mutación de los retrovirus es de  $3 \times 10^{-5}$ /pares de bases/ciclo, el tamaño del genoma del VIH es de  $10^4$  pares de bases. Con una producción aproximada de

$10^{10}$  genomas por día, es muy probable que el VIH sufra entre  $10^4$  y  $10^5$  mutaciones por día, esto favorece que muchos individuos sean portadores de mutantes resistentes a los fármacos antes de iniciar el tratamiento [71].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La importancia de los niveles circulantes de células T CD4<sup>+</sup> y de la carga viral como marcadores pronósticos del desarrollo de SIDA se ha demostrado en varios estudios. En algunos análisis se ha concluido, por un lado, que la medida de la carga viral predice la tasa de disminución de las células T CD4<sup>+</sup> y, por otro lado, el número de partículas virales es proporcional al total de células T CD4<sup>+</sup> productivas infectadas [9, 15].

Dada la importancia de estos dos marcadores y la relación tan estrecha que existe entre ellos durante el curso de la infección, es interesante determinar si existe correlación entre ellos en una población específica. Los estudios realizados al respecto se han realizado en países donde los pacientes tienen mayor acceso al tratamiento antirretroviral en comparación con nuestro país. En algunos estudios que correlacionan estos dos marcadores se han incluido sujetos con tratamiento y sin tratamiento simultáneamente [9, 15, 49]. En otros estudios solo se han incluido pacientes con tratamiento [65, 72, 73]. Probablemente los resultados de esos estudios no reflejan el comportamiento natural de la interacción entre los dos marcadores porque se usaron poblaciones heterogéneas al tratamiento, que modifica de manera importante el comportamiento de las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y de la carga viral y en algunos casos no se describe si los pacientes presentaban infecciones oportunistas activas que tienen también un efecto sobre estos marcadores.

En vista de lo anterior, es importante conocer la correlación de la carga viral y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en una población de pacientes bien caracterizada desde los puntos de vista clínico, virológico e inmunológico. Desafortunadamente, en México existen muchos pacientes que no tienen acceso al tratamiento antirretroviral. Esto permite la realización de este estudio con una cohorte bien definida y homogénea de pacientes sin tratamiento previo y sin infecciones oportunistas activas en comparación con las analizadas en estudios previos.

## **HIPÓTESIS**

En los pacientes infectados por el VIH, sin tratamiento previo, debe existir una correlación inversa entre la carga viral en plasma y las concentraciones de células T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la correlación que existe entre la carga viral y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> circulantes en pacientes infectados con el VIH sin tratamiento previo de la cohorte del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

### **Específicos**

1. Determinar el número de copias del RNA-VIH/mL en plasma en los pacientes participantes.
2. Cuantificar las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en sangre periférica.
3. Determinar y analizar la correlación entre estos marcadores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio**

Estudio observacional, descriptivo, transversal en el que se realizó la medición de los marcadores, carga viral y concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> una sola vez a cada paciente, para evaluar la correlación entre ellos.

### **Población de estudio**

En este estudio se incluyeron 505 individuos con infección por VIH, documentada por evidencia de laboratorio. Los pacientes fueron reclutados del Servicio de Infectología para el Paciente Inmunocomprometido (SIPI), del INER.

## **Criterios de selección**

### **Criterios de inclusión**

1. Individuos con infección por VIH documentada.
2. Individuos sin tratamiento antirretroviral previo.

### **Criterios de exclusión**

1. Pacientes con infecciones oportunistas activas.
2. Pacientes tratados con activadores del sistema inmune.
3. Pacientes tratados con esteroides, inmunosupresores o reguladores de la respuesta inmune.



## **Medición de los marcadores**

### **Carga viral en plasma por el método RT-PCR Amplicor HIV-1**

Este procedimiento se basa en la retrotranscripción del RNA genómico viral y posterior amplificación del DNA complementario resultante mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [74]. El RNA viral se aisló del plasma de sangre tratada con anticoagulante EDTA. Con un agente caotrópico se destruye la membrana viral y las proteínas de la cápside del VIH, el RNA genómico viral se precipita con alcoholes para separarlo de los residuos en el medio.

### **Transcripción inversa**

La transcripción inversa y la amplificación por PCR se realizan por una enzima DNA polimerasa recombinante termoestable de *Thermus thermophilus* (*rTth* pol), dependiente de RNA y DNA. En presencia de  $Mn^{2+}$  y deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) la *rTth* extiende un primer (iniciador SKCC1B), que está marcado con biotina, para formar un DNAc al RNA objetivo.

### **Amplificación del objetivo**

Con los primers (iniciadores) marcados con biotina, SK145 (sentido) y SKCC1B (anti-sentido), se define y amplifica una secuencia de 155 nucleótidos dentro de

la región altamente conservada del gen *gag*. Con un aumento de temperatura (96° C) se desnaturaliza al híbrido RNA:DNAc, quedando expuestas las secuencias objetivo. Conforme disminuye la temperatura, el iniciador ascendente (SK145) se une específicamente con la cadena de DNAc. La *rTth* pol extiende el primer y se sintetiza una segunda cadena de DNA, resultando en una copia de DNA de doble cadena. Con aumento de temperatura (96° C) se separa la cadena y quedan libres las secuencias complementarias para los primers. Conforme desciende la temperatura SK145 y SKCC1B se unen con el DNA objetivo. Este paso se repite un número previsto de ciclos para formar copias de DNA de doble cadena (amplicones) con 155 pares de bases de extensión.

### **Reacción de hibridación**

Con una solución desnaturalizante se separan químicamente las dobles cadenas de DNA para dejarlas en cadena sencilla. A continuación se separan los productos de PCR del medio. Para esto se utilizan partículas magnéticas revestidas de una sonda de oligonucleótidos (CP35) que reconocen una región específica de los amplicones. CP35 se hibrida con los amplicones que a su vez están marcados con biotina. Mediante un magneto se captan las esferas y con un lavado se aparta el material no hibridado.

## **Reacción de detección**

A continuación se añade un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (AV-HRP). La estreptavidina se liga con alta afinidad a la biotina. Se extrae el conjugado no ligado lavando las partículas magnéticas nuevamente. Finalmente se añade una solución sustrato que contiene peróxido de hidrógeno y 3,3', 5,5'- tetrametilbencidina (TMB). En presencia de peróxido de hidrógeno, la peroxidasa de rábano picante conjugada con las partículas cataliza la oxidación de TMB para formar un complejo colorido cuya absorbancia es medida a una longitud de onda de 660 nm.

## **Determinación cuantitativa**

Este procedimiento es monitoreado por un control interno que se agrega desde el inicio al que se le aplican las mismas reacciones que al RNA blanco. El control interno (patrón de determinación) consiste en una cantidad conocida de moléculas de RNA no infeccioso que tiene 233 nucleótidos de extensión. Presenta regiones de reconocimiento a los primeros SK145 y SKCC1B. Se genera un producto de amplificación de la misma extensión del blanco (155 bases). La diferencia es que este control interno tiene modificada la región de conjugación para que reconozca a una sonda de oligonucleótidos distinta al blanco, SK102 acoplada a esferas magnéticas. La absorbancia a 660 nm es proporcional a la cantidad de amplicón del objetivo y del patrón de determinación. Se calcula la absorbancia total del VIH y del patrón de

determinación multiplicando la absorbancia en cada dilución por el factor de dilución y se selecciona la que contiene la dilución total máxima. La cantidad de RNA del VIH se calcula dividiendo la absorbancia del objetivo por la absorbancia del control interno, multiplicado por el número de moléculas de RNA del control usando una ecuación. En nuestro estudio los cálculos fueron realizados por el software que esta incluido en el equipo Cobas Amplicor.

### **Cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica por citometría de flujo con el equipo FACS Calibur**

Para la cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se utilizó un reactivo de inmunofluorescencia directa de tres colores llamado *TriTEST CD4/CD8/CD3* (Becton Dickinson). Que esta constituido por anticuerpos (Ac) monoclonales conjugados a fluorocromos. El anti-CD4 esta conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e identifica a los linfocitos T colaboradores/inductores por el antígeno CD4 Mr de 59 kDA [75]. El anti-CD8 esta conjugado a ficoeritrina (PE) y reconoce a los linfocitos T supresores/citotóxicos, se une a un antígeno expresado en la subunidad  $\alpha$  de 32 kDA del CD8 [76]. El anti-CD3 esta conjugado a la proteína peridín clorofila (PerCP), reconoce a los linfocitos T mediante la cadena  $\epsilon$  del complejo CD3, que esta unido al receptor de antígeno de las cT [77]. Los Ac se encuentran liofilizados en el fondo de los tubos *TruCOUNT*. Se tiñe un volumen conocido de sangre con anticoagulante EDTA directamente en estos tubos cuando el sedimento liofilizado se disuelve. Los Ac

se unen en forma específica a los antígenos de superficie de las células. Posteriormente las células migran en fila por un capilar, una por una, y pasan a través del haz de un láser a 488 nm. La luz láser se dispersa y también provoca que las células teñidas emitan fluorescencia. Estas señales de dispersión y fluorescencia son detectadas por el equipo; se genera una señal visualizada en una gráfica de dos planos, a partir de la cual se determina la cantidad de células que expresan el marcador de superficie buscado. Con estos datos el software MultiSET® calcula el número absoluto de células positivas/ $\mu\text{L}$ .

### **Análisis estadístico**

Se aplicó el método de correlación de Pearson para analizar la medida de la asociación lineal entre estos marcadores en la población (coeficiente de correlación,  $\rho$ ). En el análisis de los datos se utilizó preferentemente el logaritmo de la carga viral. Para observar el sentido de la medida de la asociación lineal se utilizaron rectas de regresión. Lo anterior se realizó con el programa SPSS versión 10.

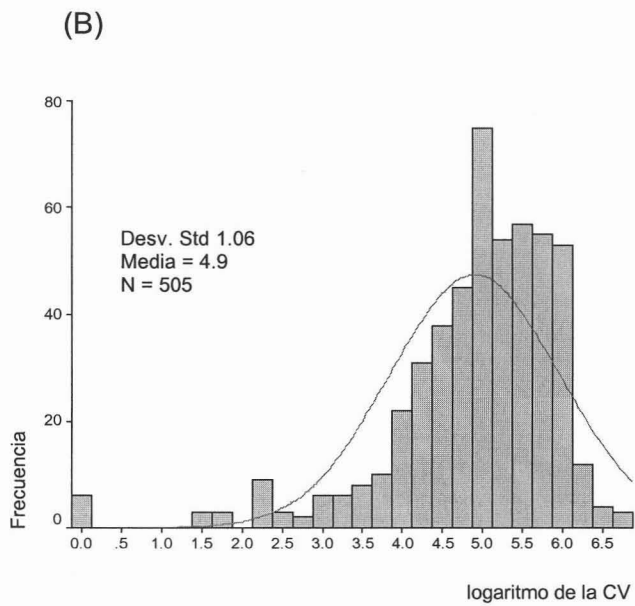
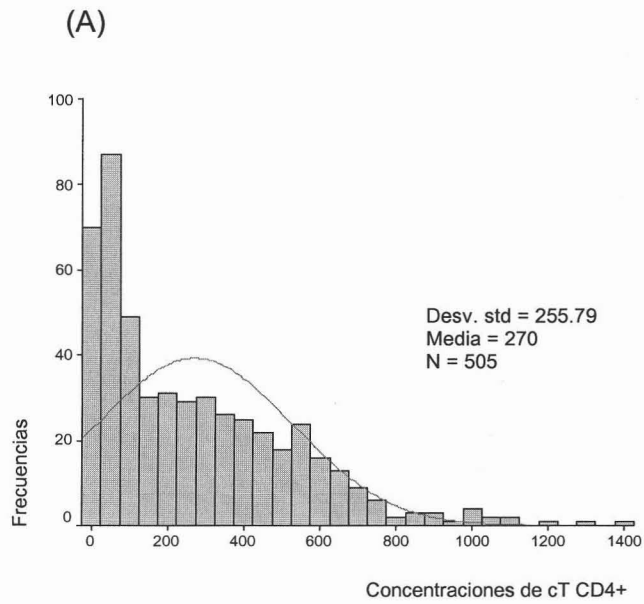
## RESULTADOS

La población de estudio abarcó 505 individuos (N=505) que cumplieron con los criterios de selección, 19% (94) mujeres y 81% (411) hombres, el promedio de edad fue de 36 años (DE 10.24).

Se midieron los marcadores: carga viral (copias de RNA-VIH/mL) y concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>/μL a todos los pacientes. Las medidas de carga viral obtenidas se ubicaron dentro del intervalo 1 a 7.39 X 10<sup>6</sup> copias de RNA-VIH/mL y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en 4 a 1424 células/μL. La tabla 1 resume la estadística descriptiva de las variables. La distribución de estos datos fue con una tendencia hacia extremos contrarios de la normal. En el caso de las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> la tendencia fue a hacia valores bajos; mientras que las cuantificaciones de carga viral tienden hacia valores altos (Fig. 4).

	N	Intervalo	Minimo	Maximo	Media	Desviacion std	Varianza
Concentraciones de cT CD4 <sup>+</sup>	505	1420	4	1424	270.55	255.79	65428.093
Carga viral	505	7389999	1	7390000	334267.54	633930.04	4.0E+11
log de la CV	505	6.87	.00	6.87	4.9010	1.0602	1.124
N valida	505						

**Tabla 1.** Estadística descriptiva de las variables medidas en la población de estudio que abarcó 505 pacientes. CV = carga viral.



**Figura 4.** Distribución de los marcadores en la población, **(A)** Concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>. **(B)** Logaritmo de las cargas virales.

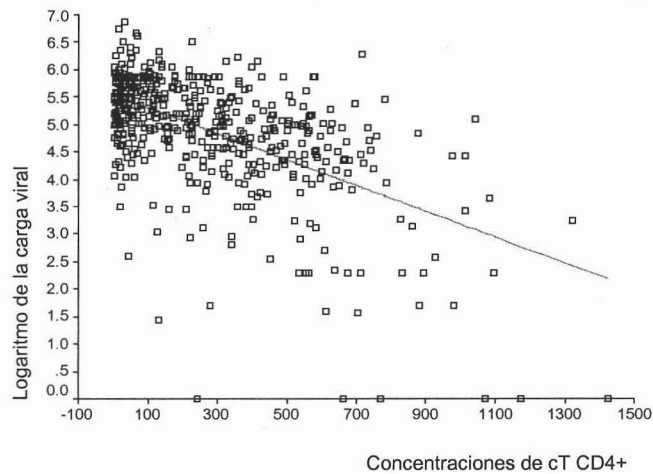
El 50% de nuestra población presentó cargas virales superiores a 100,000 copias de RNA-VIH/mL. La misma proporción de pacientes presentó concentraciones inferiores a 209 cT CD4<sup>+</sup>/μL. Solo poco más del 25% presentó concentraciones superiores a 400 cT CD4<sup>+</sup>/μL. Interesantemente, cuando se dividieron las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en cuartiles, se encontró que los puntos de corte son muy parecidos a los valores de cT CD4<sup>+</sup> que determinan la transición de un estadio de la infección a otro [43]. La tabla 2 muestra la distribución en percentiles.

Percentiles	Marcadores		
	Concentraciones de cT CD4 <sup>+</sup>	Carga Viral	log de la carga viral
25	53	31100	4.49
50	209	117000	5.07
75	427	425000	5.63

**Tabla 2.** Distribución en percentiles para los marcadores medidos en la población.

Se calculó la medida de la asociación lineal entre las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y el logaritmo (log) de la carga viral. En esta población el log de la carga viral correlacionó inversamente de manera significativa con las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> ( $\rho = -0.569$ ,  $p < 0.001$ ) (Tabla 3). En la figura 5 se muestra el ajuste de la curva entre las variables conforme se modifican las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>.





**Figura 5.** Regresión lineal que muestra el ajuste de la curva conforme aumentan las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>. Los puntos representan las 505 mediciones, la línea es la regresión lineal calculada para los puntos.

Como se muestra, esta población representa a pacientes en distintos estadios de la infección. El siguiente paso fue determinar si existe relación entre estos marcadores en pacientes representantes de las distintas etapas de la enfermedad. Se determinó la correlación entre los marcadores en grupos formados por el mismo número de pacientes para que tuvieran el mismo peso. Aprovechando que los puntos de corte en los cuartiles para CD4<sup>+</sup> son muy parecidos a las concentraciones usadas para caracterizar los distintos estadios de la infección, se formaron cuatro grupos con intervalos ascendentes de cT CD4<sup>+</sup> tomando como base esta distribución (tabla 2), y se analizó la correlación en ellos. Los grupos se limitaron por los siguientes intervalos de cT CD4<sup>+</sup>/μL, I: 1-52, II: 53-208, III: 209-426 y IV: más de 427.

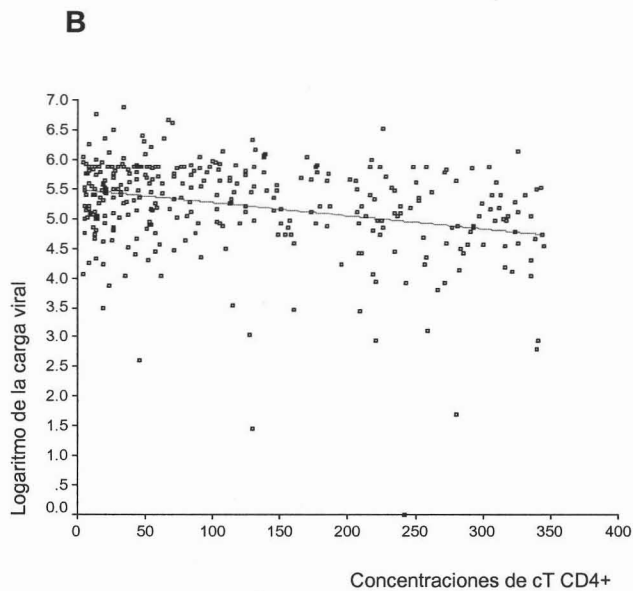
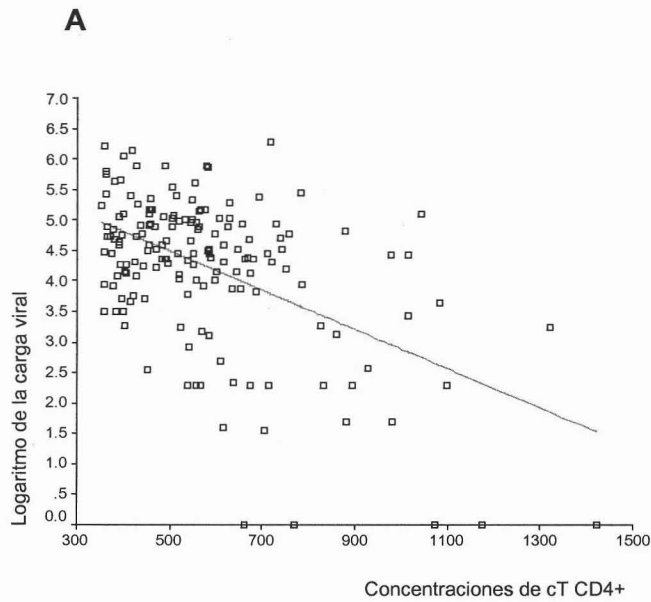
Aunque en la población total se encontró correlación inversa significativa entre los marcadores, en el análisis de estos grupos no fue así. La tabla 3 muestra los resultados de correlación en estos grupos. Solo se observó correlación inversa significativa en el grupo IV ( $\rho = -0.518$ ,  $p < 0.001$ ), en los demás no fueron significativas. Además se observó que la negatividad de la relación en la población no esta dada por el grupo I (1-52 cT CD4<sup>+</sup>/μL), en este se encontró una correlación positiva muy próxima a cero. Se observa que conforme disminuyen las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> la correlación pierde fuerza.

	Coeficiente de correlación	P
Población	-0.569	<0.001
Grupos		
I: 1 –52*	0.071	0.433
II: 53 – 208*	-0.125	0.160
III: 209 – 426*	-0.099	0.274
IV: mas de 427*	-0.518	< 0.001

\* Intervalos de cT CD4<sup>+</sup>/μl

**Tabla 3.** Análisis de correlación entre las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y el logaritmo de la carga viral observados en la población (N=505) y en los grupos formados con intervalos ascendentes de cT CD4<sup>+</sup> tomando como punto de corte los valores de los cuartiles.

Las guías internacionales para el inicio del TAVAA en adultos, recomiendan vigilar las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y la carga viral para tomar decisiones terapéuticas. Proponen ciertos valores en estos marcadores como indicadores del inicio, con los que se esperan resultados óptimos de respuesta al tratamiento. Los estudios dirigidos a la búsqueda de estos parámetros se han conducido en poblaciones de distintos países [78]. A continuación se determinó si existe relación entre los marcadores en subgrupos específicos en nuestra población, tomando como punto de corte esos valores. En primer lugar se dividió la población en dos grupos tomando como punto de corte 350 cT CD4<sup>+</sup>/μL, que es el valor determinante para las decisiones terapéuticas según las guías internacionales [78]. En el análisis se encontró que en estos grupos existe correlación inversa significativa. La correlación es más fuerte en el grupo formado con concentraciones superiores a 350 cT CD4<sup>+</sup>/μL, aunque solo ~33% de la población presentó estos valores (Tabla 4). En la figura 6 se muestran las regresiones estimadas para cada grupo. Se observa que la pendiente es más acentuada en el grupo con concentraciones elevadas de cT CD4<sup>+</sup>. Las gráficas se colocaron de acuerdo al modelo de progresión de la enfermedad; primero la estimada para el grupo con mayores concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>, después la del grupo con concentraciones bajas. Con esto se confirma que la correlación entre los marcadores se pierde conforme avanza la enfermedad o disminuyen las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>.



**Figura 6.** Regresión lineal que muestra el ajuste de la curva para los grupos formadas tomando como punto de corte concentraciones de 350 cT CD4<sup>+</sup>/μL.

**A.** Más de 350 cT CD4<sup>+</sup>/μL. **B.** Menos de 350 cT CD4<sup>+</sup>/μL.

Concentraciones de cT CD4 <sup>+</sup> *	n	% en la población	Coefficiente de correlación	P
Menores a 350	340	67.3	-0.293	<0.001
Mayores a 350	165	32.7	-0.509	<0.001

\* cT CD4<sup>+</sup>/μL

**Tabla 4.** Muestra las frecuencias y el análisis de correlación para los grupos formados tomando como punto de corte las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> recomendadas por las guías internacionales para las decisiones terapéuticas.

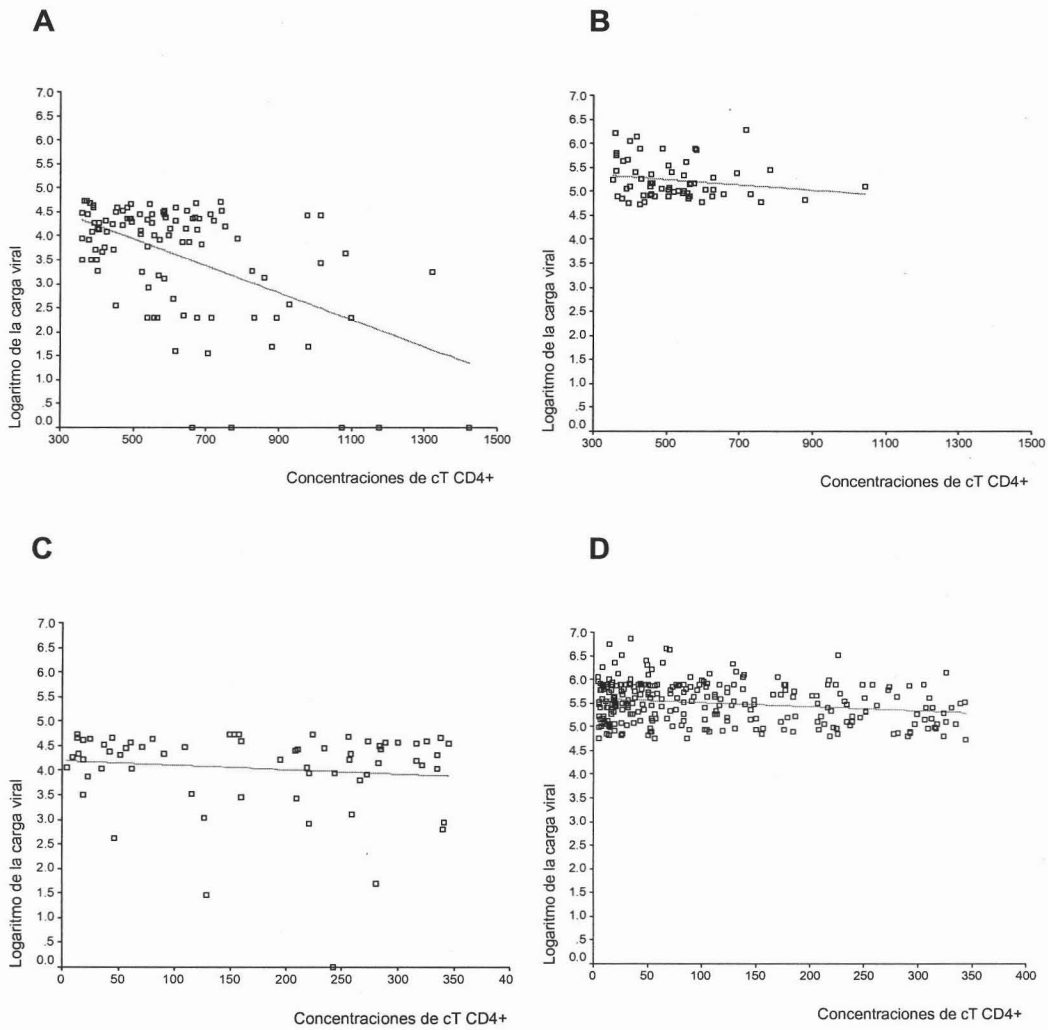
Las guías internacionales para el inicio del TAVAA manifiestan no solo considerar las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>, también recomiendan tomar en cuenta valores de carga viral mayores a 55,000 copias para iniciar tratamiento [78]. Debido a eso, el siguiente paso fue incluir esa medida en el análisis. Con ese valor se dividieron los dos grupos anteriores para formar cuatro subgrupos. Esta clasificación nos permitió observar algunas características de nuestra población. Más del 50% de los pacientes presenta concentraciones inferiores a 350 cT CD4<sup>+</sup> y carga viral mayor a 55,000 copias; mientras que solo el 20% presenta valores inversos, más de 350 cT CD4<sup>+</sup> y carga viral menor a 55,000 copias. Estos fueron los subgrupos con más representatividad (Tabla 5). Con el análisis de correlación en estos grupos se determinó en cuales existe relación entre los marcadores. En todos encontramos correlaciones inversas, pero solo fueron significativas en algunos subgrupos (Tabla 5). La figura 7 muestra el ajuste de la curva para estos subgrupos, de manera interesante, se observa cuales habrían sido los “puntos palanca” en la regresión inicial hecha en la población total. Las gráficas se ordenaron de acuerdo al comportamiento

esperado en los marcadores durante el desarrollo de la historia natural de la enfermedad, empezando por las regresiones para los grupos con mayor concentración de cT CD4<sup>+</sup> y menor carga viral. Esto nos permite observar como se podría ir perdiendo la correlación entre los marcadores conforme avanza la enfermedad.

cT CD4 <sup>+</sup> /μL	n	CV	Frec.	% en la clase	% en la población	ρ	P
<350	340	<55,000	65	19	13	-0.121	0.335
		>55,000	275	81	54.5	-0.201	< 0.001
>350	165	<55,000	101	62	20	-0.526	< 0.001
		>55,000	64	38	12.5	-0.185	0.143

CV=carga viral, Frec=Frecuencia, ρ = coeficiente de correlación

**Tabla 5.** Distribución de los datos usando como punto de corte las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y los valores de carga viral que determinan las decisiones terapéuticas de acuerdo con las guías internacionales. Se muestran los resultados del análisis de correlación para cada subgrupo.



**Figura 7.** Regresiones que muestran el ajuste de la curva en los subgrupos formados utilizando como punto de corte los valores de  $cT\ CD4^+/\mu L$  y carga viral recomendados por las guías internacionales para las decisiones terapéuticas. **A.** Más de  $350\ CD4^+$  con menos de 55,000 copias. **B.** Más de 350  $CD4^+$  con más de 55,000 copias. **C.** Menos de  $350\ CD4^+$  con menos de 55,000. **D.** Menos de  $350\ CD4^+$  con más 55,000 copias.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se correlacionaron las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en sangre periférica y los valores de carga viral (RNA-VIH) en plasma, en una cohorte bien caracterizada de individuos infectados por el VIH en México. De acuerdo con la clasificación clínica actual y tomando como base las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>, la población de estudio estuvo conformada mayoritariamente por pacientes en estadios avanzados de la infección, con un promedio de 270 cT CD4<sup>+</sup>/μl. Al mismo tiempo se observó un promedio alto en la carga viral de ~33.5 X 10<sup>5</sup> copias. Los datos se distribuyeron con tendencia hacia extremos contrarios de la normal. Esto muestra que la población no era homogénea en cuanto al estadio de la infección, la mayoría de las frecuencias observadas corresponden a estadios avanzados de la infección (Figura 4) [43]. La población representa lo que típicamente se observa en la práctica clínica en México, donde lo usual es que los pacientes se encuentren en estadios avanzados de la infección cuando son captados. De forma interesante, al determinar la distribución en percentiles de acuerdo con las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>, se encontró que los cuartiles son muy parecidos a los puntos de corte en cT CD4<sup>+</sup> que determinan la transición de un estadio a otro en la enfermedad (Tabla 2) [43].

Los resultados muestran que existe una fuerte interrelación entre la carga viral y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> a nivel poblacional. Se encontró correlación inversa significativa ( $\rho = -0.569$ ,  $p < 0.001$ ). Este coeficiente de correlación junto



con la regresión mostrada en la figura 5, muestran que podría existir una fuerte asociación entre los viriones libres y la disminución de cT CD4<sup>+</sup>. Sin intentar dar explicaciones de causa efecto, esta asociación es una evidencia de que la viremia es un factor central en la patogénesis de la infección por VIH. Esto va de acuerdo con estudios en los que se ha determinado que el nivel de carga viral determina el pronóstico de la enfermedad [44, 49]. Los resultados obtenidos son comparables, hasta cierto punto, a los obtenidos en estudios previos. Mellors y cols., coincidentemente, también encontraron una correlación inversa entre estos marcadores ( $\rho=-0.420$ ,  $p < 0.05$ ,  $N=1604$ ). En su estudio concluyen que el mejor pronóstico de evolución en la infección se obtiene del análisis de la carga viral y las concentraciones cT CD4<sup>+</sup> [15]. Aunque realizaron el estudio en una población de mayor tamaño, la diferencia trascendental con el presente trabajo es que los individuos participantes en su estudio se encontraban en etapas tempranas de la infección. Presentaban en promedio concentraciones superiores a 500 cT CD4<sup>+</sup>/μl, casi el doble del encontrado en la nuestra. En otro estudio, los mismos autores encontraron resultados equivalentes. Aunque la población de estudio ahora fue de menor tamaño, presentaba características semejantes a la anterior en cuanto al estado inmune, los pacientes mayoritariamente se encontraban en estadios tempranos de la infección con una media alta en las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>. En este estudio los autores sugieren que la carga viral es mejor determinante pronóstico de la infección sobre las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> [49]. Tomando en cuenta que la diferencia entre la población de estudio del presente trabajo y las utilizadas por trabajos previos radica en distintas concentraciones de cT

CD4<sup>+</sup> fue muy acertado realizar un análisis en grupos específicos de la población total.

Así, aunque se encontró asociación significativa a nivel población, en el análisis de correlación en los grupos que pueden representar distintos estadios de la infección (Tabla 2) se encontraron resultados distintos (Tabla 3). Solo se encontró correlación inversa significativa en el grupo con las más altas concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> (Tabla 3, IV). En los restantes grupos las correlaciones fueron muy próximas a cero y no significativas, inclusive en el grupo con las concentraciones más bajas de cT CD4<sup>+</sup> se encontró correlación positiva (Tabla 3, I). Estos resultados muestran que existe una fuerte asociación entre los marcadores en los estadios tempranos de la infección, pero conforme avanza la enfermedad la interrelación entre ellos se va perdiendo. Lo anterior es respaldado por los resultados de correlación obtenidos al dividir la población en dos grupos tomando como punto de corte 350 cT CD4<sup>+</sup>/μl (Tabla 4). La correlación inversa entre los marcadores es más fuerte en el grupo con concentraciones superiores a 350 cT CD4<sup>+</sup>/μl, por debajo de ese valor la correlación pierde fuerza, por lo que se observan distintas pendientes en cada grupo (Figura 6). Confirmando así que los datos en los grupos con bajas concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> no tienen relación matemática, aunque todos los grupos tienen el mismo peso al estar formados con el mismo número de individuos. Estas observaciones sugieren que probablemente las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> pueden ser menos importantes que la carga viral para monitorear pacientes en estadios tempranos de la infección por VIH.

La varianza en la carga viral disminuye conforme avanza la infección. En lo que corresponde a las etapas iniciales los valores de carga viral varían considerablemente entre los pacientes. Esto es mostrado por la amplia dispersión horizontal de los puntos alrededor de la línea, en la parte que corresponde a mayores concentraciones de  $cT\ CD4^+$ , de la gráfica de regresión para la población (Figura 5), y detallado por las regresiones para los grupos formados con los valores de  $cT\ CD4^+$  que determinan las decisiones terapéuticas (Figura 6). Por el contrario, conforme disminuyen las concentraciones de  $cT\ CD4^+$ , que es un evento relacionado con etapas posteriores de la enfermedad, la variabilidad en la carga viral disminuye tendiendo hacia valores elevados. Al principio de la enfermedad la replicación del VIH es contenida de forma no absoluta y variable en cada individuo. Pero con el paso del tiempo la replicación gradual del VIH provoca daños en el hospedero que resultan en la reducción de las  $cT\ CD4^+$ . A primera vista los datos sugieren que la reducción está fuertemente asociada a la replicación viral, pero esta no es del todo producto de la carga viral, puesto que es posible encontrar sujetos con cargas virales altas y niveles de  $cT\ CD4^+$  dentro del límite común en personas sanas. La pérdida en la interdependencia de los marcadores conforme avanza la enfermedad demuestra que existen variaciones biológicas en cada etapa. Lo que sugiere que la carga viral es importante como una medida relativa de los fenómenos biológicos que ocurren en un sujeto infectado de un punto en el tiempo a otro, como resultado de la interacción entre factores virológicos y genéticos. Que en adición están influenciados por factores genéticos distintos en cada sujeto. Probablemente

las células en circulación no influyen mucho en el mantenimiento de la carga viral a lo largo de la infección, o por lo menos en las etapas finales.

El tratamiento antirretroviral restablece la interrelación entre los marcadores, probablemente porque reduce la carga viral de forma efectiva, de niveles muy altos, por arriba de los límites confiables hasta niveles cuantificables o por debajo de los límites confiables. El efecto no es tan amplio en la recuperación de las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>. Un estudio realizado por Hughes y cols demostró que la interrelación entre los marcadores en etapas finales de la infección se puede recuperar mediante el tratamiento antirretroviral. Ellos analizaron la relación entre estos marcadores en una población con un promedio de concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> correspondiente a etapas finales (145 células/ $\mu$ l) y que estuvo bajo tratamiento previamente durante por lo menos 6 meses. Como parte de sus resultados encontraron que los marcadores muestran una interdependencia fuerte en respuesta al tratamiento en pacientes en este estadio [72]. De forma contraria a lo que sucede en pacientes que no tienen tratamiento y que se encuentran en este estadio (Tabla 3. I, II).

El riesgo de progresión en la enfermedad se incrementa de forma directa con la carga viral y de forma inversa con las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup>. Concentraciones de 350 cT CD4<sup>+</sup> son un punto crítico en la historia de la enfermedad. La figura 6 muestra como cambia la interdependencia entre los marcadores conforme aumentan las concentraciones de cT cd4<sup>+</sup>. Los pacientes

con concentraciones superiores a este valor tienden a presentar valores de carga viral muy variables que pueden ser desde muy bajos hasta rondar el límite superior confiable. Por otro lado, en los pacientes con concentraciones inferiores a este valor la carga viral se eleva disminuyendo la varianza. Pacientes con valores de carga viral altos pueden desarrollar SIDA más rápidamente porque la producción viral elevada exhausta la capacidad del hospedero para compensar las CD4<sup>+</sup> destruidas [15]. La replicación del VIH, reflejada en la carga viral, es un importante determinante en la progresión de la enfermedad.

Cuando se incluyó en el análisis los valores de carga viral recomendados por las guías internacionales para el inicio del tratamiento y se formaron subgrupos tomando como punto de corte estos valores, se encontró que solo existe relación matemática entre los marcadores cuando se examinan subgrupos con valores opuestos en los marcadores. Estos subgrupos fueron los más representados en la población (Tabla 5). En las regresiones lineales se observan fuertes cambios de pendiente conforme disminuyen las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y aumentan los valores de carga viral, esto apoya la observación de que existen diferencias biológicas en la interacción microorganismo-hospedero en cada estadio de la enfermedad. Cuando se ha evolucionado ha concentraciones inferiores a 350 cT CD4<sup>+</sup>/μl y no se cuenta con tratamiento el riesgo de progresión aumenta pues en estas circunstancias se observa que la carga viral es muy elevada, muy pocos pacientes mantienen cargas virales bajas en esta circunstancia (Figura 7C y tabla 5). Altos niveles

de carga viral en plasma se han asociado con un estado clínico pobre [72]. Análisis de riesgo proporcional para la progresión en la infección indican que el monitoreo de concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> y carga viral perfecciona la efectividad del tratamiento en la práctica clínica [70].

Los resultados del presente trabajo son consistentes con los reportados por varios autores. Sin embargo, a diferencia de ellos, esta población es representativa de los sucesos en distintos estadios de la infección. Esta comparación permitió comprobar que la interacción entre estos marcadores varía de un estadio a otro. Además se debe tomar en cuenta que las poblaciones en cada caso presentan características propias que provocan respuesta de forma variable a la infección.

En conclusión, los niveles de carga viral se asocian de forma significativa con las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en los estadios iniciales de la infección. Los niveles de carga viral varían entre individuos con concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> elevadas, esta variación se va perdiendo conforme disminuyen las cT CD4<sup>+</sup>. Concentraciones de 350 cT CD4<sup>+</sup> son un punto crítico en la historia de la enfermedad. Concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> inferiores a ese valor correlacionan con valores altos de carga viral. Mientras que por arriba de ese valor se observan valores de carga viral variables pero discretos. La carga viral por si misma no explica la reducción en las cT CD4<sup>+</sup>.

En los pacientes infectados por VIH del INER, sin tratamiento previo y sin infecciones oportunistas activas, existe correlación negativa (inversamente proporcional) entre la carga viral y las concentraciones de cT CD4<sup>+</sup> en circulación de forma global, también se observa en los grupos con cT CD4<sup>+</sup> que indican las decisiones terapéuticas de acuerdo con las guías internacionales. Estos datos concuerdan con los mostrados en otros estudios, pero son los primeros realizados en una cohorte bien definida de pacientes en México.

## REFERENCIAS

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599):868-71.
2. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599):865-67.
3. Wain HS. Is antigenic variation of HIV important for AIDS and might be expected in the future? In: Stephen SM (ed). *The evolutionary biology of viruses*. 1994. New York: Raven Press.
4. Smith TF, Srinivasan A, Schochetman G, Marcus M, Myers G. The phylogenetic history of immunodeficiency viruses. *Nature* 1988;333(6173):573-575.
5. Tsujimoto H, Hasegawa A, Maki N, Fukasawa M, Miura T, Speidel S, Cooper RW, Moriyama EN, Gojobori T, Hayami M. Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandril. *Nature* 1989;341(6242):539-41.



6. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225(4664):840-2.
7. Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy, VIIth Report of the ICTV, Academic Press, San Diego, 2000.*
8. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;124(7):654-63.
9. Saah AJ, Hoover DR, Weng S, Carrington M, Mellors J, Rinaldo CR Jr, Mann D, Apple R, Phair JP, Detels R, O'Brien S, Enger C, Johnson P, Kaslow RA. Association of HLA profiles with early plasma viral load, CD4+ cell count and rate of progression to AIDS following acute HIV-1 infection. Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 1998;12(16):2107-13.
10. Tindall B, and Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991;5(1):1-14.
11. Horsburgh CR Jr, Ou CY, Jason J, Holmberg SD, Longini IM Jr, Schable C, Mayer KH, Lifson AR, Schochetman G, Ward JW, et al. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 1989;2(8664):637-40.
12. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990;322:166-72.

13. Ho DD, Moudgil T, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989;321(24):1621-25
14. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M.. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection. *Nature* 1995;373(6510):123-6.
15. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997;126(12):946-54.
16. Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 1995;83(4):569-76.
17. Franke EK, Luban J. Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology* 1996;222(1):279-82.
18. Poznansky M, Lever A, Bergeron L, Haseltine W, Sodroski J. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* 1991;65(1):532-6.
19. Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* 1993;67(12):7229-37.
20. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 1988;331(6153):280-3.

21. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 1992;256(5065):1783-90.
22. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 1990;249(4976):1555-8.
23. Ashorn P, McQuade TJ, Thaisrivongs S, Tomasselli AG, Tarpley WG, Moss B. An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(19):7472-6.
24. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998;393(6686):648-59.
25. Harrich D, Ulich C, Gaynor RB. A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* 1996;70(6):4017-27.
26. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989;338(6212):254-7.
27. Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* 1989;63(9):3708-13.
28. Garcia JV, Miller AD. Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* 1992;143(1):52-5.

29. Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 1996;70(7):4283-90.
30. Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7311-15.
31. Braaten D, Franke EK, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 1995;69:6859-64.
32. Sato A, Igarashi H, Adachi A, et al. Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes* 1990;4:303-12.
33. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 1992;66(12):7193-7200.
34. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MA, et al. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990;64:621-29.
35. Høglund S, Ohagen A, Lawrence K, et al. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994;201(2):349-355.
36. Douek D, Picker L, Koup R. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol* 2003;21:265-304.
37. Kwa D, Vingerhoed J, Boeser-Nunnink B, Broersen S, Schuitemaker H. Cytopathic effects of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 variants on different CD4(+)-T-cell subsets

- are determined only by coreceptor expression. *J Virol* 2001;75(21):10455-10459.
38. White JM. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu Rev Physiol* 1990;52:675-97.
39. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991;324(5):308-17.
40. Cullen BR, Green WC. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 1989;58(3):423-6.
41. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998;280:1880-3.
42. Reyes-Terán G, Alcocer-Varela J. Patogénesis de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. *Rev Invest Clin* 1994;46:113-47.
43. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992 Dec;41(RR-17):1-19.
44. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virological characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998;128:613-20.
45. Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991;5(1):1-14.
46. Pantaleo G, Fauci AS. Tracking HIV during disease progression. *Curr Op Immunol* 1994;6:600-4.
47. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998;339:33-9.

48. Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. Second edition. 1998. ASM Press. Washington, D.C., U.S.A.
49. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV Infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272(5265):1167-70.
50. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP, et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 1994;370(6489):463-7.
51. Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Toward understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 1996;271:324-28.
52. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332:201-08.
53. Liegler, T., Grant, R. HIV viral load Assays. HIV InSite Knowledge Base Chapter. February 2001.
54. Pitak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749-54.
55. Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy of HIV infection in 1997: Updated recommendations of the international AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 1997;277:1962-69.

56. Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD, Volberding PA. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med* 1996;6:625-29.
57. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut* 1989;59:200-06.
58. Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:598-605.
59. Giorgi JV, Hultin LE. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. *Clin Immunol Newslett* 1990;10:55-61.
60. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 1990;4:479-497.
61. Centers for Disease Control. 1997 Revised guidelines for performing CD4<sup>+</sup> T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR*. 1997;46(No. RR-2):1-29.
62. Coombs RW, Welles SL, Hooper C, et al. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. *J Infect Dis* 1996;174:704-12.
63. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, et al. Natural History of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA* 1995;274:554-58.
64. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR Jr, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, Gupta P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995;122(8):573-79.

65. Nakota M, Pu M, Spritzler J, Gross B, Shafer R, Robbins G, Pollard RB. Relationship of immunological markers and thymic index to CD4 T cells and HIV RNA at baseline in treatment naive HIV-infected patients. XIV International AIDS Conference. Barcelona 2002.
66. Mole L, Ripich S, Margolick D, et al. Plasma HIV RNA levels are increased during active herpes simplex virus infection. In: Program and Abstracts of the 2<sup>nd</sup> National Conference on Human Retroviruses and Related Infections. Washington, DC. January 29 – February 02. Abstract 239.
67. Goletti D, Weissman D, Jackson RW, et al. Effects of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication: Role of immune activation. *J Immunol* 1996;157:1271-78.
68. Donovan RM, Bush CE, Markowitz NP, et al. Changes in virus load markers during AIDS-associated opportunistic diseases in human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Infect Dis* 1996;174:401-3.
69. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373(6510):117-22.
70. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, et al. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271(5255):1582-1586.
71. Najera I, Holguin A, Quiñones-Mateu ME, et al. Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: Mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol* 1995;69:23-31.



72. Hughes MD, Johnson VA, Hirsch MS, Bremer JW, Elbeik T, Erice A, Kuritzkes DR, Scott WA, Spector SA, Basgoz N, Fischl MA, D'Aquila RT. Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team. *Ann Intern Med* 1997;126(12):929-38.
73. Garcia F, Vidal C, Gatell JM, Miró JM, Soriano A, Pumarola T. Viral load in asymptomatic patients with CD4+ lymphocyte counts above 500x10<sup>6</sup>/l. *AIDS* 1997;11(1):53-57.
74. Mulder, J. McKinney, N. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J Clin Microbiol* 1998;36(10): 292-300.
75. Organizing Committee of the Fourth International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. Appendix A: CD guide. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press Inc; 1989:1074-93.
76. Moebius U. Cluster report: CD8. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:342-43.
77. Van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood* 1988;71:603-12.

78. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection. DHHS, 2004.

**ANEXO**  
**METODOLOGÍAS**

**I. Carga viral en plasma por el método COBAS-Amplicor HIV-1  
Monitor (RT-PCR Roche Diagnostics)**

**Reactivos**

De preparación de la muestra

- HIV-1 QS, v1.5 estándar de cuantificación.
- HIV-1 Lys (solución de lisis)
- HIV-1 Dil (Diluyente)
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Agua estéril.

Controles

- NHP Plasma Humano Normal
- HIV-1 (-)C (Control negativo de HIV-1)
- HIV-1 L(+)C (Control positivo bajo de HIV-1)
- HIV-1 H(+)C (Control positivo alto de HIV-1)

De amplificación:

- HIV-1 MMX v1.5 (Master mix HIV-1 monitor)

- HIV-1 Mn<sup>2+</sup> v1.5 (Solución de manganeso)

#### Específicos de detección

- AD3 (Reactivo de dilución del amplicón)
- IM PS1, v1.5 (Sonda HIV-1 MONITOR de suspensión 1)
- IM4, v1.5 (Sonda HIV-1 MONITOR de suspensión 2)
- IQ PS1, v1.5 (Sonda HIV-1 MONITOR de patrón de determinación cuantitativa, suspensión 1)
- IQ4, v1.5 (Sonda HIV-1 MONITOR de patrón de determinación cuantitativa, suspensión 2)

#### Genéricos de detección

- DN4 (Solución de desnaturalización)
- CN4 (Conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante)
- SB3 (Sustrato A)
- SB (Sustrato B)

#### Buffer de lavado

- WB, Solución de lavado concentrada (10x)

#### Material y equipos

- Tubos con tapa a rosca de 2mL, estériles.
- Pipetas serológicas estériles desechables de 10 mL.

- Pipetas estériles de transferencia desechables de punta fina, libres de RNasa.
- Micropipetas
- Puntas desechables con filtro para aerosol y libres de RNasa de 200 y 1000  $\mu$ l.
- Tubos de polipropileno o poliestireno de 50 mL.
- Pipeteador mecánico
- Vórtex
- Ultracentrifuga refrigerada con rotor a ángulo fijo
- Probetas de 1000 mL
- Campana de flujo laminar
- Anillos-A COBAS AMPLICOR equipado con 12 tubos. (A-Rings)
- Sujetador del anillo-A
- Rejillas de copas D (D-cups)

### **Precauciones**

Esta prueba se realiza con plasma humano recolectado a partir de sangre tratada con anticoagulantes EDTA o ACD. La heparina inhibe la amplificación y no debe usarse en este procedimiento. Evitar la contaminación microbiana y con ribonucleasas de los reactivos. Las tareas de laboratorio deben realizarse de un modo unidireccional, desde la zona de pre-amplificación hacia la zona de post-amplificación. Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas por lo que es necesario leer el manual de bioseguridad del

laboratorio. Varios reactivos contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre para formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar soluciones que contengan azida sódica por las cañerías del laboratorio, se deben enjuagar con un gran volumen de agua. El **SB** y el sustrato de trabajo (Mezcla de reactivos **SB3** y **SB**) contienen dimetilformamida, una sustancia tóxica a dosis orales elevadas, que en mujeres embarazadas puede ser nociva para el feto. La solución de lisis (**LYS**), que contiene tiocianato de guanidina y el **IM4** e **IQ4 v1.5**, que contienen tiocianato de sodio, no deben tener contacto con solución de hipoclorito de sodio, debido a que producen un gas sumamente tóxico.

## Procedimiento

Pre-amplificación: Preparación de la muestra y el control

1. Rotular un tubo estéril de 2.0 mL con tapa a rosca para cada muestra que va a ser procesada (21 tubos) y 3 tubos adicionales para cada control CN (control negativo), CL (control positivo bajo), CH (control positivo alto). Poner una marca de orientación en cada tubo.
2. Preparar la solución de trabajo del buffer de lisis. Disolver los cristales que se formen en el buffer de lisis (**HIV-1 LYS**) calentándolo a 25-37° C y/o mezclándolo vigorosamente. Al momento de usarlo debe estar a temperatura ambiente y sin cristales. Mezclar el estándar de cuantificación **HIV-1 QS, v1.5** y añadir 100 µl a un frasco de HIV-1 Lys. Mezcle bien agitando en el vórtex.

3. Añada 600  $\mu$ l de la solución de trabajo del buffer de lisis a cada tubo de 2.0 ml.
4. Añada 200  $\mu$ l de plasma humano normal (**NHP**), previamente mezclado por vórtex, a los tubos que serán utilizados para procesar los controles (CN, CL y CH) y mezclar.
5. Mezclar los tubos que contienen los controles: **HIV-1(-)C**, **HIV-1L(+)**C y **HIV-1H(+)**C y añadir 50 $\mu$ l a su correspondiente tubo. Mezclar.
6. Agregar 200  $\mu$ l de cada **muestra de plasma**, previamente mezclada, a su tubo correspondiente que contiene la solución de trabajo del buffer de lisis. Mezclar y a continuación incubar todos los tubos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Añadir 800  $\mu$ l de **isopropanol** a cada tubo. Mezclar hasta que se homogenice la muestra.
8. Colocar los tubos en la microcentrífuga con la marca de orientación hacia fuera. A esta marca se alineará el pellet. Centrifugar todos los tubos durante 15 minutos a 16,000g a temperatura ambiente.
9. Identificar la marca de orientación y si es posible el pellet. Retirar el sobrenadante con una pipeta de transferencia con punta fina, por la pared contraria a la que se deposita el pellet, lentamente y con cuidado.
10. Añadir 1000  $\mu$ l de **etanol al 70%** a cada tubo y mezclar bien.
11. Colocar los tubos en la microcentrífuga con la marca de orientación hacia fuera. Centrifugar durante 5 minutos a 12,500-16,000g a temperatura ambiente.

12. Identificar la marca de orientación y el pellet. Retirar el sobrenadante con una pipeta de transferencia con punta fina, por la pared contraria a la que se deposita el pellet, lentamente y con cuidado. Retirar tanto sobrenadante como sea posible. **Residuos de etanol pueden inhibir la amplificación.**
13. Añadir 400  $\mu\text{l}$  de **HIV-1 DIL** y mezclar vigorosamente en el vórtex durante 10 segundos. Tanto las muestras como los controles deben ser procesados dentro de las 2 horas siguientes o bien pueden ser congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por hasta una semana.

Pre-amplificación: preparación del reactivo

14. Preparar la mezcla maestra de trabajo, con la pipeta y las puntas destinadas a este fin, añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de **HIV-1 Mn<sup>2+</sup>, v1.5** previamente mezclado, a un vial de master mix, **HIV-MMX**. Mezclar por inversión durante 10 a 15 veces, **NO** usar vórtex.
15. Añadir 50  $\mu\text{l}$  de la mezcla maestra a cada tubo de los A-rings, utilizando la pipeta destinada a este fin. Los tubos no deben permanecer abiertos.
16. Agitar cada muestra durante 5 segundos. Añadir 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra y control ya procesados a su correspondiente tubo del A-ring, utilizar una punta para cada muestra. No transferir ningún precipitado de las muestras.
17. Cierre perfectamente los tubos. Llevar los Anillos a la zona de post-amplificación.



## Post-amplificación: Amplificación/detección

18. Verificar el depósito de lavado. Preparar buffer de lavado de trabajo añadiendo 1 volumen de **WB** a 9 volúmenes de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Es necesario mantener siempre 3 o 4 litros del buffer de lavado como mínimo.
19. Vaciar el contenedor de residuos en la tarja con la llave del agua abierta.
20. Reemplazar los racks de D-cups usadas.
21. Realizar un lavado extendido del equipo de acuerdo al manual del equipo.
22. Preparar reactivos genéricos de detección. Agregar 5 mL de **SB** con una pipeta serológica a un frasco de **SB3**. Resuspender con la pipeta varias veces hasta que la mezcla se vuelva homogénea. Colocar 2 frascos en el rack específico para reactivos genéricos (Rack número 4)
23. Colocar en el rack número 4, un frasco de **DN4** y 2 frascos de **CN4**.
24. Preparar reactivos específicos de detección agregando 2.5ml de **IM PS1, v1.5**, previamente mezclado en el vórtex, a un frasco de **IM4, v1.5**. Colocar el frasco en el rack número 1, indicado por los reactivos específicos de detección.
25. Añadir 2.5 ml de **IQ PS1, v1.5**, previamente mezclado en el vórtex, a un frasco de **IQ4, v1.5**. Colocar el frasco en el rack número 1.
26. Colocar el frasco de **AD3** en el rack número 1.
27. Dar la orden de trabajo al equipo de acuerdo al manual del usuario.

28. El equipo COBAS-Amplicor genera los resultados de la carga viral en número de copias de RNA-VIH/mL.

**II. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ de sangre periférica por citometría de flujo con el equipo FACScan (Becton Dickinson)**

**Material y equipo requerido**

**Reactivos**

- TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP  
con tubos TruCOUNT (BD, No. cat. 340401)

**Material**

1. Microesferas CaliBRITE 3 (BD, No. cat. 340486).
2. Solución de lisis FACS (10X), 100 mL (BD, No. cat. 349202).
3. Agua de grado reactivo (destilada o desionizada).
4. Tubos Vacutainer con EDTA.
5. Agitador vórtex.
6. Micropipeta automática y puntas.

7. Líquido de revestimiento (FACSFlow, BD, No. cat. 340398)
8. Controles TruCOUNT (BD, No. cat. 340335)
9. Control de sangre entera lisible.

## **PROCEDIMIENTO:**

Tinción:

1. Rotular un tubo TruCOUNT con el número de identificación de la muestra.
2. Agregar 20  $\mu$ L del reactivo TriTEST CD4/CD8/CD3 al fondo del tubo, evitar tocar el sedimento.
3. Dispensar 50  $\mu$ L de sangre entera anticoagulada al fondo del tubo. Evitar que la sangre resbale por las paredes del tubo.
4. Mezclar suavemente en el vortex. Incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C).
5. Agregar 450  $\mu$ L de solución de lisis FACS 1X al tubo.
6. Mezclar suavemente en el vortex. Incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C).
7. Analizar la muestra en el citómetro de flujo.
8. Con el software MultiSET determinar los recuentos absolutos.