

MARCADORES VIROLOGICOS NO CONVENCIONALES EN PACIENTES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA: ADN HIV-T, ADN HIV-2LTR Y ARN DE HIV

ROSANA GARIGLIO¹, MIGUEL A. TABORDA², RAUL BORTOLOZZI³, JENNIFER L. MCDERMOTT⁴, ISABELLA MARTINI⁴,
 MARIANA BORGOGNONE¹, G. VANINA VILLANOVA², OLIVIERO E. VARNIER⁴, ADRIANA A. GIRI^{2, 5}

¹Centro de Investigación y Biotecnología, Wiener Laboratorios SAIC; ²Area Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario; ³Servicio de Clínica Médica, Hospital de Día, Hospital J.B. Alberdi; ⁴Laboratorio de Microbiología Molecular, Sección de Microbiología de la Universidad de Génova, Italia; ⁵Instituto de Biología Molecular y Celular (IBR-CONICET) Rosario

Resumen La terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE) induce una reducción marcada y persistente de la viremia plasmática, contribuyendo a disminuir la mortalidad y morbilidad de los pacientes HIV-positivos. Así, la carga viral (CV) es el método de referencia para evaluar la eficacia terapéutica. Sin embargo, aun en presencia de una TAAE eficiente no se ha logrado la erradicación viral. En este estudio analizamos la presencia del ADN total de HIV (ADN HIV-T), del ADN no integrado con 2LTR (ADN HIV-2LTR) y del ARN de HIV, en un grupo de 55 pacientes HIV-positivos en distintos estadios clínicos, con y sin TAAE, mediante ensayos de PCR con revelado colorimétrico en microplaca, optimizados en nuestro laboratorio. La sensibilidad clínica del ARN de HIV fue evaluada con el bDNA, resultando del 74% y del 64%, respectivamente, con una concordancia del 85%. Este ensayo podría ser utilizado en el seguimiento de pacientes bajo TAAE. El ADN HIV-2LTR resultó positivo en el 54% aunque estuvo ausente en pacientes con elevada CV. Este marcador se consideraba un producto lábil y su presencia se asociaba a infección reciente. Sin embargo, actuales evidencias ponen en discusión su estabilidad por lo que su significado clínico debe ser reconsiderado. La ausencia del ADN HIV-2LTR en pacientes con CV detectable puede relacionarse con la heterogeneidad de la secuencia utilizada para su detección. El ADN HIV-T estuvo presente en el 100% de las muestras y resultaría relevante como marcador de remisión cuando se dispongan de terapias que efectivamente erradiquen la infección.

Palabras clave: virus de la inmunodeficiencia humana, marcadores virológicos, PCR con revelado colorimétrico

Abstract *Non conventional virological markers in HIV-infected patients: T-HIV DNA, 2LTR-HIV DNA and HIV RNA.* Highly active antiretroviral therapy (HAART) induces a persistent reduction of the plasmatic viremia, contributing to decrease mortality and morbidity of infected people with human immunodeficiency virus (HIV). Thus, viral load (VL) is the reference method to evaluate therapy effectiveness. However, even in the presence of efficient HAART viral eradication was yet not achieved. In this study, we analyzed the presence of total HIV DNA (T-HIV DNA), non-integrated DNA with 2LTR (2LTR-HIV DNA) and HIV RNA in a group of 55 HIV-positive subjects from Rosario City, with different clinical stages, with and without HAART. All markers were evaluated by PCR assays optimized in our laboratory that included colorimetric detection in microplate. HIV RNA clinical sensitivity was compared with a reference test, bDNA, resulting in 74% and 64% respectively, with an 85% of agreement. Thus, our HIV RNA assay could be used to monitor patients under HAART and at risk of infection. The 2LTR-HIV DNA was 54% positive although it was absent in patients with high VL. This marker was considered a labile product therefore its presence was associated with recent infection. However, current evidences question its stability. Thus, its clinical significance should be reconsidered. The absence of 2LTR-HIV DNA in patients with detectable VL may relate to the heterogeneity of the sequence used for its detection. T-HIV DNA was present in 100% of the samples and could be a relevant remission marker when therapies that effectively eradicate the infection became available.

Key words: human immunodeficiency virus, virological markers, PCR with colorimetric detection

La introducción de la terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE) ha revolucionado el seguimiento de los in-

dividuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)^{1,2}. Esta terapia ha disminuido notablemente la mortalidad y morbilidad de la enfermedad causada por el HIV además de mejorar la calidad de vida de los pacientes. La TAAE consiste en una combinación de inhibidores de la transcriptasa reversa (RT) y proteasa virales, e induce una reducción marcada y persistente de la carga viral plasmática (CV) llevándola a valores inferiores a las 50 copias de ARN de HIV/ml^{1,2}. Una vez

Recibido: 26-III-2004

Aceptado: 20-V-2004

Dirección Postal: Dra. Adriana A. Giri, Area Virología, Departamento de Microbiología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.
 Fax: (54-341) 439 0465 e-mail: agiri@fbioyf.unr.edu.ar

decidido el inicio y tipo de terapia, la respuesta del paciente a la misma se evalúa fundamentalmente a través de la CV plasmática por lo que esta determinación es considerada un importante marcador de eficacia terapéutica. La reducción de los niveles de CV se correlaciona con una buena respuesta al tratamiento y la ausencia de resistencias al mismo, por lo que el dosaje de CV se ha convertido en el método de referencia para el seguimiento de los pacientes HIV-positivos^{3, 4, 5}. Sin embargo, el optimismo inicial que despertó el uso de la TAAE dejó al descubierto nuevas facetas de la infección por HIV hasta el momento desconocidas. Se pudo aislar virus con capacidad replicativa a partir de células monocleares de sangre periférica de pacientes bajo TAAE con valores no detectables de CV durante muchos meses^{6, 7}. Esta observación fue confirmada por estudios posteriores, lo cual llevó a distintas hipótesis que pudieran explicar la persistencia viral a pesar de la supresión prolongada de la viremia plasmática, entre ellas: *i*) adherencia incompleta al tratamiento; *ii*) aparición de mutaciones como consecuencia de la resistencia viral; y/o *iii*) penetración incompleta de las drogas antirretrovirales en todos los sitios biológicamente relevantes⁸. Más allá de los complejos equilibrios virales e inmunológicos que impiden la completa erradicación del HIV en la era de la TAAE, las actuales evidencias arrojan una importante conclusión: la CV no refleja la infección del HIV completamente. Dado que la mayoría de las decisiones terapéuticas actualmente se basan en la cantidad de ARN viral circulante, y por lo antes expuesto, surge la necesidad de evaluar otros marcadores virológicos para una mejor caracterización de la infección de HIV en general y para el seguimiento de pacientes avirémicos en particular.

El HIV pertenece a la familia *Retroviridae* por lo que presenta intermediarios de ADN viral en su ciclo replicativo, característica que diferencia a los miembros de esta familia de los demás virus con genoma de ARN⁹. Dichos intermediarios, tales como el ADN de HIV integrado y episomal, han sido evaluados como marcadores virológicos de regresión de la infección y de replicación viral, respectivamente^{5, 10-14}. Vale la pena recordar que la infección del HIV se inicia a través de la interacción de glicoproteínas presentes en la envoltura viral y el receptor CD4 de las células blanco en conjunción con co-receptores⁹. Como consecuencia de esta interacción la nucleocápside viral ingresa en el citoplasma celular donde se inicia la transcripción reversa del genoma (Fig. 1). Esta reacción, catalizada por la enzima RT presente en el interior de la nucleocápside, consiste en la síntesis de ADN doble hebra lineal (ADN HIV-L) a partir del genoma de ARN simple hebra y de sentido positivo del HIV. Una vez sintetizado, el ADN HIV-L es transportado al núcleo donde se integra al ADN celular, constituyendo el reservorio de ADN integrado (ADN HIV-I)

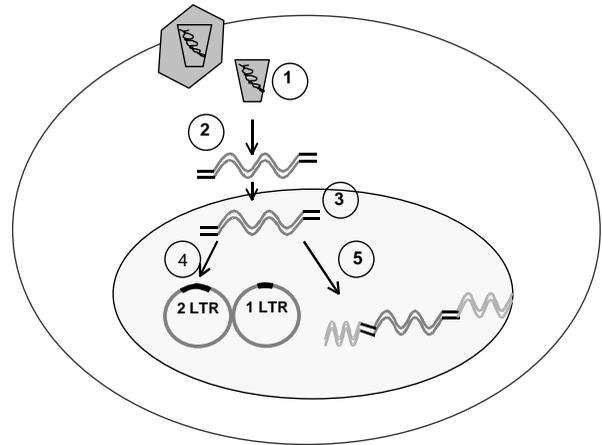


Fig. 1.- Mecanismo de transcripción reversa e integración celular del genoma del HIV. 1- La nucleocápside viral ingresa en el citoplasma celular. 2- Transcripción reversa. Síntesis de ADN HIV-L. 3- Transporte de ADN HIV-L al núcleo. 4- Circularización, formación de episomas: ADN HIV-1LTR y ADN HIV-2LTR. 5- Integración en el genoma celular: ADN HIV-I.

o provirus. El ADN HIV-I es competente para la transcripción de los ARN mensajeros y para la producción de nuevos genomas virales. Así, las proteínas derivadas de la traducción de los mensajeros virales junto con los nuevos genomas, serán utilizados para la formación de la nueva progenie de viriones^{15, 16}. Sin embargo, no todo el ADN HIV-L termina por integrarse en el genoma celular. Algunas de estas moléculas pueden circularizarse y formar episomas con una (ADN HIV-1LTR) o dos repeticiones terminales (ADN HIV-2LTR)¹⁶. Por lo tanto, en el núcleo de una célula infectada existen 4 formas distintas de ADN del HIV, cuyo conjunto se ha denominado ADN Total del HIV (ADN HIV-T): ADN HIV-L, ADN HIV-I, ADN HIV-1LTR y ADN HIV-2LTR. El ADN HIV-L funciona como sustrato para la integración, mientras que las formas circulares ADN HIV-1LTR y ADN HIV-2LTR se consideran productos secundarios de la transcripción reversa con función desconocida^{15, 9}. Dado que el HIV carece de los factores necesarios para mantener una replicación episomal, las formas ADN HIV-1LTR y ADN HIV-2LTR han sido consideradas productos lábiles por lo que su presencia en el núcleo celular sería un indicador de infección activa^{11, 17, 18}. Por lo tanto, y según esta hipótesis, el ADN HIV-2LTR debería estar ausente en presencia de una TAAE eficiente que induzca una caída persistente en la CV a niveles inferiores a los límites de detección de los métodos usados para su determinación, mientras que debería ser fácilmente detectable en los sujetos que no siguen ningún tipo de terapia o cuyos regímenes terapéuticos fallan por resistencias a las drogas o poca adherencia al mismo. Por otro lado, el ADN HIV-T ha sido utilizado como marcador de eficacia tera-

peútica^{10, 13} y, en ausencia de replicación viral activa, serviría como una medida indirecta del ADN HIV-1^{1, 7}.

En este trabajo analizamos el significado clínico del ADN HIV-T y del ADN HIV-2LTR en un grupo de pacientes de la ciudad de Rosario (Provincia de Santa Fe) infectados con el HIV y que se hallaban en distintos estadios clínicos de la enfermedad, con y sin TAAE. Además presentamos un ensayo optimizado en nuestro laboratorio para determinar la presencia de ARN del HIV en plasma y evaluamos su sensibilidad clínica comparando los resultados derivados del mismo con los de un sistema de referencia para determinar CV, en el mismo grupo de pacientes.

Materiales y métodos

Pacientes. En este estudio se analizaron 55 muestras tomadas en el último año de seguimiento de 55 individuos infectados por el HIV, 36 atendidos en el Servicio de Clínica Médica del Hospital J.B. Alberdi y 19 en las Unidades Penitenciarias. Las características demográficas, clínicas y terapéuticas de los individuos analizados se muestran en la Tabla 1. El estadio clínico de todos los pacientes fue determinado según el criterio de clasificación del *Centers for Disease Control*¹⁹. Se evaluaron los tratamientos luego de los 6 meses de su inicio, considerándose una buena respuesta a la TAAE cuando se lograba una CV no detectable, y mala si esta condición no se lograba en el mismo período de tiempo^{1, 5}. Por otro lado, la respuesta a la TAAE fue considerada como "no evaluable" cuando el período de suministro de la TAAE era menor a los 6 meses (Tabla 1). Sin embargo, para los pacientes que estaban recibiendo el 3^{er} esquema de TAAE o superior se esperaba el mayor beneficio posible, optimizando el esquema a aplicar²⁰. Las indicaciones del tratamiento y cambios, así como los esquemas utilizados se fueron modificando en el tiempo, siguiendo las recomendaciones del Panel de expertos de la Sociedad Internacional de SIDA²¹ y del *Department of Health and Human Services* de los EE.UU. [http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/adult/AA_071403.pdf].

Procesamiento de las muestras. Se recogieron 55 muestras de sangre entera tratadas con EDTA como anticoagulante. Para el análisis de la presencia de ARN del HIV se separaron los plasmas por centrifugación y se alicuotaron en fracciones de 200 µl, las que fueron congeladas a -20°C hasta su uso. El ARN se extrajo a partir de 200 µl de plasma con un sistema comercial (*High Pure Viral RNA kit*, Roche, Alemania) y, para aumentar la sensibilidad del ensayo, fue resuspendido en 100 µl de H₂O tratada con dietil pirocarbonato. Para el análisis de ADN HIV-T, de ADN 2LTR y de las subpoblaciones linfocitarias, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de las mismas muestras anteriores, mediante centrifugación en gradiente de *Ficoll-Hypaque*. Una alícuota de las CMSP se utilizó para el análisis de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo. Para el análisis de ADN HIV-T y de ADN 2LTR, las CMSP fueron contadas, alicuotadas en fracciones de 10⁶ células/tubo y conservadas a -20°C hasta la lisis. La lisis fue realizada con una solución con detergentes no iónicos y proteinasa K e incubación a 56°C durante 90 minutos, como ha sido descrito²². La idoneidad de las muestras de CMSP fue verificada mediante amplificación del fragmento de 268 pb del gen que codifica para la β-globina humana²³.

Ensayos moleculares utilizados en la detección de ácidos nucleicos virales. La medida de CV plasmática del HIV fue rea-

lizada mediante el sistema *Versant HIV-1 RNA 3.0 branch DNA* (bdNA), según las instrucciones del fabricante (*Bayer Corporation*, EE.UU.). El ARN del HIV, el ADN HIV-T y el ADN 2LTR fueron determinados mediante ensayos cualitativos optimizados en nuestro laboratorio, cuyas características generales se muestran en la Fig. 2.

Presencia de ADN HIV-T. El ensayo para el análisis de la presencia del ADN HIV-T fue como el descrito para la versión cuantitativa¹⁰, con una única modificación que consistió en la realización de 40 ciclos de amplificación en lugar de 35.

Presencia de ADN 2LTR. La forma de ADN 2LTR es la única forma viral de ADN del HIV que puede ser discriminada de las restantes debido a la presencia de 2 regiones LTR unidas covalentemente (Fig. 1). Por lo tanto, y como estimación de la presencia de ADN no integrado del HIV, se realizó la amplificación de un fragmento de 120 pb de la unión LTR-LTR mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), con los cebadores AC477 y AC516 biotinilado en 5', y detección colorimétrica, como ha sido descrito^{17, 18}. Brevemente, se alicuotaron 50 µl de mezcla de PCR compuesta de los siguientes reactivos en las correspondientes concentraciones finales: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 3.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.2 µM de cada cebador (*TIB-Molbiol*, Italia) y 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa (*Invitrogen*, EE.UU.). A cada tubo de PCR se le agregaron 50 µl de lisado celular correspondiente a 200 000 CMSP o control. En cada experimento se incluyeron los siguientes controles: control de reactivos (50 µl de H₂O), control negativo (lisado de CMSP de donador sano) y control positivo (50 copias del plásmido p2LTR diluidas en control negativo). Todas las reacciones fueron amplificadas en un ciclador térmico *Mastercycler Personal* (*Eppendorf*, Alemania) con el siguiente perfil: desnaturalización inicial (2 min a 95°C) seguida por 5 ciclos de amplificación iniciales (10" a 95°C, 10" a 60°C, 10" a 72°C), 40 ciclos de amplificación (10" a 94°C, 10" a 55°C, 10" a 72°C) y una extensión final a 72°C por 5 min. Posteriormente, se procedió a la detección colorimétrica de los productos de PCR. Una alícuota de cada producto amplificado por PCR fue hibridizada en fase líquida a la sonda AC569 conjugada a fluoresceína^{12, 22}. Los híbridos obtenidos fueron inmovilizados a la microplaca (*Nunc*, EE.UU.) mediante incubación por 1 hora a 37°C, detectados con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a peroxidasa (*Roche*, EE.UU.) y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (*Wiener Lab*, Argentina) como reactivo cromóforo. Luego de terminar la reacción con H₂SO₄ 1 M, se midió la producción de color a 450 nm en un lector de microplacas.

Presencia de ARN de HIV. Se optimizó la reacción de transcripción reversa (RT) seguida por PCR en dos pasos. La RT fue realizada en un volumen final de 50 µl. A 25 µl de ARN extraído a partir de plasma se le agregaron 25 µl de la mezcla de RT, constituida por 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP, 5 mM DTT, 15 pmoles del cebador SK431²⁴ conjugado a biotina en 5' (*Tib-Molbiol*, Italia), 20 U Rnasin recombinante (*Promega*, EE.UU.), 40 U RT-MuLV (*Promega*, EE.UU.). Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C por 30 min y luego 5 min a 95°C. Una vez finalizada la reacción de RT, los tubos fueron colocados en hielo y se les agregaron 50 µl de la mezcla de reacción de PCR, compuesta por 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 15 pmoles del cebador SK145²⁴ y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (*Invitrogen*, EE.UU.). Las mezclas fueron sometidas a 35 ciclos de amplificación y, posteriormente, los productos derivados de la RT-PCR fueron detectados colorimétricamente con la sonda SK102²⁴, como descrito¹⁰. Como control positivo se utilizó el ARN proveniente de un *pool* de sujetos infectados con el HIV con altos niveles de viremia mientras que como control negativo se utilizó el ARN proveniente de donadores sanos.

TABLA 1.— Características generales de los pacientes incluidos en este estudio F: femenino; M: masculino; HA: Hospital Alberdi; UP: Unidad Penitenciaria; HET: heterosexual; H: homosexual; DEV: drogadicto endovenoso; NVP: nevirapina; ABC: abacavir; LPV: lopinavir; AZT: zidovudina; 3TC: lamivudina; D4T: stavudina; IDV: indinavir; DDI: didanosina; EFV: efavirenz; RTV: ritonavir; SQV: saquinavir

Pacientes	Estadio clínico	Edad (años)	Sexo	Procedencia	Factor de riesgo	CD4/CD8	TAAE	Nº de esquemas terapéuticos	Respuesta a la TAAE
219		32	F	HA	HET	445/1608	NVP/ABC/LPV	2	No evaluable
W92		23	F	HA	HET	780/2150	AZT/3TC/NVP	1	Buena
W84		31	F	HA	HET	1024/2703	AZT/3TC/ABC	2	Buena
258		29	F	HA	HET	477/2360	D4T/3TC/IDV	1	Buena
320		27	F	HA	HET	1342/2457	D4T/3TC/IDV	1	Buena
W53		27	F	HA	HET	1563/3363	D4T/3TC/IDV	1	Buena
263		36	F	HA	HET	679/3334	LPV/DDI/D4T	2	Buena
W88		63	F	HA	HET	580/1650	AZT/3TC/NVP	1	Buena
W19		37	F	HA	HET	411/1364	D4T/3TC/NVP	1	Buena
W20		31	F	HA	HET	298/677	NVP/D4T/3TC	1	Buena
316		36	M	HA	DEV	480/2115	D4T/3TC/IDV	1	Buena
W101		34	M	HA	H	202/2198	D4T/3TC/NVP	1	Buena
W147		27	M	UP	DEV	233/1404	D4T/3TC/NVP	1	Mala
264		37	M	HA	HET	642/2539	D4T/3TC/IDV	1	Mala
256		42	M	HA	DEV	91/1582	AZT/3TC/EFV	1	No evaluable
W15		42	M	HA	DEV	36/1596	AZT/3TC/EFV	1	Buena
W164	A	38	M	UP	DEV	775/2280	D4T/3TC/NVP	1	Buena
W162		32	M	UP	DEV	331/4005	ABC/D4T/LPV	3	No evaluable
W5		34	M	HA	DEV	980/2550	D4T/3TC/EFV	2	Buena
W153		21	F	HA	HET	371/1660	—	—	—
W152		25	F	UP	HET	656/2194	—	—	—
W50		31	F	HA	HET	457/1272	—	—	—
W161		27	M	UP	DEV	463/1866	—	—	—
W99		39	M	HA	DEV	162/602	—	—	—
W149		26	M	UP	DEV	327/1497	—	—	—
W170		35	M	UP	DEV	190/2474	—	—	—
W151		23	M	UP	DEV	332/1374	—	—	—
W145		29	M	UP	DEV	305/1448	—	—	—
W150		29	M	UP	DEV	131/1062	—	—	—
W47		34	M	UP	DEV	278/2224	—	—	—
W13		36	M	HA	H	238/832	—	—	—
W159		27	M	UP	HET	726/1845	—	—	—
W90		30	M	UP	DEV	341/1505	—	—	—
W94		24	M	HA	DEV	41/437	DDI/D4T/LPV	3	No evaluable
W14		36	F	HA	HET	126/1745	LPV/ABC/AZT/3TC	3	No evaluable
W52		38	F	HA	HET	164/1271	D4T/3TC/IDV	1	Buena
W168		30	M	UP	DEV	210/1235	D4T/3TC/NVP	2	No evaluable
W148		27	M	UP	DEV	396/2205	AZT/3TC/NVP	1	Mala
W163	B	27	M	UP	DEV	219/1184	AZT/3TC/EFV	1	Mala
W103		30	M	HA	HET	135/1677	D4T/3TC/RTV/SQV	1	Buena
W169		26	M	UP	DEV	99/1307	D4T/3TC/NVP	1	No evaluable
321		40	M	HA	HET	51/1099	AZT/3TC/LPV	1	No evaluable
W26		36	M	HA	DEV	253/1520	DDI/ABC/LPV	3	No evaluable
W30		41	M	HA	DEV	98/852	—	—	—
W31		31	M	HA	H	171/884	—	—	—
322		51	F	HA	HET	339/1835	RTV/SQV/D4T/3TC	2	Buena
W102		30	F	HA	HET	54/458	DDI/D4T/EFV/LPV	3	Mala
W7		27	M	HA	DEV	189/1295	LPV/ABC/NPV	3	No evaluable
W54		34	M	HA	H	11/520	LPV/DDI/D4T/ABC	3	Mala
W51		43	M	HA	DEV	241/1214	ABC/AZT/3TC/EFV	2	Buena
W16	C	49	M	HA	HET	88/604	AZT/3TC/NVP	2	No evaluable
W91		25	M	HA	DEV	1509/4240	D4T/3TC/EFV	1	Buena
W18		34	F	HA	HET	103/1340	—	—	—
W55		30	F	HA	HET	14/185	—	—	—
W33		24	M	HA	DEV	170/648	—	—	—

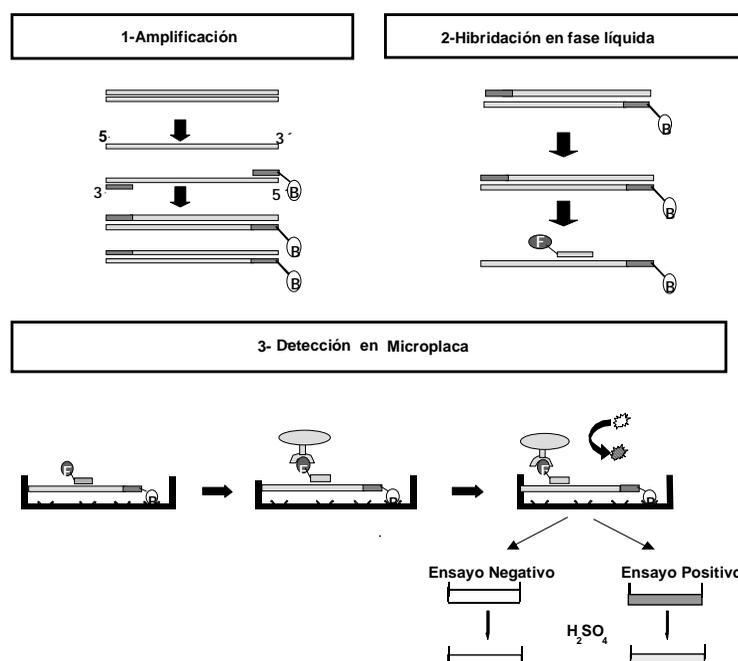


Fig. 2.- Características generales de los ensayos de PCR con detección colorimétrica en microplaca. 1- Amplificación: el ADN diana es amplificado mediante PCR utilizando un cebador antisentido conjugado a biotina en el extremo 5'. 2- Hibridación en fase líquida: el fragmento amplificado biotinilado es desnaturizado por calor e hibridado con una sonda específica conjugada a una molécula de fluoresceína en el extremo 5'. 3- Detección en microplaca: i) captura de los híbridos en una microplaca revestida con estreptavidina; ii) detección de los híbridos inmovilizados a la microplaca con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con una peroxidasa; iii) revelado por adición del sustrato cromógeno y H₂O₂; iv) corte de la reacción de color por adición de H₂SO₄; v) lectura del color producido en un lector de microplacas a 450 nm.

Resultados

En este trabajo optimizamos dos sistemas de PCR con detección colorimétrica en microplaca para el análisis del ARN del HIV y del ADN 2LTR, basándonos en una estrategia previamente utilizada por nuestro grupo para el análisis del ADN HIV-T^{10, 25}. Cabe destacar que el ensayo de ADN HIV-T fue desarrollado para medir los niveles de ADN HIV-T en muestras de CMSP provenientes de pacientes bajo TAAE, pudiéndose demostrar la asociación de este marcador con la eficacia terapéutica¹⁰. Por lo tanto, las características generales de los ensayos presentados en este trabajo están esquematizadas en la Fig. 2 y se describen brevemente: *i)* obtención de un producto amplificado biotinilado mediante PCR por la inclusión del cebador antisentido conjugado a biotina en el extremo 5'; *ii)* hibridación líquida del producto amplificado biotinilado con una sonda específica sintetizada con la inserción de una molécula de fluoresceína; *iii)* captura de los híbridos en una microplaca revestida con estreptavidina; *iv)* detección de los híbridos inmovilizados a la microplaca

con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con una peroxidasa y un sustrato cromógeno; *v)* lectura del color producido a 450 nm en un lector de microplacas.

En todos los ensayos se calculó el valor de corte (VC) como el doble de la media de las lecturas de punto final de los controles negativos, como determinado precedentemente^{25, 10}.

Ensayo para determinar la presencia de ARN de HIV

El primer objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de un ensayo de RT-PCR para detectar la presencia de ARN del HIV en muestras de plasma, con sensibilidad clínica comparable a los sistemas comerciales. Se optimizó una reacción de RT-PCR en dos pasos con detección colorimétrica en microplaca utilizando condiciones previamente establecidas¹⁰. Se ajustaron las condiciones de reacción de manera de obtener, luego de detectar coloriméricamente los productos de la RT-PCR, máximos valores de densidad óptica (DO) en los controles positivos con mínimos valores de DO en los contro-

les negativos. Las condiciones finales se describen en la sección Materiales y métodos.

La sensibilidad clínica del ensayo de ARN del HIV optimizado fue evaluada con un sistema de referencia para determinar la CV, el bDNA (*Bayer Corporation*, EE.UU.). Se analizaron con ambos ensayos 55 muestras de plasma provenientes de 55 sujetos infectados con el HIV que se encontraban en distintos estadios clínicos de la enfermedad, 36 de los cuales recibían TAAE

(Tablas 2 y 3). De las muestras analizadas, el 85% (47/55) presentó resultados concordantes en ambas determinaciones. Las discordancias se dieron en el grupo de pacientes bajo TAAE que presentaban valores de CV bajos o no detectables con el sistema de referencia (Tablas 2 y 4): 7 de las 8 muestras discordantes fueron positivas con el sistema cualitativo y no detectadas con el bDNA, mientras que una única muestra fue detectada con el ensayo de referencia y negativa en el ensayo de

TABLA 2.- *Marcadores virológicos en individuos bajo terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE) D.O: densidad óptica a 450 nm; P: positivo; ND: no detectable*

Pacientes	Estadio clínico	ADN HIV-T D.O.	ADN HIV-2LTR D.O.	ARN de HIV D.O.	CV copias/ml
219		P (1.154)	P (0.290)	P (1.070)	3 998
W92		P (0.764)	ND (0.022)	P (0.321)	ND
W84		P (1.713)	P (0.653)	P (0.322)	ND
258		P (0.436)	ND (0.039)	P (>3.000)	ND
320		P (1.821)	ND (0.031)	ND (0.083)	ND
W53		P (1.391)	P (0.440)	ND (0.080)	ND
263		P (0.687)	ND (0.027)	P (0.600)	ND
W88		P (0.644)	ND (0.022)	ND (0.092)	ND
W19		P (1.655)	P (1.330)	ND (0.036)	ND
W20	A	P (0.767)	P (0.209)	ND (0.047)	ND
316		P (2.521)	P (2.071)	ND (0.066)	ND
W101		P (0.728)	ND (0.028)	ND (0.066)	ND
W147		P (1.461)	ND (0.024)	ND (0.109)	311
264		P (1.801)	ND (0.038)	P (2.360)	33 278
256		P (1.663)	ND (0.032)	P (0.813)	348 194
W15		P (0.802)	P (1.530)	P (2.191)	ND
W164		P (1.503)	P (0.170)	ND (0.083)	ND
W162		P (2.482)	ND (0.044)	P (1.821)	500
W5		P (0.587)	ND (0.025)	ND (0.056)	ND
W94		P (1.669)	ND (0.025)	P (2.204)	>500 000
W14		P (1.712)	ND (0.024)	P (1.283)	>500 000
W52		P (2.565)	ND (0.022)	ND (0.078)	ND
W168		P (2.045)	ND (0.027)	P (2.160)	26 578
W148	B	P (1.790)	P (0.179)	P (2.455)	40 595
W163		P (2.771)	P (>3.000)	P (>3.000)	43 028
W103		P (1.877)	ND (0.030)	ND (0.051)	ND
W169		P (0.434)	P (0.197)	P (>3.000)	33 342
321		P (>3.000)	ND (0.041)	P (2.755)	220 427
W26		P (1.776)	ND (0.035)	P (1.567)	240 000
322		P (>3.000)	ND (0.029)	ND (0.086)	ND
W102		P (1.040)	P (>3.000)	P (2.087)	>500 000
W7		P (1.472)	ND (0.032)	P (1.884)	25 558
W54	C	P (2.295)	P (0.770)	P (>3.000)	156 022
W51		P (2.598)	P (1.667)	ND (0.087)	ND
W16		P (1.973)	P (1.521)	P (2.196)	ND
W91		P (1.948)	ND (0.025)	P (1.234)	ND

TABLA 3.– Marcadores virológicos en individuos sin TAAE. D.O: densidad óptica a 450 nm; P: positivo; ND: no detectable

Pacientes	Estadio clínico	ADN HIV-T D.O.	ADN HIV-2LTR D.O.	ARN de HIV D.O.	CV copias/ml
W153		P (1.894)	P (1.301)	P (1.074)	7 007
W152		P (0.511)	P (0.154)	P (0.376)	4 227
W50		P (2.412)	P (0.137)	P (2.614)	26 855
W161		P (0.450)	ND (0.039)	P (2.956)	25 200
W99		P (0.981)	P (0.167)	P (1.216)	26 985
W149		P (0.803)	P (0.109)	P (1.535)	10 946
W170	A	P (1.388)	ND (0.073)	P (1.593)	3 700
W151		P (1.817)	P (0.222)	P (1.915)	447
W145		P (2.228)	P (1.410)	P (1.769)	7 366
W150		P (2.366)	P (0.381)	P (2.435)	21 020
W47		P (0.917)	ND (0.045)	P (>3.000)	31 967
W13		P (1.475)	P (1.808)	P (2.504)	38 000
W159		P (1.707)	ND (0.062)	P (>3.000)	13 756
W90		P (1.624)	P (0.433)	P (1.815)	13 342
W30	B	P (2.051)	P (0.126)	P (1.202)	45 325
W31		P (1.701)	P (0.726)	P (1.122)	>500 000
W18		P (2.945)	P (>3.000)	P (2.079)	>500 000
W55	C	P (2.335)	P (0.640)	P (2.905)	>500 000
W33		P (0.643)	P (1.199)	P (2.880)	>500 000

TABLA 4.– Presencia de ARN de HIV vs. Carga viral (CV) (bDNA) P: positivo o cuantificable; ND: no detectable

Resultado		Presencia del ARN de HIV			
		TAAE +		TAAE -	
		P	ND	P	ND
C.V. (bDNA)	P	15	1	19	-
	ND	7	13	-	-
Total		22	14	19	-
		36		19	

ARN del HIV. Teniendo en cuenta que la sensibilidad clínica de un ensayo se define como la habilidad del mismo a identificar una enfermedad, y dado que todos los individuos incluidos en este estudio eran HIV-positivos, la sensibilidad clínica del ensayo de ARN del HIV fue de 74% (41/55) mientras la del bDNA fue de 64% (35/55).

Análisis del ADN HIV-T

El ADN HIV-T refleja la población total de células infectadas, ya sea que en éstas el virus se encuentre en replicación activa o en estado de latencia. Dado que en este estudio se disponía de una única muestra por pa-

ciente, se procedió a determinar cualitativamente la presencia del ADN HIV-T como marcador de infección. El ADN HIV-T estuvo presente en el 100% (55/55) de las muestras analizadas, como previsto por el estado de infección de los pacientes incluidos en este estudio (Tablas 2 y 3). Cabe recordar que el ensayo para determinar el ADN HIV-T posee una sensibilidad de 5 copias/reacción (correspondiente a 5 copias de HIV/10⁵ CMSP)¹⁰. La ausencia de resultados negativos en la determinación del ADN HIV-T en el grupo de pacientes incluidos en este estudio y en las condiciones ensayadas, reflejaría la baja reducción de la población de células crónicamente infectadas por el HIV aun en presencia de una TAAE eficiente.

Análisis de la presencia de ADN HIV-2LTR

Como puede observarse en las Tablas 2 y 3, el ADN HIV-2LTR resultó positivo en el 54% (30/55) de las muestras analizadas, siendo esta presencia mayor entre los pacientes que no recibían ningún tipo de terapia (80%; 15/19) respecto a los que sí estaban bajo TAAE (42%; 15/36). Observando detalladamente los resultados en los pacientes bajo TAAE con niveles de viremia no detectables (Tabla 5), 10 resultaron negativos para el ADN HIV-2LTR mientras que 5 fueron positivos para este

TABLA 5.— ADN HIV-2LTR vs. Carga viral (CV) (bDNA)
P: positivo o cuantificable; ND: no detectable

Resultado		CV (bDNA)			
		TAAE +		TAAE -	
		P	ND	P	ND
ADN HIV-2LTR	P	10	5	15	-
	ND	11	10	4	-
Total		36		19	

marcador. Según lo dicho anteriormente, se podría interpretar que en los primeros el régimen terapéutico era eficiente mientras que en los segundos la terapia comenzó a fallar aun en ausencia de viremia. Sin embargo, dentro del grupo de pacientes bajo TAAE, se obtuvieron valores negativos de ADN HIV-2LTR en sujetos que presentaban valores de CV detectable. Una situación similar se obtuvo en 4 pacientes que no recibían ningún tipo de tratamiento y que por lo tanto presentaban valores elevados de CV.

Discusión

En este trabajo presentamos el análisis de 3 marcadores virológicos para el monitoreo de pacientes HIV-positivos: el ARN del HIV, el ADN HIV-T y el ADN 2LTR. Para ello fueron optimizados sistemas de PCR con revelado colorimétrico en microplaca para cada marcador, y los ensayos resultantes fueron evaluados en muestras provenientes de 55 sujetos HIV-positivos residentes en la ciudad de Rosario y que se hallaban en distintos estadios clínicos de la enfermedad; 36 estaban bajo TAAE y 19 no recibían tratamiento alguno.

En primer lugar evaluamos la sensibilidad clínica del ensayo optimizado para la detección cualitativa del ARN del HIV en plasma con un sistema de referencia para determinar CV (bDNA). Los resultados obtenidos con ambos ensayos fueron concordantes en un 85% de las muestras analizadas, siendo la sensibilidad clínica del ARN del HIV netamente mayor a la del bDNA (74% vs. 64%, respectivamente). Si bien el número de muestras analizado no fue estadísticamente relevante, los resultados indican que el ensayo para la detección cualitativa del ARN del HIV podría constituir un instrumento de utilidad para el monitoreo de sujetos infectados bajo TAAE y a riesgo de infección de HIV. Teniendo en cuenta que en la actualidad el criterio de los clínicos para considerar una respuesta óptima a la TAAE es la negativización de la CV luego de 6 meses de iniciado el tratamiento, un ensayo cualitativo de alta sensibilidad podría dar la información suficiente al médico sobre la respuesta al

tratamiento sin necesidad de recurrir a los sistemas comerciales que determinan CV. Este instrumento adquiere mayor importancia si además consideramos que la disponibilidad de tales sistemas está frecuentemente condicionada por las fluctuaciones económicas nacionales, por lo que disponer de un test desarrollado en la región aseguraría tanto la calidad como la continuidad de los resultados y por lo tanto permitiría un seguimiento más eficiente de los pacientes HIV-positivos.

Otro de los objetivos de este estudio fue el análisis del ADN HIV-2LTR y ADN HIV-T en el mismo grupo de pacientes como marcadores de replicación viral activa y de infección, respectivamente. Fue posible detectar el ADN HIV-2LTR en el 54% de las muestras analizadas, siendo esta positividad mayor entre los pacientes que no recibían ningún tipo de tratamiento (80% vs. 42% bajo TAAE). Sin embargo, y dado el supuesto significado clínico de este marcador, se esperaba que el ADN HIV-2LTR fuera fácilmente detectable en los pacientes con niveles de CV elevados, ya sea que estuvieran bajo TAAE o que no recibieran terapia alguna. Cabe recalcar que la integridad de las muestras de CMSP analizadas fue verificada mediante amplificación de β -globina y confirmada con la determinación del ADN HIV-T, que resultó positiva en el 100% de las mismas. Por lo tanto, descartamos que los resultados del ADN HIV-2LTR en los 15 pacientes con CV elevadas (11 pacientes bajo TAAE y 4 sin tratamiento alguno; Tablas 2, 3 y 5) fueran falsamente negativos. Recientemente, y en contraste con las consideraciones anteriores sobre la estabilidad del ADN HIV-2LTR, varios grupos han demostrado que las formas circulares de ADN del HIV son productos estables y que su disminución dependería de la dilución de estos episomas como consecuencia del proceso de división celular^{26, 27}. Sin embargo, si estos episomas fueran estables deberían ser detectables en la mayoría de los sujetos infectados por el HIV independientemente de los niveles de CV que éstos presentarían. Es posible que la ausencia del ADN HIV-2LTR esté relacionada más con la heterogeneidad de la secuencia blanco utilizada para la amplificación y detección del ADN HIV-2LTR que con la estabilidad de esta forma viral. Cara y col. analizaron la secuencia que incluye la unión de los 2LTR del ADN HIV-2LTR en 8 pacientes bajo TAAE²⁸: sólo la secuencia de un paciente fue la esperada. Las 7 secuencias restantes fueron heterogéneas en la unión LTR-LTR, observándose inserciones de 1-9 bases y deleciones de 13 bases²⁸. Como consecuencia de esta heterogeneidad, las secuencias de los extremos de cada LTR carecían de los residuos conservados que actúan como substratos para la integración. Es factible que una variabilidad similar en la secuencia de unión LTR-LTR exista en el grupo de pacientes incluidos en nuestro estudio, condicionando de esta manera su detección. Para verifi-

car esta hipótesis sería necesario determinar la secuencia nucleotídica del fragmento que incluye la unión LTR-LTR para poder así diseñar nuevos cebadores y sondas que hibridicen en regiones más conservadas, de manera de asegurar su amplificación y detección. En definitiva, y según las actuales evidencias sobre la estabilidad de estos episomas y la heterogeneidad de las secuencias blanco utilizadas para su detección, la presencia del ADN HIV-2LTR no estaría necesariamente asociada a una infección activa, por lo que sería necesario reconsiderar su significado clínico.

Por último, otro aspecto de nuestro estudio incluyó la determinación cualitativa del ADN HIV-T. El análisis del ADN HIV-T en el grupo de pacientes seleccionado confirmó que este marcador sigue siendo detectable aun en sujetos que permanecen avirémicos por largos períodos de tiempo. Cabe recordar que la medida de los niveles de ADN HIV-T en muestras secuenciales de un mismo paciente bajo TAAE ha permitido evaluar la eficacia terapéutica^{6, 7, 8, 10, 13}. Sin embargo, los actuales regímenes terapéuticos no parecen suprimir por completo la replicación viral, aun cuando la CV no sea detectable por los ensayos actualmente disponibles. Por lo tanto, este ensayo resultaría relevante para un futuro en el que se disponga de drogas antivirales que inhiban por completo la replicación del HIV y permitiría evaluar la erradicación de las células crónicamente infectadas que constituyen uno de los reservorios de HIV. En ese nuevo escenario la determinación del ADN HIV-T podría convertirse en el ensayo de elección para medir la eficacia de tales regímenes terapéuticos.

En conclusión, hemos podido desarrollar sistemas altamente sensibles para ser utilizados en el seguimiento de los pacientes HIV-positivos usando tecnología regional, con las consiguientes ventajas socioeconómicas que de ello se desprende. La búsqueda de marcadores virológicos que reflejen de manera precisa los distintos estadios de la infección del HIV y que permitan evaluar terapias que efectivamente promuevan la erradicación viral debe ser considerada un tema prioritario de análisis y estudio.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por un subsidio del *Fogarty International Center, AIDS International Training Research Program-NIH* (Subsidio N°: 5 D43 TW001037). Agradecemos la colaboración de la Dra. Daniela Gardiol en la corrección de este manuscrito.

Bibliografía

1. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, et al. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997; 387: 188-91.
2. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997; 337: 734-9.
3. Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, et al. Clinical use of quantitative molecular methods in studying human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 135-47.
4. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, et al. Determinations of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome. TUBE Meeting Workshop Attendees. Technology Utilization for HIV-1 Blood Evaluation and Standardization in Pediatrics. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1471-9.
5. Powderly WG, Saag MS, Chapman S, Yu G, Quart B, Clendeninn NJ. Predictors of optimal virological response to potent antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13: 1873-80.
6. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278: 1295-300.
7. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278: 1291-5.
8. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, et al. 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. *Nat Med* 2000; 6: 82-5.
9. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM (ed.), *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*, Washington DC (USA): ASM Press, 2000, pp 631-61.
10. McDermott JL, Giri AA, Martini I, et al. HIV DNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with antiretroviral therapy efficacy. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2361-5.
11. Sharkey ME, Teo I, Greenough T, et al. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6: 76-81.
12. Suzuki K, Okamoto N, Watambe S, Kano T. Chemiluminescent microtiter method for detecting PCR amplified HIV-1 DNA. *J Virol* 1992; 38: 113-22.
13. Christopherson C, Kidane Y, Conway B, Krowka J, Sheppard H, Kwok S. PCR-Based Assay to quantify Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 630-4.
14. De Milito A, Titanji K, Zazzi M. Surrogate markers as a guide to evaluate response to antiretroviral therapy. *Curr Med Chem* 2003; 10: 349-65.
15. Varmus HE, Swanstrom R. Replication of retroviruses. In Weiss R, Brown N, Teich N, Coffin J. (ed.), *RNA tumor viruses*, NY (USA): Cold Spring Harbor, 1984 pp 75-134.
16. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM, Bishop JM. Correct integration of retroviral DNA *in vitro*. *Cell* 1987; 49: 347-57.
17. Cara A and Reitz MS Jr. New insights on the role of extrachromosomal forms of retroviral DNA. *Leukemia* 1997; 11: 1395-9.
18. Giri AA, McDermott JL, Martini I, Bertolotti F, Musolino B, Varnier OE. Unintegrated 2LTR HIV DNA as a marker of therapy inefficacy in aviremic patients under HAART. *The 1st IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*, Buenos Aires (Argentina), 8-11/07/2001, Abs. LB-P7, p. 326.
19. CDC 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992; 41: 1-19.
20. Gallant JE. Treatment strategies for the antiretroviral-experienced patient. Posted on 08/28/2002 in <http://www.medscape.com/viewarticle/440611>.
21. Yeni PG, Hammer SM, Carpenter CC, et al. Antiretroviral treatment for adult HIV infection in 2002: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2002; 288: 222-35.

22. Giri AA, Lillo FB, McDermott JL, et al. Detection of HIV sequences in children using radioactive and colorimetric polymerase chain reactions. *J Med Virol* 1994;42:414-9.
23. Saiki Rk, Bugawan TL, Horn GR, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986;324:163-6.
24. Kellogg DE, Kwok S. Detection of human Immunodeficiency virus. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990:337-47.
25. Giacomini M, Mc Dermott JL, Giri AA, Martini I, Lillo FB, Varnier OE: A novel and innovative quantitative kinetic software for virological colorimetric assays. *J Virol Meth.*1998; 73: 201-9.
26. Butler SL, Johnson EP, FD Bushman. Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J Virol* 2002; 76: 3739-47.
27. Pierson TC, Kieffer TL, Ruff CT, Buck C, Gange SJ, Siliciano RF. Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 2002; 76: 4138-44.
28. Cara A, Vargas J Jr, Keller M, et al. Circular viral DNA and anomalous junction sequence in PBMC of HIV-infected individuals with no detectable plasma HIV RNA. *Virology* 2002; 292: 1-5.

What is found in biology is mechanisms, mechanisms built with chemical components and that are often modified by other, later, mechanisms added to the earlier ones. While Occam's razor is a useful tool in the physical sciences, it can be a very dangerous implement in biology. It is thus very rash to use simplicity and elegance as a guide in biological research. While DNA could be claimed to be both simple and elegant, it must be remembered that DNA almost certainly originated fairly close to the origin of life when things were necessarily simple or they could not have got going.

Lo que se encuentra en biología son *mecanismos*, mecanismos construidos con componentes químicos y que a menudo son modificados por otros agregados posteriormente a los anteriores. Mientras la navaja de Occam es una herramienta útil en las ciencias físicas, puede ser un implemento muy peligroso en biología. Es por lo tanto muy apresurado usar la simplicidad y elegancia como guías en la investigación biológica. Así como del ADN se podría afirmar que es simple y elegante, se debe recordar que el ADN casi seguramente se originó muy cerca del origen de la vida cuando las cosas eran necesariamente simples o no podrían haber continuado.

Francis Crick (1916-2004)

What mad pursuit. A personal view of scientific discovery. New York: Basic Books, 1988, p. 138.

Francis Harry Compton Crick, OM, nació el 8 de junio de 1916, en Northampton (UK), falleció el 28 de julio del 2004 en San Diego, California (USA). Matt Ridley (el autor de *Genoma*) dijo: "Francis Crick no hizo uno sino varios grandes descubrimientos científicos. Descubrió que los genes son códigos digitales escritos en las moléculas de ADN, descubrió que el código está escrito con palabras de tres letras y jugó un papel decisivo en descifrar el código. Cualquiera de ellos le hubiera asegurado un lugar en el panteón científico. Descubrir los tres lo colocan al lado de Newton, Darwin y Einstein". London: The Guardian, 30 Julio, 2004.