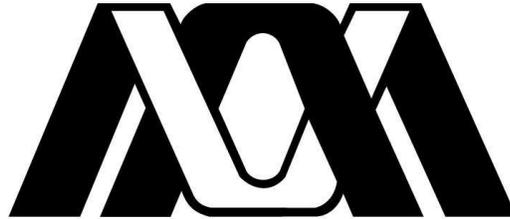


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



“Desarrollo y estandarización de un ensayo para la determinación cuantitativa de la carga proviral y las formas episomales del VIH-1 y su relación con el tropismo proviral”

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

Moisés Vergara Mendoza

Comité Tutorial:

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dra. Mónica Viveros Rogel

Septiembre 2015



“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302029

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Desarrollo y estandarización de un ensayo para la determinación cuantitativa de la carga proviral y las formas episomales del VIH-1 y su relación con el tropismo proviral”, que presentó

Moisés Vergara Mendoza

El día 3 de septiembre del año 2015

Sinodales:



Presidente

Dr. Edmundo Bonilla González

Adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Biología Celular y Molecular



Secretario

Dra. Mónica Viveros Rogel

Adscrita al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología. Laboratorio de Virología Molecular.

Vocal 1

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Adscrita a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular

Vocal 2

Dr. Guillermo Gómez Icazbalceta

Adscrito a la Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Miembros del comité Tutorial

Dr. Luis Enrique Soto Ramírez

Codirector Adscrito al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología. Laboratorio de Virología Molecular.

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Codirector Adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular

Dra. Mónica Viveros Rogel

Asesora. Adscrita al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología. Laboratorio de Virología Molecular.

RESUMEN

Introducción: El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) es capaz de establecer un reservorio viral de forma estable en el genoma celular y formas episomales de su genoma en diferentes poblaciones celulares, en particular aquellas que expresan el receptor CD4+ y los correceptores virales CXCR4 y CCR5, los cuales determinan su tropismo. Estas poblaciones son infectadas durante distintas etapas de la enfermedad situándose como blancos de estudio ya que presentan diferentes características que determinan el proceso de patogénesis, el desarrollo de la enfermedad y la generación de reservorios de larga duración.

Objetivo: En este trabajo se desarrolló y se estandarizó un método para cuantificar al genoma proviral y la forma episomal 2-LTR del VIH-1 en muestras de pacientes con tratamiento antirretroviral y se evaluó la diferencia entre el reservorio establecido por el virus de acuerdo con su tropismo proviral.

Metodología: Para la cuantificación de la carga proviral se emplearon oligonucleótidos dirigidos a las secuencias Alu, usadas como un ancla molecular y un oligonucleótido dirigido a una zona conservada en el gen *gag* para diferenciar la forma proviral de las episomales. Las células 8E5 que contienen una sola copia del genoma viral, se utilizaron como un estándar para la carga proviral (CP). Para la forma circular 2-LTR se usó un plásmido con la secuencia de unión que abarca 513 pb. Para diferenciar entre las formas circulares, se construyeron de forma sintética dos plásmidos con las secuencias correspondientes a 1-LTR y 2-LTR. Una vez

establecidas las curvas patrón, se analizaron 123 muestras de pacientes infectados con el VIH-1 y viremia controlada por la aplicación de un esquema farmacológico supresor. Las muestras analizadas se clasificaron en dos grupos de acuerdo con su tropismo y se determinó la carga proviral y episomal para su comparación.

Resultados: Se construyeron curvas patrón para la determinación de la carga proviral y episomal 2-LTR, sin embargo no fue posible diferenciar la forma circular 1-LTR posiblemente por su alto grado de homología con las otras formas del genoma viral. Las curvas patrón se utilizaron para la cuantificación de la CP y 2-LTR en dos grupos de estudio de aislados virales con tropismo para linfocitos T (X4) y para monocitos y macrófagos (R5). Se encontró una mayor CP y episomal 2-LTR en las variantes virales con tropismo R5 en comparación con las variantes X4 y la diferencia fue estadísticamente significativa con una $p=0.027$ y 0.00008 respectivamente.

Conclusiones: Se desarrolló un método para la determinación cuantitativa de la carga proviral y episomal 2-LTR del VIH-1, que es reproducible y con un rango de sensibilidad amplio de detección de 1×10^4 a 1×10^0 y 1×10^6 a 1×10^1 respectivamente, por lo que se puede proponer su uso como una herramienta para el seguimiento clínico de los pacientes infectados con el virus y para el estudio del reservorio. Así mismo se evaluó la diferencia entre carga proviral y episomal en muestras con tropismo proviral (X4 y R5) donde se mostró que el tropismo R5 tuvo una mayor carga proviral y 2-LTR respecto a X4.

Índice

Miembros del jurado	ii
Miembros del comité tutorial.....	iii
Resumen	iv
Introducción.....	1
<i>Epidemiología de la infección por VIH en México y en el mundo</i>	1
<i>Clasificación y morfología del VIH-1</i>	2
<i>Ciclo de replicación del VIH-1</i>	3
<i>Tropismo viral</i>	5
<i>Determinación del tropismo proviral</i>	8
<i>ADN viral no integrado.....</i>	9
<i>Tratamiento antirretroviral.....</i>	12
<i>Cuantificación del genoma proviral y episomal.....</i>	14
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIAL Y MÉTODOS	21
1.-Células.....	21
2.- Virus.....	22
3.- Plásmido	22
4.- Muestras de ADN de pacientes infectados con VIH-1	22
5.- Oligonucleótidos	22
6.-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
7.- PCR en tiempo real.....	23
MÉTODOS.....	23
<i>Preparación del medio de cultivo RPMI 1640® suplementado con suero fetal bovino.....</i>	23
<i>Medio de congelación</i>	25
<i>Análisis de los productos de PCR.....</i>	28
<i>Infección de las células MT2</i>	29
<i>Obtención del fragmento de unión de 2-LTR</i>	30
<i>Obtención de las secuencias de las formas circulares 1-LTR y 2-LTR.....</i>	31
<i>Construcción de 1-LTR</i>	35

Obtención de los plásmidos p-1LTR, p-2LTR y p-U2LTR.....	37
<i>Ligación de los fragmentos 1-LTR, 2-LTR y F3-R5 al plásmido pJet 1.2/blunt Cloning.....</i>	37
<i>Transformación de bacterias E.coli DH5-α</i>	38
<i>Verificación de los plásmidos</i>	40
<i>Secuenciación de plásmidos p-U2LTR, p-1LTR y p-2LTR.....</i>	41
<i>Diferenciación de la forma circular 1-LTR.....</i>	42
<i>Especificidad de la amplificación de la forma circular 2-LTR</i>	44
<i>Especificidad de la amplificación del fragmento para la carga proviral.</i>	45
<i>Curva patrón del genoma proviral y 2-LTR</i>	46
<i>Curva patrón para la carga proviral.....</i>	48
<i>Curva patrón para 2-LTR</i>	49
<i>Análisis Estadístico.....</i>	51
RESULTADOS.....	52
<i>Obtención del fragmento de unión de 2-LTR.</i>	53
<i>Obtención de fragmentos 1-LTR, 2 LTR.</i>	56
<i>Ligación de las secuencias en el plásmido pJET1.2</i>	58
<i>Análisis de los plásmidos correspondientes a las formas circulares p-1LTR, p-2LTR y p-U2LTR.....</i>	59
<i>Amplificación específica de 1-LTR.....</i>	62
<i>Amplificación específica de la secuencia usada para la carga proviral.....</i>	65
<i>Amplificación de la secuencia de unión de 2-LTR.....</i>	66
<i>Curva patrón de la carga proviral</i>	68
<i>Curva patrón de la forma episomal 2-LTR</i>	71
<i>Resultados de la carga proviral y 2-LTR para tropismos provirales X4 y R5</i>	73
<i>Presencia de 2-LTR en los grupos de estudio</i>	79
<i>Análisis Estadístico.....</i>	81
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	94

INTRODUCCIÓN

Epidemiología de la infección por VIH en México y en el mundo

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se produce por la infección del Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1), identificado en 1983 por el Dr. Luc Montagnier y Fraçoise Barré-Sinoussi.¹ Se han identificado tres vías de transmisión del VIH-1: la sexual, la sanguínea y la perinatal; sin embargo, el 80% de los adultos adquieren el VIH-1 después de la exposición de sus superficies mucosas, por lo que se considera principalmente como una enfermedad de transmisión sexual.²

Existen dos tipos principales del VIH: el VIH-1 que prevalece en todos los continentes y es responsable de la pandemia mundial y el VIH-2 que se presenta principalmente en África occidental.³ De acuerdo con el último reporte del 2014 del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (más conocido por el acrónimo **ONUSIDA**), se estima que en el 2013 existían 35 millones de personas que vivían con el VIH-1 y alrededor de 1.5 millones de personas en todo el mundo, fallecieron por causas relacionadas con el SIDA. En México, la prevalencia de la infección por el VIH-1 es del 0.24% en la población general. En el 2013 ONUSIDA estimó que en México había aproximadamente 180,000 personas que vivían con el virus, se reportaron 9,300 nuevas infecciones en adultos y en niños y ocurrieron aproximadamente 5,600 defunciones por SIDA.⁴ Por otra parte, el último reporte realizado por el Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA

(CENSIDA) al cierre del 2014, notificó que en México existía un total de 228,200 casos de VIH/SIDA notificados en el periodo 1983-2014, de los cuales se reportaron 174,564 casos de SIDA, 119,200 casos (52.2%) estaban vivos y se agruparon como seropositivos (53,636 casos) y personas que viven con SIDA (65,975 casos). Se estima que del total de casos de personas seropositivas para el VIH-1, el 77% son hombres y el 23% son mujeres.⁵ Aunque la infección por VIH-1 se ha convertido en una enfermedad tratable y crónica, sigue siendo un problema de salud pública importante en México.⁵

Clasificación y morfología del VIH-1

El VIH-1 pertenece a la familia *Retroviridae* subfamilia *Orthoretrovirinae* y el género *Lentivirus*.⁶ La familia de los retrovirus se caracteriza por la transcripción reversa del genoma del ARN viral en ADN de doble cadena (dc) y su integración en el genoma de la célula hospedera por la enzima viral “integrasa”.⁶

Con respecto a su morfología, la partícula del VIH-1 mide 100 nm de diámetro, es de forma esférica y está envuelto con una bicapa lipídica que toma de la célula hospedera. El genoma del VIH-1 consta de aproximadamente 9.8 kb, está constituido por dos copias de ARN de cadena sencilla lineal, de polaridad positiva, en el sentido 5' - 3' y flanqueado por dos repeticiones terminales largas (LTR). El genoma del VIH-1 codifica para 9 genes que producen 15 proteínas.⁷ Consta de tres genes principales, el gen *gag* que codifica para las proteínas de la matriz y de la cápside (p24); el *env*, para las proteínas de la envoltura (gp120 y gp41); el *pol*, para las

enzimas transcriptasa reversa, proteasa e integrasa y seis genes accesorios *vif*, *vpr*, *rev*, *vpu*, *tat* y *nef*, necesarios para su replicación (Figura 1).³

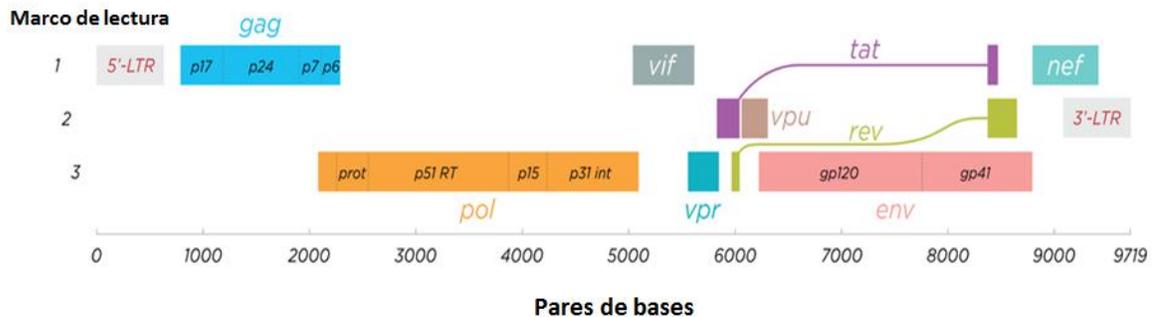


Figura 1.- Estructura del genoma del VIH-1. Se muestran los tres genes principales del virus gag, pol y env en azul, naranja y rosa respectivamente y los genes accesorios vif, vpr, tat, rev, vpu y nef. Asimismo se aprecian las regiones LTR 5' y 3' en color gris que flanquean a los genes virales.

Ciclo de replicación del VIH-1

La entrada del VIH-1 en la célula se produce mediante la interacción secuencial con dos receptores, CD4+, que es el receptor principal para el virus y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, que son los receptores secundarios o correceptores. La interacción inicial se produce entre gp120 y CD4+ e induce cambios conformacionales que exponen al dominio V3 de gp120 y regiones adyacentes que forman el dominio de unión de la glicoproteína gp120 a los receptores de quimiocinas.⁸ Posteriormente ocurre un rearrreglo conformacional de la glicoproteína gp41 que ocasiona la aproximación y fusión de la membrana viral con la celular. Una vez fusionadas las membranas viral y celular, se produce la internalización de la nucleocápside y sucede la decapsidación del genoma viral.⁹ En este proceso, las proteínas de la cápside se desensamblan y liberan al genoma.¹⁰ Posteriormente el

complejo enzimático de la transcriptasa reversa realiza el proceso de síntesis del ADN de doble cadena (ADNdc) a partir del ARN viral. Tras la conversión del ARN se produce el complejo de pre-integración (CPI) que contiene ADNdc, proteínas virales incluyendo a la integrasa, vpr y las proteínas del huésped como HMGA1 y BAF.¹¹⁻¹⁴ El CPI es transportado al núcleo, donde se integra el ADN de doble cadena viral en el ADN del hospedero; constituyendo la forma **proviral** del VIH-1.¹⁵

El genoma viral se integra preferentemente en la cromatina activa a nivel transcripcional.^{16,17} Los genes virales que se expresan a través de factores de transcripción del huésped, y la síntesis de la proteína viral Tat que favorece la transactivación del promotor viral en LTR, garantizan la transcripción de los genes virales integrados en el genoma del huésped y por ende a la síntesis de las proteínas virales conduciendo a la finalización del ciclo de replicación viral (**Figura 2**).¹⁷

El factor clave para promover el ciclo de replicación viral es la activación de las células TCD4+, de lo contrario la transcripción reversa se produce de forma incompleta ya que depende de los niveles de nucleótidos y de la acción de factores celulares que se inducen en el curso de la activación y de la proliferación celular. Si la activación no se produce, el ARN y el ADN retrotranscritos parcialmente, se degradan entre 3 y 15 días por las nucleasas celulares.¹⁸

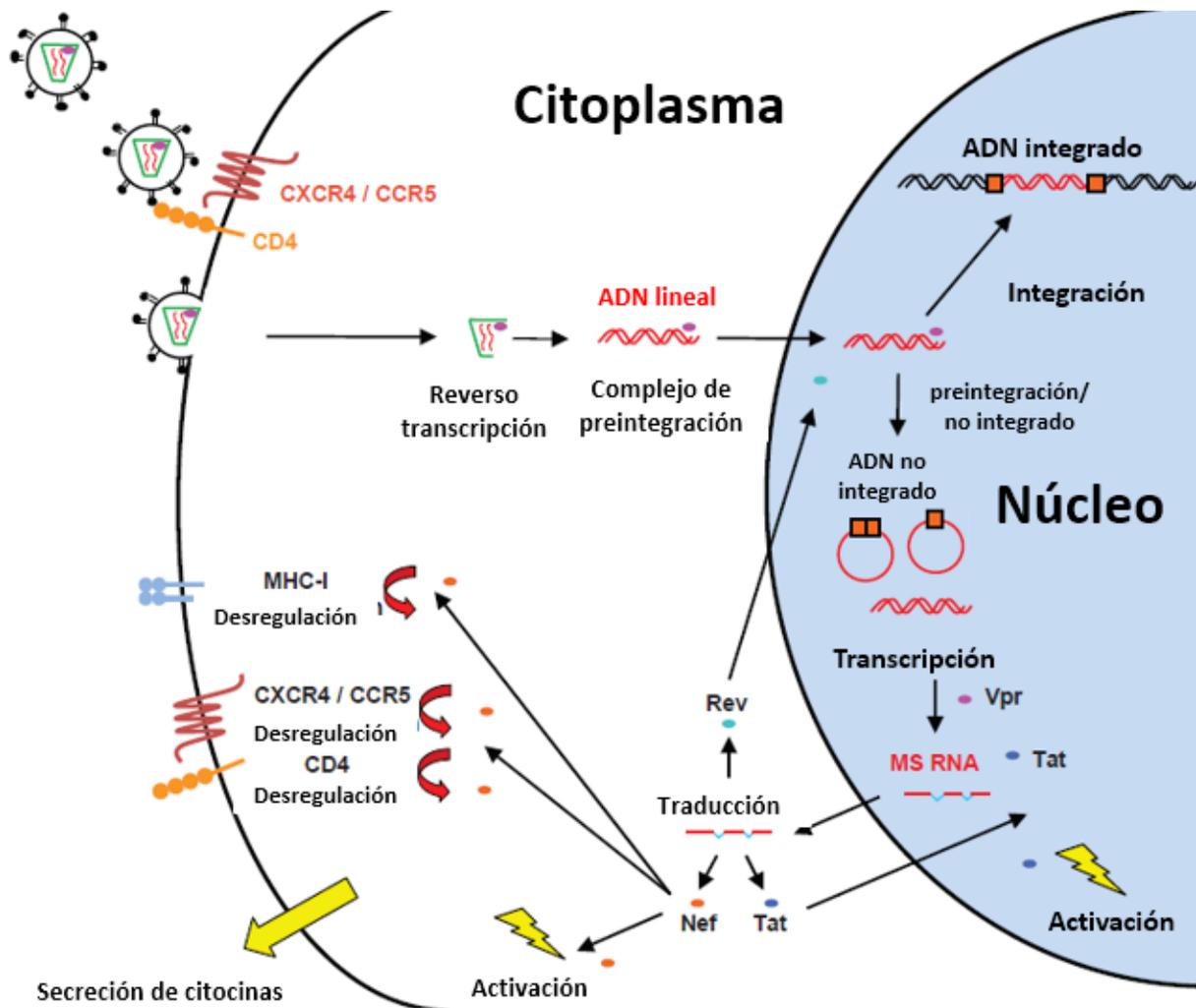


Figura 2.- Ciclo de replicación del VIH-1 La infección dada por el VIH-1 en la célula hospedera se lleva a cabo mediante interacción gp120 y el receptor CD4 seguido de la unión de gp41 y el correceptor CXCR4 o CCR5 según sea la célula infectada. Inmediatamente después se lleva a cabo la descapsidación del genoma viral y el ciclo continúa con la retrotranscripción de su material genético y su posterior translocación al núcleo para su integración. El genoma no integrado es circularizado y degradado. Una vez integrado el genoma viral se inicia la transcripción y traducción de sus genes para la formación de nuevas partículas virales, los genes accesorios dan lugar a proteínas virales capaces de regular la expresión viral y la activación celular así como la desregulación de receptores celulares tales como MCH-1, CD4 y CXCR4/CCR5. . (Figura tomada y adaptada de Sloan y col., 2011)¹⁹

Tropismo viral

La primera fase del ciclo de replicación viral, se inicia con la adhesión de virus a la célula huésped y termina con la fusión de la membrana de la célula y la membrana viral, con la posterior entrega de la nucleocapside viral en el citoplasma. La

interacción del VIH-1 con las células blanco involucra una unión secuencial de la proteína viral gp120 con el receptor CD4 y un correceptor de quimiocinas CCR5 o el CXCR4 (**Figura 3**).²⁰

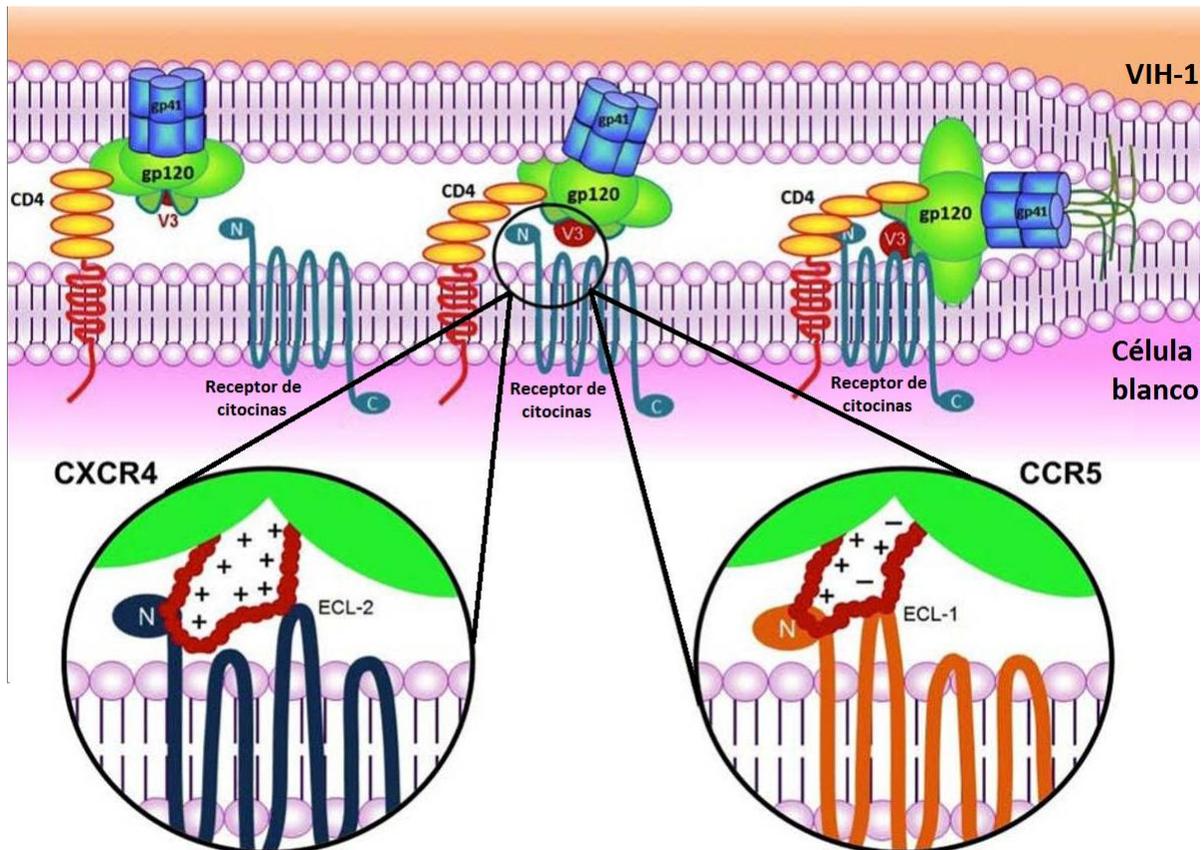


Figura 3.- Mecanismo de entrada del VIH-1. La entrada requiere inicialmente de la unión del trímero de gp120 al CD4 presente en la membrana plasmática de la célula huésped. Esta interacción desencadena un cambio conformacional en gp120, que resulta en la exposición del bucle V3. Este bucle se acopla posteriormente al bucle extracelular (ECL por sus siglas en inglés "extracellular loop") de cada uno de los dos receptores de las quimiocinas y correceptores para el VIH-1, CXCR4 (ECL-2 a la izquierda) o CCR5 (ECL-1 a la derecha). La carga total del bucle V3 determina el uso del correceptor, de tal forma que las cargas iónicas más positivas son usadas por el virus X4. (figura tomada y adaptada de Aiamkitsumrit y col., 2014)⁹

La subunidad gp120 es responsable de la unión al receptor y contiene cinco dominios relativamente conservados (C1-C5) y cinco bucles variables (V1-V5), llamados así por su heterogeneidad genética. Cada una de las regiones variables se compone de una estructura de bucle formado por un enlace disulfuro, con la

excepción de V5. Los bucles variables se encuentran predominantemente en la superficie de la gp120 y juegan un papel crítico en la evasión inmune y la unión del correceptor, en particular el bucle V3, siendo este el siguiente paso para la infección, considerado como el disparador que activa la fusión de membranas.²¹

Las cepas del VIH-1 se pueden clasificar en función de su uso del correceptor, también definido como el tropismo viral en: I) virus Macrófago/monocitotrópicos (usan al receptor CCR5 o virus R5) sin formación de sincicios, II) Linfotrópicos (usan al correceptor CXCR4 o virus X4) con formación de sincicios o III) con tropismo doble (capaces de usar ambos correceptores).²²

Varios análisis genotípicos han determinado que la carga electrostática total de la región V3 es el principal determinante que puede predecir el tropismo. Los virus X4 o R5 tienen diferentes cargas electrostáticas en los residuos presentes en el dominio de V3. Los virus R5 mantienen cargas entre +2 y +4 reflejado por la presencia de aminoácidos básicos (arginina y lisina) y aminoácidos ácidos (aspartato y glutamato). En contraste los dominios de V3 en los virus X4 tienen cargas netas mayores o iguales a 5 formados frecuentemente por aminoácidos básicos.²²

Las variantes virales X4 y R5 infectan células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés), en particular las variantes R5 infectan células como monocitos, macrófagos y linfocitos T que expresen CCR5, las variantes X4 preferentemente infectan a linfocitos T pero no a monocitos y macrófagos. Los virus

con tropismo dual infectan a ambos tipos celulares que expresen CCR5 y CXCR4 (Tabla 1).²²

Tabla 1.- Blancos celulares y correceptores para variante viral y carga neta del dominio V3 de gp120. (Tabla tomada de Goodenow y col., 2003).²²

Fenotipo viral	Correceptor	PBMC	MDM	MT2	Carga de V3
R5	R5	+	+	-	≤4
Dual	X4 y R5	+	+	+	≥5
X4	X4	+	-	+	≥5

Generalmente los virus R5 predominan en la infección temprana en el 80 a 90% de los individuos infectados y que inician el tratamiento antiviral. En cambio durante la etapa crónica de la infección, predomina una mezcla de poblaciones virales R5 y X4 que se encuentran en más del 50% de los infectados y que reciben terapia antirretroviral altamente activa (TARAA).^{23, 24} Las variantes de virus X4 son más patogénicas y virulentas respecto a las R5, se presentan en la etapa tardía de la infección y están asociadas con bajos niveles de células T CD4+ y altas cargas virales, en esta etapa ocurre una rápida progresión a SIDA.²⁵ Los mecanismos que subyacen a la ventaja selectiva del establecimiento de los virus con tropismo R5 aún se desconocen, aunque se ha demostrado que las células blanco que determinan el establecimiento de la infección inicial preferentemente expresan al receptor CCR5.²⁵

Determinación del tropismo proviral

La gran mayoría de las personas infectadas con el VIH-1 y que reciben tratamiento antirretroviral mantienen la carga viral indetectable o con niveles muy bajos del ARN viral en el plasma.²⁶ En general, para garantizar la obtención de un resultado positivo, la prueba de tropismo requiere de al menos 1,000 copias/ml de ARN viral en plasma,

suero o sobrenadante de cultivo.²⁷ Cuando se requiere determinar el tropismo en muestras de individuos que reciben tratamiento y que por lo tanto, tienen niveles de carga viral indetectables, el tropismo es determinado del genoma proviral del VIH-1 integrado en las PBMCs. La determinación del tropismo se realiza mediante la amplificación por PCR y la secuenciación de la región V3 de gp120 mediante la técnica de Sanger.^{9, 28}

ADN viral no integrado

La integración del genoma viral en la cromatina huésped es el sello distintivo de la replicación retroviral, sin embargo, durante la infección natural por el VIH-1, existen diversas formas de ADN viral no integradas o episomales que se encuentran con frecuencia **(Figura 4)**.^{29, 30} Este ADN viral episomal surge cuando el ADNdc viral no llega a integrarse en el genoma del huésped y puede ser de dos formas:

- ADN circular no integrado que puede ser de dos tipos:
 - ✓ 1-LTR circular: se encuentra en un 90% en el núcleo y el restante en el citoplasma³¹, se forma a través de la recombinación homóloga de los LTR del ADN lineal, lo que resulta en la forma circular que lleva sólo una copia de la LTR y retrotranscritos incompletos que portan un sólo LTR.
 - ✓ 2-LTR circular: que contiene la longitud completa del ADN viral y ambos LTR unidos en el núcleo por sistemas de reparación del ADN como

respuesta de protección de la célula hospedera en presencia de ADNdc foráneo.

- ADN lineal: único precursor del ADN proviral que contiene el genoma viral completo flanqueado por dos LTR.

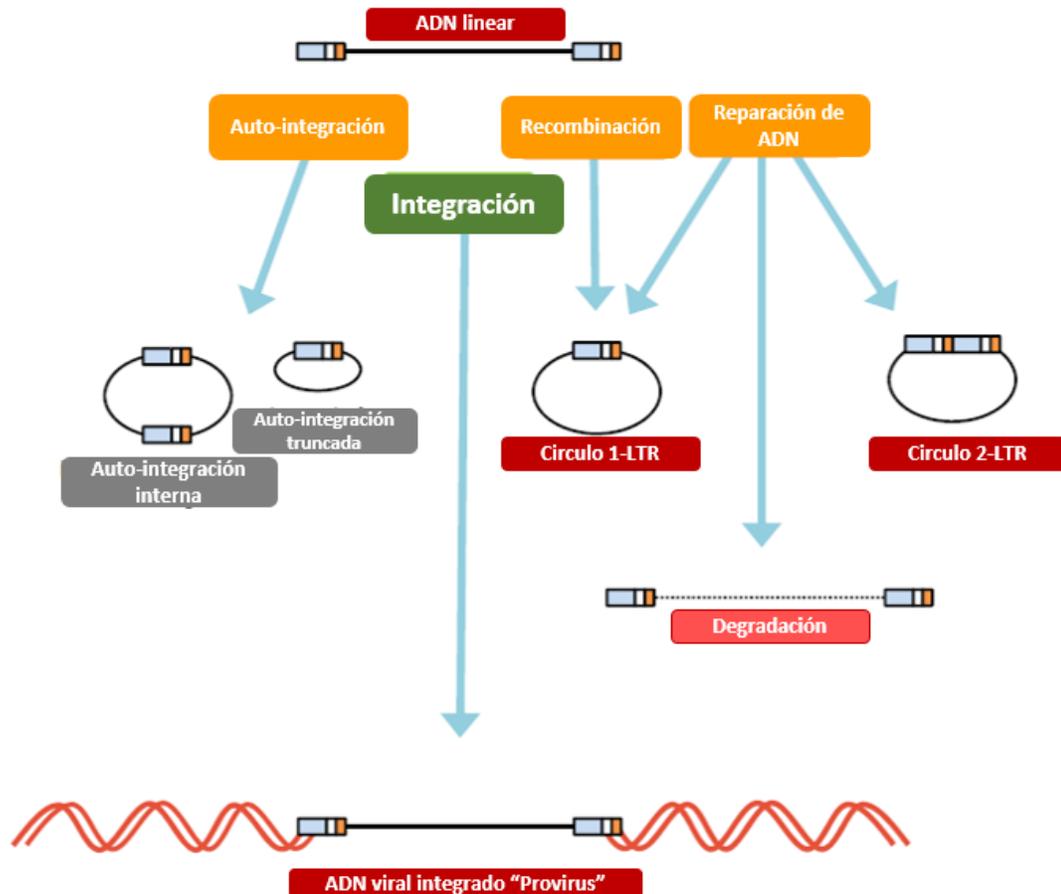


Figura 4. Formación de las distintas estructuras del genoma viral. Después de la retrotranscripción el ADNdc viral lineal es traslocado al núcleo donde se establece en diferentes formas. La integración del ADNdc viral (provira) es la forma más estable, sin embargo distintos mecanismos como auto-integración del genoma viral, recombinación homóloga de los LTR o por mecanismos de reparación del ADN (indicado en rectángulos naranja) pueden conducir distintas conformaciones episomales como 1-LTR y 2-LTR (rectángulos rojos), el ADNdc lineal el cual es degradado casi inmediatamente por nucleasas celulares (rectángulo rosa) y las autointegraciones (rectángulos color gris). (Figura tomada y adaptada de Sloan y col. 2011)¹⁹

La estabilidad de los distintos tipos del genoma viral con relación al ADN proviral se representa a continuación.

ADN viral integrado > ADN circular no integrado 1-LTR y 2-LTR > ADN lineal no integrado.

El ADN no integrado representa a la fracción más grande del ADN del VIH-1 en el núcleo de células T-CD4+ en reposo y activadas. Experimentos realizados *in vitro* demuestran que la mayor parte del ADN viral circular es de tipo 1-LTR y una pequeña cantidad de 2-LTR.^{32 33} Gracias a la facilidad para cuantificar el ADN viral 2-LTR, se propone que esta forma circular podría utilizarse como un marcador de la infección reciente debido a su estabilidad observada *in vitro* e *in vivo*³⁴. Además, se ha demostrado que las formas 2-LTR son incapaces de dirigir una infección productiva.³⁵

La función del genoma viral no integrado, cuando aún no hay integración del genoma viral con el genoma del huésped, es la transcripción de los genes virales.^{36, 37} Se ha descrito que todos los tipos de ADN no integrados podrían servir como plantillas transcripcionales antes de que exista una forma proviral y que en particular las formas circulares 1-LTR, pueden conducir a altos niveles de expresión de las proteínas virales.³⁸ Las formas circulares poseen una actividad transcripcional más baja que la forma proviral integrada, debido a la posición de la región LTR en su estructura, sin embargo la forma circular de 1-LTR es más activa que la forma 2-LTR. Esta diferencia parece ser debido a la interferencia entre las dos LTR de esta última.³⁸ Este hallazgo, aunado a la observación de que hay un número relativamente alto de los círculos 1-LTR en comparación con las otras formas no integradas, implica que éstos podrían ser un contribuyente importante para la transcripción, lo

que sugiere que pueden contribuir activamente a la cantidad total del virus producido, es decir, pueden ser consideradas como un reservorio viral.¹⁹

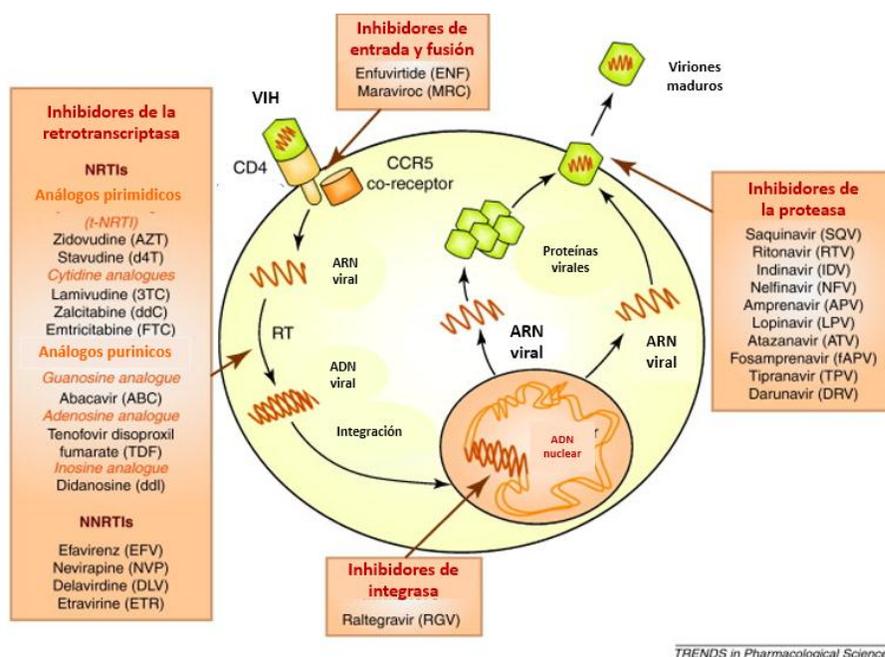
Tratamiento antirretroviral

El objetivo de la terapia antirretroviral es reducir la carga viral al mínimo con el fin de detener la progresión de la enfermedad y restaurar la actividad inmune. Los fármacos antirretrovirales actuales actúan sobre distintas proteínas virales necesarias para la replicación o la entrada del VIH-1 a la célula (**Figura 5**). Los antirretrovirales se clasifican en 5 grupos de acuerdo con su mecanismo de acción

- Inhibidores de la transcriptasa reversa (ITR), la enzima necesaria para la síntesis del ADN viral.
- Inhibidores de la enzima proteasa (IP) necesaria para la escisión de un polipéptido precursor que constituye las partículas virales.
- Inhibidores de la fusión entre el virus y la membrana celular.
- Inhibidores de la integrasa, una enzima necesaria para la integración del ADN viral dentro del ADN cromosómico de las células huésped.
- Inhibidores de entrada que actúan en el correceptor CCR5 e impiden la unión del virus a la membrana celular.

El uso de combinaciones de tres o cuatro fármacos o mejor conocido como TARAA ha sido muy efectivo para controlar la replicación del VIH-1 y tiene un efecto profundo en el pronóstico de la infección.³⁹ TARAA es eficaz en la supresión de la carga viral plasmática del VIH-1, reduciéndola eficazmente a menos de 40 copias/ml, el límite de

detección de los ensayos más aprobados y ha sido capaz de restaurar a niveles óptimos, a los linfocitos T-CD4+, para evitar infecciones por patógenos oportunistas. Sin embargo esta terapia no es capaz de eliminar por completo al VIH-1 de los pacientes infectados debido a la presencia de los reservorios virales en los linfocitos T-CD4+, macrófagos y monocitos, donde los antirretrovirales no tienen acceso ⁴⁰ Se ha demostrado que la replicación viral que continúa en los pacientes con TARAA también puede contribuir a la estabilidad del depósito proviral.³⁵



TRENDS in Pharmacological Sciences

Figura 5.- Antirretrovirales dirigidos a interrumpir el ciclo viral. Se muestran los principales fármacos usados y el proceso viral que inhiben. (figura tomada y adaptada de Apostolova y col. 2011).⁴¹

Aun con TARAA existe una viremia residual en plasma que puede variar entre 1-39 copias/mililitro dependiendo de la sensibilidad de la prueba de carga viral. ²⁶ Se ha descrito que las células NK, los monocitos y linfocitos T son el principal reservorio de

larga duración del VIH-1.^{40,42} Estos reservorios son importantes para la progresión de la enfermedad ya que una vez que se retira el tratamiento, la carga viral aumenta en unas pocas semanas, a niveles similares a los que presentan los pacientes vírgenes al tratamiento antirretroviral.⁴³ Teniendo en cuenta la vida media de las células T-CD4+, con infección latente, se estima que se necesitarían alrededor de 60 años para agotar el reservorio viral principal.⁴⁴

Cuantificación del genoma proviral y episomal

En la actualidad se han descrito dos marcadores de la progresión a SIDA en la infección por el VIH-1: la determinación de la carga viral, definida como el número de virus libres en el plasma y el conteo de linfocitos T CD4+. La carga viral plasmática determina el riesgo de progresión a SIDA o muerte, mientras que el conteo de los linfocitos T CD4+ indica el deterioro del sistema inmune del paciente.⁴⁵ Una vez que se ha administrado la terapia antirretroviral, la carga viral en plasma disminuye a niveles no detectables y el conteo de linfocitos T aumenta hasta mantenerse estable y aparentemente normal, por lo que es necesario otro marcador que pudiera ser de utilidad para el diagnóstico clínico y la progresión de la enfermedad. Una herramienta útil para esto es la determinación de la carga viral proviral, ya que proporcionaría información valiosa acerca del virus presente en los reservorios, donde los antivirales no pueden actuar.

Una vez que el virus ha entrado a la célula hospedera y completa su ciclo de replicación en ella, la proporción relativa del genoma integrado respecto a las formas

no integradas o episomales pueden variar de 1:1 a 1:100 *in vitro*⁴⁶, mientras que la proporción de las células que contienen formas no integradas del genoma viral *in vivo* durante la terapia antirretroviral se mantienen muy bajas en comparación con el momento del inicio del tratamiento.⁴⁷

Las formas circulares 1-LTR y 2-LTR no son capaces de producir una infección viral, sin embargo conservan la capacidad de mantener la expresión de las proteínas virales, particularmente por 1-LTR. La mayoría de los estudios están enfocados a cuantificar todas las formas de ADN viral y se ha descrito que niveles altos de éste están asociados con una rápida progresión a SIDA. Aunque la cuantificación del genoma integrado total y 2-LTR de manera simultánea en correlación con otros marcadores, puede proporcionar mayor información sobre la replicación viral aún con TARRA.⁴⁸ Tsiara *y col. en 2012* realizaron un estudio de meta-análisis que confirma que el ADN viral es el mejor predictor de la infección por el VIH-1, incluso mejor que el ARN viral en el plasma.⁴⁹ Por lo tanto el genoma viral puede ser un potencial indicador para la iniciación del tratamiento antirretroviral en pacientes vírgenes a tratamiento y para el monitoreo de estos fármacos.⁵⁰

Debido a la presencia de los reservorios virales y de los tipos diferentes del ADN viral en las células hospederas, se han desarrollado ensayos para la cuantificación del ADN proviral del VIH-1 mediante PCR convencional o de punto final y PCR en tiempo real.⁴⁵ La mayoría de estos ensayos se basan en la cuantificación del ADN viral total en los reservorios celulares y se centran en las PBMCs, debido a que no son fraccionadas en subtipos celulares, lo cual ofrece un ensayo con mayor rendimiento

escalable para el depósito latente.⁵¹ Sin embargo estrategias recientes permiten establecer diferencias entre la cuantificación de distintos tipos de ADN viral presente en el núcleo: desde el integrado ⁵², el linear no integrado y el circular 2-LTR y más recientemente 1-LTR **(Figura6)**.³¹ Esto ofrece distintas opciones para evaluar el papel que tiene cada uno de estos tipos de ADN en la replicación viral.

Los ensayos para la cuantificación del ADN proviral del VIH-1 en pacientes tratados con TARAA, sugieren que después de un año de la terapia antirretroviral eficaz las formas intracelulares de ADN del VIH-1 son suprimidas considerablemente ^{39, 53} y que hasta después de 8 años de TARAA, la carga proviral disminuye en la mayoría de los pacientes, aunque aún es detectable ^{54, 55} En este contexto, se considera que el ADN proviral del VIH-1 puede ser un marcador predictivo del riesgo de desarrollar el SIDA.⁴⁵

La dinámica de los niveles de integración del virus después de la terapia antirretroviral, puede proporcionar pistas sobre cómo los reservorios se acumulan y sobre la asociación de los fármacos a los niveles de los reservorios virales y el control de la replicación viral. Un ejemplo claro de esto es la asociación de los inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos con bajos niveles de viremia residual y altos niveles de carga proviral; mientras que el uso de los inhibidores de la proteasa se asocian con bajos niveles de carga proviral.^{56 57}

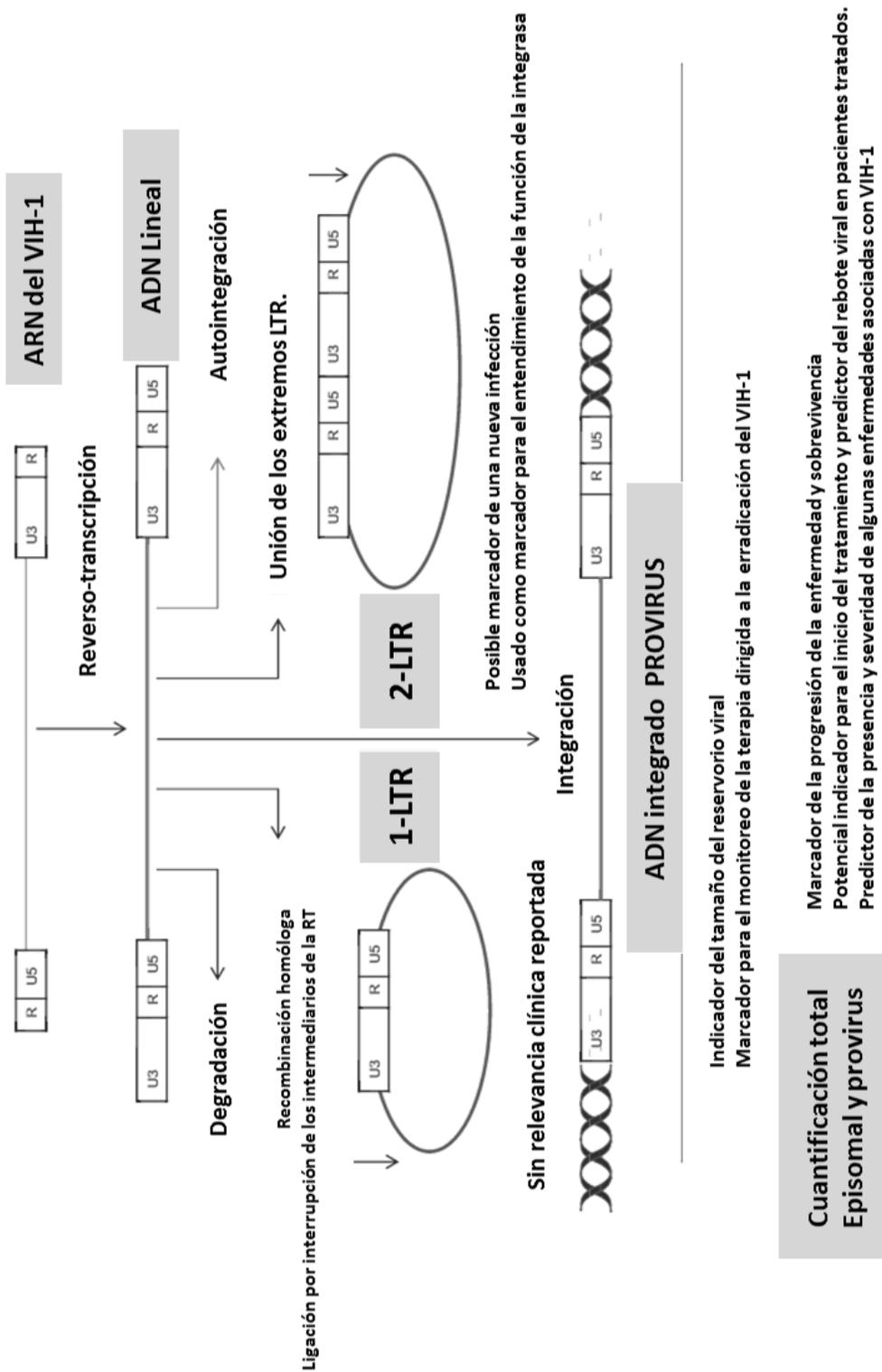


Figura 6. - Formas del ADN viral en una célula infectada y los posibles usos clínicos. (Figura tomada y adaptada de Alicjinou y col., 2015).⁴⁷

JUSTIFICACIÓN

Desde el descubrimiento del VIH-1 y el síndrome que produce, en México se han establecido métodos para determinar el avance y el estado de la infección, mediante métodos que cuantifican el nivel de las células TCD4+ y a la carga viral plasmática del virus. Sin embargo, no se ha establecido un método capaz de realizar la cuantificación del genoma viral integrado o carga proviral y que brinde información acerca de la replicación del virus en los reservorios, cuyo papel es determinante para el establecimiento de la infección. Por lo tanto la determinación de la carga proviral de las formas episomales del virus mediante un método reproducible y sensible, puede ser útil para la cuantificación de los cambios en la cantidad de virus presente en los reservorios en sangre periférica, los cuales no son detectables con las técnicas actuales que se realizan en México. Asimismo, es de gran importancia conocer la carga proviral y episomal en pacientes que reciben tratamiento ya que podría indicar el grado de la eficiencia de los fármacos antirretrovirales en el reservorio viral y que aunados con la determinación del tropismo proviral, podrían revelar indicios de la patogénesis del virus y utilizarse como un marcador que indique la replicación viral residual.

HIPÓTESIS

Si la replicación viral de los virus con tropismo X4 es más eficiente con respecto a las variantes R5 entonces existe una mayor carga proviral en las PBMCs para los virus X4 en pacientes que reciben TARAA. Por otra parte si la TARAA mantiene la replicación viral controlada la presencia de 2-LTR será escasa.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar un método para la determinación cuantitativa de la carga proviral y episomal del VIH-1, para determinar si existen diferencias de estos parámetros en muestras de pacientes infectados a los que se les ha determinado el tropismo proviral X4 o R5 y que reciben TARAA.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sintetizar las secuencias análogas correspondientes a las formas episomales 1-LTR, 2-LTR y secuencia de unión de 2-LTR del VIH-1 para la construcción de 3 plásmidos con las secuencias análogas al genoma viral no integrado
 - a. p-1LTR (sintético)
 - b. p-2LTR (sintético)
 - c. p-U2LTR (secuencia de unión de 2-LTR obtenida por infección natural)
2. Desarrollar un método de PCR en tiempo real para el análisis cuantitativo de la carga proviral y las formas episomales del VIH-1 en modelos de infección *in*

vitro, con líneas celulares de linfocitos T y monocitos humanos y cepas de referencia del VIH-1.

3. Estandarizar las condiciones óptimas para favorecer la amplificación exclusiva y cuantificación del fragmento 1-LTR, sin la presencia de la forma circular 2-LTR.
4. Obtener las curvas patrón para la determinación de la carga proviral y de las formas episomales del VIH-1 en muestras de pacientes con TARAA.
5. Cuantificar la carga proviral y episomal en muestras de pacientes infectados con VIH-1 que reciben TARAA y con tropismo proviral X4 y R5.
6. Determinar si existe una diferencia significativa entre la carga proviral y episomal del VIH-1 y los tropismos X4 y R5 de pacientes con TARAA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-Células

Se utilizó la línea celular 8E5 de linfoblastos humanos, que contiene una copia única del genoma del VIH-1 defectuosa, la cual no es infecciosa. La línea celular 8E5 se utilizó para realizar una curva patrón y determinar la cuantificación de la carga proviral. Esta línea celular se cultivará en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de glutamina 20 mM y 1% de penicilina/estreptomicina, a 37°C y 5% CO₂.

La línea celular MT2 proveniente de células T humanas aisladas a partir de linfocitos de sangre de cordón y co-cultivadas con células de pacientes con leucemia de células T adultas, se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de Glutamina 20 mM y 1% de penicilina/estreptomicina, a 37°C y 5% CO₂.

Como control negativo se usaron PBMCs no infectadas, células mononucleares de sangre periférica provenientes de donadores no infectados con VIH-1, usadas como control negativo.

PBMCs infectadas de pacientes infectados con el VIH-1.

2.- Virus

Para infectar a las células MT2 se usó la cepa IIB del VIH-1, con una alta capacidad para replicarse en las líneas de células T humanas, utiliza al receptor celular para quimiocinas CXCR4 como co-receptor por lo que tiene tropismo linfotrópico.

3.- Plásmido

Se usó el plásmido pJET1.2/blunt Cloning Vector (Thermo Scientific™, USA) de selección positiva para la clonación de los productos de PCR (hasta 10 kb con extremo romo o cohesivo) generados con cualquier ADN polimerasa termoestable. El plásmido permite la transformación directa de cepas *E. coli*. Contiene un gen letal que se interrumpe por la ligadura de un inserto de ADN en el sitio de clonación. Como resultado, sólo las células bacterianas con plásmidos recombinantes son capaces de formar colonias.

4.- Muestras de ADN de pacientes infectados con VIH-1

Se usó el ADN de 123 pacientes infectados con VIH-1 que reciben TARAA a los cuales previamente se les había realizado la prueba de tropismo proviral.

5.- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados en este se solicitaron al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su síntesis. Se generaron alícuotas con concentración de 10 pmol/μl.

6.-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para realizar las PCR necesarias se usó la enzima Platinum® *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogene™, USA) de alta fidelidad para obtener fragmentos largos y de alto rendimiento, esta enzima tiene función de corrección 3'→5' con actividad de exonucleasa.

7.- PCR en tiempo real

Para el PCR en tiempo real se usó el kit *Power SYBR*® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems ®. USA), el cual contiene todos los componentes a excepción de los oligonucleótidos y el templado. La enzima en este sistema es la *AmpliTaq Gold*® DNA Polimerasa e incluye una versión patentada de tinte ROX™ para una referencia interna pasiva necesaria para normalizar las fluctuaciones de fluorescencia no relacionadas con el PCR, como errores de pipeteo y evaporación de la muestra.

MÉTODOS

Preparación del medio de cultivo RPMI 1640® suplementado con suero fetal bovino.

Para el cultivo y mantenimiento de las células MT2 y 8E5 se preparó medio de cultivo R-10, para lo cual se adicionó el medio en polvo RPMI 1640® en un volumen aproximado de 500 ml de agua bidestilada y se mezcló con un agitador magnético. Se adicionó al mismo 2 g de NaHCO₃ y se ajustó el pH a 7± 0.2 empleando NaOH 1 N o HCl 1 N. Finalmente el medio de cultivo se aforó a 1 L con agua bidestilada y se

esterilizó por filtración con membranas de 0.22 μm . El medio de cultivo se almacenó a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Para su uso, el medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% glutamina (200mM) y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina 10,000 U/ml y 10 mg/ml respectivamente). El medio suplementado se almacenó a 4°C y se atemperó a 37 °C en el momento de su uso.

Cultivo de células MT2 y 8E5

Para cultivar a las células MT2 y 8E5 se usó el medio de cultivo RPMI suplementado. Las células se cultivaron en botellas de cultivo a una concentración de 1×10^6 células/ml a 37°C, 85% de humedad y 5% CO_2 . El medio se cambió cada tercer día mediante la recuperación y centrifugación de las células en suspensión a 805 xg por 10 minutos, posteriormente se descartó el medio y las células se resuspendieron en la solución amortiguadora de sales y fosfatos 1X (PBS 1X) para realizar el conteo celular en el hemocitómetro o cámara de Neubauer. Una vez realizado el conteo celular, se ajustó la concentración de las células a 1×10^6 células /ml en el medio de cultivo suplementado y se continuó el cultivo.

Se cultivaron 1×10^8 células 8E5 y se almacenaron en alícuotas de 1×10^6 células a -70°C hasta su uso. Las células MT2 se cultivaron para realizar la infección como se indica más adelante.

Medio de congelación

Se preparó medio de congelación para la criopreservación de las células. El medio contenía 90% de SFB y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) volumen/volumen. El medio se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Criopreservación de las células

Para preservar a las células MT2, 8E5 y PBMCs, se resuspendieron en el medio de congelación frío, a una concentración de 5 a 20 X10⁶ células/ml. Las células resuspendidas en este medio fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso.

Separación de PBMCs de los donadores de sangre y de pacientes infectados con el VIH-1.

Se realizó la separación de las PBMCs haciendo uso del gradiente de densidad empleando una solución separadora de linfocitos LymphoprepTM (STEMCELL TECHNOLOGIES, Noruega). Las PBMCs se separaron a partir de una muestra de sangre completa anticoagulada de los donadores de sangre y de los pacientes infectados con el virus. El procedimiento se describe a continuación.

El plasma se separó de la fracción celular por centrifugación a 805 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el plasma y se separaron los leucocitos de los eritrocitos, para lo cual el paquete celular se diluyó 1:2 con PBS 1X estéril, La dilución se mezcló por inversión suavemente para homogenizar las células y se transfirió lentamente a un tubo de centrífuga de 15 mL

al que previamente se le adicionaron 6 mL de Ficoll, de tal forma que no se rompiera el gradiente y se mantuvieran las dos fases. Posteriormente se centrifugaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos a 805 xg sin freno y sin aceleración, para la formación del anillo de las PBMCs entre las dos fases. Se recuperó la capa de las PBMCs y se transfirieron a tubos de Falcón de 15 mL, se adicionó PBS (proporción 3:1) para eliminar el Ficoll y plasma remanentes.

El lavado de las PBMC consistió en un centrifugación de la mezcla de PBMCs y PBS a 805 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células; se realizaron al menos dos lavados. Finalmente las células se contaron en la cámara de Neubauer y se almacenaron en medio de congelación a -70 °C hasta su uso

Extracción del ADN y su cuantificación.

Se realizó la extracción del material genético de las células con el uso del estuche de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit ® (QIAGEN, E.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se resuspendieron 5×10^6 células en un volumen de 200 ml de PBS en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml. Se agregaron 20 μ l de proteinasa K, 200 μ l del buffer AL y se mezclaron en el agitador por 15 segundos. Posteriormente la mezcla se incubó a 56 °C por 10 minutos y se concentró por centrifugación; se añadieron 200 μ l de etanol absoluto y se mezclaron nuevamente por 15 segundos en el agitador y se concentró por centrifugación. La mezcla se transfirió a una columna para

centrifugación QIAamp Mini® (QIAGEN, E.U.), se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto y se descartó el filtrado. Se añadieron 500 µl del Buffer AW1, se centrifugó nuevamente a 6000 x g por un minuto y se descartó el filtrado. Se realizó un lavado con 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó a 20,000 x g por 3 minutos, de la misma manera se desechó el filtrado. Finalmente se colocó la columna en un tubo de recolección y se agregaron 200 µl del buffer AE, se dejó incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y se eluyó el ADN por centrifugación a 6,000 x g por un minuto.

La cuantificación del material genético extraído y la determinación de su pureza se realizaron por espectrofotometría con el uso del equipo Nanodrop®.

Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del software A plasmid Editor (ApE, M. Wayne Davis v2.0.47, E.U.) con base en la secuencia de la cepa HXB2 del VIH-1. Las secuencias de los oligonucleótidos están ubicadas en regiones conservadas del genoma viral de acuerdo con el análisis realizado en el programa MEGA v.6 (Koichiro Tamura, E.U). Se hizo un alineamiento de las secuencias de los oligonucleótidos usando la base de datos de Los Álamos, presente en el compendio de secuencias del VIH-1 2013 ⁵⁸, que integra a más de 5013 secuencias. Se diseñaron dos oligonucleótidos en los extremos 5' del LTR5' y 3' del LTR3' del VIH-1 con secuencias de corte para la enzima *EcoRI* (**Tabla 2**). Así mismo en la tabla 2 se

enlistan los oligonucleótidos Alu-1 y Alu-2 previamente descritos para la cuantificación de la carga proviral⁵⁹

Tabla 2.- Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para el desarrollo de este trabajo. En el nombre del oligonucleótido se indica el sentido (F=forward, R= reverse) y la posición en que se alinean para la cepa viral HXB2.

OLIGONUCLEÓTIPO	CODIGO	SECUENCIA 5'→3'	Longitud
F0-7963HXB2	F0	TCCTGGCTGTGGAAAGATAC	20
F1-8508HXB2	F1	TTCAGCTACCACCGCTTGAGAG	22
F2-8925HXB2	F2	CACAAGTAGCAATACAGCAGC	21
F3-9352HXB2-LTR	F3	GACAGCCGCCTAGCATTTCATC	22
F4-9645HXB2-LTR	F4	GTGCCCGTCTGTTGTGTGACT	21
F5-335HXB2-LTR	F5	TCGAGCTTGCTACAAGGGAC	20
F6-796HXB2	F6	GCGAGAGCGTCAGTATTAAGC	21
F7-1268HXB2	F7	AAGAGAAGGCTTTCAGCCCAG	21
R0-1784HXB2	R0	GTCTTACAATCTGGGTTCCG	20
R1-1486HXB2	R1	GTTCTGCTATGTCACTTCC	20
R2-1033HXB2	R2	GCACACAATAGAGGGTTGCTAC	22
R3-768HXB2	R3	CTCTCCTTCTAGCCTCCGCT	20
R4-408HXB2-LTR	R4	TATGCAGGATCTGAGGGCTCG	21
R5-124HXB2-LTR	R5	AGTTGTAGCACCATCCAAGG	22
R6-9327HXB2-LTR	R6	CCTCCACTCTAACACTTCTCTC	22
R7-8789HXB2	R7	CACTTGCCACCCATCTTATAGC	22
LTR5'-EcoR1	E5	GAATTCTGGAAGGGCTAATTCCTCC	27
LTR3'-EcoR1	E3	GAATTCTGCTAGAGATTTCCCACTG	26
Alu1	Alu1	TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGG	24
Alu2	Alu2	GCCTCCCAAAGTCTGGGATTACAG	25

Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa y teñidos con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene E.U.A.). Para realizar un análisis más detallado de los productos de PCR, se usó el sistema bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies E.U.), el cual implementa los principios de electroforesis y de citometría de flujo para la determinación del tamaño, cuantificación y control de calidad del ADN. Se usó el estuche de análisis de ADN de alta sensibilidad siguiendo las instrucciones del fabricante. El estuche permite la identificación de concentraciones del ADN de doble cadena de 5 pg/μl y fragmentos desde 35 hasta 10,380 pb.

Infección de las células MT2

Se cultivaron células MT2 hasta obtener 7.5×10^7 células de las cuales se usaron 6.3×10^7 para ser infectadas con 2 ml de la cepa viral IIB/H9 que tiene una dosis infectiva media (TCID_{50/m}) de 631×10^3 y una concentración de 171 ng/ μ l del antígeno p24. Las células se incubaron por 2 horas agitando suavemente el tubo cada 15 minutos a 37 °C; posteriormente se centrifugaron a 805 x g por 10 minutos, se resuspendieron en medio RPMI suplementado y se sembraron 9×10^6 células por pozo, en placas de 6 pozos a una concentración de 1.5×10^6 células/ml. Simultáneamente se sembraron células sin infectar con la misma concentración de células que los pozos con células infectadas y que se utilizaron como controles negativos. La placa de cultivo se incubó a 37°C, 85% de humedad y 5% CO₂ durante 7 días. Las células y el sobrenadante fueron cosechados los días 1 a 7 a partir del día de infección y se centrifugaron a 805 x g por 10 minutos. Las células se contaron y almacenaron en medio de congelación a -70 °C hasta su uso.

Determinación del antígeno p24 de la cápside viral

El sobrenadante de cultivo obtenido de las células MT2 infectadas, se usó para la determinación de la concentración del antígeno p24 de la cápside del virus, con el estuche Alliance HIV-1 P24 Antigen ELISA (Perkin Elmer®, E.U.A.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomaron 200 μ l de sobrenadante de cada día de infección y se realizaron diluciones seriadas para la cuantificación. Las diluciones que se realizaron fueron: dilución 1:2000 para los días 1-3 post-infección y 1:4000

para los días 4-7. Se realizó la lectura de la absorbancia por espectrofotometría a 490 nm en el equipo .

Determinación de la carga viral

Para determinar la carga viral del VIH-1 se usó 1 ml del sobrenadante de cultivo de la infección de las células MT2 de los días 1 a 7 post-infección, se usó para la y se determinó mediante RT-PCR en tiempo real en el sistema automático ABBOTT Real Time HIV-1®, que tiene un rango de detección de la carga viral de 40 a 10,000,000 de copias/mL.

Obtención del fragmento de unión de 2-LTR

Para obtener la región de unión de 2-LTR se realizó un PCR de punto final usando los oligonucleótidos F3 y R5 (**Tabla 2**), para generar un fragmento de 513 pb. Se utilizó el material genético de las células MT2 infectadas con la cepa viral IIB. En cada reacción se colocaron 500 ng de ADN.

Las reacciones de PCR se realizaron usando el estuche Platinum® *Taq* DNA Polymerasa High Fidelity, siguiendo las instrucciones del fabricante con un volumen final de 50 µl. Se agregó una unidad de la enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerasa, y MgSO₄ a una concentración de 2.5 mM., la concentración de los oligonucleótidos usados fue equimolar (200 pM) y dNTPs a concentración de 200 µM cada uno. Las condiciones del PCR para el fragmento F3-R5 fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 15 seg a 95 °C, seguido de 15 segundos a 60 °C y 30 seg a

68°C y finalmente un ciclo de 10 min a 68°C. Al terminar el ciclo de amplificación, la reacción se mantuvo a 4°C.

Para aumentar el rendimiento de la amplificación del fragmento F3-R5 se agregó DMSO al 5% (2.5 µl en volumen de reacción de 50 µl). El DMSO es una molécula orgánica usada para la optimización del PCR capaz de impedir la formación de estructuras secundarias formadas en el ADN.

Para verificar la identidad del fragmento obtenido se realizó una digestión con la enzima de restricción *Hind*III (A>AGCTT) de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo estéril de 200 µl se agregaron 16.3 µl de agua desionizada estéril, 2 µl del buffer B, 0.2 µl de BSA (10 µg/µl), 1 µl del producto F3-R5 (500 ng) y se mezclaron por pipeteo, posteriormente se agregaron 5 unidades de la enzima *Hind*III (0.5 µl) y se mezclaron gentilmente. La mezcla se dejó incubar por 15 minutos a 37 °C y posteriormente se inactivó a 65 °C por 15 minutos. Un microlitro de la digestión fue colocado en un chip de alta sensibilidad y se examinó en el bioanalizador Agilent 2100.

Obtención de las secuencias de las formas circulares 1-LTR y 2-LTR.

Para la obtención de las secuencias de las formas circulares 1-LTR y 2-LTR se realizó una construcción sintética, para lo cual se amplificó la secuencia necesaria para la construcción en dos fragmentos que posteriormente fueron unidos.

Se diseñaron oligonucleótidos con sitios de corte de *EcoRI* en los extremos de los LTR 5' y 3' (**Tabla 2**). Previamente se realizó un análisis *in silico* en el programa ApE, para buscar la existencia de los sitios de corte con la enzima *EcoRI* (G^AAATTC) en la secuencia de interés, para evitar cortes no deseados (**Figura 7**).

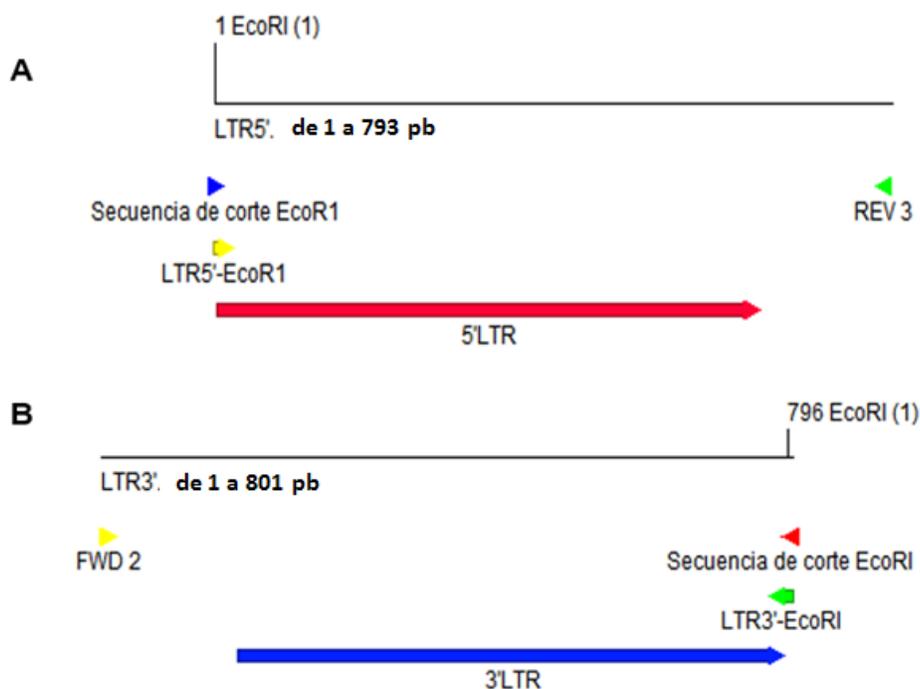


Figura 7.- Diseño de oligonucleótidos para la construcción de las formas circulares 1 y 2-LTR. **A)** Esquema y secuencia correspondiente al producto flanqueado por los oligonucleótidos E5-R3, en rojo el LTR5' del genoma del VIH-1. **B)** Esquema y secuencia correspondiente al producto flanqueado por los oligonucleótidos F2-E3. Los oligonucleótidos forward están marcados en amarillo y en verde los oligonucleótidos reverse. Se contrastan los sitios de corte de *EcoRI* al principio y al final de las secuencias de los LTR5' y LTR3' respectivamente.

Para la obtención de los productos requeridos se usó como template 500 ng del material genómico de las células 8E5 y los oligonucleótidos E5-R3 para la obtención del fragmento LTR5'-Gag de 793 pb (**figura 7 A**) y los oligonucleótidos F2-E3 para la obtención del fragmento Nef-LTR 3' de 801 pb (**figura 7 B**). La reacción de PCR se llevó a cabo usando el estuche Platinum® *Taq* DNA Polimerasa High Fidelity

siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó usando los oligonucleótidos en concentraciones equimolares (300 nM), dNTPs a concentración de 200 μ M cada uno, concentración de MgSO_4 3.5 mM y DMSO al 5%. Las condiciones de termociclación para los fragmentos F2-E3 y E5-R3 fueron las siguientes: un ciclo de 2 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguido de 15 segundos a 58 °C y 1 minuto a 68°C finalmente un ciclo de 10 minutos a 68°C y se mantuvo a 4°C por 10 minutos. A los productos obtenidos se les realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (G^AAATTC) de Promega® siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo estéril de 200 μ l se agregaron 16.3 μ l de agua desionizada estéril, 2 μ l del buffer E, 0.2 μ l de BSA (10 μ g/ μ l), 1 μ l de los productos F2-E3 y E5-R3 (500 ng) por separado y se mezclaron por pipeteo. Posteriormente se agregaron 5 unidades de la enzima *EcoRI* (0.5 μ l) y se mezclaron gentilmente. La mezcla se dejó incubar por 15 minutos a 37 °C y posteriormente se inactivó a 65 °C por 15 minutos. Un microlitro de la digestión fue colocado en un chip de alta sensibilidad y se examinó en el bioanalizador Agilent 2100.

Construcción de 2-LTR

Tras la obtención de los fragmentos F2-E3 y E5-R3 y para generar los extremos cohesivos necesarios para la unión de los fragmentos, se realizó una digestión por la enzima *EcoRI* de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo estéril de 200 μ l se agregaron 16.3 μ l de agua desionizada estéril, 2 μ l del buffer H, 0.2 μ l de BSA (10 μ g/ μ l), 1 μ l del producto F2-E3 y E5-R3 (500 ng en dos reacciones

por separado) y se mezclaron por pipeteo, posteriormente se agregaron 5 unidades de la enzima *EcoRI* (0.5 μ l) y se mezclaron gentilmente. La mezcla se dejó incubar por 15 minutos a 37 °C para generar los cortes deseados y posteriormente se detuvo la digestión inactivando a la enzima a 65 °C por 15 minutos. Un microlitro de la digestión fue colocado en un chip de alta sensibilidad y se examinó en el bioanalizador Agilent 2100.

Una vez obtenidos los productos digeridos se purificaron con uso de las columnas de purificación ViroSeq™ HIV-1 genotyping System. Se les adicionaron 250 μ L de KCl 0.2 M y 20 μ l de los productos de la digestión, posteriormente se centrifugaron a 6000 xg durante 15 minutos, se adicionaron 250 μ L de agua desionizada estéril y se centrifugaron nuevamente a 6000 xg durante 15 minutos. Finalmente, se adicionaron 10 μ L de agua desionizada estéril, para eluir los productos de la digestión. Se invirtieron las columnas, dentro de tubos colectores y se centrifugaron nuevamente a 6000 x g durante 5 minutos.

Los productos de la digestión purificados fueron mezclados y ligados por la enzima T4 de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregó el total de ambos productos, 3 μ l del buffer de ligación 10X, tres unidades de la enzima T4 y agua desionizada estéril para completar 30 μ l, se mezcló por pipeteo suavemente y se dejó incubar toda la noche a 4°C para favorecer la ligación de extremos cohesivos. La ligación fue confirmada y purificada a través de geles prefabricados

para la separación de productos de PCR E-gel Clone Well 2% Sybr Safe™ (Invitrogene, E.U.A.).

Construcción de 1-LTR

Los mismos fragmentos amplificados F2-E3 y E5-R3 fueron usados para construir la secuencia correspondiente a 1-LTR de manera sintética. Previamente se realizó un análisis *in silico* en el programa ApE para buscar los sitios de corte *Hind*III en la secuencia de los LTR, los cuales cuentan con un sitio de corte homólogo. Se llevó a cabo una digestión virtual para visualizar los resultados esperados y seleccionar los fragmentos necesarios para la construcción (**Figura 8**).

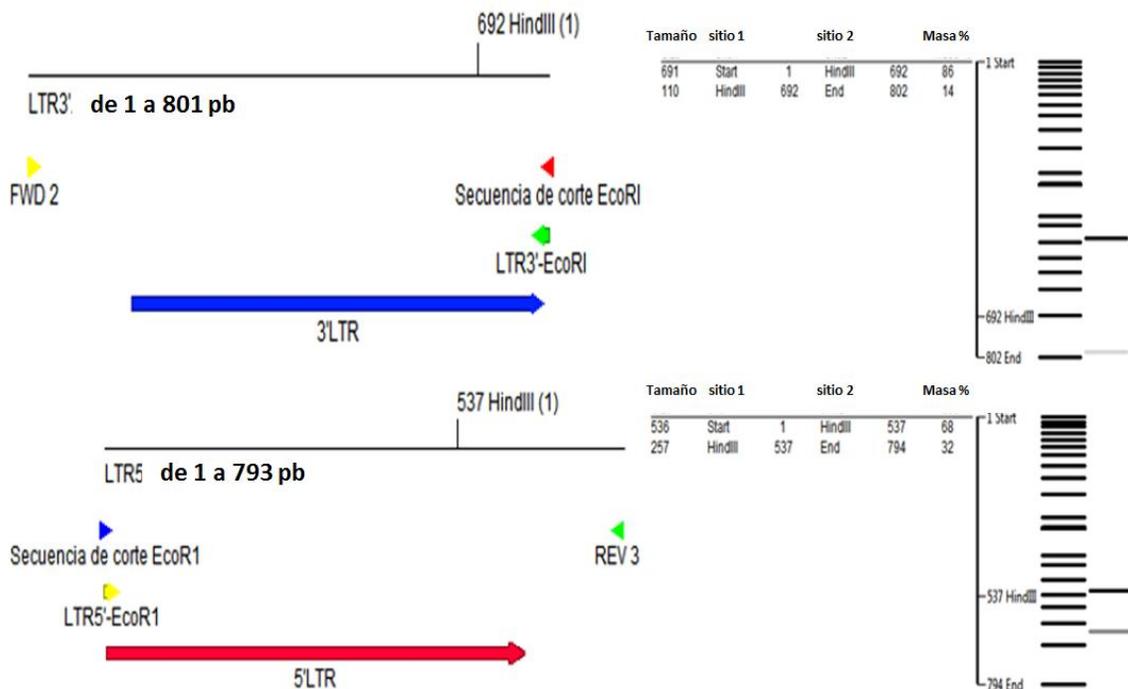


Figura 8.- Esquema representativo *in silico* que muestra los sitios de corte de la enzima *Hind*III en los fragmentos amplificados, a la derecha se muestra el patrón de bandeado *in silico* esperado después de la digestión con la enzima.

Los productos de PCR obtenidos por los oligonucleótidos F2-E3 y E5-R3 fueron digeridos por la enzima de restricción *HindIII* para obtener los fragmentos requeridos con extremos cohesivos. La digestión se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo estéril de 200 μl se agregaron 16.3 μl de agua desionizada estéril, 2 μl del buffer B, 0.2 μl de BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl del producto F2-E3 y E5-R3 (500 ng en dos reacciones independientes) y se mezclaron por pipeteo, posteriormente se agregaron 5 unidades de la enzima *HindIII* (0.5 μl) y se mezclaron gentilmente. La mezcla se dejó incubar por 15 minutos a 37 °C y posteriormente se inactivó a la enzima a 65 °C por 15 minutos. Un microlitro de la digestión fue colocado en un chip de alta sensibilidad y se examinó en el bioanalizador Agilent 2100.

Después de la digestión del fragmento F2-E3' se seleccionó el producto de 610 pb y de la digestión del amplificado E5-R3 se tomó el fragmento de 257 pb. Los fragmentos fueron purificados a través de los geles E-gel Clone Well 2% Sybr Safe™.

Finalmente se realizó la ligación de los fragmentos de 610 pb y 257 pb la cual se llevó a cabo por la enzima T4 de Promega® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron 100 ng de cada producto, 1 μl del buffer de ligación 10X, una unidad de la enzima T4 y agua desionizada estéril para completar 10 μl , se mezcló por pipeteo suavemente y se dejó incubar toda la noche a 4°C para favorecer la ligación de los extremos cohesivos.

Se corroboró la ligación para la formación de 1-LTR y se purificó por medio de electroforesis en E-gel Clone Well 2% Sybr Safe™ de Invitrogene.

Obtención de los plásmidos p-1LTR, p-2LTR y p-U2LTR

Ligación de los fragmentos 1-LTR, 2-LTR y F3-R5 al plásmido pJet 1.2/blunt Cloning.

Una vez obtenidos los fragmentos correspondientes a la unión de 2-LTR (513pb), la secuencia de 2-LTR (1588 pb) y 1-LTR (948 pb) se unieron individualmente al plásmido pJET1.2/blunt Cloning Vector siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para generar los extremos romos necesarios para la ligación, se colocaron por separado para cada reacción en tubos estériles de 200 µl: 10 µl del buffer 2x, y los fragmentos F3-R5, 1-LTR y 2-LTR (**Tabla 3**), 17 µl de agua desionizada estéril y 1 µl de la enzima DNA Blunting, se mezclaron en el agitador por 5 segundos y se incubaron a 70 °C por 5 minutos. Inmediatamente se colocaron en hielo y se agregó 1µl del plásmido pJET1.2 Blunt Cloning y 1 µl de la ligasa T4, se mezclaron en el agitador por 5 segundos y se centrifugaron para concentrar la mezcla. Finalmente se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos para obtener los plásmidos p-U2LTR, p-1LTR y p-2LTR respectivamente.

Tabla3.- Nanogramos usados para la ligación con el plásmido pJET1.2 Blunt para la formación de p-U2LTR, p-1LTR y p-2LTR

Fragmento	ng usados para la ligación	Producto obtenido (20µl)
Unión (F3-R5)	25	p-U2LTR
1-LTRs	50	p-1LTR
2-LTRs	75	p-2LTR

Transformación de bacterias *E.coli* DH5- α

Las ligaciones p-1LTR, p-2LTR y p-U2LTR, se usaron para transformar bacterias *E. coli* DH5- α mediante choque térmico. Para este procedimiento se usaron 2 μ l de la ligación y se mezclaron de manera uniforme con 50 μ l de bacterias DH5- α ultracompetentes previamente acondicionadas. La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, posteriormente 2 minutos a 42°C y 2 minutos en hielo. Después del choque térmico las células se colocaron en 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación por una hora. Finalmente se tomaron 200 μ l de las células en suspensión y se sembraron en cajas Petri con medio Luria Bertani (LB), suplementado con ampicilina a concentración de 100 μ g/ml, que se usó como medio de selección para favorecer el crecimiento de las células transformadas con el plásmido. Las placas con las células fueron incubadas a 37°C por 16 horas y las colonias que crecieron después de este tiempo fueron aisladas y cultivadas nuevamente en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml por 16 horas a 37°C y agitación constante. Se cosecharon las células obtenidas y se les extrajeron de los plásmidos mediante lisis alcalina.

Extracción de los plásmidos por lisis alcalina

Para obtener los plásmidos presentes en las bacterias transformadas se realizó el proceso de extracción por lisis alcalina para cada colonia transformada como se describe a continuación. La composición de las soluciones 1, 2 y 3 que se utilizaron para la lisis alcalina es la siguiente:

Soluciones:

- Solución 1 (100 ml):
 - 10 mM EDTA pH 8.0
 - 50 mM glucosa (0.9 g)
 - 25 mM Tris-HCl pH 8.0
- Solución 2 (500 μ l):
 - 400 μ l de H₂O
 - 50 μ l de SDS 10%
 - 50 μ l de NaOH 2N (2M)
- Solución 3:
 - 60 ml de acetato de potasio 5 M
 - 11.5 ml de ácido acético glacial
 - 28.5 ml de H₂O

Se colocaron 1.5 ml del cultivo de bacterias en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron por 2 minutos a 18,400 x g, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió vigorosamente con un agitador en 200 μ l de la SOLUCIÓN 1, posteriormente se le adicionaron 200 μ l de SOLUCIÓN 2 (preparada en el momento de la extracción) y se mezcló por inversión hasta que el lisado quedó claro. Una vez realizada la mezcla se adicionaron 200 μ l de SOLUCIÓN 3, se mezcló por inversión y se colocó en hielo durante 5 minutos, después de la incubación se centrifugó la mezcla durante 10 minutos a 18,400 x g para bajar los restos celulares y los

cromosomas, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio con 300 μl de cloroformo (para precipitar a las proteínas) y se mezcló por inversión, nuevamente se centrifugó durante 2 minutos a 18,400 x g. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo, adicionándole 2 volúmenes (respecto al volumen recuperado) de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos; enseguida se centrifugó durante 10 minutos para bajar el ADN. El sobrenadante se desechó con cuidado y se dejó secar el ADN obtenido. Posteriormente se agregó un volumen de etanol al 70% y se centrifugó durante 3 minutos a 18,400 x g, el sobrenadante fue desechado. La pastilla del ADN se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 30 μl de agua estéril y se le adicionó 1 μl de RNAsa (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Verificación de los plásmidos

Para verificar que los plásmidos son los correctos, se realizó una digestión con la enzima de restricción *HindIII* para linearizar los plásmidos, siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente para lo cual se usó 1 μg de cada plásmido. El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Se amplificaron por PCR las secuencias usando los oligonucleótidos correspondientes para cada secuencia clonada (F3-R5 para p-U2LTR y F2-R3 para p-1LTR y P-2LTR), como segunda prueba de verificación de cada plásmido y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe. Finalmente los plásmidos fueron secuenciados.

Secuenciación de plásmidos p-U2LTR, p-1LTR y p-2LTR

Reacción de marcaje con la técnica de Sanger.

Para secuenciar los plásmidos se realizó el de marcaje de los mismos con el estuche BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems® E.U.A). Para esto se adicionaron a una placa óptica de 96 pozos: 0.5 µg de cada plásmido, 3.2 pmol de cada oligonucleótido para el marcaje, 8 µl BigDye V3.1, 4 µl de buffer de secuenciación y agua desionizada estéril hasta 20 µl (**Tabla 4**). Posteriormente se selló la placa y se concentró la mezcla por centrifugación. El marcaje se realizó con las siguientes condiciones de termociclación: 96°C por 2 minutos, 25 ciclos con tres etapas de 96 °C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 1 minuto a 60 °C. Finalmente un ciclo de 4 °C por 10 minutos.

Tabla 4.- Oligonucleótidos usados para la secuenciación de cada plásmido.

PLÁSMIDO	µg por reacción	Oligonucleótidos Forward	Oligonucleótidos Reverse
p-U2LTR	0.5	F3, F4	R5, R4
p-1LTR	0.5	F2, F3, F4	R3, R4, R5
p-2LTR	0.5	F2, F3, F4	R3, R4, R5

Purificación de las secuencias marcadas

Se realizó la purificación de las secuencias marcadas inmediatamente después de la amplificación, para lo cual se adicionaron a cada pozo 80 µL de isopropanol al 80% y se centrifugó a 2250 xg durante 1 hora. Al finalizar se descartó el exceso de isopropanol por inversión, se adicionaron 80 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 40 minutos a 2250 xg. Después se descartó el exceso de etanol por inversión y

centrifugación colocando la placa de forma invertida sobre papel absorbente para eliminar el etanol. Se dejó evaporar el etanol restante a temperatura ambiente por 2 minutos. Finalmente, se agregaron 14 μL de formamida a cada pozo y se resuspendió el producto marcado por pipeteo vigorosamente. Para quitar las burbujas formadas y concentrar la mezcla, nuevamente se centrifugó por 15 segundos a 2250 xg. Se procedió a la secuenciación cubriendo la placa con una tapa de caucho y se colocó en el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, E.U.A.).

Análisis de la secuenciación

Se obtuvieron las secuencias proporcionadas por el equipo y se realizó el alineamiento y la obtención de las secuencias consenso con uso del programa SeqScape (ABI Prism ® versión 2.1, E.U.A.).

Diferenciación de la forma circular 1-LTR

Para lograr amplificar de manera diferencial la forma circular 1-LTR de 2-LTR, se realizó una mezcla de los plásmidos p-1LTR y p-2LTR en relación 1:1. Se resuspendieron 2.5 μg de cada plásmido en un volumen de 50 μl (50 ng de cada plásmido por μl). Previamente se estableció la temperatura de alineamiento ideal para los oligonucleótidos F2-R3 (60°C). Para la amplificación de la forma circular 1-LTR sin presencia de la forma circular 2-LTR se redujo el tiempo de elongación a un mínimo de 30 segundos como ha sido reportado anteriormente.¹⁹ Las condiciones del PCR fueron las siguientes: desnaturalización 4 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de:

94 °C por 30 segundos, 60°C por 15 segundos y 72 °C por 30 segundos. A la mezcla de la reacción se le agregaron de forma equimolar los oligonucleótidos F2 y R3 (300 pM), MgSO₄ a concentración de 2.5 mM y DMSO al 5% y se usó 1 µl de la mezcla para cada reacción.

Una vez amplificada la forma circular de forma diferencial, se procedió a usar el mismo protocolo para la amplificación de la forma 1-LTR, usando el material genético de las células MT2 del día 1 al 5 y de tres muestras de PBMC obtenidas de pacientes infectados con VIH-1 en diferentes condiciones clínicas: P-21 con tratamiento y falla al mismo, P-94 con tratamiento y sin falla y P-s/r sin tratamiento. Los resultados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y teñido con Sybr Safe. Además para un análisis detallado se hizo uso del bioanalizador Agilent 2100 en un chip de alta sensibilidad.

Se realizó un ensayo para disminuir la homología del amplificado 1-LTR respecto a las demás formas del genoma viral para lo cual se usaron los oligonucleótidos F0-R0, F1-R1 y F2-R2 con homologías del 21, 30 y 52% respectivamente (**Tabla 5**). Las condiciones del PCR fueron las siguientes 2 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguido de 15 segundos a 60 °C y 3 minutos a 68°C finalmente un ciclo de 10 minutos a 68°C y se mantuvo a 4°C por 10 minutos. Se analizaron los resultados con el bioanalizador Agilent 2100 en un chip de alta sensibilidad.

Se calculó la homología del fragmento 1-LTR con respecto a otras formas del genoma viral tomando en cuenta que la región homóloga compartida es el LTR de 634pb como se muestra en la siguiente fórmula.

$$\% \text{Homología} = (634/\text{tamaño del amplificado}) \times 100.$$

Tabla 5. Cálculo de la homología del fragmento amplificado con respecto a otras formas del genoma viral en relación a 1-LTR.

Oligonucleótidos	Tamaño de amplificado para 1-LTR	% Homología con respecto a la secuencia LTR
F2-R3	948 pb	66%
F2-R2	1215 pb	52%
F1-R1	2071 pb	30%
F0-R0	2907 pb	21%

Especificidad de la amplificación de la forma circular 2-LTR

Para amplificar de forma específica la región de unión de la forma circular 2-LTR se usaron los oligonucleótidos F4-R5 (221 pb) y se realizó una curva de temperatura 64-58°C y tres concentraciones de MgSO₄ (1.5 mM, 2.5 mM y 3.5 mM), para esto se usó el plásmido p-U2LTR (50 ng por reacción) y el ADN de las células MT2 infectadas con la cepa del VIH-1 IIB (500 ng por reacción). Las condiciones de termociclación fueron las siguientes: un ciclo de 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 64-58 °C por 15 segundos y 15 segundos a 68 °C seguido de un ciclo de 7 minutos a 68 °C y finalmente 4°C por 10 minutos. Los resultados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con Sybr Safe.

Finalmente se usaron los oligonucleótidos F4-R5 en muestras de PBMC infectadas con VIH-1, para verificar su especificidad usando el protocolo anterior con temperatura de alineación de 60 °C y concentración de MgSO₄ de 2.5 mM. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe.

Especificidad de la amplificación del fragmento para la carga proviral.

Para amplificar de forma específica la región usada para la carga proviral se usaron los oligonucleótidos F4-R3 (228 pb) y se realizó una curva de temperatura 66-58°C y se utilizaron tres concentraciones de MgSO₄ (1.5 mM, 2.5 mM y 3.5 mM). Se usó el genoma de las células 8E5 (500 ng por reacción) como templete. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: un ciclo de 94 °C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 64-58 °C por 15 segundos y 15 segundos a 68 °C seguido de un ciclo de 7 minutos a 68 °C y finalmente 4°C por 10 minutos. Los resultados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con Sybr Safe.

Finalmente se usaron los oligonucleótidos F4-R3 en muestras de PBMC infectadas con VIH-1 para verificar su especificidad usando el protocolo anterior con temperatura de alineación de 60 °C y concentración de MgSO₄ de 2.5 mM. Los resultados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe.

Curva patrón del genoma proviral y 2-LTR

Para realizar la cuantificación de la carga proviral y la forma circular 2-LTR se realizaron curvas patrón basadas en la dilución seriada del genoma de las células 8E5 para el genoma proviral y del plásmido p-U2LTR para la forma episomal 2-LTR.

Para la carga proviral se consideró que el genoma de una célula es equivalente a 6.6 pg⁵⁹, para lo cual se realizó un ajuste de concentración del genoma extraído de las células 8E5. La concentración inicial del concentrado de células se ajustó a 660 ng/μl (100 μl) y se realizó la dilución seriada para obtener un rango de 1×10^5 a 1×10^0 . En 5 tubos cónicos de 600 μl para microcentrífuga, libres de nucleasas se agregaron 90 μl de agua desionizada estéril en cada uno. Del concentrado principal se tomaron 10 μl y se agregaron al siguiente tubo etiquetado como 1×10^4 y se mezclaron vigorosamente con un agitador por 15 segundos, posteriormente se tomaron 10 μl de esta mezcla y se agregaron al siguiente, se repitió el procedimiento hasta lograr la dilución 1×10^0 (**Tabla 6**).

Tabla 6.- Diluciones efectuadas para construir la curva patrón para la cuantificación de la carga proviral. Se realizó con el uso del genoma de las células 8E5. Se consideró que el genoma de una célula es equivalente a 6.6 pg.

pg/μl	Número de células/μl
660,000	100,000
66,000	10,000
6,600	1,000
660	100
66	10
6.6	1

Para la construcción de la curva patrón de la forma episomal 2-LTR se consideró la siguiente fórmula para estimar el número de copias en el concentrado del plásmido (500 ng/μl).

$$\text{Número de copias} = \frac{(\text{concentración})(6.022 \times 10^{23})}{(\#pb)(1 \times 10^9)(650)}$$

- Donde la concentración corresponde a los ng por μl en el stock
- 6.022×10^{23} es el número de Avogadro
- #pb es el tamaño del plásmido en pares de bases
- 1×10^9 corresponde al factor para convertir en ng
- 650 corresponde al peso en g de un mol de un par de bases.

Por lo tanto en 500 ng/μl se tiene

$$(500 * 6.022 \times 10^{23}) / (3487 * 1000000000 * 650) = 1.3285 \times 10^{11} \text{ copias por } \mu\text{l}$$

Se ajustó el número de copias a 1×10^9 /μl en 1,000 μl, para lo cual en un tubo cónico para microcentrífuga de 1.5 ml se agregaron 7.53 μl del concentrado principal con concentración de 500 ng/μl y se adicionaron 992.47 μl de agua desionizada estéril para un volumen final de 1 ml. Se realizaron diluciones seriadas tomando 100 μl de la primera dilución como se describió anteriormente para obtener un rango de diluciones desde 1×10^9 a 1×10^1 copias por μl (**Tabla 7**).

Tabla 7.- Diluciones seriadas del plásmido p-U2LTR para la construcción de la curva patrón de la forma circular 2-LTR. El rango de las diluciones abarca 1×10^9 a 1×10^0 copias.

pg/ μ l	Copias
3760	1,000,000,000
376	100,000,000
37.6	10,000,000
3.76	1,000,000
0.376	100,000
0.0376	10,000
0.00376	1,000
0.000376	100
0.0000376	10
0.00000376	1

Curva patrón para la carga proviral.

Para cuantificar la carga proviral se realizaron dos reacciones de amplificación, la primera reacción se realizó usando tres oligonucleótidos diseñados para excluir a las formas episomales o no integradas del genoma viral. Los oligonucleótidos ALU1 y ALU2 se anclan a las secuencias Alu presentes sólo en el genoma de la célula hospedera mientras que el primer o cebador R2 está diseñado para alinearse al genoma viral en una región altamente conservada del gen gag, de tal manera que únicamente se amplificarán fragmentos pertenecientes al genoma viral integrado de forma exponencial y las formas episomales sólo se amplificarán de manera lineal.

La reacción de PCR se llevó a cabo usando el Kit Platinum® Taq DNA Polimerasa High Fidelity a un volumen final de 50 μ l, $MgSO_4$ a 4 mM, 300 nM de cada uno de los oligonucleótidos Alu1 y Alu2, 100 nM del oligonucleótido R2, 1 μ l de la enzima Platinum y 200 nM de dNTPs. Para cada reacción se usó 1 μ l de cada uno de los puntos de la curva patrón por duplicado (1×10^4 a 1×10^0). Las condiciones de

termociclación fueron las siguientes: un ciclo de 94°C 2 minutos seguido de 12 ciclos de 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 60°C y 3.5 minutos a 68°C, seguido de un ciclo de 7 minutos a 68 °C y 10 minutos a 4°C.

Inmediatamente después se preparó la segunda mezcla de reactivos de PCR, para la determinación de cada punto de la curva en tiempo real, para lo cual se usó el estuche Power SYBR Green Master Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. En un placa óptica de 96 pozos se agregaron por reacción 25 µl de la solución 2X del Master Mix, 1 µl (10 pmol) de cada uno de los oligonucleótidos F3 y R4 a una concentración final de 200 nM, 2 µl provenientes de la primera reacción para cada punto de la curva y 21 µl de agua desionizada estéril. El PCR se realizó en el termociclador 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, E.U.A.). Las condiciones para el PCR fueron las siguientes: un ciclo de 10 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C y 40 segundos a 60 °C. Los resultados fueron analizados con uso del programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, E.U.A.).

Para verificar la reproducibilidad de la curva patrón y para determinar los coeficientes de variación intra e inter ensayo se realizaron 4 repeticiones independientes por duplicado para cada punto.

Curva patrón para 2-LTR

Para construir la curva patrón de 2-LTR se usó el estuche Power SYBR Green Master Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. En un placa óptica de 96 pozos

se agregaron por reacción 25 μ l de la solución 2X del Master Mix, 1 μ l (10 pmol) de cada uno de los oligonucleótidos F3 y R5 a una concentración final de 200 nM, 1 μ l de cada punto de la curva para 2-LTR (6 puntos correspondientes a las diluciones 1×10^6 a 1×10^1) y 22 μ l de agua desionizada estéril. El equipo para llevar a cabo el PCR fue el termociclador 7500 Real-Time PCR. Las condiciones para el PCR fueron las siguientes: un ciclo de 10 minutos a 94 °C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C y 40 segundos a 60 °C. Los resultados fueron analizados con uso del programa 7500 System SDS Software.

Para verificar la reproducibilidad de la curva y para determinar los coeficientes de variación intra e inter ensayo se realizaron 4 repeticiones independientes por duplicado para cada punto.

Cuantificación de las muestras problema

Una vez estandarizadas las curvas para la cuantificación de la carga proviral y la carga episomal 2-LTR se realizó la cuantificación de las muestras de plasma de los pacientes infectados con el VIH-1.

Se obtuvieron y analizaron 123 muestras de ADN, correspondientes a pacientes que reciben TARAA y por lo tanto, tienen la viremia controlada. A estas muestras se les realizó previamente la determinación del tropismo proviral, mediante amplificación y secuenciación del dominio V3 de gp120 del VIH-1, por el método de Sanger. Es importante mencionar que las pruebas del tropismo proviral las realizóse llevaron a cabo por personal especializado del laboratorio de Virología Molecular del INCMNSZ.

Estas muestras se distribuyeron en dos grupos de acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba de tropismo proviral: tropismo CCR5 (R5) y tropismo CXCR4 (X4). Se realizó la cuantificación del material genético de las muestras y se seleccionaron las que presentaron una pureza mayor o igual a 1.8 con respecto a la relación 260/280. Se analizó el genoma de 100,000 células por cada reacción. Los resultados se reportaron en copias por millón de células.

Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadístico con ayuda del programa NCSS para realizar las pruebas de normalidad y varianza para la cuantificación de la carga proviral y 2-LTR en cada grupo (X4 y R5). Se determinó que la distribución no es normal para ninguno de los grupos y variables por lo que la prueba estadística más adecuada para realizar el análisis comparativo fue la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U.

RESULTADOS

El material genético necesario para el aislamiento del fragmento de unión de 2-LTR y para evaluar la diferenciación de las formas circulares 1-LTR y 2-LTR se obtuvo de las células MT2 infectadas con la cepa viral IIB. Visualmente la infección en estas células de linaje linfocitario se aprecia por la formación de sincicios a partir del tercer día de infección (**Figura 9**). Los sincicios son células gigantes multinucleadas que se originan de la fusión de una o más células infectadas con el VIH-1. La viabilidad celular fue disminuyendo hasta un 30% al día 7 de infección.

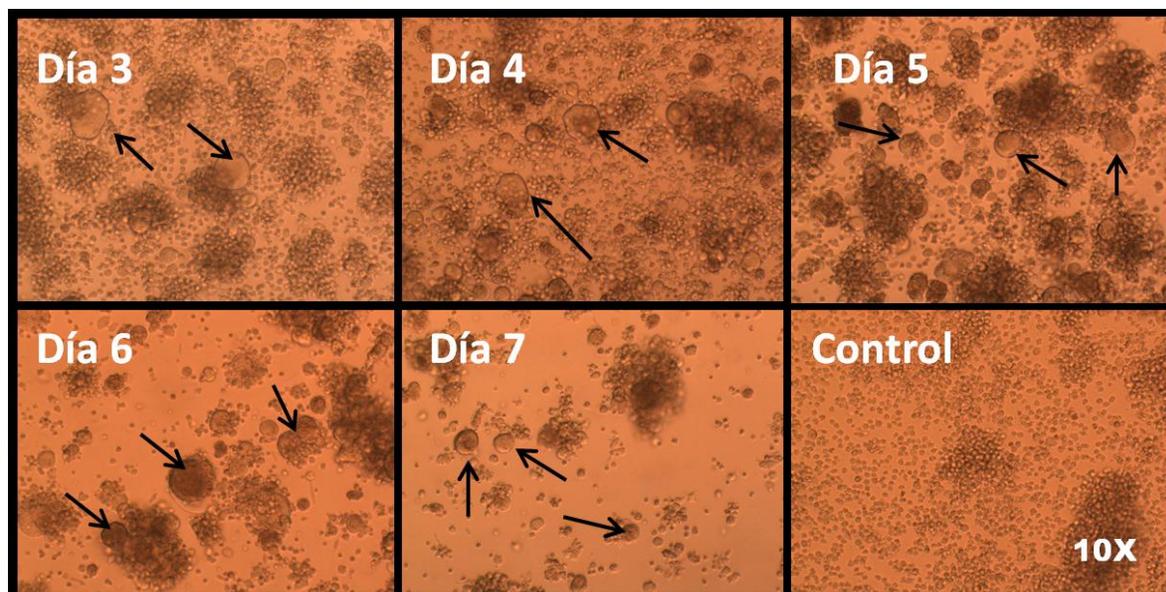


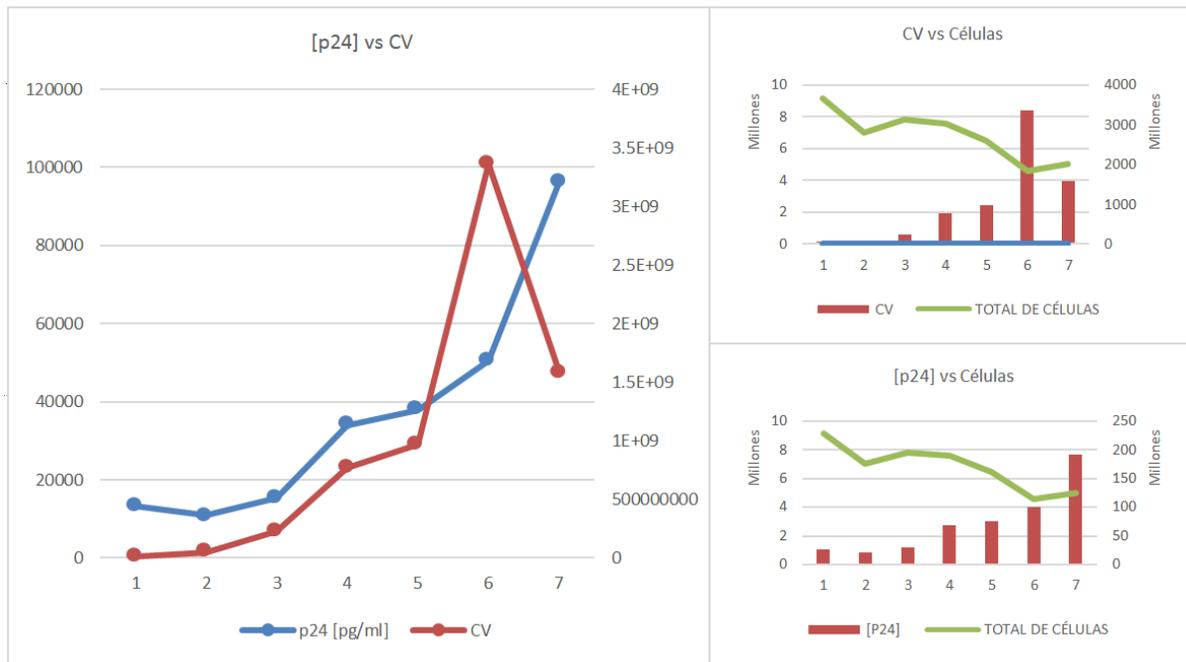
Figura 9.- Formación de sincicios en cultivos de células MT2 infectadas con la cepa IIB del VIH-1 de los días 3 al 7 post-infección. Los sincicios están señalados con flechas.

Para verificar que la infección fue exitosa se realizó la cuantificación del antígeno p24 de la cápside del virus, mediante una prueba de ELISA y la carga viral con el sistema automatizado ABBOTT® por RT-PCR tiempo real para la detección y cuantificación

de los virus libres en el sobrenadante de las células infectadas de los días 1 al 7. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 8** y en la **gráfica 1**.

Tabla 8.- Resultados de la determinación del antígeno P24 y de la carga viral en el sobrenadante de cultivo y número de células cosechadas en cada día de infección.

Muestras	Número de células infectadas	Carga Viral/ml	Antígeno p24 pg/μl
MT2 D1/IIIB	9.2 X10 ⁶	1.6 X10 ⁷	1.3 X10 ⁴
MT2 D2/IIIB	7.0 X10 ⁶	4.8 X10 ⁷	1.0 X10 ⁴
MT2 D3/IIIB	7.8 X10 ⁶	2.2 X10 ⁸	1.5 X10 ⁴
MT2 D4/IIIB	7.6 X10 ⁶	7.6 X10 ⁸	3.4 X10 ⁴
MT2 D5/IIIB	6.5 X10 ⁶	9.6 X10 ⁸	3.7 X10 ⁴
MT2 D6/IIIB	4.6 X10 ⁶	3.3 X10 ⁹	5.0 X10 ⁴
MT2 D7/IIIB	5 X10 ⁶	1.5 X10 ⁹	9.6 X10 ⁴



Gráfica 1.- Determinación de la carga viral y antígeno P24 en los días 1 a 7 de la infección de las células MT2 por la cepa IIIB del VIH-1y su comparación con el número de células obtenidas.

Obtención del fragmento de unión de 2-LTR.

Se amplificó el fragmento de la región de unión de 2-LTR necesario para la construcción del plásmido p-U2LTR. Se usó el material genético de la infección

realizada en las células MT2/IIIB de los días 1-7 post-infección. Se observa una banda de tamaño esperado (513 pb) en los días 3 al 7 y una mayor amplificación en el día 5, además de ligeras bandas inespecíficas (**Figura 10**).

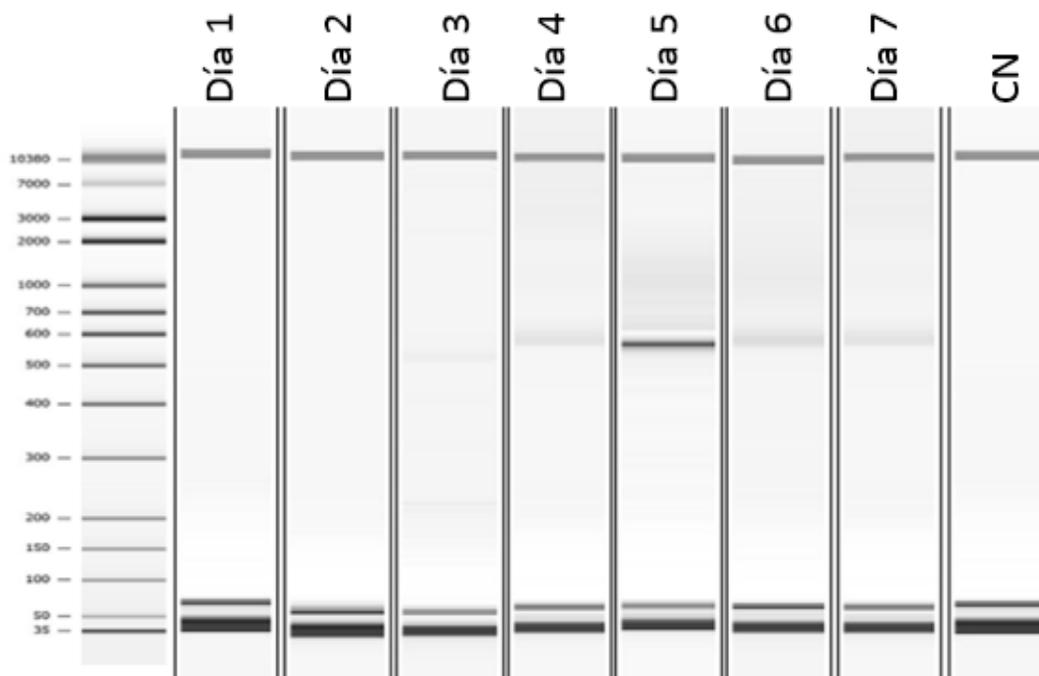


Figura 10.- Electroforesis del producto de PCR de la región de unión de 2-LTR flanqueada por FWD 3-REV 5 en los días 1-7 post-infección.

El electroferograma del día 5 muestra mayor concentración de template necesario para la clonación del fragmento de interés. Se realizó la adición de DMSO al 5% en la reacción de PCR para mejorar la eficiencia y se obtuvo un incremento en la amplificación así como la desaparición de amplificadas inespecíficos (**Figura 11**).

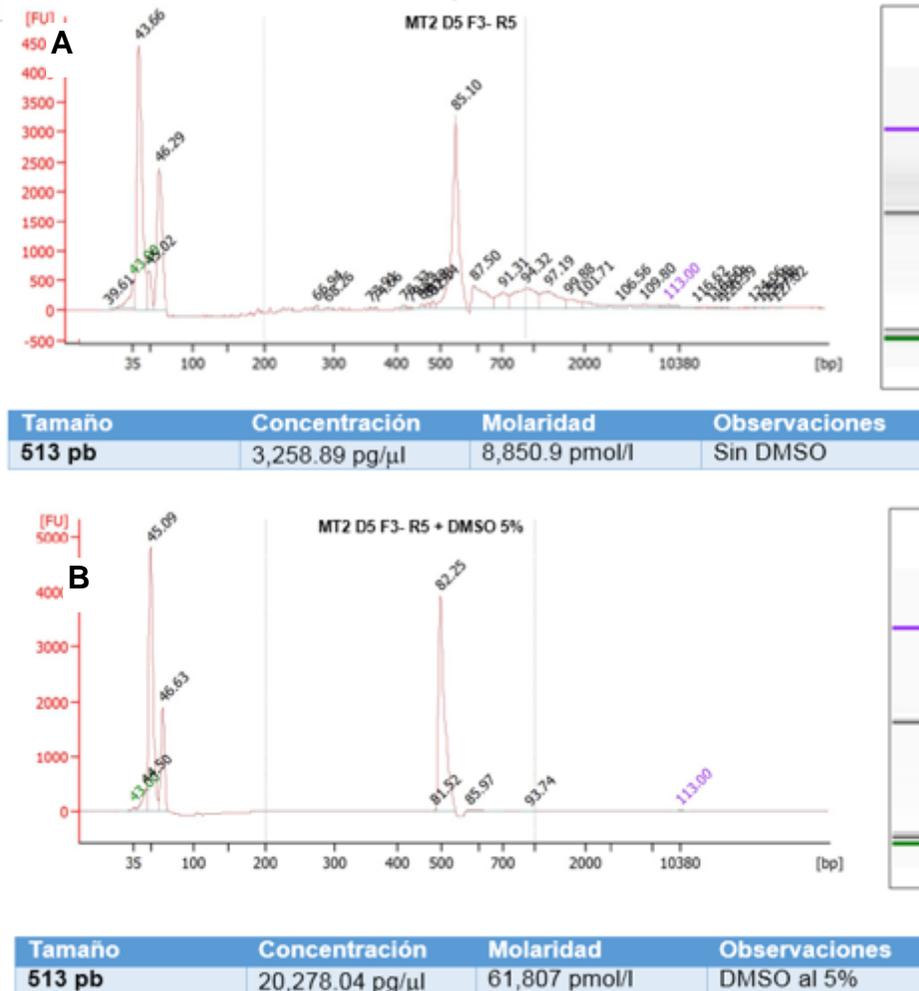


Figura 11.- Electroferograma de la amplificación del fragmento de unión de la forma circular 2-LTR en el día 5 de infección. **A)** se aprecia el pico correspondiente al fragmento esperado además de amplificados inespecíficos. **B)** Electroferograma del pico correspondiente al fragmento deseado, la adición de DMSO al 5% borra las señales inespecíficas y mejora el rendimiento del PCR.

Una vez obtenida la amplificación de F3-R5, se verificó que el fragmento correspondía a la secuencia de unión de 2-LTR, mediante la digestión con la enzima de restricción *HindIII* para realizar un corte específico en el fragmento amplificado por los oligonucleótidos F3-R5. De esta manera se corroboró la presencia del fragmento deseado al obtener dos productos de 249 y 264 pb (**Figura 12 C**) de acuerdo con el análisis computacional realizado en el programa ApE (**figura 12 B**).

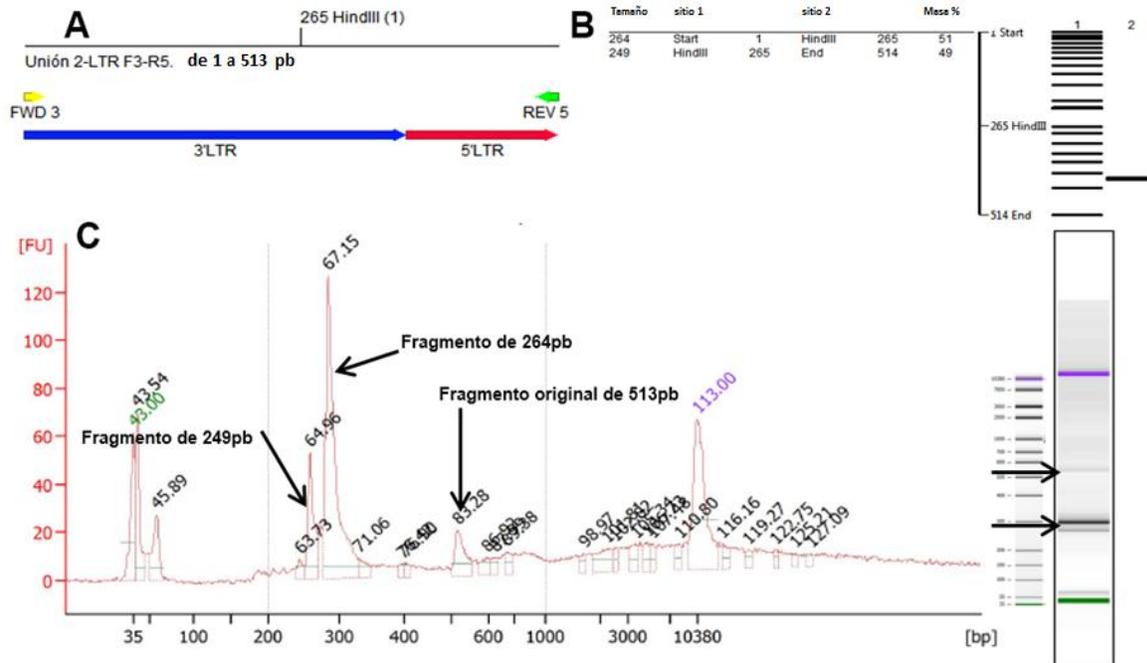


Figura 12.- Digestión del producto obtenido para la construcción de p-U2LTR A) Esquema que muestra el sitio de corte por HindIII del fragmento de 513 pb formado por los oligonucleótidos F3-R5. **B)** Digestión in silico del fragmento F3-R5 con la enzima HindIII mostrando los productos esperados. Imagen obtenida del programa ApE. **C)** Electroferograma que muestra parte del fragmento original sin digerir (flecha superior 513pb) obtenido por la amplificación de F3-R5, además se aprecian las bandas obtenidas (264pb y 249pb flecha inferior) tras la digestión de HindIII tal como se muestra en la figura B.

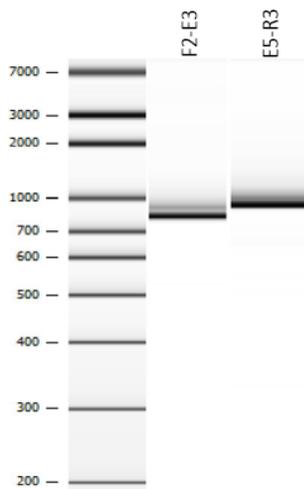


Figura 13.- Imagen del gel digital obtenido por el bioanalizador Agilent 2100, se observa el amplificado correspondiente a F2-E3 y E5-R3 de 793 pb y 801 pb respectivamente

Obtención de fragmentos 1-LTR, 2 LTR.

Para obtener los fragmentos correspondientes de las formas circulares 1-LTR y 2-LTR se realizó la amplificación de los fragmentos flanqueados por los oligonucleótidos F2-E3 y E5-R3 (**Figura 13**). Los fragmentos obtenidos fueron digeridos por dos enzimas de restricción de manera independiente,

EcoR1 y *HindIII*, para la generación de los extremos cohesivos necesarios para la construcción de 2-LTR y 1-LTR respectivamente.

Formación del fragmento 2-LTR

Para la forma 2-LTR se ligaron los fragmentos digeridos con *EcoRI*, los cuales no presentan cambio en el tamaño inicial. Se usaron los fragmentos y la enzima ligasa de ADN T4 para la unión de los extremos cohesivos. Una vez confirmada la ligación de 2-LTR se procedió a aislar el fragmento formado (1588pb) en el pozo de recuperación del E-gel Clone Well 2% Sybr Safe™ (Figura 14).

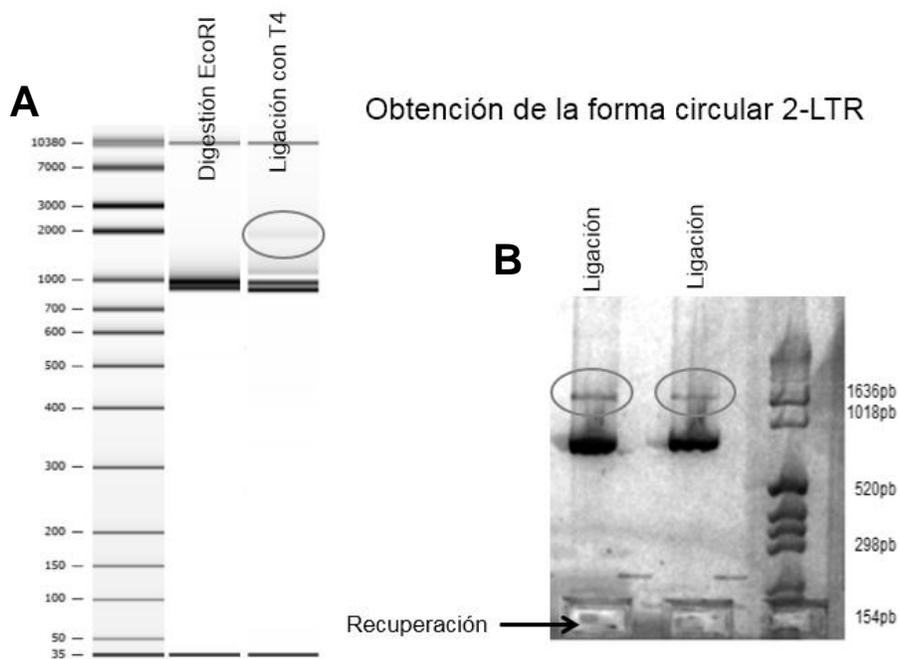


Figura 14.- Digestión y ligación de los fragmentos F2-E3 y E5-R3. **A)** gel digital obtenido por el bioanalizador Agilent 2100, donde se muestran los dos fragmentos F2-E3 y E5-R3 mezclados y digeridos con la enzima *EcoRI* en el carril 1, en el carril 2 se aprecia la formación del fragmento correspondiente 2-LTR encerrado con un círculo. **B)** Fotografía del gel de agarosa al 2% (E-gel Clone Well 2% Sybr Safe™), en ambos carriles se muestra la ligación obtenida por los fragmentos F2-E3 y E5-R3 y el pozo de recuperación para la clonación posterior. El tamaño del fragmento ligado es de 1600 pb

Formación de fragmento 1-LTR

Los fragmentos de la digestión con *HindIII* de F2-E3 (698 pb) y E5-R3 (257 pb) se separaron por electroforesis y se obtuvieron en el pozo de recuperación del E-gel

Clone Well 2% Sybr Safe™ (Figura 15 B carriles 1 y 2 indicados en óvalos color rojo), los mismos se unieron por la enzima T4 (Figura 15 C carril 1 indicado con una flecha) y se recuperaron por el mismo procedimiento.

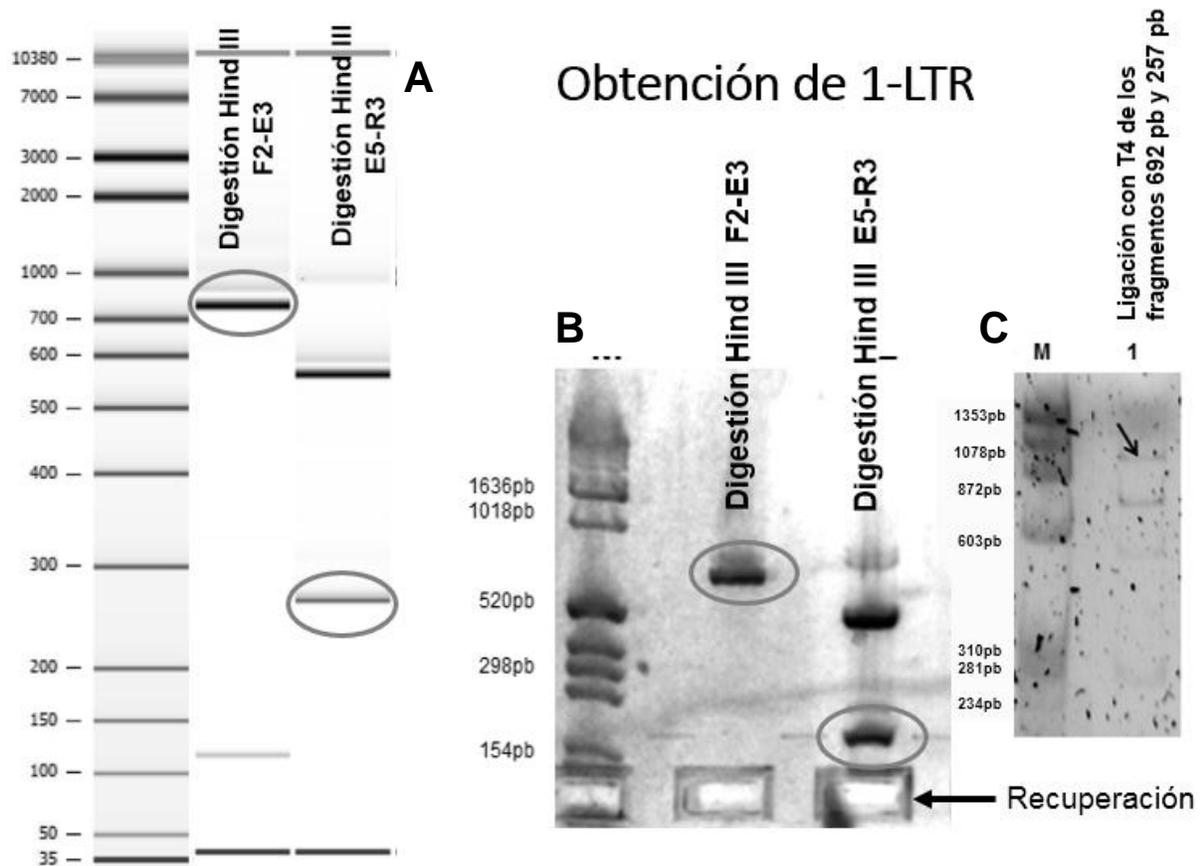


Figura 15.- Digestión de los amplificadores F2-E3 y E5-R3 con HindIII y ligación de los fragmentos 698 pb y 257 pb. **A)** gel digital obtenido por el bioanalizador Agilent 2100. Se muestran los dos fragmentos F2-E3 y E5-R3 digeridos con la enzima HindIII carril 1 y 2 respectivamente los fragmentos necesarios para la construcción de 1-LTR se indican con un círculo. **B)** Fotografía del Gel de agarosa al 2% (E-gel Clone Well 2% Sybr Safe™), en ambos carriles se muestra los fragmentos necesarios para la formación de 1-LTR y el pozo de recuperación en la parte inferior de la imagen **C)** Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con Sybr Safe, se indica con una flecha el producto obtenido por la ligación de los fragmentos de 692 pb y 257 pb. El tamaño del fragmento ligado es de 949 pb

Ligación de las secuencias en el plásmido pJET1.2

Después de la obtención de los fragmentos correspondientes a la unión de 2-LTR, de las formas 1-LTR y 2-LTR, éstas fueron clonadas por separado en el plásmido

pJET1.2. Los plásmidos obtenidos fueron usados para transformar a bacterias *E. coli* DH5- α y se obtuvieron 3, 1 y 5 colonias respectivamente.

Análisis de los plásmidos correspondientes a las formas circulares p-1LTR, p-2LTR y p-U2LTR

Se realizó un análisis por digestión enzimática con la enzima *Hind*III para verificar el tamaño del plásmido p-1LTR y p-2LTR así como los fragmentos esperados. De acuerdo con el análisis *in silico* en el programa ApE la digestión con *Hind*III para el p-1LTR produce una banda de 3042 pb (visible en los carriles 1-5 de la **figura 16**) y dos bandas tenues de 623 pb y 257 pb (no visibles en el gel de la **figura 16**). La digestión de p-2LTR produce una banda de 3042 pb (visible en el carril 6 de la **figura 16**) y dos bandas tenues de 634 y 618 pb visibles en el gel (**Figura 16**).

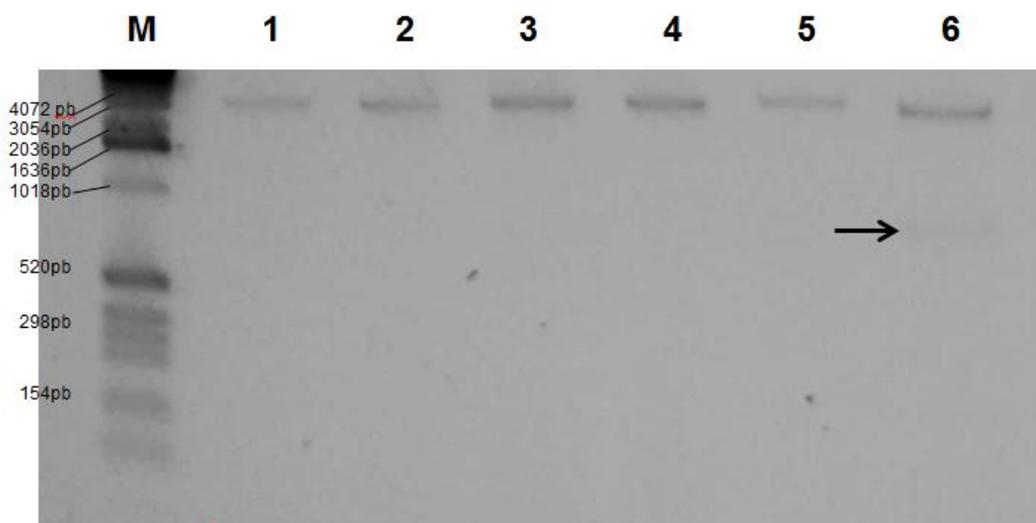


Figura 16.- Gel de agarosa al 2% que muestra las digestiones de los plásmidos correspondientes a 5 colonias obtenidas al transformar bacterias *E. coli* DH5-a (carriles 1-5) y una colonia correspondiente a 2-LTR (carril 6). Los tamaños obtenidos corresponden a los esperados de 3042 pb para 1-LTR liberando fragmentos de 634 y 257 pb y 3042 pb para 2-LTR liberando fragmentos de 623,634 y 257.

Además de la digestión enzimática, se realizó un PCR punto final para amplificar regiones particulares presentes en cada construcción. Para el p-1LTR se seleccionó la colonia 1 y se amplificó el fragmento que fue insertado usando F2-R3 (**Figura 17 A**) y F3-R3, que incluye a la región de unión después de la digestión (**Figura 17 C carril 3**). En el caso del p-2LTR se amplificó el fragmento completo (**Figura 17 B**) y la región de unión con el sitio de corte *EcoRI* con los oligonucleótidos F3-R5 de 513 pb (**Figura 17 C carril 2**).

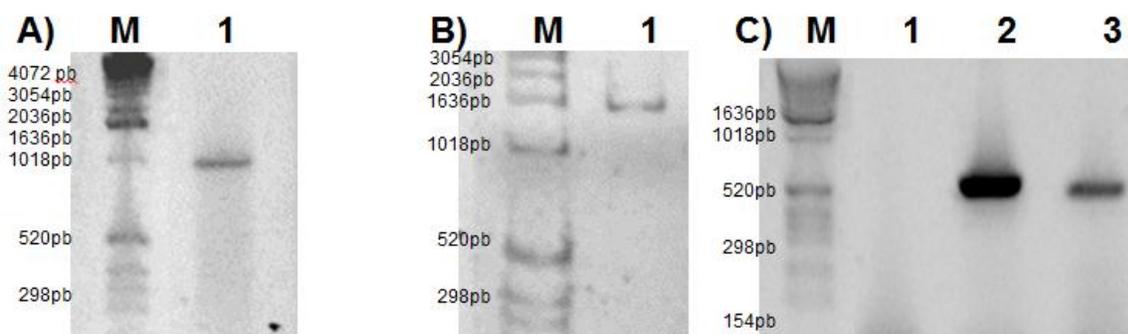


Figura 17.- Amplificación de PCR de los fragmentos ligados en el plásmido pJet1.2 correspondientes a las formas circulares y amplificaciones de las regiones que incluyen a las regiones de unión diseñadas para la construcción. **A)** Carril 1, se observa la banda de tamaño de 948 pb correspondiente al fragmento ligado 1-LTR de la colonia 1. **B)** Amplificación de la forma circular 2-LTR, tamaño de 1588 pb. **C)** Amplificación de la región de unión F3-R5 (carril 2 tamaño de 524pb) correspondiente a la forma circular 2-LTR y en el carril 3 el fragmento correspondiente a F3-R3 que incluye el sitio de unión de *HindIII* con tamaño de 453 pb. M= Marcador de peso molecular

El plásmido que contiene la región de unión F3-R5 (p-U2LTR) se analizó mediante la digestión con *HindIII* (carriles 7, 8 y 9 **figura 18**) Las bandas de las colonias 1 y 3 (carriles 7 y 9 de la **figura 18**) confirman que el plásmido aislado es el deseado (el tamaño esperado por la digestión es de 2200 pb aproximadamente) además se realizó la amplificación de dos fragmentos con oligonucleótidos F3-R5 (513 pb) y F4-R5 (228 pb). La amplificación por PCR confirmó la presencia de la secuencia deseada en el plásmido en dos de las tres colonias seleccionadas (**figura 18**). El

plásmido obtenido de la segunda colonia presentó un patrón de bandeado que incluye el tamaño esperado y bandas de mayor tamaño en las dos amplificaciones, lo que sugiere que varios fragmentos del mismo tamaño fueron ligados en el mismo plásmido, (**Figura 18** carril 2 y 5). Se seleccionó el plásmido de la colonia 3 para realizar la secuenciación.

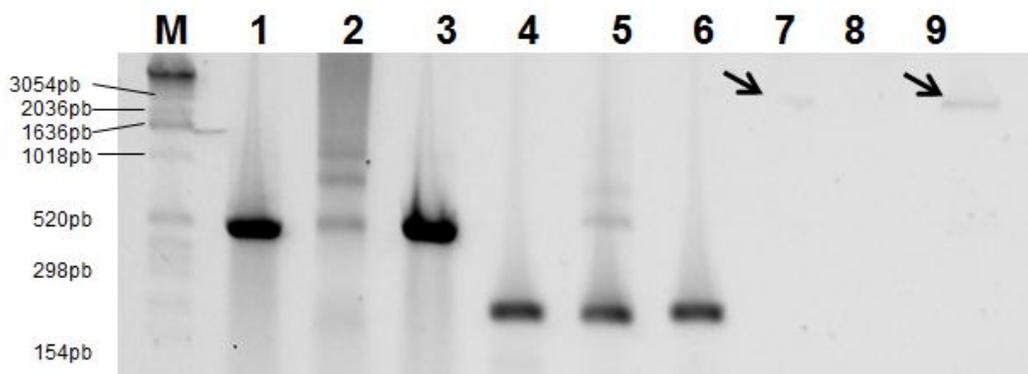


Figura 18.- Gel de agarosa al 2% que muestra la amplificación de los fragmentos formados por los oligonucleótidos F3-R5 de 513 pb (carriles 1-3) y el fragmento F4-R5 (carriles 4-6) de 221 pb. En los carriles 7-9 se aprecia el plásmido (indicado con flechas) después de la digestión con la enzima HindIII para las colonias 1-3 respectivamente.

Secuenciación de los plásmidos construidos

Los plásmidos fueron secuenciados para verificar la construcción. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa SeqScape v2.5 para realizar el alineamiento correspondiente.

Una vez obtenidos los plásmidos y confirmada su secuencia, se usaron para estandarizar las condiciones óptimas de PCR en la amplificación de los fragmentos que se requieren para la cuantificación de las distintas formas del genoma viral en las células.

Amplificación específica de 1-LTR

Para amplificar y diferenciar la forma circular 1-LTR de la forma 2-LTR se realizó el PCR con tiempo de elongación de 30 segundos. Con esto se obtuvo la amplificación diferencial de 1-LTR sin interferencia de 2-LTR (**Figura 19**).

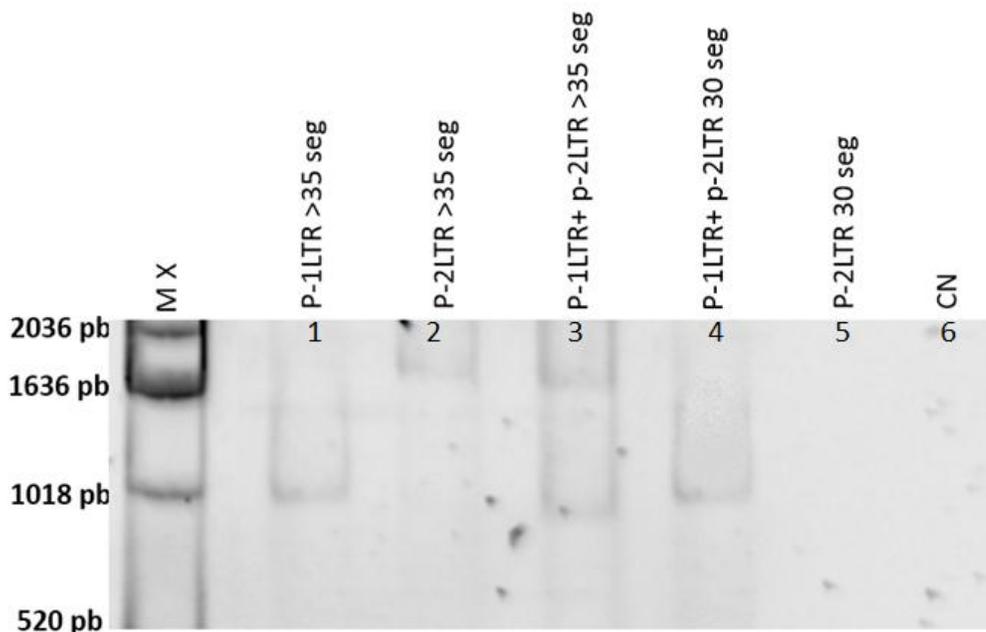


Figura 19.- Fotografía del gel de agarosa al 1.5 % teñido con Sybr Safe. Se muestra la amplificación diferencial de 1-LTR. En el carril 1 al 3 se realizó una amplificación con tiempo de elongación mayor a 35 segundos y carriles 4 y 5 amplificación con 30 segundos, carril 6 control negativo PBMC-.

La amplificación con tiempo de elongación de 30 segundos permite evidenciar la presencia de 1-LTR e impide la formación de la banda correspondiente a 2-LTR en la mezcla de plásmidos p-1-LTR con p-2LTR y 2-LTR solo.

Una vez optimizadas las condiciones para la forma 1-LTR, se realizó la amplificación de la secuencia de 1-LTR en los diferentes días de infección (1 al 5 post-infección) de las células MT2. Se probaron así mismo tres muestras de pacientes infectados con el VIH-1. En la figura 20 aprecia una banda correspondiente al tamaño de la forma

circular 1-LTR en los días 1 y 2 (**Figura 20** carriles 1 y 2), sin embargo se puede observar un barrido en todos los carriles que produce una interferencia para la apreciación clara de 1-LTR (**Figura 20**).

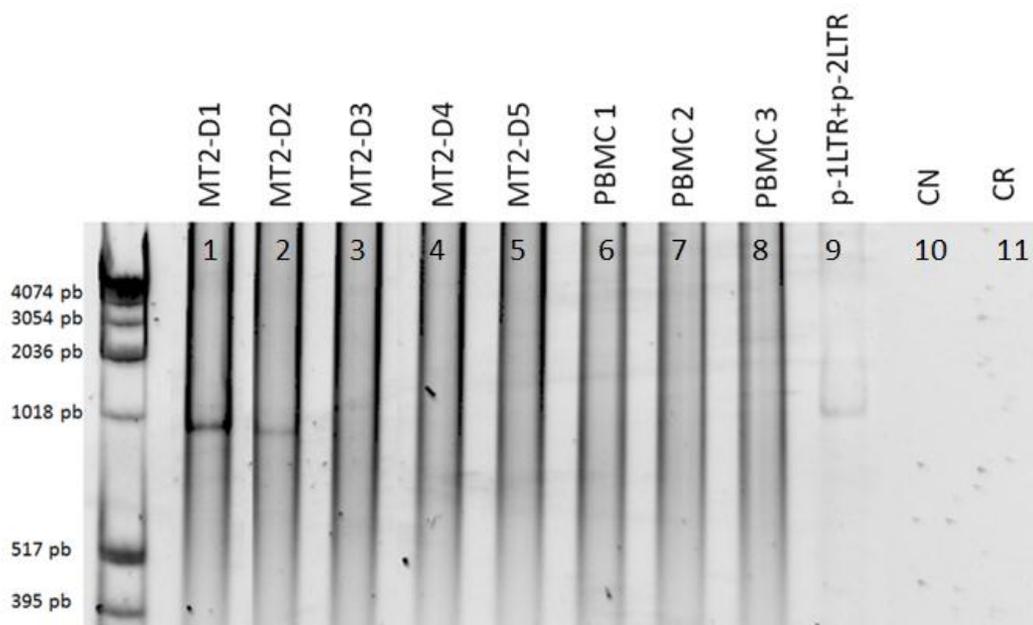


Figura 20.- Fotografía del Gel de agarosa al 1.5 % teñido con Sybr Safe, donde se muestra la amplificación de la forma circular 1-LTR de células MT2 infectadas con la cepa viral IIB en los días 1-5 post-infección (carriles 1-5) y PBMC infectadas con VIH-1 (carriles 6-8), control positivo para 1-LTR (carril 9), control negativo (carril 10) control de reactivos (carril 11).

Las muestras correspondientes a los días 1, 2 y 3 así como las muestras de PBMCs y el control positivo (p-1LTR+p-2LTR) fueron analizadas con uso del bioanalizador Agilent 2100 para verificar la interferencia de los resultados de forma detallada. Se realizó una dilución 1:20 de cada muestra para su procesamiento en el chip de alta sensibilidad. En la mayoría de las muestras es imposible definir de manera eficiente la banda correspondiente a 1-LTR a excepción del día 1 (**Figura 21** MT2 Día 1). Se aprecia la interferencia ocasionada probablemente por las otras formas del genoma viral.

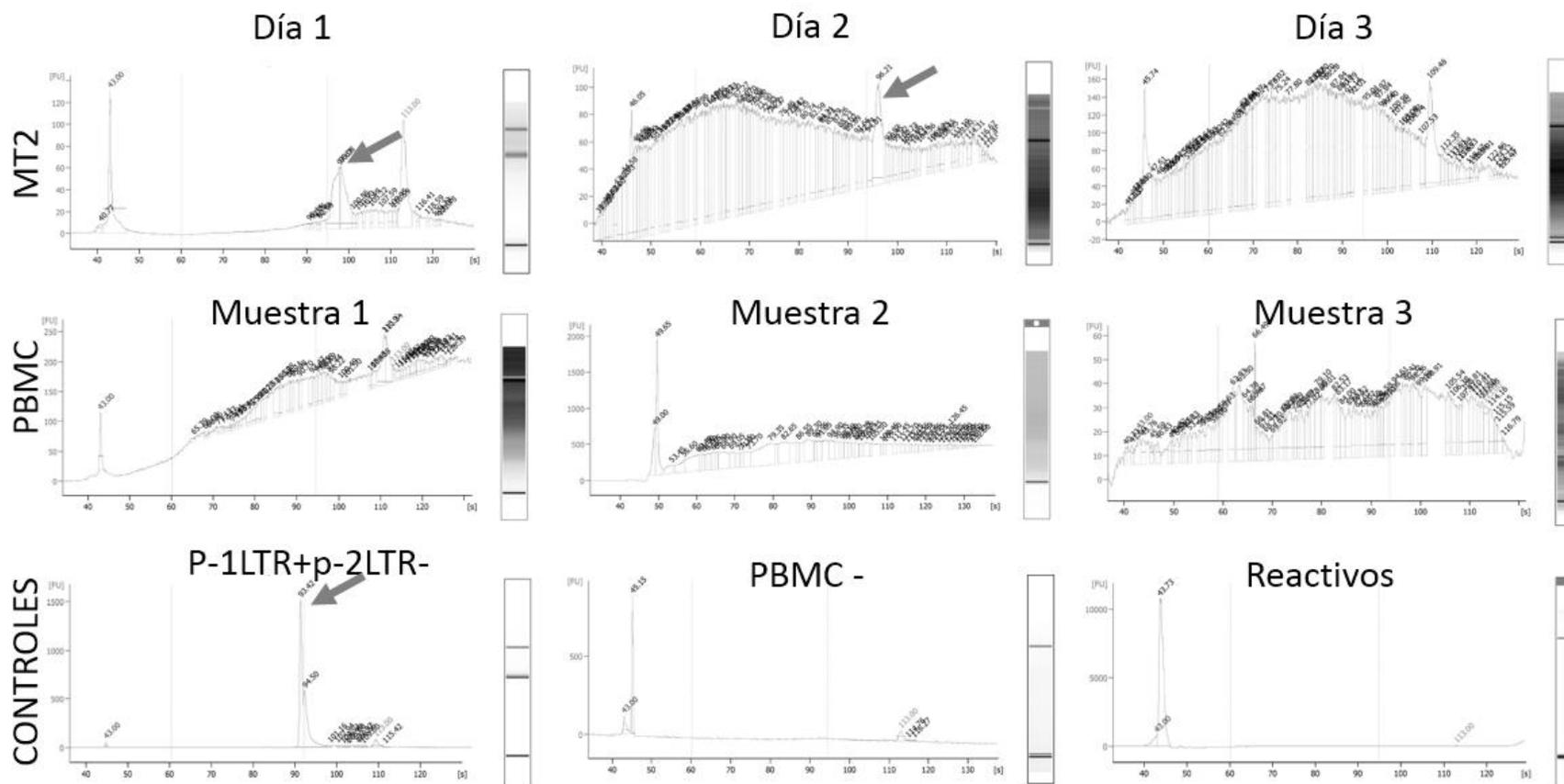


Figura 21 Electroferogramas de los productos de PCR obtenidos con el bioanizador Agilent 2100. En la primera fila (MT2) se observan los productos obtenidos de la infección de las células MT2/IIIB de los días 1-3 post-infección, donde se evidencian señalando con la flecha roja en el día 1 de infección, el pico corresponde al producto deseado además de una ligera interferencia hacia los lados. En el día 2 la banda se aprecia pero con mayor interferencia y finalmente en el día 3 la banda ya no está presente, en la segunda fila (PBMCs+) se aprecian los electroferogramas de muestras de PBMC infectadas con el VIH-1 mostrando resultados similares al día 3 donde no se define la banda correspondiente a 1-LTR, finalmente la tercera fila (controles) muestra el control positivo (mezcla de plásmidos p-1LTR y p-2LTR) con la banda esperada señalada con una flecha. Controles negativos de PBMC y control de reactivos.

La disminución de la homología dada por el LTR impide la amplificación del fragmento deseado incluyendo a los inespecíficos (**Figura 22**).

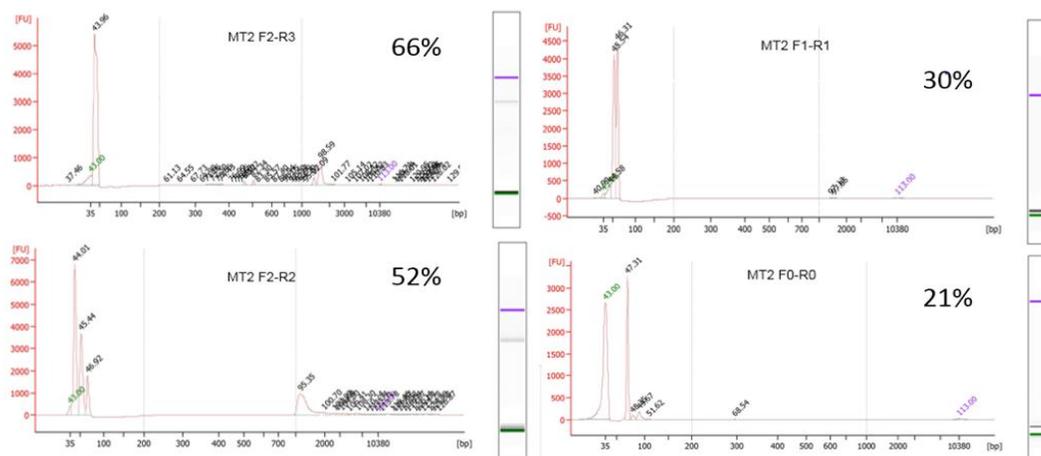


Figura 22.- Electroferogramas donde se muestra la pérdida de la eficiencia del PCR, al reducir la homología de los fragmentos amplificados para 1-LTR. Se muestra una pérdida gradual de la amplificación desde el 66% al 21% donde ya no existe amplificado alguno.

Amplificación específica de la secuencia usada para la carga proviral.

Se definieron las condiciones óptimas para la amplificación específica de la banda correspondiente al fragmento F4-R3 para la cuantificación de la carga proviral. Se realizó la curva de temperatura y de $MgSO_4$ para el PCR; la temperatura de alineamiento óptima fue de 60 °C y la concentración de Mg de 2.5 mM (**Figura 23**).

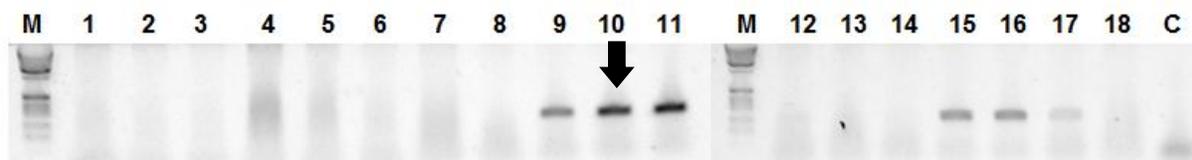


Figura 23.- Fotografía del gel de agarosa al 2% y teñido con Sybr Safe. Carriles 1-6 concentración de $MgSO_4$ 1.5 μM , Carriles 7-12 concentración del $MgSO_4$ a 2.5%, Carriles 13-18 concentración del $MgSO_4$ a 3.5 mM. Carriles 1,7,13 $T_m=66$ °C, carriles 2, 8 y 14 $T_m=64$ °C, carriles 3, 9 y 15 $T_m=62$ °C, carriles 4,10 y 16 $T_m=60$ °C, carriles 5,11 y 17 $T_m=58$ y carriles 6, 12 y 18 $T_m=56$ °C. Con una flecha negra se indica la condición más ideal donde se logró amplificar el fragmento deseado.

Se usaron los oligonucleótidos para verificar su especificidad en distintas células incluyendo PBMC infectadas con el VIH-1 y para verificar que no existan amplificadores inespecíficos (**Figura 24**).

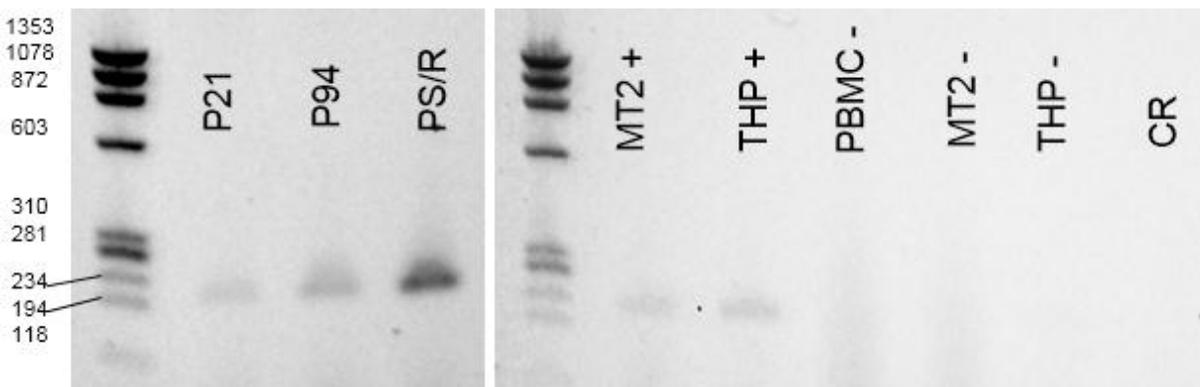


Figura 24.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe, donde se muestra la especificidad de los oligonucleótidos para amplificar la secuencia que se requiere para la cuantificación de la carga proviral (oligonucleótidos F4-R3) en muestras de pacientes infectados con el VIH-1 (carriles P-21, P94, P-s/r) en 2 líneas celulares (MT2 y THP) infectadas con cepas virales de referencia (IIIB y ADAM respectivamente) y los controles negativos para cada una.

Amplificación de la secuencia de unión de 2-LTR

El p-U2LTR se usó para estandarizar la amplificación de la región de unión de 2-LTR usando los oligonucleótidos F4-R5 y su presencia se confirmó usando al genoma de células MT2 infectadas con la cepa viral IIIB. Se realizaron curvas de Mg⁺ y de temperatura tanto para el plásmido como para las células (figura 25). Se realizó una curva de temperatura desde 66 °C a 58 °C y una curva de Mg⁺ de 1.5-3.5 mM (figura 25). Las condiciones más eficientes para la amplificación fueron de 2.5 mM de Mg⁺ y 60 °C para el alineamiento de los oligonucleótidos como se muestra en la **figura 25**.

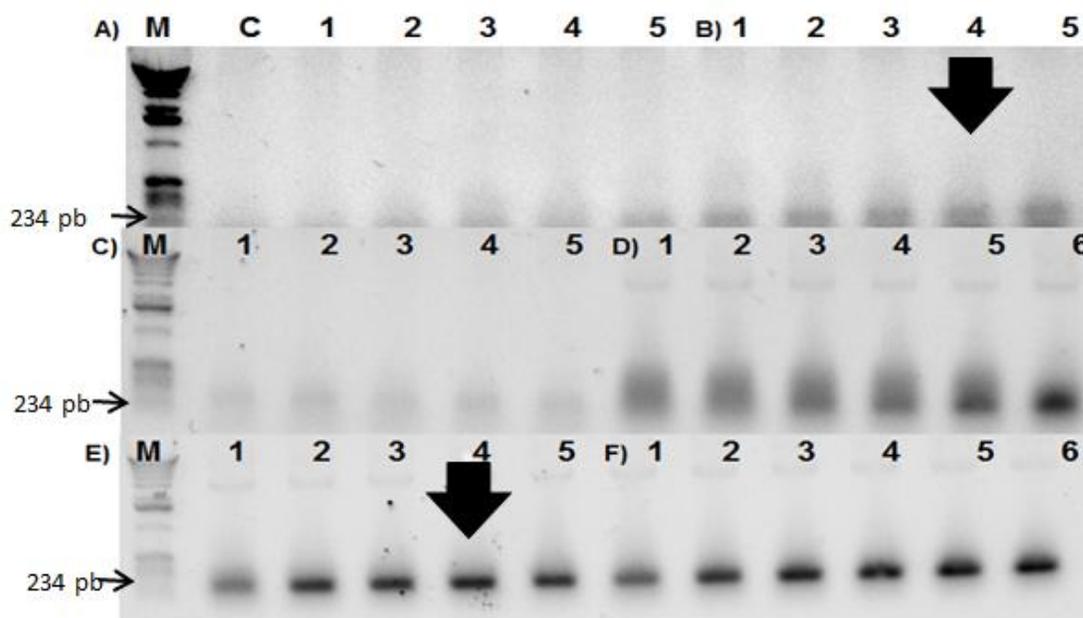


Figura 25- Curvas de Mg^{+} (1.5-3.5 mM) y de temperatura (66-58°C) para la amplificación de la unión de 2-LTR (F4-R5 200 pb). Para A-F Carriles 1. 66°C, 2. 64°C, 3. 62°C, 4. 60°C, 5. 58°C. **A-C)** Genoma de las células MT2 infectadas con IIB. **D-F)** p-U2LTR. **A y D)** 1.5 mM Mg^{+} , **B y E)** 2.5 mM Mg^{+} y **C y F)** 3.5 mM Mg^{+} . Se marca con una flecha el carril con las condiciones más favorables para la amplificación.

De la misma manera se usaron los oligonucleótidos para verificar la especificidad en las muestras de pacientes y descartar la amplificación de fragmentos inespecíficos (Figura 26).

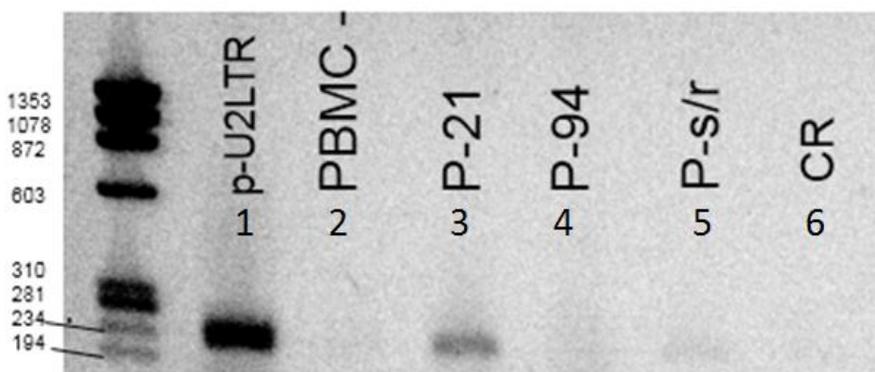


Figura 26.- Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe. Se muestra la especificidad de los oligonucleótidos para amplificar la secuencia de unión de la forma episomal 2-LTR en muestras de pacientes infectados con el VIH-1 (carriles P-21, P94, P-s/r)

Curva patrón de la carga proviral

La carga proviral se cuantificó mediante dos reacciones de PCR, la primera reacción se realizó con los oligonucleótidos Alu-1, Alu-2 y R2. La segunda reacción se llevó a cabo con el oligonucleótido F4 y R3. En la **figura 27** se muestran las gráficas de amplificación obtenidas por el programa 7500 System SDS. Se determinó el coeficiente de variación para cada punto de la curva patrón (**Tabla 9, Gráfica 2**).

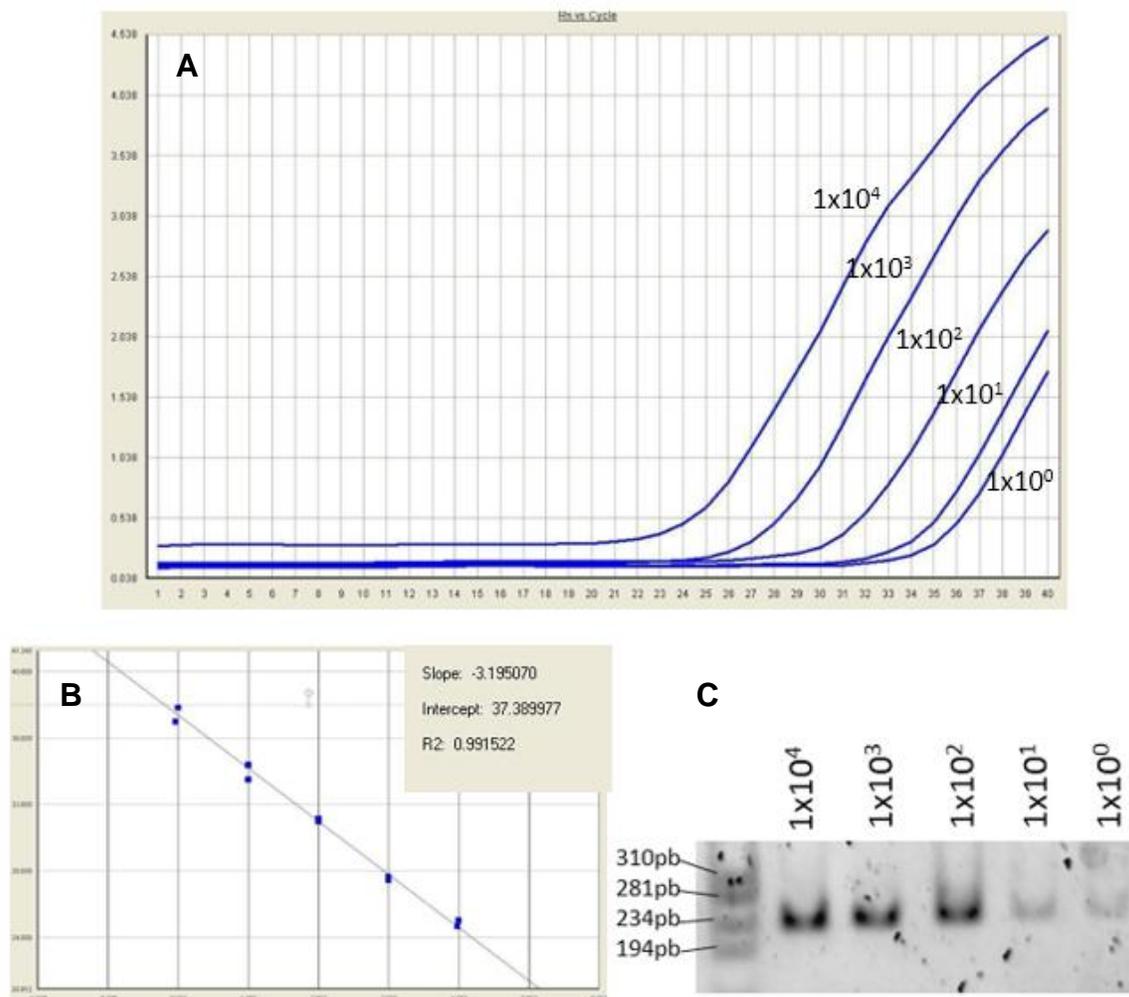
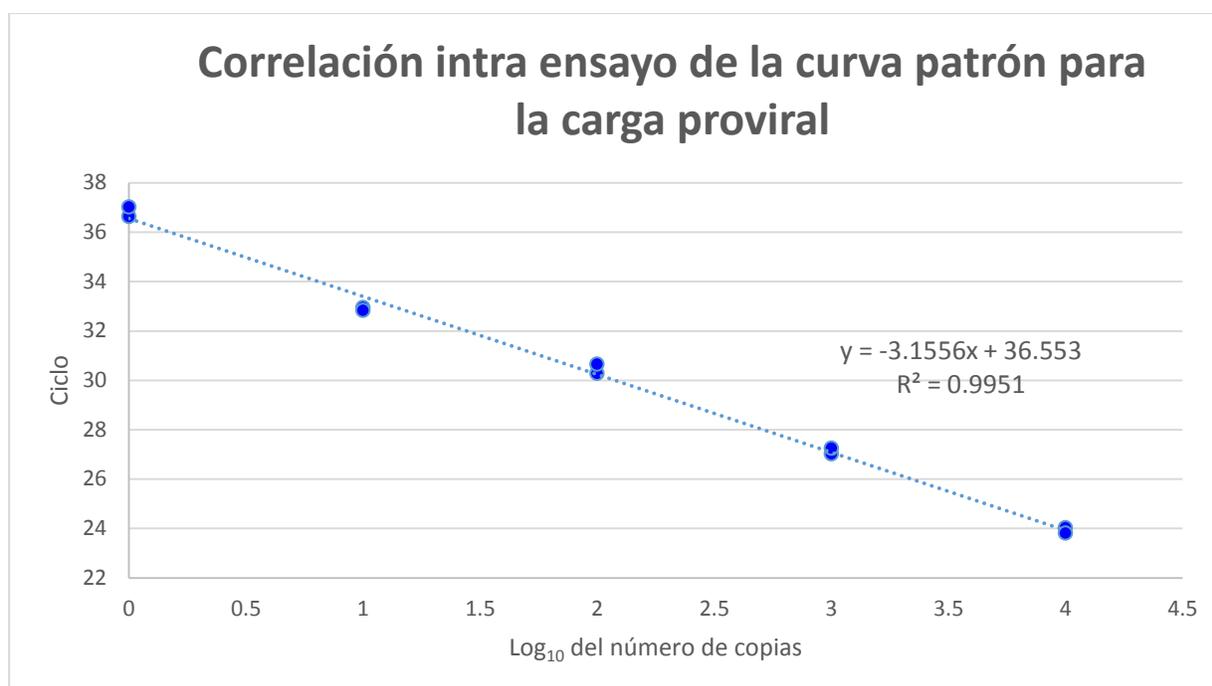


Figura 27.- Imágenes que muestran la amplificación de los fragmentos para cada uno de los puntos de la curva patrón elaborada para la cuantificación de la carga proviral. **A)** Gráfica que muestra la amplificación en tiempo real de cada punto en la curva patrón. **B)** Curva estándar. **C)** Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe, donde se muestra la banda correspondiente para cada punto en la curva patrón.

Tabla 9.- Resultados de la amplificación de cada punto de la curva patrón realizados por duplicado y el logaritmo del ciclo de amplificación. Se muestra para cada punto el coeficiente de variación (CV) del ciclo de amplificación. En las celdas marcadas con gris se muestran los puntos con mayor coeficiente de variación.

Número de copias	Ciclo	CV ciclo
1	36.18	0.75
10	32.54	0.26
100	30.45	0.86
1000	27.13	0.61
10000	24.41	0.63

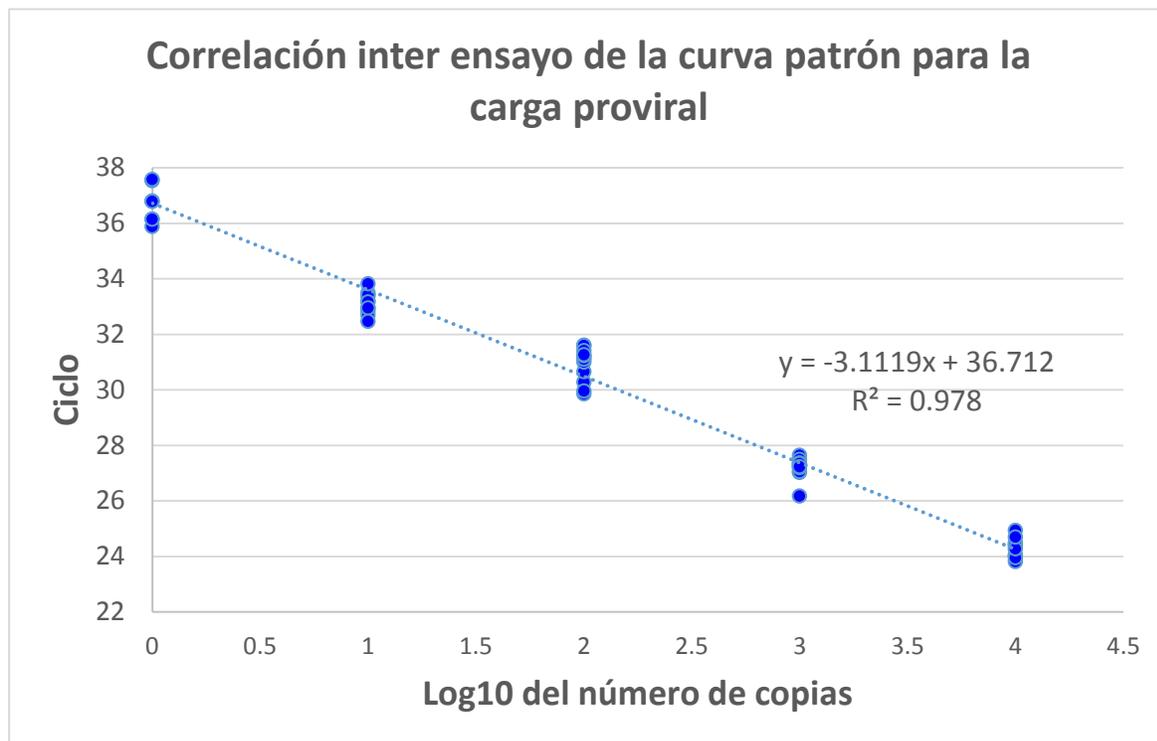


Gráfica 2.- Curva patrón construida con la amplificación de los oligonucleótidos F4-R3 para cada punto en la dilución seriada. Se aprecia una buena correlación determinada por la $R^2=0.9951$ y una buena eficiencia de la amplificación dada por la pendiente $=-0.31556$. Para cada punto del eje x 0=1 copia, 1=10 copias, 2=100 copias, 3=1000 copias y 4=10,000 copias.

La reproducibilidad de la curva patrón se determinó después de 4 repeticiones independientes por duplicado (8 determinaciones para cada punto en la curva) y se calculó el coeficiente de variación para cada punto. El punto de la curva con mayor variación es el de 1 copia (**Tabla10, Gráfica 3**).

Tabla 10.- Se muestran el promedio de los resultados obtenidos del ciclo de amplificación para cada punto en la curva patrón tras 4 repeticiones independientes por duplicado (8 determinaciones por punto). En las columnas sombreadas de color naranja se muestra el coeficiente de variación para el ciclo de amplificación.

No. copias	Promedio Ciclo	CV ciclo
1	36.95	2.62
10	33.11	1.19
100	30.91	1.95
1000	27.18	1.40
10000	24.29	1.44



Gráfica 3.- Curva patrón construida para la determinación de la carga proviral. Muestra 8 determinaciones para cada punto de la curva. La correlación está determinada por la $R^2=0.978$ y la eficiencia de la amplificación definida por la pendiente $=-3.1119$. Para cada punto del eje x 1=10 copias, 2=100 copias, 3=1000 copias, 4=10,000 copias.

Curva patrón de la forma episomal 2-LTR

Se realizó la construcción de la curva patrón para la forma episomal 2-LTR (Figura 28) y se calcularon los coeficientes de variación para cada punto en la curva como se muestra en la **Tabla 11** y **Gráfica 4**.

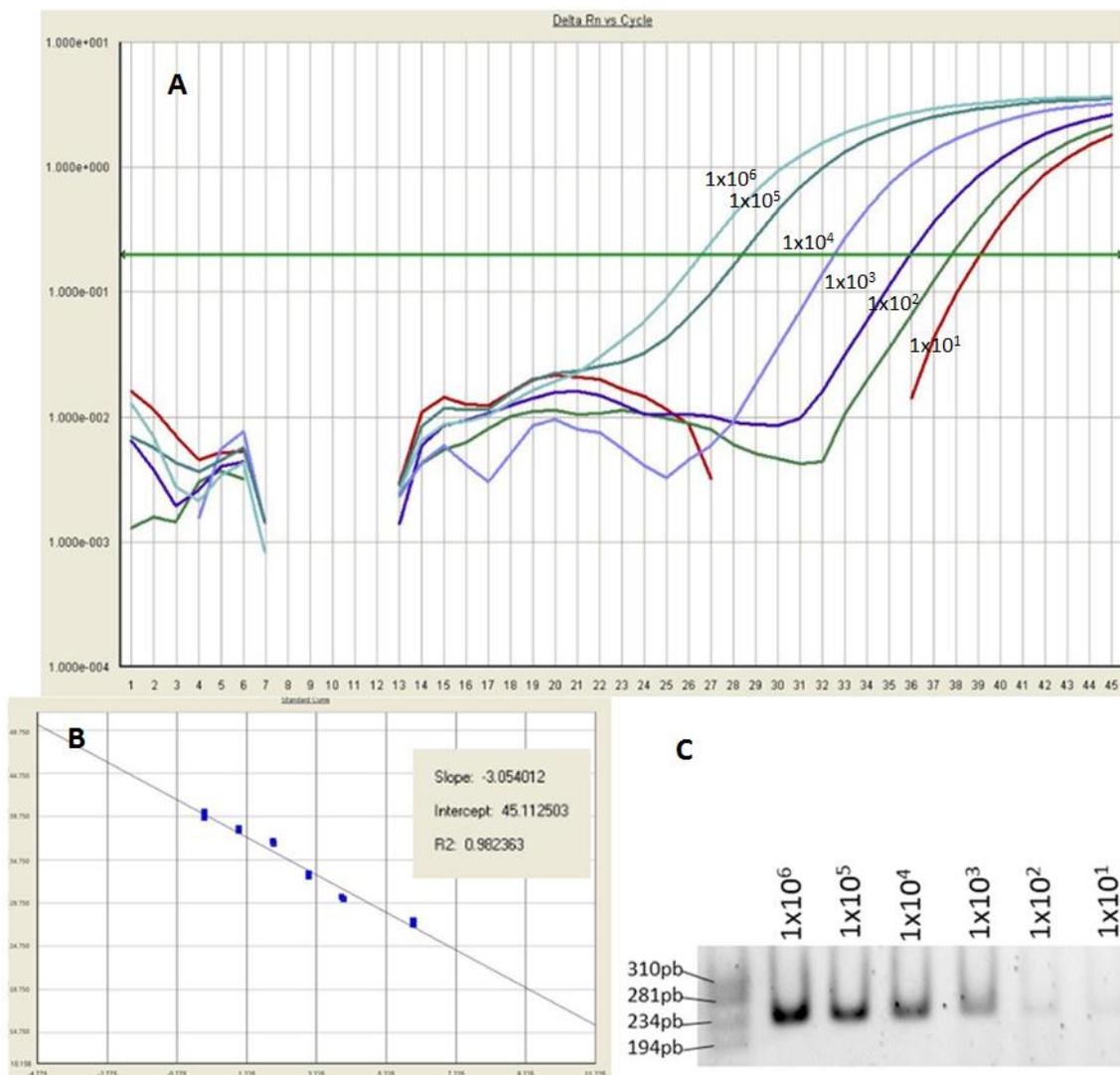
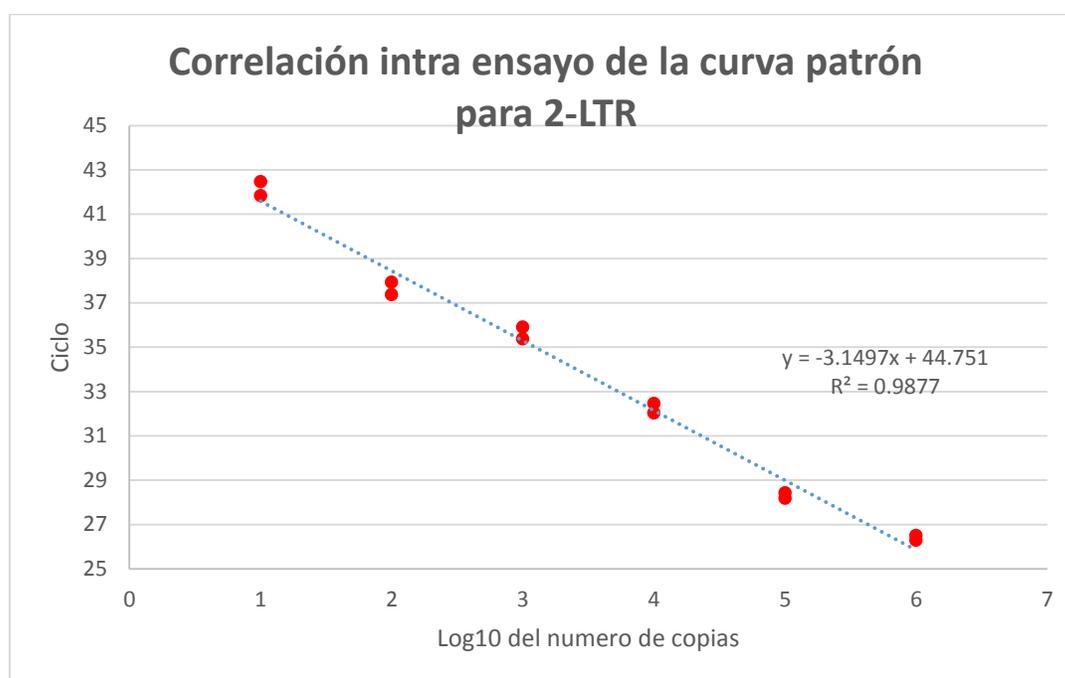


Figura 28.- Imágenes que muestran la amplificación de los fragmentos para cada uno de los puntos de la curva patrón elaborada para la cuantificación de la carga episomal 2-LTR. **A)** Gráfica que muestra la amplificación en tiempo real de cada punto en la curva patrón. **B)** Curva estándar de 2-LTR **C)** Gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr Safe, donde se muestra la banda correspondiente para cada punto en la curva patrón.

Tabla 11.- Coeficientes de variación del ciclo de amplificación para cada punto en la curva patrón de la forma episomal 2-LTR. Se muestra el promedio de amplificación para cada punto por duplicado y se marcan en celdas gris los puntos con los coeficientes más grandes.

Número de copias	Promedio Ciclo	CV Ciclo
10	42.15	1.04
100	37.65	1.05
1000	35.64	1.07
10000	32.24	0.96
100000	28.30	0.61
1000000	26.39	0.56

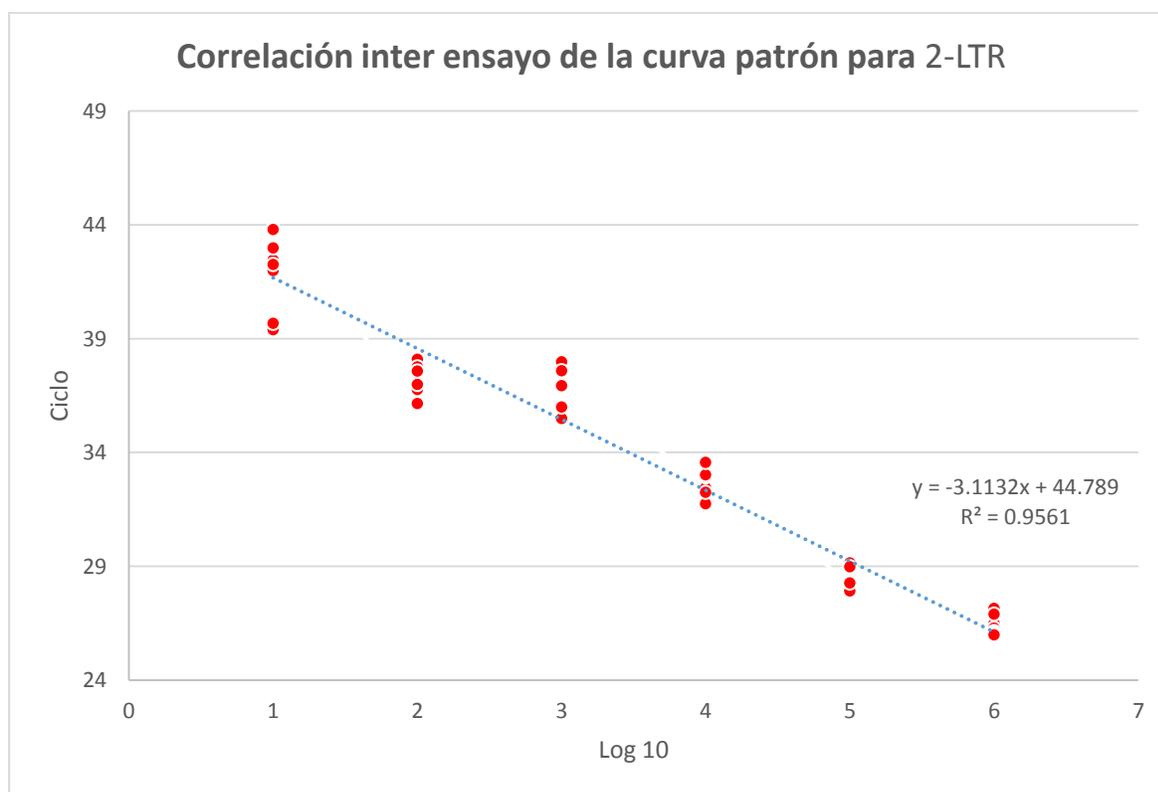


Gráfica 4.- Curva patrón construida para la determinación de la carga episomal 2-LTR. Muestra la correlación determinada por la $R^2=0.9951$ y la eficiencia de la amplificación definida por la pendiente $=-3.1497$. Para cada punto del eje x 1=10 copias, 2=100 copias, 3=1000 copias, 4=10,000 copias, 5=100,000 copias y 6=1,000,000 copias

La reproducibilidad de la curva patrón se determinó después de 4 repeticiones independientes por duplicado (8 determinaciones para cada punto en la curva, **(Gráfica 5)** y se calculó el coeficiente de variación para cada punto. El punto de la curva con mayor variación es el de 1 copia **(Tabla 12)**.

Tabla 12.- Resultados de la amplificación de cada punto en la curva patrón realizados por duplicado. Se muestra para cada punto el coeficiente de variación del ciclo de amplificación.

Número de copias	Promedio Ciclo	CV Ciclo
10	42.05	4.02
100	37.36	1.78
1000	36.55	2.58
10000	32.52	1.85
100000	28.49	1.65
1000000	26.38	1.63



Gráfica 5.- Curva patrón construida para la determinación de la carga episomal 2-LTR. Muestra 8 determinaciones por cada punto de la curva. La correlación está determinada por la $R^2=0.9561$ y la eficiencia de la amplificación definida por la pendiente $=-3.11332$. Para cada punto del eje x 1=10 copias, 2=100 copias, 3=1000 copias, 4=10,000 copias, 5=100,000 copias y 6=1,000,000 copias

Resultados de la carga proviral y 2-LTR para tropismos provirales X4 y R5

Se realizó el análisis de 123 muestras de ADN de pacientes infectados con VIH-1 y que se clasificaron en dos grupos de acuerdo con el resultado de la prueba de

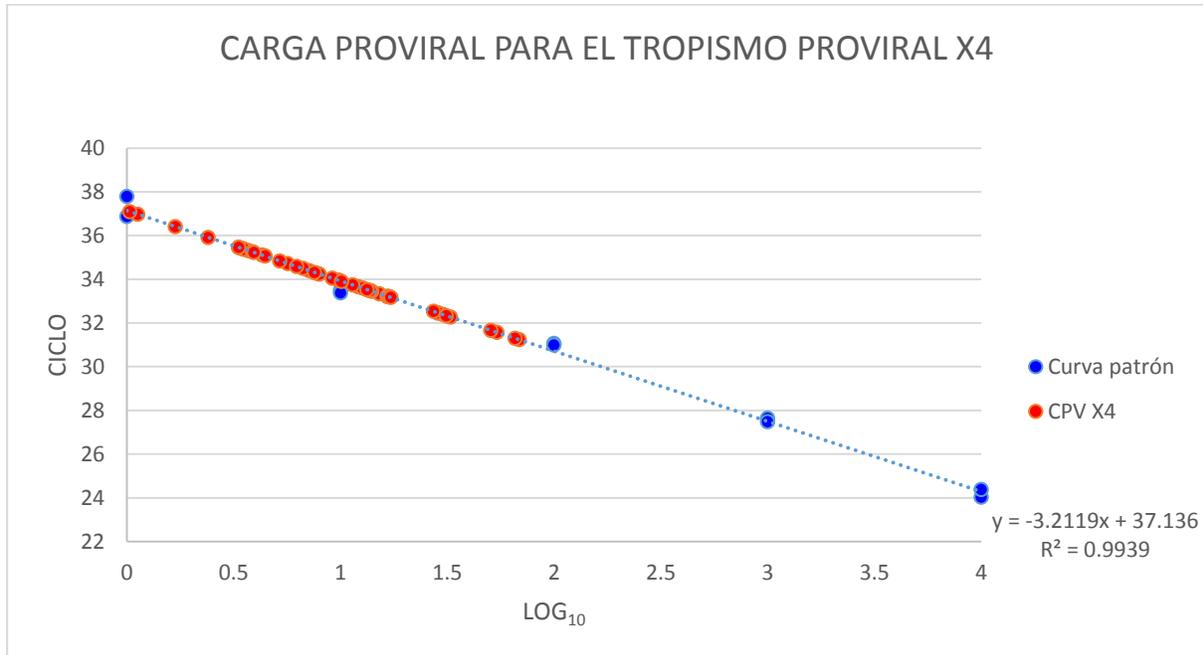
tropismo proviral determinado por la secuenciación del dominio V3 de gp120 por la técnica de Sanger. Se obtuvieron 56 muestras (46%) con tropismo proviral X4 y 67 muestras (54%) con tropismo proviral R5.

Los datos obtenidos a través de la cuantificación por PCR-TR se muestran en las **tablas 14 y 15**, en estas se indica la carga proviral (CPV) y la carga episomal 2-LTR (2-LTR). En las **gráficas 6, 7, 8 y 9** se aprecian las curvas patrón y los resultados obtenidos. Los datos se reportan en copias por millón de células. Las estadísticas descriptivas para cada grupo se muestran en la Tabla 13.

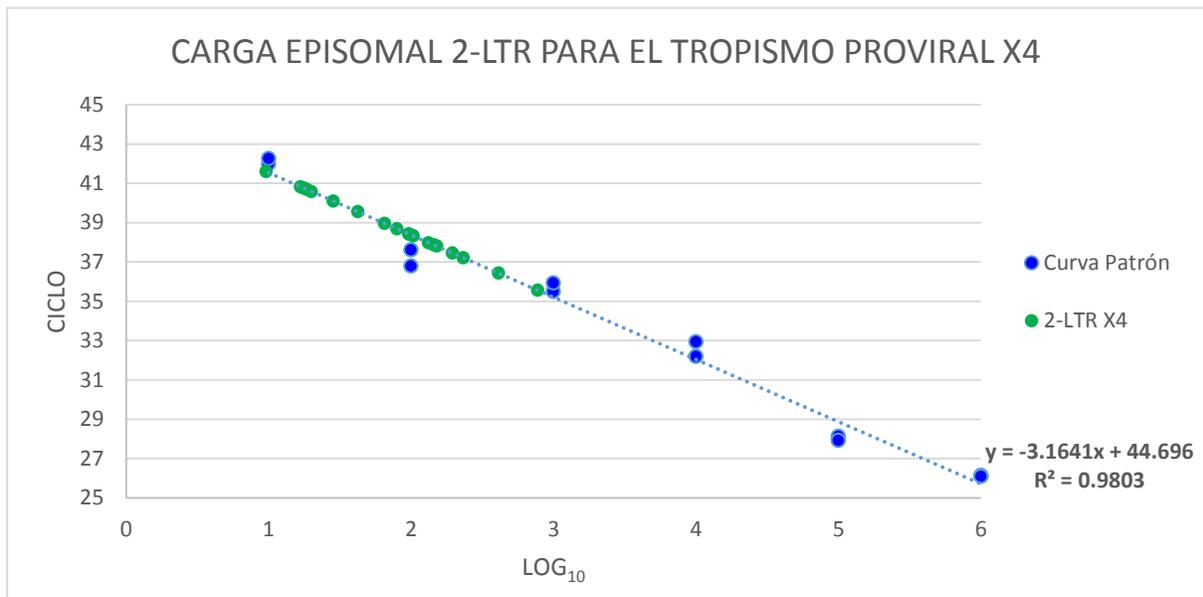
Tabla 13.- Resultados obtenidos por las cuantificaciones de la carga proviral y episomal 2-LTR para cada grupo R5 y X4 respectivamente.

Variable	Grupo	Conteo	Promedio	Error Estándar
CPV	X4	56	132.58	21.08
CPV	R5	67	380.05	87.69
2-LTR	X4	56	471.23	165.4
2-LTR	R5	67	3949.50	2243.7

Las muestras a las que no fue posible detectar la carga proviral se les asignó un valor de 9, ya que el análisis se realizó solo a 100,000 células y la curva patrón diseñada detecta un rango de 1×10^4 a 1×10^0 con una $r^2=0.99$ por lo que el valor mínimo inmediato para un millón de células es 9.



Gráfica 6.- Resultados de la cuantificación de la carga proviral para el tropismo X4. Se muestra la curva patrón para esta determinación (puntos azules) y los resultados para cada muestra procesada (puntos rojos).

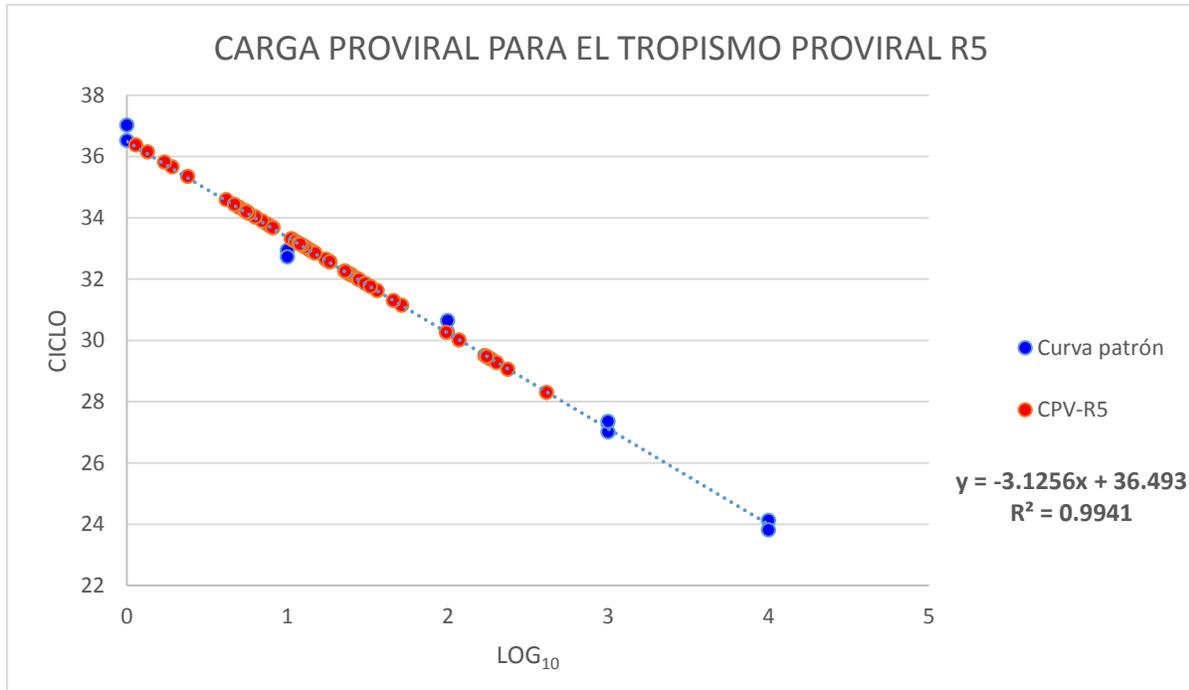


Gráfica 7.- Resultados de la cuantificación de la carga episomal 2-LTR para el tropismo X4, se muestra la curva patrón para esta determinación (puntos azules) y los resultados para cada muestra procesada (puntos verdes)

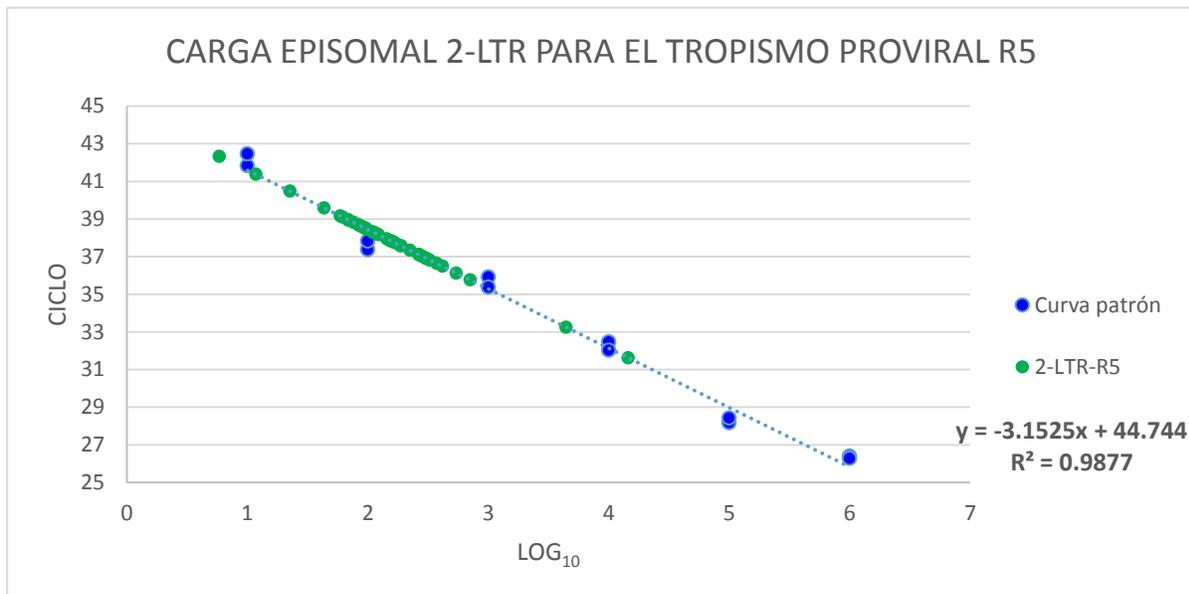
Los resultados obtenidos para el tropismo X4, la carga proviral y la episomal 2-LTR se muestran en copias por millón de células (**Tabla 14**).

Tabla 14.- Resultados de la carga proviral y episomal 2-LTR de las 56 muestras obtenidas con tropismo proviral X4. Las cargas se representan en copias por millón de células.

No. Muestra	CPV	2LTR	No. Muestra	CPV	2LTR
1	78	0	29	168	0
2	121	1037	30	92	973
3	540	0	31	140	2330
4	37	0	32	657	967
5	43	0	33	44	0
6	71	0	34	303	1330
7	98	1513	35	76	0
8	9	0	36	328	0
9	67	0	37	507	0
10	34	0	38	286	0
11	9	0	39	137	0
12	35	0	40	138	0
13	9	0	41	39	0
14	152	1950	42	9	185
15	165	0	43	52	0
16	127	0	44	101	0
17	35	0	45	9	0
18	57	653	46	11	0
19	33	96	47	273	0
20	114	0	48	169	0
21	33	0	49	172	285
22	80	0	50	9	4115
23	169	0	51	24	1440
24	687	200	52	133	177
25	286	423	53	313	797
26	62	0	54	17	7750
27	9	0	55	9	0
28	39	0	56	10	168



Gráfica 8.- Resultados de la cuantificación de la carga proviral para el tropismo R5, se muestra la curva patrón para esta determinación (puntos azules) y los resultados para cada muestra procesada (puntos rojos).



Gráfica 9.- Resultados de la cuantificación de la carga episomal 2-LTR para el tropismo R5, se muestra la curva patrón para esta determinación (puntos azules) y los resultados para cada muestra procesada (puntos rojos).

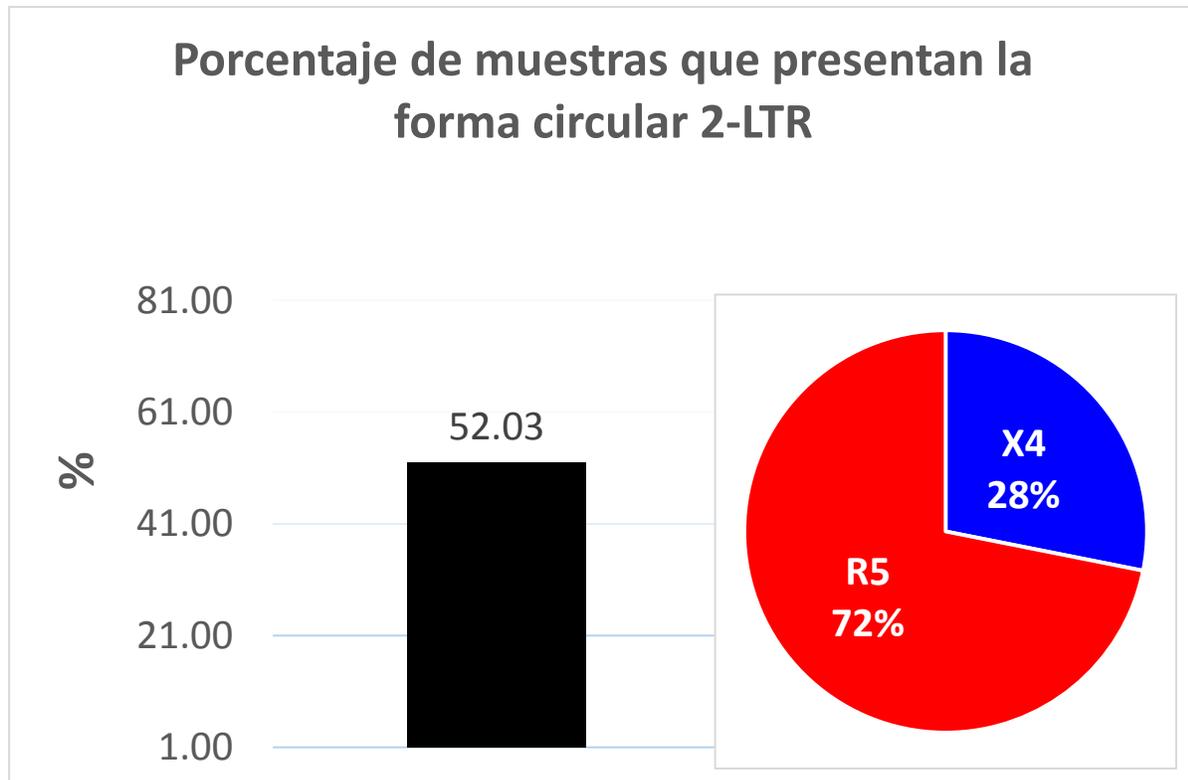
Los resultados obtenidos para el tropismo X4. La carga proviral y la episomal 2-LTR se muestran en copias por millón de células (**Tabla 15**).

Tabla 15.- Resultados de la carga proviral y episomal 2-LTR de las 67 muestras obtenidas con tropismo proviral R5. Las cargas se representan en copias por millón de células.

No. Muestra	CPV	2LTR	No. Muestra	CPV	2LTR
1	185	5433	35	2020	0
2	78	1573	36	184	687
3	50	3160	37	127	0
4	181	760	38	138	0
5	2370	0	39	55	1223
6	252	0	40	56	0
7	1177	44333	41	58	0
8	57	937	42	112	0
9	1817	2243	43	230	0
10	246	1520	44	9	0
11	63	0	45	47	58.5
12	75	0	46	134	226
13	1707	2640	47	9	1891.5
14	1877	4167	48	364	0
15	42	1193	49	982	620
16	228	0	50	149	1090
17	82	3733	51	9	591
18	4133	2753	52	9	1590
19	142	2667	53	129	117.5
20	54	0	54	1755	1855
21	55	963	55	305	868
22	70	7100	56	19	834
23	173	0	57	124	2735
24	247	0	58	13	434
25	81	903	59	9	1441
26	63	690	60	118	3275
27	238	973	61	56	3000
28	517	1120	62	11	3035
29	107	0	63	17	1148.5
30	273	0	64	330	920
31	108	0	65	120	1676
32	147	0	66	460	0
33	106	145333	67	24	0
34	281	1107			

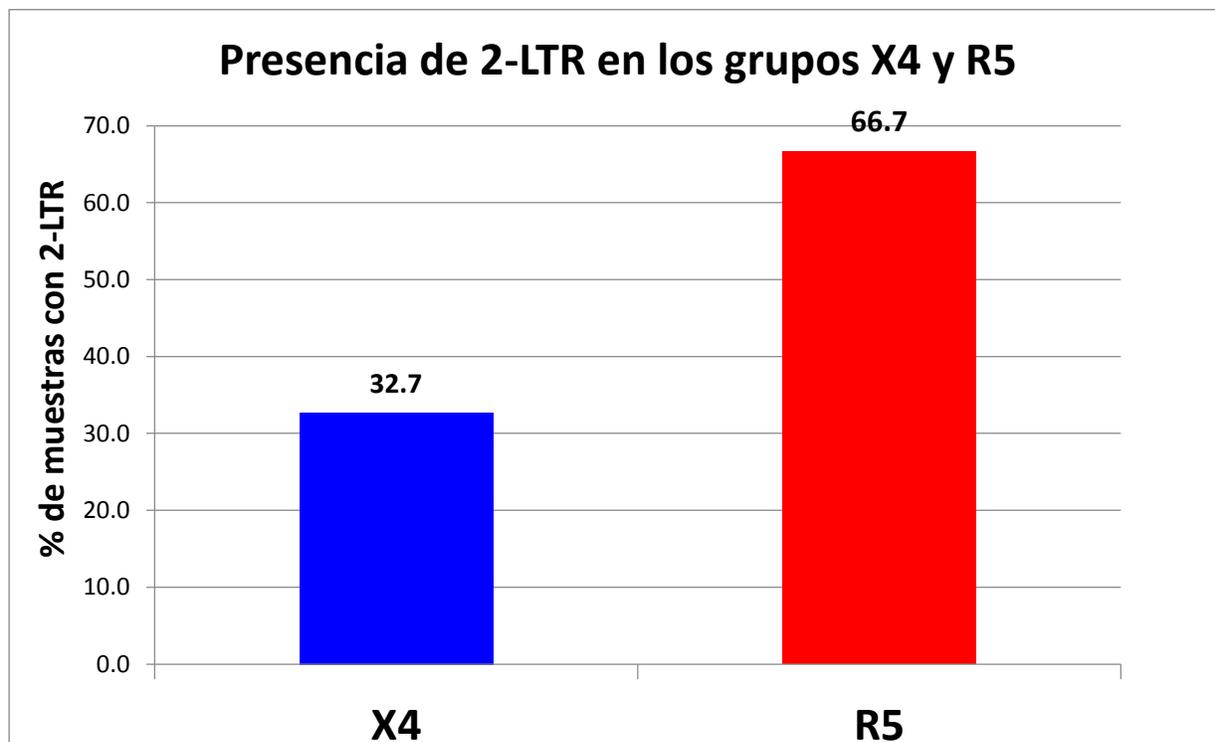
Presencia de 2-LTR en los grupos de estudio

De acuerdo con los resultados obtenidos, el 52% de las muestras totales tienen presencia de la forma circular 2-LTR. De éstas el 72% tienen tropismo proviral R5 y 28% X4 (**Gráfica 10**).



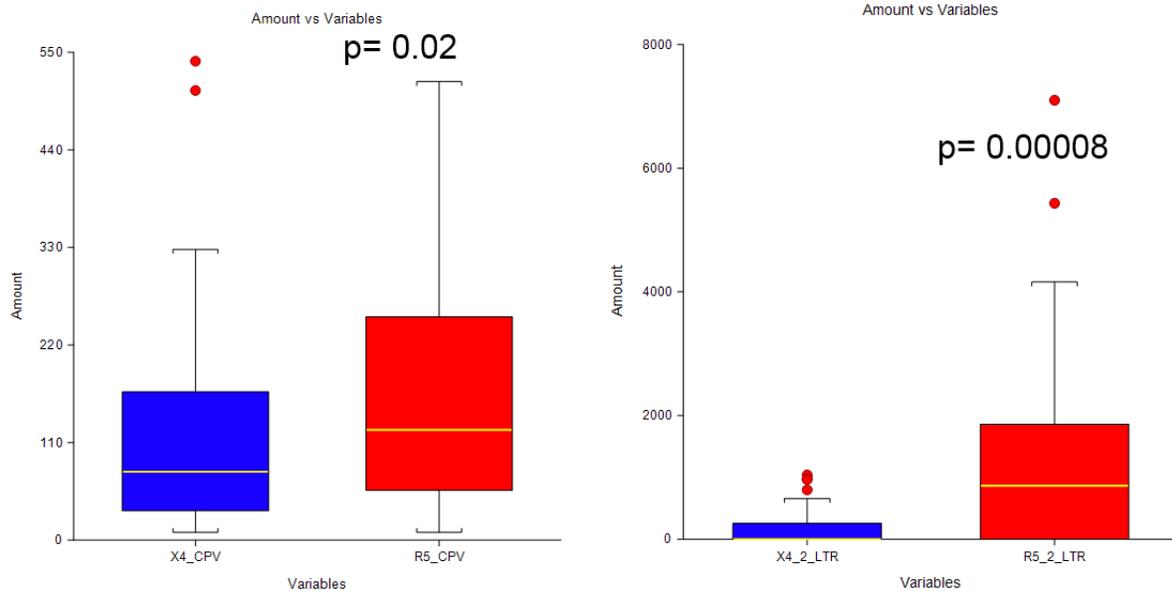
Gráfica 10.- Porcentaje de las 123 muestras que muestran la presencia de la forma circular 2-LTR (52.03% 64 muestras barra indicada en negro) de estas el 72% corresponden al tropismo R5 y 28% al tropismo X4

De manera independiente en el grupo R5, el 66.6% de las muestras (46 muestras) tienen la presencia de 2-LTR y en el grupo X4 los pacientes con la forma circular 2-LTR representan el 32.7% (18 muestras) (**Gráfica 11**).



Gráfica 11.- Porcentaje de muestras que presentan la forma circular 2-LTR en cada grupo de estudio.

Análisis Estadístico



Gráfica 12.- Diagrama de caja y bigotes para la carga proviral (a la izquierda) para X4 (en azul) y R5 (en rojo) y forma episomal (a la derecha) para X4 (en azul) y R5 (en rojo). Para R5 se han excluido los valores máximos extremos.

De acuerdo con esta prueba estadística se observa una diferencia para la carga proviral y 2-LTR del grupo X4 respecto a R5. La carga proviral es estadísticamente mayor para el tropismo proviral R5 con un valor de $p=0.027$ y de la misma manera la carga episomal 2-LTR es mayor para el tropismo R5 con un valor de $p=0.000081$ (Gráfica 12).

DISCUSIÓN

Durante el ciclo de vida del VIH-1, se requiere de un proceso de integración de su genoma en la célula hospedera para el establecimiento de los reservorios necesarios para la replicación del virus. Sin embargo este proceso no siempre se lleva a cabo con éxito, de tal manera que el genoma viral es procesado por la maquinaria de reparación celular.¹⁹ Con mayor frecuencia el genoma viral no integrado es circularizado y degradado.³² Este genoma tiene una estabilidad que depende de su conformación ya sea en forma lineal o circular, siendo esta última la forma más estable, dando como resultado la presencia de la forma episomal 1-LTR y 2-LTR principalmente. La presencia de estas formas episomales es un marcador indirecto de la replicación viral, ya que sólo pueden formarse con nuevas infecciones. Por lo tanto, se sugiere que el análisis de las distintas formas del genoma viral, puede aportar información valiosa principalmente en pacientes que reciben tratamiento antirretroviral, para saber la eficacia de los fármacos en el control de la viremia.

Las formas del genoma del VIH-1 episomales y la forma proviral tienen secuencias homólogas entre sí, sin embargo cada una de éstas tiene una característica particular que puede permitir la identificación individual, ya sea basándose en una secuencia como la unión de los extremos LTR del genoma (2-LTR), la pérdida de una de estas secuencias por recombinación homóloga (1-LTR) o la forma integrada en el genoma.

La detección y la cuantificación de 1-LTR son complicadas por la ausencia de una secuencia única que pueda ser amplificada. Además los oligonucleótidos designados para la amplificación de 1-LTR también pueden unirse a todas las formas del genoma

viral y amplificar secuencias indeseables capaces de mostrar interferencia en el análisis (**Figura 20 y 21**).

Para poder diferenciar a la forma 1-LTR de 2-LTR se construyeron dos plásmidos con las secuencias homólogas a cada forma p-1LTR y p-2LTR respectivamente. Estos plásmidos permitieron definir las condiciones ideales para la amplificación de 1-LTR. Los oligonucleótidos usados F2-R3 para un fragmento de 936 pb de 1-LTR y 1569 pb de 2-LTR, amplificaron ambas formas episomales, por lo que 1-LTR fue favorecido por una disminución del tiempo de elongación a 30 segundos (**Figura 19**), lo que impidió la formación de la banda correspondiente a 2-LTR como se ha descrito en otros estudios.³¹ Una vez establecida esta condición se amplificó 1-LTR en un ensayo de infección controlado utilizando a la línea celular de linfocitos humanos MT2 infectadas con la cepa viral de referencia IIIB y se encontró una diferenciación de la forma 1-LTR, dependiente del día la infección viral, siendo evidente el fragmento de 936 pb sólo durante el primer y segundo día después de la infección. El análisis detallado muestra que en el primer día de infección no existe mucha interferencia, mientras el tiempo y la infección avanzan se hace evidente el aumento de la interferencia y la pérdida de la banda correspondiente a 1-LTR (**Figura 21 MT2 días 1-3**). Este resultado se observó también en las muestras de pacientes con infección por el VIH-1 (**Figura 21 PBMC 1-3**). Previamente se identificó a la forma circular 2-LTR (**Figura 26**) en dos de las tres muestras, sugiriendo la presencia de 1-LTR ya que se ha reportado que esta última se encuentra en mayor proporción con respecto a 2-LTR.⁶⁰

Los resultados mostraron que 1-LTR puede ser eclipsado por amplificaciones inespecíficas posiblemente provenientes de las secuencias homólogas presentes en otras formas del genoma viral. Se ha reportado que en condiciones normales de infección, las formas del genoma viral en conjunto (2-LTR, lineal no integrado e integrado principalmente) se encuentran en mayor cantidad respecto a la forma circular 1-LTR.⁶¹ Es probable que el 68% de la homología del fragmento amplificado de 1-LTR con respecto a cualquier otra forma viral, cause una amplia gama de amplificadas que ponen en evidencia la interferencia en el análisis. La homología se calculó tomando en cuenta el tamaño de 634 pb del LTR con respecto al tamaño de 936 pb del fragmento amplificado (**Tabla 5**). Bajo esta suposición se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una banda de mayor tamaño para disminuir la homología y favorecer a 1-LTR, sin embargo sólo se produjo una pérdida de la eficiencia del PCR (**Figura 22**). En otros estudios se han obtenido resultados similares como los reportados por Yoder y Fishel en el 2006, cuyos experimentos condujeron a una pérdida en la eficiencia del PCR al disminuir la homología.⁶²

Estas amplificaciones no deseadas y la pérdida de la eficiencia del PCR impiden realizar una cuantificación adecuada para 1-LTR por lo que continúa siendo un reto importante para su análisis.

Identificación de 2-LTR

Por otra parte la detección de 2-LTR tanto en un ensayo de infección controlado como en células de pacientes infectados (**Figuras 10, 25 y 26**) ha sido posible gracias a una secuencia única presente en la unión de los LTR. Se ha demostrado

que los oligonucleótidos usados F4-R5 221pb son eficientes para la detección de esta forma circular de manera específica. Para su detección y cuantificación se decidió construir p-U2LTR y no usar el plásmido p-2LTR por la secuencia extra agregada a la región de unión de este último, que es una secuencia de corte para la enzima *EcoRI* “G<AATTC”, cuya presencia aunque no altera la amplificación o las condiciones de reacción, podría interferir con la unión posterior de sondas para mejorar la señal en el PCR en Tiempo Real.

La simple presencia de la forma circular 2-LTR permite sin duda, evaluar la eficacia de un tratamiento y verificar la viremia residual en pacientes con TARAA y carga viral indetectable. Por lo tanto 2-LTR es un marcador sumamente interesante y su cuantificación no solo aporta esta información sino que puede ayudar a establecer diferencias entre grupos de estudio tal como se llevó a cabo en trabajo.

Carga proviral y 2-LTR del grupo de estudio

La carga proviral por otra parte indica el número de virus verdaderamente integrados en la célula y para su determinación se usaron los oligonucleótidos Alu1 y Alu2 previamente reportados en otros estudios.⁵² Estos oligonucleótidos se alinean a secuencias ALU presentes en el genoma del hospedero (aproximadamente cada 5,000 pb se encuentra una secuencia ALU) en ambas hebras, es decir, uno es en sentido Forward y el otro en Reverse, sin que ambos produzcan un amplificado, de tal manera que no es relevante en cual sentido se integre el genoma viral, ya que permite que con el oligonucleótido R2, puedan amplificar en forma exponencial sólo el genoma viral integrado. Una vez realizada esta amplificación un segundo par de

oligonucleótidos que sólo se alinean en el genoma viral F4-R3, se usó para la cuantificación adecuada.

Bajo estas condiciones, los ensayos por PCR en Tiempo Real realizados para la determinación de la carga episomal 2-LTR y del genoma proviral, cumplen con las especificaciones necesarias para ser confiables y reproducibles. Se establecieron las condiciones de amplificación óptimas para evitar la formación de productos inespecíficos para la carga proviral (**Figura 23**) y 2-LTR (**Figura 26**) de tal manera que no interfieran con la cuantificación.

Análisis de las curvas patrón PCR-Tiempo Real

Las curvas patrón obtenidas muestran una alta eficiencia y correlación, las cuales fueron medidas por dos variables obtenidas en la ecuación de la recta de las curvas patrón. El valor de la pendiente indica la eficiencia del PCR, un valor de -3.33 corresponde a una eficiencia del 100%, los valores aceptados oscilan entre el 90% y 110%, las pendientes obtenidas en este ensayo oscilan alrededor de -3.1 (**Gráfica 2 y 4**), lo que equivale una eficiencia entre el 93%-95%. Por otra parte el R^2 indica la correlación entre los puntos que forman la curva, una R^2 de 1 indica una perfecta correlación entre los puntos. Los valores obtenidos para la R^2 en este ensayo fueron >0.98 (**Gráfica 2 y 4**).

Finalmente la reproducibilidad del ensayo se evaluó por duplicado en 4 repeticiones en diferentes días, de tal forma que se pudo calcular la variación intra e interensayo, para dar una mayor robustez a los resultados obtenidos. En general los coeficientes de variación para cada punto de las curvas, muestran baja variabilidad y los puntos

de cuantificación más bajos muestran mayor variación como era de esperarse, 1 copia para la carga proviral muestra un Cv de 0.75 y 2.62% intra e inter-ensayo respectivamente (**Tablas 9 y 10**) y para la carga episomal el Cv de 10 copias tiene valores de 1.04 y 4.02% intra e inter-ensayo respectivamente (**Tablas 11 y 12**). De la misma manera la evaluación inter-ensayo conserva una buena correlación con $R^2=0.97$ y $R^2=0.95$ para la carga proviral y 2-LTR respectivamente (**Gráfica 3 y 5**) confiriendo una alta fiabilidad para realizar las cuantificaciones correspondientes.

Una vez estandarizados los parámetros para la cuantificación de la carga proviral y 2-LTR, se analizaron 123 muestras provenientes de pacientes que recibían TARAA y tenían la viremia controlada. A estas muestras se les realizó la prueba de tropismo proviral por personal experto en el laboratorio de Virología Molecular del INCMNSZ. Del total de las muestras evaluadas, 67 tuvieron un tropismo proviral R5 y 56 muestras un tropismo proviral X4.

Carga proviral

La formación de los reservorios virales es dependiente del tipo de célula infectada y del tropismo viral. Las cepas X4 por lo general muestran cinéticas de replicación rápida y un efecto patogénico para las células T, en contraste con los virus R5 que por lo general se replican más lentamente en macrófagos, sin embargo no tienen efectos citopáticos, lo que permite la formación de un reservorio estable.¹⁸

En contraste con lo reportado por Soulie y colaboradores⁶³, quienes encontraron una carga proviral mayor en los variantes virales con tropismo proviral X4, en este trabajo se encontró una diferencia significativamente mayor en la carga proviral del grupo R5

con respecto al grupo X4 ($p=0.02$ **Gráfica 12**). Estos resultados en conjunto con la presencia de la forma circular 2-LTR, sugieren que las variantes R5 a pesar de que no son más patogénicas que las cepas X4, muestran un mayor “fitness” viral o adaptación a sus células blanco, que les permiten mantenerse por más tiempo y consecuentemente sostener una replicación viral residual.

El fitness representa una ventaja selectiva para la propagación entre poblaciones de organismos que compiten en un ambiente en particular. Este concepto es aplicado a los virus de ARN incluyendo al VIH-1, donde el fitness está relacionado con la capacidad de replicación pero no es absolutamente equivalente.⁶⁴

El 50% de las personas adultas que progresan a SIDA tienen virus con un tropismo R5.⁶⁵ Estos virus son capaces de incrementar la replicación en macrófagos derivados de monocitos.^{65, 66} Por otra parte, diversos estudios han mostrado que los virus R5 aislados de pacientes con SIDA (virus tardíos) promueven la infección en macrófagos^{66, 67} y causan un aumento en la muerte de las células T CD4 + en comparación con cepas R5 aisladas de individuos asintomáticos (tempranos).⁶⁸ Estos resultados proporcionan evidencia de que los virus R5 pueden potenciar sus efectos citopáticos.^{68, 69}

Asimismo se ha demostrado la presencia de virus R5 No-macrófago-trópicos, con capacidad de infectar y de replicarse en las células primarias T CD4+ pero no en los macrófagos. Esto sugiere que aunque CCR5 es el correceptor principal para la infección de los macrófagos por el VIH-1, no todos los virus R5 infectan a estas células.⁷⁰⁻⁷² Es posible que las interacciones de los virus R5 para infectar a otros tipos

celulares involucren cambios en las glicoproteínas de la envoltura viral *Env* que mejoran las interacciones con los receptores CD4+/CCR5+, lo cual podría ser un medio por el cual estos virus aumentan su virulencia y conducen a la explotación de bajos niveles de estos receptores.^{69, 73}

Un factor más que puede poner a prueba la adaptación viral es la TARAA, que suprime la carga viral atribuida preferentemente por los virus X4, en comparación con los virus R5. En consecuencia, la administración del tratamiento antirretroviral puede conducir a un cambio en el fenotipo de la población viral predominante de tropismo X4 a R5⁷⁴⁻⁷⁷; sin embargo la razón de la supresión preferencial de las cepas X4 y el cambio del fenotipo del correceptor aún no se han esclarecido. Además, la TARAA conduce a una reducción en la expresión de correceptores en el tejido linfóide disminuyendo hasta 40% la expresión de los receptores CCR5 y CXCR4⁷⁸. Esta reducción en la expresión de CCR5 y CXCR4 puede cambiar el equilibrio de diferentes correceptores y dar lugar a la replicación diferencial de las cepas R5 después de la terapia.

En este estudio se encontró que poco más del 50% de las muestras (**Gráfica 10**) presentan la forma circular 2-LTR, lo que indica que a pesar del tratamiento recibido aún existe replicación viral residual (**Gráfica 11**). Existen otros reportes donde se ha demostrado que pacientes con TARAA agudos y crónicos siguen manteniendo una viremia residual evidenciada por la presencia de 2-LTR⁷⁹, lo que apoya a los resultados obtenidos en este trabajo. Por otra parte, el análisis estadístico realizado para verificar la diferencia entre los grupos R5 y X4 respecto a la carga episomal 2-

LTR, mostró una diferencia significativamente mayor en el grupo R5 en comparación con el grupo X4 (**p=0.0008, gráfica 12**).

En correlación a este hallazgo, se ha demostrado que el ADN viral no integrado puede persistir y seguir activo a nivel transcripcional en macrófagos, hasta por 30 días y con niveles altos de la forma circular 2-LTR *in vitro*⁸⁰, esto debido a la limitada actividad biológica de los macrófagos. Mientras que en células metabólicamente activas y en proliferación como los linfocitos TCD4+, las formas no integradas son rápidamente degradadas o diseminadas con la división celular.⁸⁰ La presencia diferencial de las formas circulares 2-LTR en el grupo R5 con respecto al grupo X4 hallada en este trabajo, no necesariamente representa una mayor replicación viral, ya que se debe posiblemente a la acumulación de la forma circular 2-LTR.

La vida relativamente larga de las formas episomales manifiesta que la presencia de éstas no necesariamente indica nuevas olas de replicación del virus que pueden ser predecibles, pero sin duda su presencia es evidencia de una replicación residual.⁸⁰ Cabe destacar que la forma circular 2-LTR y otras formas del genoma viral no integrado en macrófagos conduce a la producción de citocinas que favorecen la infección de las células T por el VIH-1.⁸¹

Gracias a su amplia adaptación y a su capacidad de explotar el bajo nivel de los receptores CD4+ y CCR5⁷³, se sugiere que los virus R5 pueden mantener niveles de replicación residual y formación de nuevos reservorios de manera diferencial a los virus X4 aún con TARAA, sin embargo estas hipótesis aún deben ser demostradas.

Por lo tanto, la capacidad de replicación en los macrófagos y el fitness viral pueden ser marcadores importantes de la patogénesis viral. Múltiples factores selectivos como la genética o inmunidad del hospedero, la viabilidad de la célula blanco, el genotipo viral y los antirretrovirales, pueden contribuir a disminuir la eficiencia de la replicación. Sin embargo, debido a varias razones, la supresión de la replicación viral en los individuos infectados es incompleta, lo que favorece el surgimiento de especies resistentes a los fármacos, que a su vez pueden incrementar la adaptación del virus.²²

Los resultados obtenidos en este trabajo marcan un indicio que puede conducir a estudios más controlados que permitan dilucidar el papel de la replicación de virus con tropismo R5 a lo largo de la infección viral.

No está claro si la diferencia de la carga proviral y episomal encontrada, dependen de la capacidad de replicación del virus, del fitness viral, de la larga duración de las formas episomales o de la larga vida de las células blanco para el virus R5. Sin embargo, la presencia de la forma episomal 2-LTR sugiere un posible restablecimiento del reservorio viral y podría conducir a una resistencia a los fármacos. Debe considerarse como un factor adicional que el tipo de tratamiento antirretroviral puede estar asociado con la carga proviral y con la viremia residual^{56,57} proporcionando una variable más para evaluar en los próximos análisis.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los plásmidos necesarios para la amplificación diferencial de la secuencia correspondiente a la forma circular 1-LTR en ausencia de la forma circular 2-LTR mediante la disminución del tiempo de elongación (30 seg); sin embargo no se logró cuantificar la forma 1-LTR debido a la interferencia presentada por la alta homología en todas las formas del genoma del VIH-1 durante la infección.
- Se desarrolló un método para la determinación cuantitativa de la carga proviral y episomal 2-LTR del VIH-1, que es reproducible y con un rango de sensibilidad amplio de detección de 1×10^0 a 1×10^4 y 1×10^1 a 1×10^6 respectivamente, por lo que se puede proponer su uso como una herramienta para el seguimiento clínico de los pacientes infectados con el virus.
- La medición simultánea de la carga proviral y episomal 2-LTR, nos proporcionó información sobre el tamaño del reservorio y la replicación residual del VIH-1 en pacientes que reciben tratamiento antirretroviral y con tropismo proviral definido. Se obtuvo una mayor carga proviral y episomal ($p=0.02$ y $p=0.00008$ respectivamente) en muestras con tropismo proviral R5 en comparación con el tropismo proviral X4, lo que sugiere una mayor adaptación de las variantes virales R5 y por lo tanto una replicación viral residual mayor. Se encontró que el reservorio de las variantes R5 es mayor al

de las variantes X4 y se sigue manteniendo una replicación viral residual en al menos la mitad de las muestras analizadas aún con TARAA.

- El análisis de la carga proviral y episomal 2-LTR del VIH-1 puede ser considerado como un marcador clínico útil, además de los otros marcadores que se utilizan actualmente, durante el seguimiento de los individuos infectados con el virus, así como para evaluar la replicación viral en el reservorio y la eficacia del tratamiento antirretroviral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W y Montagnier L (1983) **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science* 220(4599):868-871.
2. Hladik F y McElrath MJ (2008) **Setting the stage: host invasion by HIV.** *Nature reviews. Immunology* 8(6):447-457.
3. Frankel AD y Young JA (1998) **HIV-1: fifteen proteins and an RNA.** *Annual review of biochemistry* 67:1-25.
4. ONUSIDA (2015) ESTATUS EPIDEMIOLOGICO, disponible en: <http://www.unaids.org/es/dataanalysis/datatools/aidsinfo>, consultado el 15 de julio del 2015
5. CENSIDA (2015) SUIVE/DGE/SS. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de VIH/SIDA. Disponible en: <http://www.censida.salud.gob.mx>, consultado el 15 de julio del 2015
6. ICTV (2014) ICTV Taxonomy History for Human immunodeficiency virus 1. Disponible en: http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20143643&taxa_name=Human%20immunodeficiency%20virus%201, consultado el 1 de julio del 2015
7. Danielson CM y Hope TJ (2009) **Imaging of HIV/host protein interactions.** *Current topics in microbiology and immunology* 339:103-123.
8. Arenzana-Seisdedos F (2008) **[Viral entry as therapeutic target. Current situation of entry inhibitors].** *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 26 Suppl 11:5-11.
9. Aiamkitsumrit B, Dampier W, Antell G, Rivera N, Martin-Garcia J, Pirrone V, Nonnemacher MR y Wigdahl B (2014) **Bioinformatic analysis of HIV-1 entry and pathogenesis.** *Current HIV research* 12(2):132-161.
10. Alcami J y Coiras M (2011) **[Immunopathogenesis of HIV infection].** *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 29(3):216-226.
11. Mansharamani M, Graham DR, Monie D, Lee KK, Hildreth JE, Siliciano RF y Wilson KL (2003) **Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag**

- and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *Journal of virology* 77(24):13084-13092.
12. Chen H y Engelman A (1998) **The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15270-15274.
 13. Farnet CM y Bushman FD (1997) **HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro.** *Cell* 88(4):483-492.
 14. Lin CW y Engelman A (2003) **The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes.** *Journal of virology* 77(8):5030-5036.
 15. Miller MD, Farnet CM y Bushman FD (1997) **Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition.** *Journal of virology* 71(7):5382-5390.
 16. Scherdin U, Rhodes K y Breindl M (1990) **Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration.** *Journal of virology* 64(2):907-912.
 17. Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC y Bushman FD (2007) **HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications.** *Genome research* 17(8):1186-1194.
 18. Coiras M, Lopez-Huertas MR, Perez-Olmeda M y Alcamí J (2009) **Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs.** *Nature reviews. Microbiology* 7(11):798-812.
 19. Sloan RD y Wainberg MA (2011) **The role of unintegrated DNA in HIV infection.** *Retrovirology* 8:52.
 20. Berger EA, Murphy PM y Farber JM (1999) **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.** *Annual review of immunology* 17:657-700.
 21. Wilen CB, Tilton JC y Doms RW (2012) **HIV: cell binding and entry.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(8).
 22. Goodenow MM, Rose SL, Tuttle DL y Sleasman JW (2003) **HIV-1 fitness and macrophages.** *Journal of leukocyte biology* 74(5):657-666.
 23. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL y Mullins JI (1999) **Consistent viral evolutionary changes associated with the**

- progression of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Journal of virology* 73(12):10489-10502.
24. Irlbeck DM, Amrine-Madsen H, Kitrinou KM, Labranche CC y Demarest JF (2008) **Chemokine (C-C motif) receptor 5-using envelopes predominate in dual/mixed-tropic HIV from the plasma of drug-naive individuals.** *Aids* 22(12):1425-1431.
 25. Daar ES, Kesler KL, Petropoulos CJ, Huang W, Bates M, Lail AE, Coakley EP, Gomperts ED, Donfield SM, Hemophilia G y Development S (2007) **Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45(5):643-649.
 26. Doyle T y Geretti AM (2012) **Low-level viraemia on HAART: significance and management.** *Current opinion in infectious diseases* 25(1):17-25.
 27. Garcia F, Alvarez M, Bernal C, Chueca N y Guillot V (2011) **[Laboratory diagnosis of HIV infection, viral tropism and resistance to antiretrovirals].** *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 29(4):297-307.
 28. Ferrer P, Montecinos L, Tello M, Tordecilla R, Rodriguez C, Ferres M, Perez CM, Beltran C, Guzman MA y Afani A (2013) **HIV-1 tropism: a comparison between RNA and proviral DNA in routine clinical samples from Chilean patients.** *Virology journal* 10:318.
 29. Robinson HL y Zinkus DM (1990) **Accumulation of human immunodeficiency virus type 1 DNA in T cells: results of multiple infection events.** *Journal of virology* 64(10):4836-4841.
 30. Butler SL, Hansen MS y Bushman FD (2001) **A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo.** *Nature medicine* 7(5):631-634.
 31. Munir S, Thierry S, Subra F, Deprez E y Delelis O (2013) **Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle.** *Retrovirology* 10:87.
 32. Farnet CM y Haseltine WA (1991) **Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro.** *J Virol* 65(12):6942-6952.
 33. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P y Siliciano RF (1997) **Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection.** *Nature* 387(6629):183-188.

34. Shen A, Siliciano JD, Pierson TC, Buck CB y Siliciano RF (2000) **Establishment of latent HIV-1 infection of resting CD4(+) T lymphocytes does not require inactivation of Vpr.** *Virology* 278(1):227-233.
35. Blankson JN, Persaud D y Siliciano RF (2002) **The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection.** *Annual review of medicine* 53:557-593.
36. Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP y Lamonica CA (1990) **HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration.** *The EMBO journal* 9(5):1551-1560.
37. Sloan RD, Kuhl BD, Donahue DA, Roland A, Bar-Magen T y Wainberg MA (2011) **Transcription of preintegrated HIV-1 cDNA modulates cell surface expression of major histocompatibility complex class I via Nef.** *Journal of virology* 85(6):2828-2836.
38. Cara A, Cereseto A, Lori F y Reitz MS, Jr. (1996) **HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal forms of viral DNA.** *The Journal of biological chemistry* 271(10):5393-5397.
39. Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, Costagliola D, D'Arminio Monforte A, de Wolf F, Reiss P, Lundgren JD, Justice AC, Staszewski S, Leport C, Hogg RS, Sabin CA, Gill MJ, Salzberger B, Sterne JA y Collaboration ARTC (2002) **Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies.** *Lancet* 360(9327):119-129.
40. Van Lint C, Bouchat S y Marcello A (2013) **HIV-1 transcription and latency: an update.** *Retrovirology* 10:67.
41. Apostolova N, Blas-Garcia A y Esplugues JV (2011) **Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol-gamma inhibition.** *Trends in pharmacological sciences* 32(12):715-725.
42. Chen X, Zheng Y, Mamadou D, He Y, Zhou H, Chen Z, Luo Y, He B, He M y Yao Y (2013) **[Dynamic changes of cellular HIV-1 DNA quantification during highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV infected individuals].** *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences* 38(5):537-544.
43. Imamichi H, Crandall KA, Natarajan V, Jiang MK, Dewar RL, Berg S, Gaddam A, Bosche M, Metcalf JA, Davey RT, Jr. y Lane HC (2001) **Human immunodeficiency virus type 1 quasi species that rebound after discontinuation of highly active antiretroviral therapy are similar to the viral quasi species present before initiation of therapy.** *The Journal of infectious diseases* 183(1):36-50.

44. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ y Siliciano RF (2003) **Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells.** *Nature medicine* 9(6):727-728.
45. Beloukas A, Paraskevis D, Psychogiou M y Hatzakis A (2009) **The role of HIV-1 DNA as an additional marker of HIV-1 infection.** *Current HIV research* 7(3):255-265.
46. Suspene R y Meyerhans A (2012) **Quantification of unintegrated HIV-1 DNA at the single cell level in vivo.** *PloS one* 7(5):e36246.
47. Alidjinou EK, Bocket L y Hober D (2015) **Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: A review of relevant clinical uses and laboratory methods.** *Pathologie-biologie* 63(1):53-59.
48. Mexas AM, Graf EH, Pace MJ, Yu JJ, Pappasavvas E, Azzoni L, Busch MP, Di Mascio M, Foulkes AS, Migueles SA, Montaner LJ y O'Doherty U (2012) **Concurrent measures of total and integrated HIV DNA monitor reservoirs and ongoing replication in eradication trials.** *Aids* 26(18):2295-2306.
49. Tsiara CG, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Goujard C, Katzenstein TL, Minga AK, Rouzioux C y Hatzakis A (2012) **Impact of HIV type 1 DNA levels on spontaneous disease progression: a meta-analysis.** *AIDS research and human retroviruses* 28(4):366-373.
50. Goujard C, Bonarek M, Meyer L, Bonnet F, Chaix ML, Deveau C, Sinet M, Galimand J, Delfraissy JF, Venet A, Rouzioux C, Morlat P y Agence Nationale de Recherche sur le Sida PSG (2006) **CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 42(5):709-715.
51. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, Bosch RJ, Lai J, Chioma S, Emad F, Abdel-Mohsen M, Hoh R, Hecht F, Hunt P, Somsouk M, Wong J, Johnston R, Siliciano RF, Richman DD, O'Doherty U, Palmer S, Deeks SG y Siliciano JD (2013) **Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies.** *PLoS pathogens* 9(2):e1003174.
52. Liszewski MK, Yu JJ y O'Doherty U (2009) **Detecting HIV-1 integration by repetitive-sampling Alu-gag PCR.** *Methods* 47(4):254-260.
53. Komninakis SV, Santos DE, Santos C, Oliveros MP, Sanabani S y Diaz RS (2012) **HIV-1 proviral DNA loads (as determined by quantitative PCR) in patients subjected to structured treatment interruption after**

- antiretroviral therapy failure.** *Journal of clinical microbiology* 50(6):2132-2133.
54. Desire N, Dehee A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, Rozenbaum W y Nicolas JC (2001) **Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay.** *Journal of clinical microbiology* 39(4):1303-1310.
55. Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, Lourenco M, Rothschild C y Rouzioux C (2004) **Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level.** *Aids* 18(1):45-49.
56. Graf EH y O'Doherty U (2013) **Quantitation of integrated proviral DNA in viral reservoirs.** *Curr Opin HIV AIDS* 8(2):100-105.
57. Nicastrì E, Palmisano L, Sarmati L, D'Ettoire G, Parisi S, Andreotti M, Buonomini A, Pirillo FM, Narciso P, Bellagamba R, Vullo V, Montano M, Di Perri G y Andreoni M (2008) **HIV-1 residual viremia and proviral DNA in patients with suppressed plasma viral load (<400 HIV-RNA cp/ml) during different antiretroviral regimens.** *Current HIV research* 6(3):261-266.
58. DATABASES H (2015) HIV Sequence Compendium 2014. Disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/compendium.html>, consultado el 1 de julio del 2015.
59. Walker JM (2006) *Human Retrovirus Protocols Virology and Molecular Biology* (Totowa, New Jersey 07512).
60. Sonza S, Kiernan RE, Maerz AL, Deacon NJ, McPhee DA y Crowe SM (1994) **Accumulation of unintegrated circular viral DNA in monocytes and growth-arrested T cells following infection with HIV-1.** *Journal of leukocyte biology* 56(3):289-293.
61. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhass U, Montagnier L y Charneau P (2000) **HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap.** *Cell* 101(2):173-185.
62. Yoder KE y Fishel R (2006) **PCR-based detection is unable to consistently distinguish HIV 1LTR circles.** *Journal of virological methods* 138(1-2):201-206.
63. Soulie C, Marcelin AG, Ghosn J, Amellal B, Assoumou L, Lambert S, Duvivier C, Costagliola D, Katlama C y Calvez V (2007) **HIV-1 X4/R5 co-receptor in viral reservoir during suppressive HAART.** *Aids* 21(16):2243-2245.

64. Domingo E, Menendez-Arias L y Holland JJ (1997) **RNA virus fitness.** *Reviews in medical virology* 7(2):87-96.
65. Lathey JL, Brambilla D, Goodenow MM, Nokta M, Rasheed S, Siwak EB, Bremer JW, Huang DD, Yi Y, Reichelderfer PS y Collman RG (2000) **Co-receptor usage was more predictive than NSI/SI phenotype for HIV replication in macrophages: is NSI/SI phenotyping sufficient?** *Journal of leukocyte biology* 68(3):324-330.
66. Tuttle DL, Anders CB, Aquino-De Jesus MJ, Poole PP, Lamers SL, Briggs DR, Pomeroy SM, Alexander L, Peden KW, Andiman WA, Sleasman JW y Goodenow MM (2002) **Increased replication of non-syncytium-inducing HIV type 1 isolates in monocyte-derived macrophages is linked to advanced disease in infected children.** *AIDS research and human retroviruses* 18(5):353-362.
67. Li S, Juarez J, Alali M, Dwyer D, Collman R, Cunningham A y Naif HM (1999) **Persistent CCR5 utilization and enhanced macrophage tropism by primary blood human immunodeficiency virus type 1 isolates from advanced stages of disease and comparison to tissue-derived isolates.** *Journal of virology* 73(12):9741-9755.
68. Kwa D, Vingerhoed J, Boeser B y Schuitemaker H (2003) **Increased in vitro cytopathicity of CC chemokine receptor 5-restricted human immunodeficiency virus type 1 primary isolates correlates with a progressive clinical course of infection.** *The Journal of infectious diseases* 187(9):1397-1403.
69. Gray L, Sterjovski J, Churchill M, Ellery P, Nasr N, Lewin SR, Crowe SM, Wesselingh SL, Cunningham AL y Gorry PR (2005) **Uncoupling coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from macrophage tropism reveals biological properties of CCR5-restricted HIV-1 isolates from patients with acquired immunodeficiency syndrome.** *Virology* 337(2):384-398.
70. Gorry PR, Bristol G, Zack JA, Ritola K, Swanstrom R, Birch CJ, Bell JE, Bannert N, Crawford K, Wang H, Schols D, De Clercq E, Kunstman K, Wolinsky SM y Gabuzda D (2001) **Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 isolates from brain and lymphoid tissues predicts neurotropism independent of coreceptor specificity.** *Journal of virology* 75(21):10073-10089.
71. Dejuqc N, Simmons G y Clapham PR (1999) **Expanded tropism of primary human immunodeficiency virus type 1 R5 strains to CD4(+) T-cell lines determined by the capacity to exploit low concentrations of CCR5.** *Journal of virology* 73(9):7842-7847.

72. Peters PJ, Sullivan WM, Duenas-Decamp MJ, Bhattacharya J, Ankghuambom C, Brown R, Luzuriaga K, Bell J, Simmonds P, Ball J y Clapham PR (2006) **Non-macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes predominate in blood, lymph nodes, and semen: implications for transmission and pathogenesis.** *Journal of virology* 80(13):6324-6332.
73. Mefford ME, Kunstman K, Wolinsky SM y Gabuzda D (2015) **Bioinformatic analysis of neurotropic HIV envelope sequences identifies polymorphisms in the gp120 bridging sheet that increase macrophage-tropism through enhanced interactions with CCR5.** *Virology* 481:210-222.
74. Philpott S, Weiser B, Anastos K, Kitchen CM, Robison E, Meyer WA, 3rd, Sacks HS, Mathur-Wagh U, Brunner C y Burger H (2001) **Preferential suppression of CXCR4-specific strains of HIV-1 by antiviral therapy.** *The Journal of clinical investigation* 107(4):431-438.
75. Equils O, Garratty E, Wei LS, Plaeger S, Tapia M, Deville J, Krogstad P, Sim MS, Nielsen K y Bryson YJ (2000) **Recovery of replication-competent virus from CD4 T cell reservoirs and change in coreceptor use in human immunodeficiency virus type 1-infected children responding to highly active antiretroviral therapy.** *The Journal of infectious diseases* 182(3):751-757.
76. Galan I, Jimenez JL, Gonzalez-Rivera M, De Jose MI, Navarro ML, Ramos JT, Mellado MJ, Gurbindo MD, Bellon JM, Resino S, Cabrero E y Munoz-Fernandez MA (2004) **Virological phenotype switches under salvage therapy with lopinavir-ritonavir in heavily pretreated HIV-1 vertically infected children.** *Aids* 18(2):247-255.
77. Jiao Y, Wang P, Zhang H, Zhang T, Zhang Y, Zhu H y Wu H (2011) **HIV-1 co-receptor usage based on V3 loop sequence analysis: preferential suppression of CXCR4 virus post HAART?** *Immunological investigations* 40(6):597-613.
78. Andersson J, Fehniger TE, Patterson BK, Pottage J, Agnoli M, Jones P, Behbahani H y Landay A (1998) **Early reduction of immune activation in lymphoid tissue following highly active HIV therapy.** *Aids* 12(11):F123-129.
79. Buzon MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P, Paredes R, Sharkey M, Palmer S, Stevenson M, Clotet B, Blanco J y Martinez-Picado J (2010) **HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects.** *Nature medicine* 16(4):460-465.

80. Pace MJ, Graf EH y O'Doherty U (2013) **HIV 2-long terminal repeat circular DNA is stable in primary CD4+T Cells.** *Virology* 441(1):18-21.
81. Kelly J, Beddall MH, Yu D, Iyer SR, Marsh JW y Wu Y (2008) **Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA.** *Virology* 372(2):300-312.