



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Diseño y desarrollo de un control  
interno de técnica para la determinación  
de la carga viral plasmática del VIH-1”**

**M. Carolina Ottati Braselli**

**Dr. MSc. Ernesto Cairolí Morossini**  
Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina  
Universidad de la República

**Dr. Alfonso Cayota**  
**Dr. Juan Cristina**

**Diciembre de 2009**

## INDICE

1.	RESUMEN.....	4
2.	INTRODUCCION .....	6
3.	OBJETIVOS.....	24
	<b>3.1. Objetivo general.....</b>	24
	<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	24
4.	MATERIALES Y METODOS .....	25
	<b>4.1. Obtención de muestras de plasma y medidas de bioseguridad .....</b>	25
	<b>4.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica .....</b>	25
	<b>4.3. RT-PCR con primers específicos para el fragmento de 600pb de la GAPDH</b>	
	.....	26
	<b>(control interno).....</b>	26
	<b>4.4. Detección de los fragmentos amplificados: electroforesis de ácidos nucleicos</b>	
	.....	27
	<b>4.5. Clonación del control interno en bacterias electrocompetentes.....</b>	27
	<b>4.6. Síntesis de ARN mediante el quit T7 RiboMAX™.....</b>	30
	<b>4.7. Estimación de la concentración óptima de ARN de síntesis a adicionar a...</b>	31
	<b>muestras de plasma .....</b>	31
	<b>4.8. Ensayo DNasa .....</b>	32
	<b>4.9. Ensayo RNasa .....</b>	32
	<b>4.10. Puesta a punto de la PCR utilizando SYBRgreen-I .....</b>	32
5.	RESULTADOS.....	33
	<b>5.1. Aislamiento de PBMC. Clonación y verificación de la presencia del control</b>	
	.....	33
	<b>interno en el vector pGEM-T Easy .....</b>	33
	<b>5.2. Transcripción “in vitro” .....</b>	34
	Evaluación enzimática.....	34
	<b>5.3. Rendimiento de re-extracción del ARN de síntesis sobre muestras de plasma</b>	
	.....	36
	<b>VIH-1 negativo.....</b>	36
	<b>5.4. Puesta a punto de la PCR utilizando SYBR green-I .....</b>	37
6.	DISCUSION.....	38
	<b>6.1. Clonación y verificación del control interno en el vector pGEM-T Easy.....</b>	39
	<b>6.2. Transcripción “in vitro”: Síntesis del ARN del control interno mediante el</b>	
	<b>quit .....</b>	39
	<b>T7 RiboMAX™.....</b>	39
	<b>6.3. Evaluación enzimática: Ensayo RNasa y ensayo DNasa.....</b>	39
	<b>6.4. Rendimiento de re-extracción del ARN de síntesis sobre muestras de plasma</b>	
	.....	40
	<b>VIH-1 negativo.....</b>	40
	<b>6.5. Puesta a punto de la PCR utilizando SYBR green-I .....</b>	41
7.	CONCLUSIONES .....	42
8.	BIBLIOGRAFIA.....	43

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
b-ADN	ADN ramificado
ADNr	ADN recombinante
AgNO <sub>3</sub>	nitrate de plata
Amp	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CVP	carga viral plasmática
BET	bromuro de etidio
dNTPs	deoxinucleósidos trifosfatos
DTT	dithiotreitol
D.O.	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
GAPDH	glicer-aldheído fosfato deshidrogenada
HAART	highly active antiretroviral therapy
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LB	medio Luria-Bertani
mA	miliamperes
mL	mililitros
mM	milimolar
ms	milisegundos
M-MuLV RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
NASBA	amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos
nm	nanómetros
µg	microgramos
ng	nanogramos
pb	pares de bases
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PSA	persulfato de amonio
RT	retrotranscripción
SCM	sitio de clonado múltiple
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TAE	tris-acetato edta
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
VIH-1	virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1
VIH-2	virus de la inmunodeficiencia humana tipo-2
V	volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

## 1. RESUMEN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Desde 1983, año en que fue aislado el VIH, hasta abril de 2005 se notificó en Uruguay el fallecimiento de 1.328 personas de acuerdo a los registros epidemiológicos disponibles en la Unidad de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública de Uruguay [Programa Nacional VIH-SIDA, 2005]. A nivel mundial se han reportado hasta el 2003 más de 60 millones de infectados, detectándose 14.000 nuevos infectados por día [Fauci, 2003].

La valoración clínica, pronóstico e inicio de tratamiento se realiza utilizando la carga viral plasmática (CVP), el número de linfocitos T CD4+ (LTCD4+) y estudios de resistencia a los antirretrovirales. Los niveles de CVP detectados dependen de la sensibilidad de la técnica utilizada para su medida, determinando en ocasiones el inicio de la terapia antirretroviral. El objetivo terapéutico es lograr niveles indetectables de CVP. Los ensayos disponibles comercialmente detectan entre 50-200 copias/mL, logrando un nivel de sensibilidad mayor de detección con los que utilizan la técnica de Real Time -PCR.

El proyecto en el que está enmarcada esta pasantía propone poner a punto la detección de la CVP en pacientes seropositivos para el VIH-1 mediante la técnica Real Time RT-PCR cuantitativa utilizando SYBR-green 1, siendo los objetivos específicos del mismo: mejorar la sensibilidad en la detección del número de copias por mL de plasma y reducir los costos en la realización de los ensayos [Cairolí, 2004-2005].

Las características de la técnica Real Time RT-PCR: sensibilidad, rapidez y reproducibilidad, permite que se logren niveles más sensibles de detección, menor a 50 copias/mL llegando en algunos casos a valores de 1 copia/mL [Désiré, 2001; Gibellini, 2004; Mackay, 2002; Palmer, 2003].

Este nivel de detección permitiría realizar un seguimiento de la viremia residual a lo largo del tratamiento previendo o evitando en parte, la emergencia de partículas resistentes a componentes antirretrovirales específicos [Gibellini, 2004; Palmer, 2003].

Dentro del proyecto se establecieron tres áreas de trabajo experimental: la producción de un control interno del ensayo, la producción de un patrón de cuantificación y la detección de la CVP de la muestra de pacientes infectados [Cairolí, 2004-2005].

El trabajo de pasantía consistió en desarrollar la primera de las tres áreas: producción del control interno de las técnicas de extracción de ARN y transcripción reversa, utilizando un fragmento del gen de la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como molécula blanco.

## 2. INTRODUCCION

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es el nombre dado al último estadio de la enfermedad causada por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Reconocido como entidad clínica en 1981 y aislado en 1983: VIH-1 y en 1986: VIH-2, el virus de la inmunodeficiencia humana es causante de una de las pandemias más devastadoras, con más de 60 millones de infectados en todo el mundo [**Barre- Sinoussi, 1983; Fauci, 2003; Gatell, 1997; Levy, 1984; Popovic, 1984**].

En el Uruguay la infección por VIH-1 presenta un incremento progresivo, reportándose hasta abril de 2005 un total de 8.407 casos de los cuales 2.600 corresponden a personas enfermas de SIDA y 5.807 infectados con VIH-1. Desde 1983 hasta abril de 2005 se notificó el fallecimiento de 1.328 personas de acuerdo a los registros epidemiológicos disponibles en la Unidad de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública de Uruguay [**Programa Nacional VIH-SIDA, 2005**].

A nivel mundial entre el 75% y el 80% de los casos de SIDA son producto de las relaciones sexuales, siendo las relaciones heterosexuales el principal mecanismo de contagio.

Entre los casos pediátricos más del 90% de las infecciones se atribuyen al contagio vertical (materno-fetal) y perinatal. Así mismo las transfusiones de sangre o derivados hemáticos, trasplantes de órganos, contacto directo con sangre en superficies mucosas o con soluciones de continuidad cutáneas y el uso compartido de material de inyección entre usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) representan mecanismos de alto riesgo de contagio viral [**Gatell, 1997; Rius, 2004**].

El VIH pertenece a la subfamilia *Lentivirinae* clasificada dentro de la familia *Retroviridae*.

Los retrovirus son virus ARN cuya proliferación está dirigida por un provirus de ADN bicatenario sintetizado mediante la transcriptasa reversa (ADN-polimerasa dependiente de ARN) que posee el propio virus. El ADN viral puede integrarse al ADN celular, proceso catalizado por la integrasa viral, o permanecer en el citoplasma [**Cayota, 2004; Flint, 2004; Gatell, 1997**].

El VIH (Figura 1) está formado por una partícula esférica de 80 a 200nm de diámetro, con una estructura en tres capas: una interna o nucleoide, que contiene: ARN, la

nucleoproteína y algunas enzimas necesarias para el ciclo vital (una proteasa, una transcriptasa reversa y una integrasa); una cápside icosaédrica y una envoltura derivada de la célula huésped donde se insertan las glicoproteínas (gp 120 y gp 41) y antígenos de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y clase II (HLA-II) [Ibarra, 2001].

El VIH consta de un genoma formado por dos hebras idénticas de ARN de polaridad positiva unidas por puentes de hidrógeno en 5', cada cadena tiene una longitud aproximada de 9.2 Kb.

Además de las dos poliproteínas estructurales comunes a todos los retrovirus: *Gag* y *Env*, y proteínas enzimáticas: *Pol*, el genoma del VIH codifica para otras proteínas auxiliares.

Las mismas se denominan: *Tat* y *Rev*, que cumplen funciones regulatorias esenciales para la replicación viral y proteínas accesorias: *Nef*, *Vif*, *Vpr*, comunes para VIH-1 y 2, *Vpu* en VIH-1 y *Vpx* en VIH-2 (Tabla 1).

Estas proteínas aumentan de forma significativa la patogénesis viral, disminuyendo la expresión de CD4, CD28 y MHC I en superficie, facilitando la fusión de la envoltura viral a la membrana celular, favoreciendo el ensamblaje y maduración viral, promoviendo la entrada del ácido nucleico viral al núcleo y estimulando una liberación viral eficiente [Iwatani, 1997].

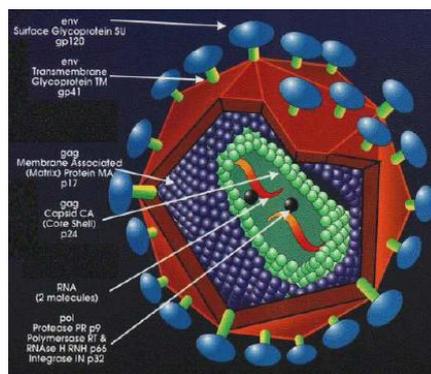


Figura 1: estructura del virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH).

Ibarra,C., 2001. Factores inmunitarios protectivos del huésped contra la infección por el VIH-1 y la progresión a SIDA: quimiocinas y sus receptores.

Como en todos los retrovirus, la secuencia del VIH presenta repeticiones terminales largas (RTL) que se localizan en los dos extremos del genoma (Figura 2). Las mismas

regulan la integración del genoma viral en el genoma del huésped; la expresión de genes anteriormente mencionados y la replicación del virus [Abbas, 2004; Stevenson, 2003].

Tabla 1: Genes del VIH. Ibarra, C., 2001. Factores inmunitarios protectivos del huésped contra la infección por el VIH-1 y la progresión a SIDA: quimiocinas y sus receptores.

Gen	Proteínas	Funciones
Proteínas estructurales		
<i>gag</i>	p55. Precursora de p17 p24 p15. Precursora de p9 p6	Proteínas estructurales del core Proteína miristilada de la matriz Proteína de la cápside Proteína de la nucleocápside Proteína unida al ácido nucleico Ayuda a la maduración del virus
<i>pol</i>	p90. Precursora de p15 p13 p63, p55 p11 Integrasa	Enzimas Proteasa RNasa H Transcriptasa inversa Integración del DNAC viral
<i>env</i>	p160. Precursora de gp120 gp41	Proteínas de envoltura Proteína de envoltura (superficie) Proteína de envoltura (transmembrana)
Proteínas reguladoras		
<i>vpr</i>	p18	Acelerador del ciclo de replicación. Transporte nuclear
<i>vif</i>	p23	Proteína asociada a la infecciosidad del virión.
<i>tat</i>	p14	Activa la transcripción de todos los genes
<i>rev</i>	p19	Regulador de la expresión post-transcripcional de los genes <i>gag</i> y <i>env</i> Transporte selectivo de RNAm en el citoplasma.
<i>nef</i>	p27	Regulación negativa de CD4 y MHC-1. Parece inhibir la transcripción del VIH y retardar la transcripción viral
<i>vpu</i>	p15	Sólo en VIH. Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada. Podría aumentar el título de virus presente en la persona infectada.

MHC, *major histocompatibility complex*.

Se han descrito hasta el momento dos tipos de VIH: el VIH-1 y el VIH-2 (Figura 2).

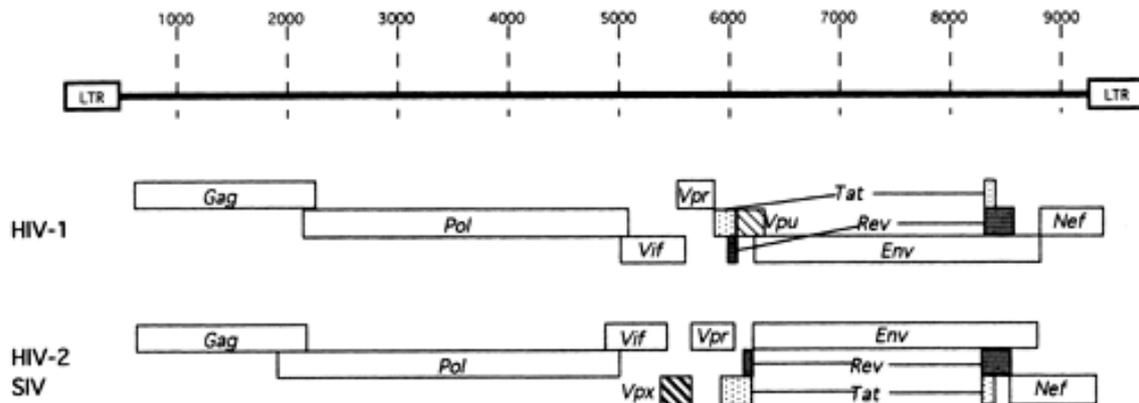


Figura 2: Estructura del VIH-1 y VIH-2. Streicher, H. et al. 2000; Cap 157 in Mandell, Principles and Practice of Infectious Diseases.

A diferencia del VIH-1, más extendido a nivel mundial, el VIH-2 está restringido a ciertas regiones de África Occidental y países con nexos históricos en áreas donde el virus es endémico [Facal, 2003; Plantier, 2004].

Los individuos infectados con VIH-2 al igual que los infectados con VIH-1, desarrollan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida pero el período de incubación es mayor y menor el desarrollo de sintomatología [Flint, 2004].

Según los análisis filogenéticos de las secuencias provirales genómicas y subgenómicas del VIH-1 se han determinado hasta el momento tres grupos dentro del VIH-1: M (most), O (outliers) y N (no O no M). El grupo M es el de mayor prevalencia, conteniendo al menos 10 subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) y 4 formas recombinantes (AB, AE, AG, AGI) [Nelson, 1999]. Siendo cada subtipo prevalente en diferentes áreas geográficas.

El VIH-2, por otra parte, está definido por 8 grupos filogenéticos designados de la A hasta la H, siendo el grupo A el que contiene la mayoría de las cepas de VIH-2 hasta ahora caracterizadas [Plantier, 2004].

El ingreso del VIH a las células se realiza a través de las mucosas a excepción de aquellos casos en los que existe contacto directo con sangre infectada [Flint, 2004].

Las células susceptibles al VIH son aquellas que expresan la molécula CD4+ en su superficie: los linfocitos T CD4+ (LTCD4+) cooperadores o “helper”, los monocitos/macrófagos, células dendríticas (de Langerhans de los epitelios y células foliculares dendríticas de los ganglios linfáticos), *stem cells* hematopoyéticas, células endoteliales, microglías del cerebro y células epiteliales del tracto gastrointestinal, aunque también existen otras moléculas de membrana que participan en el proceso de entrada del VIH a la célula [Cayota, 2004; Facal, 2003].

Se pueden distinguir varias fases dentro del ciclo viral de infección por VIH-1: adsorción, fusión e internalización del virión, transcripción reversa e integración del genoma viral dentro del genoma del huésped, latencia, expresión temprana de genes reguladores, expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos, morfogénesis y salida del virión (Figura 3).

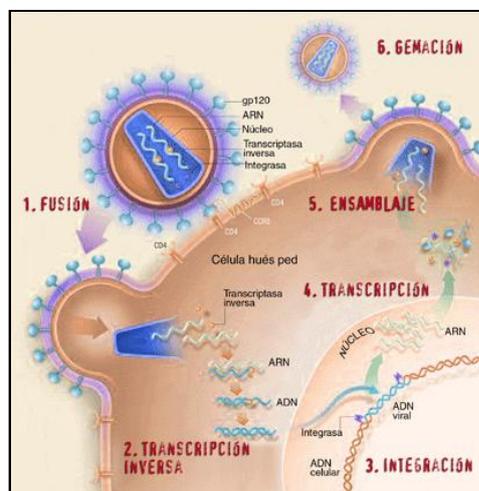


Figura 3. Fases del ciclo vital del VIH-I. <http://gtt-vih.org/book/print/1781>

El ingreso a la célula se lleva a cabo mediante un mecanismo denominado fusión mediada por receptor, en el cual intervienen las glicoproteínas de superficie: gp120 y gp41 del VIH y el receptor CD4+.

Las subunidades gp41 transmembrana y la gp120 externa forman un complejo denominado Env. Este complejo media un proceso de fusión de la envoltura del virión con la membrana de la célula diana. La subunidad gp120 sufre un cambio conformacional luego de unirse a la molécula CD4+ facilitando la unión secundaria de gp120 a un co-receptor de quimiocinas. La unión de gp120 al co-receptor provoca un

cambio conformacional de la subunidad gp41, por lo que queda expuesta una región hidrófoba, denominada péptido de fusión, que se inserta en la membrana celular y permite que la membrana del virus se fusione con la de la célula diana (Figura 4) [Binley, 2006].

Como se expresó anteriormente, además del receptor CD4+ se han identificado dos co-receptores que intervienen en este proceso: CXCR4 y CCR5.

Estos co-receptores funcionan normalmente como receptores para citoquinas quimiotactivas: las quemoquinas (pequeñas moléculas proteicas que atraen selectivamente glóbulos blancos: neutrófilos, macrófagos y linfocitos, al sitio de infección) [By Lijun Wu, 1997; Hatse, 2006; Rucker, 1997].

La habilidad para unirse a un co-receptor específico determina el tropismo celular de las diferentes cepas del VIH. Las cepas de virus que se unen a los co-receptores CCR5, denominadas cepas R5, dominan en etapas tempranas de la infección e infectan monocitos y macrófagos (aunque algunas cepas pueden infectar también células T: R5X4), aquellas cepas de virus que se unen a los co-receptores CXCR4, denominadas cepas X4 evolucionan tarde durante la infección e infectan líneas celulares T. El cambio de R5 a X4 está asociado con la aceleración en la progresión de la enfermedad [Cayota, 2004; Ito, 2003; Pastore, 2007].

Existen otros mecanismos por los cuales el virus puede ingresar a una célula: contacto directo con una célula infectada, endocitosis de partículas virales a través de receptores de superficie Fc, receptores glicolípidos alternativos como galactosil ceramida o 3' sulfo galactosil ceramida [Flint, 2004].

La conversión de ARN viral a ADN proviral ocurre en el citoplasma de la célula blanco. Este paso es crucial en el ciclo de replicación viral y está mediado por la transcriptasa reversa del virus. La transcripción reversa es un proceso de varios pasos. Después de la unión de los templados tARN, la síntesis de DNA ocurre en una polimerización de cadena negativa iniciando en el PBS ("primer binding site", [sitio de unión del templado]), en la porción larga repetida 5' como DNA R/U5 corto. El siguiente paso incluye la degradación del ARN por la enzima viral ARNasa H y el cambio de templado del DNA R/U5 con hibridación de la secuencia R a la región 3' ARN terminal. Se completa la polimerización total del ADN viral con la degradación de tARN. La transcripción reversa produce un ADN de doble cadena con regiones LTR en los extremos terminales.

El VIH entra en las células T en reposo, por lo que la transcripción reversa puede resultar en la acumulación del ADN viral no integrado. La activación celular es necesaria para la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped después del transporte del complejo de preintegración al núcleo.

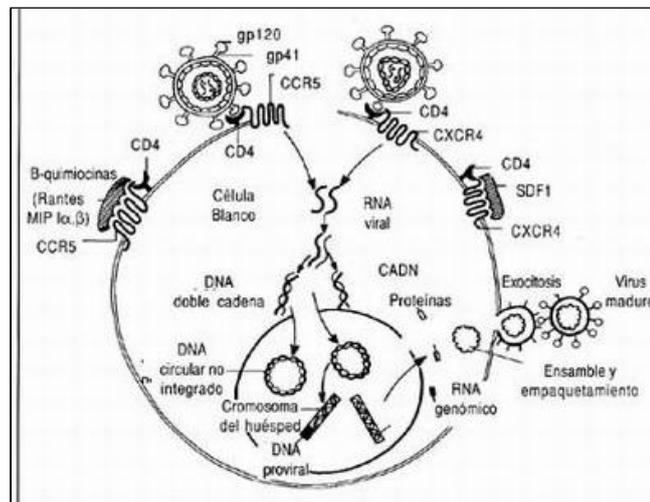


Figura 4: Ciclo viral de la infección por VIH-1

El ADN viral ingresa al núcleo y la integrasa viral cataliza la integración del ADN vírico en el genoma de la célula huésped. La selección del sitio de integración del ADN viral no es al azar, sino que se favorece su integración entre unidades transcripcionales activas del genoma huésped (**Lewinski, 2005**).

El ADN integrado del VIH se denomina provirus y puede permanecer inactivo transcripcionalmente durante meses o años, con una producción escasa o nula de nuevas proteínas víricas o viriones (**Abbas, 2000**).

La transcripción de los genes del ADN provírico está regulado por las RTL de los genes estructurales del virus, mientras que las citocinas u otros estímulos fisiológicos para los linfocitos T y los macrófagos incrementan la transcripción de los genes víricos (**Abbas, 2000**).

Después de la estimulación con mitógenos o citocinas, los factores celulares de transcripción NF- $\kappa$ B, SP1 y NFAT entre otros, son translocados al núcleo donde se unen a la región LTR del VIH, iniciando la transcripción de genes del VIH. La

transcripción inicial trae como resultado la síntesis temprana de proteínas reguladoras de VIH como Tat o Rev.

Tat se une al sitio TAR (“transactivation response element” o elemento de respuesta a la transactivación) en el núcleo y estimula la transcripción y la formación de transcritos largos de ARN.

Rev activa la expresión de genes estructurales y enzimáticos e inhibe la producción de proteínas reguladoras, por lo tanto promueve la formación de partículas virales maduras. Las proteínas codificadas por *pol* y *gag* forman el núcleo de las partículas maduras del VIH y los productos génicos codificados por *env* generan las espículas de gp120 de la envoltura viral.

Las espículas de gp120 de la envoltura son sintetizadas como moléculas precursoras largas de gp160 y son cortadas por la proteasa de VIH en gp120 y gp41.

Las proteínas Gag derivan de una molécula precursora de 53 kD, que es clivada por la proteasa del VIH en p24, p17, p9 y p7. El corte de las moléculas precursoras por la proteasa es necesario para la generación de partículas virales infecciosas, y por consiguiente la proteasa representa un blanco interesante para tratamiento (**Abbas, 2000**).

El ensamblaje de las partículas víricas infecciosas se da mediante el empaquetamiento del ARN transcrito del genoma provírico en el interior de un complejo nucleoproteico formado por las proteínas nucleares Gag y las enzimas codificadas por *pol* necesarias para el siguiente ciclo de integración (**Abbas, 2000**).

Durante el proceso de liberación de nuevas partículas virales, la membrana lipídica del virus puede incorporar varias proteínas de la célula huésped y enriquecerse con ciertos fosfolípidos y colesterol de la membrana celular.

En contraste con las células T, donde la liberación ocurre en la superficie celular y los viriones son liberados al espacio extracelular, el proceso de liberación en monocitos y macrófagos resulta en una acumulación de viriones en vacuolas celulares.

La replicación de los retrovirus está caracterizada por un alto grado de mutaciones espontáneas. En promedio, la transcripción reversa origina de 1 a 10 errores por genoma por ciclo de replicación, que pueden dar lugar a la formación de especies virales no-competentes para la replicación pero también pueden generar cepas resistentes a fármacos antirretrovirales.

El rápido recambio de partículas virales ( $10^9$  producidas y eliminadas por día) y las elevadas tasas de mutación generan poblaciones virales cercanamente relacionadas, denominadas “cuasiespecies”. La presión selectiva sobre mutaciones pre-existentes puede ser ejercida por ciertos medicamentos y por componentes del sistema inmune, tales como los anticuerpos neutralizantes o células T citotóxicas (CTL) [**Haddad-Reyes\_Terán, 2003**].

Los lentivirus pueden producir infecciones celulares latentes de larga evolución y efectos citopáticos a corto plazo, inmunodeficiencias y desórdenes en el sistema nervioso central y en el sistema hematopoyético, síndromes de emaciación, artritis y autoinmunidad.

La evolución de la infección por VIH-1 está caracterizada desde el punto de vista clínico por tres fases: una fase aguda, seguida de un período de latencia clínica o asintomática de duración variable llegando por último a la fase final: período sintomático o de SIDA (Figura 5).

#### **Fase aguda.**

Luego de la infección se produce un incremento de la carga viral (viremia) en sangre (aprox.  $5 \cdot 10^6$  partículas/mL de plasma). Los linfocitos activados producen el crecimiento de los nódulos linfáticos (adenomegalias) y un síndrome agudo compuesto por signos y síntomas inespecíficos característicos de una infección viral. A pocas semanas de la infección, la carga viral disminuye debido a la respuesta inmune mediada por células, el número de CTL aumenta y el de LTCD4+ disminuye, retornando el mismo a valores cercanos al valor normal [**Coffin, 1995; Goulder, 2001**].

#### **Fase asintomática.**

De 3 a 4 meses luego de la infección, la viremia se reduce aunque continúa la producción de partículas virales principalmente en los nódulos linfáticos. En esta fase se produce una latencia o silencio clínico pero persiste la actividad replicativa viral, sostenida y en baja concentración. El nivel de viremia en esta fase es un predictor de cuán rápido progresará la enfermedad en un individuo en particular (alta viremia/rápida progresión). La destrucción de LTCD4+ en los tejidos linfáticos progresa de forma constante y el número de LTCD4+ circulantes disminuye de forma sostenida a una tasa constante de aproximadamente 60 células/ $\mu$ L/año. El nivel de LTC permanece elevado. Esta fase tiene una duración variable de 5 a 20 años [**Coffin, 1995; Mellors, 1996**].

### Fase sintomática o SIDA.

En los nódulos linfáticos, la replicación viral aumenta con la concomitante destrucción de las células linfáticas y de la arquitectura normal del tejido linfoide. El recuento de LTCD4+ en la sangre cae por debajo de 200 células/ $\mu$ L y el número total de LTC desciende. Esta fase se caracteriza por inmunodepresión severa, marcada clínicamente por diversas infecciones oportunistas, desarrollo de neoplasias malignas, deterioro neurológico y repercusión general severa [Coffin, 1995]. La fase sintomática o de SIDA queda entonces definida por la presencia de algunos tipos específicos de infecciones oportunistas, neoplasias, afección neurológica y/o cifras de LTCD4+ menores a 200 células/ $\mu$ L.

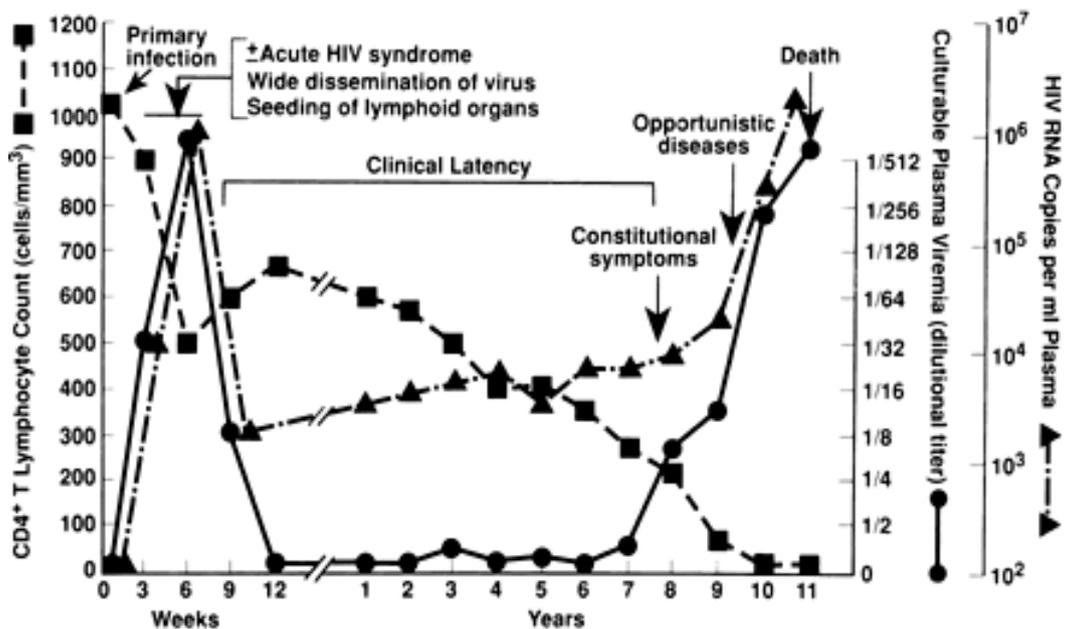


Figura 5: Relación observada entre los linfocitos T CD4+ y la carga Viral Plasmática. Pantaleo et al. 1993 NEJM: 328.

Durante el curso de la infección por VIH existe una disminución progresiva del número de linfocitos T (LT), con pérdida preferencial de las células con fenotipo “naive” (CD45RA+) en etapas tempranas, mientras que en etapas avanzadas se pierden los LTCD4+ memoria (CD45RO+).

Esto se acompaña también por una disminución progresiva del repertorio de receptores de LT (RCT), que se vuelve evidente cuando el recuento de LTCD4+ cae por debajo de

200 células/ $\mu\text{L}$  [**Cayota, 1990**]. A esto se le suma la gran cantidad de ciclos replicativos del VIH durante la infección viral, produciéndose una variación en el pool genético del VIH y aumentando la carga viral del paciente [**Palmer, 2003**].

Se estima que la producción diaria de nuevas partículas virales es de 100.000 millones con una pérdida de 1.000 a 2.000 millones de LTCD4+, sin embargo el número de células T con infección productiva existentes en la circulación es bajo [**Ho, 1995**].

Se han definido tres estadios sobre la base de las cifras de LTCD4+ y de las manifestaciones clínicas de los pacientes.

Si el paciente presenta más de 500 LTCD4/ $\mu\text{L}$ , su estado inmunitario es de inmunocompetencia, por lo que probablemente se encuentre en una fase inicial de la infección y por lo tanto no presente sintomatología.

Si el paciente tiene entre 200 y 500 LTCD4/ $\mu\text{L}$ , presenta una inmunodepresión moderada y probablemente se encuentre en una fase intermedia de la infección, pudiendo encontrarse asintomático o con infecciones de menor complejidad.

Si el paciente tiene menos de 200 LTCD4/ $\mu\text{L}$ , presenta una inmunodepresión severa, se encuentra en una fase avanzada de la infección (presenta criterios de SIDA), aunque puede estar asintomático, siendo en esta fase donde desarrolla las infecciones y neoplasias diagnósticas de SIDA [**Cayota- Cairolì, 2004; Gatell, 1997**].

El diagnóstico de la infección por VIH en adultos, adolescentes y niños mayores de 18 meses se realiza por métodos basados en la detección de anticuerpos anti VIH-1 y VIH-2 en el suero de personas infectadas (dos ELISAS positivos).

Como el nivel de especificidad no llega al 100% especialmente en poblaciones de baja prevalencia de infección por VIH, todos los resultados reactivos por serología de tamizaje deben ser confirmados por un procedimiento de alta especificidad, como es la técnica de Western Blot o los inmuno ensayos en línea (Diagrama 1) [**Pautas VIH SIDA MSP, 2006**].

Para valorar el estado inmunitario se realiza una determinación de LTCD4+ por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Los ensayos más comunes en la estimación de la actividad replicativa viral son la determinación de la concentración de p24 y la medida de la carga viral plasmática (CVP) mediante PCR convencional y PCR en tiempo real [**Gatell, 1997; Klein, 2003**].

La Carga Viral (CV) corresponde a la cantidad de virus replicativo o latente presente en un individuo infectado. La misma varía en las diferentes fases de la infección,

presentando en la fase aguda títulos elevados de carga viral, disminuyendo en la fase crónica hasta hacerse indetectable y aumentando nuevamente al ingresar al estadio SIDA.

La CV se encuentra en dos grandes compartimentos: tisular-celular y plasmático **[Cayota-Cairolí, 2004]**.

Dentro del primer compartimiento se encuentran: el tracto genital, sistema nervioso, glándulas mamarias y cavidad oral, que son vías de transmisión del virus y pueden ser sitios santuarios potenciales en la producción del VIH **[Shepard, 2000]**.

La carga viral correspondiente al compartimiento plasmático se denomina carga viral plasmática (CVP) y se correlaciona directamente con la replicación viral.

A nivel sanguíneo, el ARN mensajero viral (ARNmv) puede ser encontrado bajo forma de partículas virales libres en suero y plasma, en estado latente o de ADN proviral en células mononucleares de sangre periférica y replicativo bajo forma de ARNm **[Cayota, 2004; Furtado, 1995; Saksela, 1994]**.

La CVP representa un valor estimativo de la carga viral total y se expresa como el número de copias de ARNm por mL de plasma o su equivalente en logaritmo de base 10 **[Pautas MSP, 2005; Pautas VIH SIDA MSP, 2006]**.

La CVP es un importante predictor del inicio de la enfermedad, el estado de replicación viral, determinante del inicio o cambio de la terapia antirretroviral y un marcador de la eficacia de nuevas drogas antirretrovirales **[Gibellini, 2004; Furtado, 1995; Mellors, 1996; Nelson, 1999; Palmer, 2003; Saksela, 1994; Wei, 1995]**.

Se considera una CVP baja cuando los valores de la misma están entre 5.000 y 10.000 copias/mL, intermedia entre 10.000 y 30.000 copias/mL y alta con valores que superan las 30.000 a 50.000 copias/mL, siendo mayor el riesgo de evolucionar al estadio SIDA en aquellos individuos cuyo valor de CVP se encuentra por encima de 30.000 copias/mL **[Cayota-Cairolí, 2004]**.

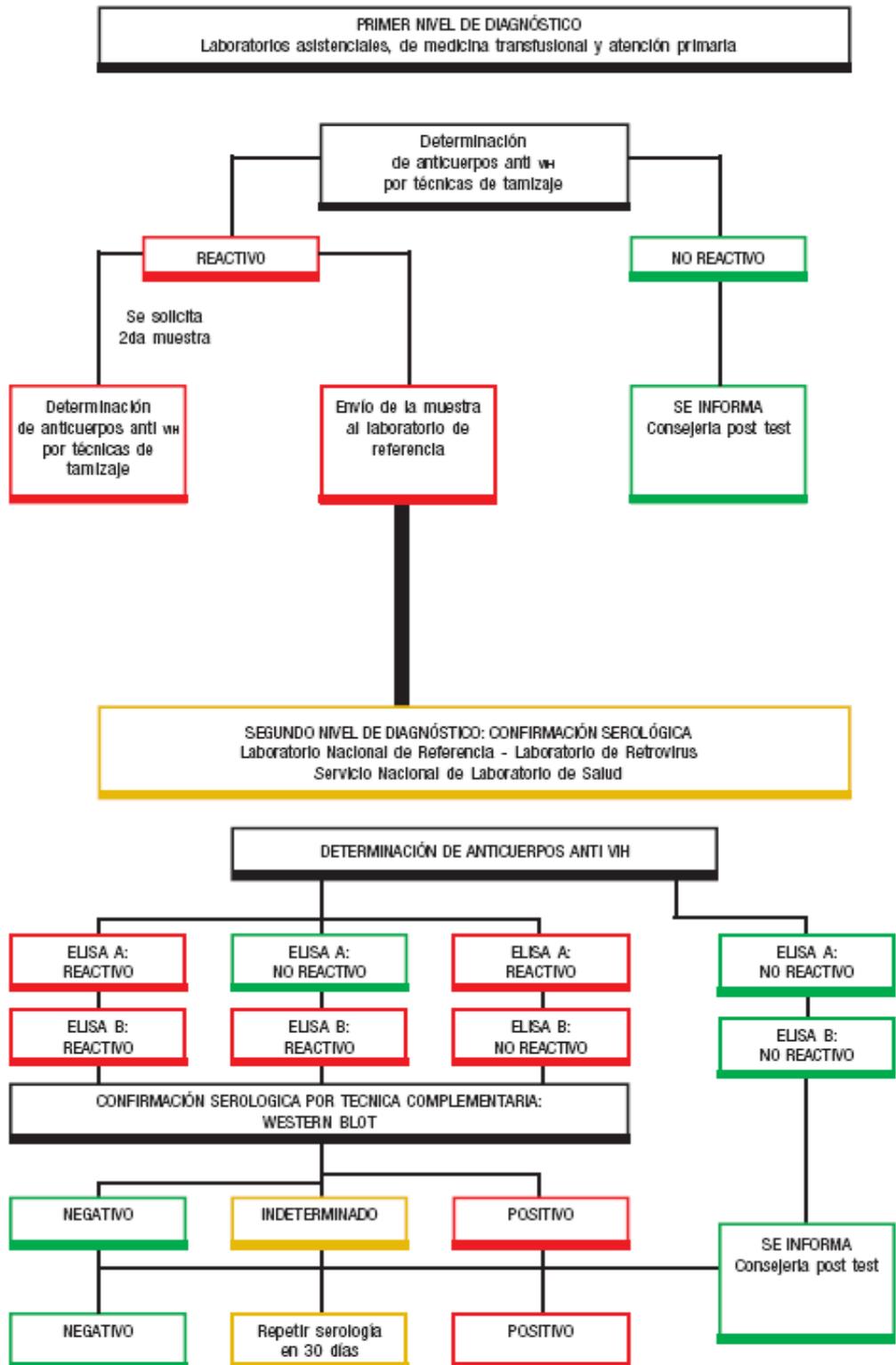


Diagrama 1: Niveles en el diagnóstico de infectados con VIH-1. Guías para diagnóstico, tratamiento antiretroviral y monitorización adultos y embarazadas. Pautas VIH SIDA MSP.

Uruguay 2006.

El otro parámetro de importancia en el control evolutivo de la infección es la población de LTCD4+.

El nivel de LTCD4+ permite conocer el estado inmunológico del paciente, acercarse a un pronóstico evolutivo, decidir el momento oportuno para iniciar el tratamiento antirretroviral y es de fundamental ayuda para realizar el control de la respuesta terapéutica. También indica la oportunidad de hacer profilaxis de las infecciones oportunistas y es un auxiliar para el diagnóstico clínico en la etiología de las mismas. Aunque los niveles de LTCD4+ no son útiles para predecir los efectos terapéuticos de agentes antivirales en el curso temprano de la enfermedad, valores menores a 200 LTCD4+/ $\mu$ L definen el ingreso a la etapa de SIDA [**Pautas VIH SIDA MSP, 2006; Cairolí, 2004-2005; Facal, 2003; Robin, 1994**].

Algunos individuos infectados con VIH-1 permanecen asintomáticos aun teniendo niveles muy bajos de LTCD4+ mientras que otros, con niveles comparativamente mayores de LTCD4+, establecen rápidamente un nivel avanzado de la enfermedad. Dichos patrones evolutivos son conocidos con el nombre de patrones evolutivos no progresores y patrones evolutivos progresores rápidos respectivamente [**Cayota-Cairolí, 2004; Mulder, 2004; Robin, 1994**].

No se dispone en la actualidad de una vacuna profiláctica para el VIH y el tratamiento de la infección mediante monoterapia con fármacos antivirales (inhibidores de la integrasa, de proteasa, de fusión, de unión a los receptores de quemoquinas e inhibidores de transcriptasa reversa análogos y no análogos de nucleósidos) aunque producen una reducción significativa del ARN del VIH en el plasma, no detienen la progresión de la enfermedad, en gran medida debido a la pérdida del efecto del agente antirretroviral frente a cepas resistentes [**Ho, 1995; Palmer, 2005**].

Actualmente se dispone de un tratamiento denominado Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) que consiste en la administración de combinaciones de tres clases de fármacos antivirales: análogos nucleósidos de la transcriptasa reversa, análogo no nucleósidos de la transcriptasa reversa e inhibidores de la proteasa.

Los análogos de nucleósidos son inhibidores competitivos de la transcriptasa reversa o terminadores de la cadena de ADN.

Los análogos no nucleósidos son un grupo de agentes estructuralmente diverso que provocan un cambio conformacional en el sitio activo de la transcriptasa reversa luego de unirse a un sitio distante del sitio activo, provocando su inhibición.

Los inhibidores de la proteasa del virus compiten con el sustrato por el sitio activo de la proteasa viral [Abbas, 2004; Molina, 2003; Weller, 2001].

Estos fármacos actúan directamente sobre el ciclo de replicación viral.

Este tipo de terapia puede disminuir la carga de VIH-1 en plasma hasta valores por debajo del límite de detección (menor a 50 copias/mL) en una significativa proporción de pacientes infectados [Demeter, 2002; Désiré, 2001].

A pesar de la efectividad de este tipo de terapias no ha sido posible erradicar el VIH-1 en individuos infectados debido a la persistencia de la replicación viral en varios reservorios virales, como son los LTCD4+ de larga vida, macrófagos y células dendríticas, que fueron infectadas durante la fase aguda inicial, ni siquiera luego de tratamientos por períodos de 5 a 9 años [Chun, 2005; Hermankova, 2003; Stevenson, 2003; Valentin, 2002].

Existe en estudio una estrategia alternativa para reducir costos y toxicidad de los tratamientos HAART denominada: structured intermittent therapy (SIT).

La misma consiste en tratar a los pacientes con HAART de forma intermitente [Dybul, 2001].

Se han desarrollado nuevas clases de drogas como los inhibidores de fusión que bloquean la actividad de la proteína transmembrana viral gp41, así como ensayos valorando el uso de interleuquina 2 y desarrollo de vacunas terapéuticas [Ayoub, 2008; Chinnadurai, 2007; Kovacs, 2005; Natarajan, 2002; Nora, 2008; Weller, 2001; Youle, 2008].

La importancia de la medida de la CVP es tal, que a modo de ejemplo, el objetivo terapéutico de los planes con antirretrovirales consiste en lograr una CVP indetectable o lo más baja posible.

Los niveles de CVP detectados dependerán de la sensibilidad de la técnica utilizada para su medida y sus valores determinan en muchos casos si es necesario el inicio o no de las terapias antirretrovirales.

Según la evidencia médica actual, se recomienda iniciar el tratamiento antiretroviral (HAART) en individuos con una infección aguda sintomática (cuando los niveles de viremia superan las 30.000 copias/mL) en pacientes asintomáticos y pacientes asintomáticos con CD4 < 250 células/mm<sup>3</sup> (independientemente del nivel de carga viral) [Cairolì, 2004-2005; Pautas VIH SIDA MSP, 2006].

Se considera que un tratamiento es inicialmente exitoso si el nivel de viremia puede ser reducido a niveles por debajo de 50 copias/mL [**Palmer, 2003**].

El mantenimiento en forma sostenida de viremias residuales por debajo de este nivel, podría potencialmente generar resistencia a las HAART, por lo que es necesario conocer la dinámica de replicación viral por debajo de estos límites [**Cairolì, 2004-2005; Stevenson, 2003**].

A pesar de que se produce una inhibición importante en la actividad replicativa viral en la mayoría de los pacientes bajo HAART, es importante considerar la capacidad del VIH-1 de desarrollar resistencia a las drogas utilizadas en estos tratamientos y la persistencia de ADN proviral en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en tejido linfóide [**Baldwin, 2007**].

El nivel de ADN proviral permanece detectable y cuantificable a pesar de que los niveles de CVP estén por debajo del nivel de detección por más de 1 año en pacientes sometidos a terapias combinadas [**Christopherson, 2000; Martínez-Picado, 2000; Zhao, 2002**].

Este reservorio, que se establece rápidamente durante la fase primaria de infección, es uno de los mayores obstáculos para la erradicación del virus, aun si el tratamiento es iniciado en estadios tempranos de la infección [**Désiré, 2001**].

El nivel de ADN proviral disminuye a una tasa menor que el ARN del VIH-1 luego de las HAART, por lo que es importante la cuantificación del ADN proviral del VIH-1 y el estudio de su dinámica cuando los niveles de ARN viral plasmático están por debajo de los límites de detección. Así, la cuantificación del ADN proviral, podría ser de utilidad en el monitoreo de los pacientes o como marcador adicional para comparar la eficiencia entre diferentes tratamientos [**Désiré, 2001; Saha, 2001; Zhao, 2002**].

Es de importancia clínica disponer de ensayos que determinen el número de copias de ADN proviral o ARN del VIH-1 de forma exacta en circunstancias donde los niveles de ambos disminuyen como consecuencia de las terapias HAART [**Witt, 2000**].

La necesidad de ensayos más sensibles y reproducibles para la cuantificación de la carga viral del VIH-1 llevó a la adaptación de nuevas técnicas con un menor límite de detección (50 copias/mL) y a la comparación entre ensayos que hacen uso de diferentes tecnologías con el fin de obtener valores de CVP comparativos.

La equivalencia en las medidas de ARN permitiría una comparación más exacta de las respuestas a nuevos regímenes de terapia **[Elbeik, 2000; Ginocchio, 1999; Griffith, 1997; Nowicki, 2001; Schuurman, 1996; Shepard, 2000]**.

Existen 3 reactivos validados a nivel internacional para la determinación de carga viral: RT-PCR Amplicor HIV-1 Monitor ROCHE (test estándar y ultrasensitivo); NASBA Nuclisens Biomerieux y Branched DNA Quantiplex BAYER **[Murphy, 2000; Pautas VIH SIDA MSP, 2006; Shepard, 2000; Won, 2001]**.

El ensayo Amplicor HIV-1 MONITOR se basa en la amplificación de un fragmento no infectante del ácido nucleico del VIH-1 mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) previa Retrotranscripción (RT) **[Mulder, 1994]**.

Este ensayo tiene un límite de detección de entre 40-75.000 copias/mL **[Hözl, 2003; Won, 2001]**.

El ensayo Quantiplex cuantifica el ARN viral plasmático mediante la amplificación de la señal generada por cada molécula de ARNm viral. El límite de detección está dentro de las 50-500.000 copias/mL **[Ho, 1995; Mellors, 1996; Robin, 1994; Won, 2001]**.

El método basado en la técnica de NASBA (amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico) permite la amplificación isotérmica del ARNm viral. La sensibilidad de este método permite detectar entre 40 a 200 copias/mL **[Cairolì, 2004-2005; Weusten, 2002]**.

Existen variantes dentro de cada ensayo que mejoran el límite de detección **[Christopherson, 2000; Elbeik, 2000; Witt, 2000]**.

El ensayo que logra mayor sensibilidad en la determinación de la CVP es el basado en técnicas de Transcripción Reversa y amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa.

La detección de la CVP del VIH-1 basada en la técnica Real Time RT-PCR cuantitativa ha comenzado a implementarse recientemente **[Gibellini, 2004; Palmer, 2003]**.

Las ventajas de esta técnica, sensibilidad, rapidez, reproducibilidad, permiten niveles de detección más sensibles, menor a 50 copias/mL, llegando en algunos casos a valores de 1 copia/mL **[Gibellini, 2004; Mackay, 2002; Palmer, 2003]**.

El Proyecto en el que está enmarcada esta pasantía, denominado; “Métodos alternativos en la determinación de la carga viral: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en tiempo Real y su aplicación al diagnóstico de los infectados por el VIH-1”, consistió en la puesta a punto de la detección de la CVP del VIH-1 basado en la técnica de Real

Time RT-PCR de tipo cuantitativa con el fin de mejorar la sensibilidad en la detección de CVP y reducir los costos de los métodos comercialmente disponibles.

La primera parte del proyecto consistió en la puesta a punto de la detección de diversos amplicones mediante técnicas de PCR en tiempo final.

La segunda parte consistió en desarrollar la detección de las moléculas blanco en PCR en tiempo real. Para esto se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real y el agente intercalante fluorescente SYBRgreen-I.

La molécula SYBRgreen-I tiene la propiedad de unirse como agente intercalante únicamente a moléculas de ADN de doble hebra emitiendo una señal fluorescente proporcional al número de amplicones sintetizados durante la reacción de PCR.

En este proyecto se establecieron tres áreas de trabajo: diseño y desarrollo de un control interno del ensayo, construcción de un patrón de cuantificación y detección de la CVP en muestras de pacientes VIH-1 positivos, siendo la primera de ellas el objetivo principal de esta pasantía.

La estrategia experimental planteada fue básicamente: sintetizar el ARN de un fragmento del gen de la Gliceraldehido fosfato deshidrogenada (GAPDH): control interno, y adicionar diferentes concentraciones del mismo a muestras de plasma de individuos seronegativos.

El objetivo fue determinar la concentración mínima del fragmento (control interno) a adicionar al plasma de individuos seronegativos que fuera de fácil visualización en geles de agarosa luego de los pasos de re-extracción y RT-PCR.

De esta forma se estarían validando las técnicas de extracción de ARN, transcripción reversa y amplificación por PCR, técnicas utilizadas posteriormente en la detección de la CVP en las muestras de pacientes infectados.

Como hipótesis de trabajo planteamos que el agregado de una cantidad conocida de ARN del fragmento de la GAPDH, podría constituir una molécula adecuada como control interno de las técnicas antes mencionadas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

- Diseño de un control interno, tomando un fragmento de la GAPDH como molécula blanco de amplificación, para las técnicas de extracción de ARN, transcripción reversa y amplificación por PCR en tiempo final en muestras de pacientes VIH-1 seronegativos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Clonación y transcripción “*in vitro*” del fragmento de la GAPDH (control interno).
- Determinación de la concentración mínima de ARN de síntesis del control interno a ser adicionado a muestras de plasma VIH-1 negativo.
- Determinación del rendimiento de re-extracción del control interno de muestras de plasma VIH-1 negativo.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Obtención de muestras de plasma y medidas de bioseguridad

Se obtuvieron muestras de sangre de 5mL del banco de sangre del Servicio de Hemoterapia del Hospital del Clínicas Dr. Manuel Quintela. Las mismas eran seronegativas para: VIH-1, sífilis, hepatitis y chagas.

Las muestras fueron recolectadas en tubo estéril de tapa rosca, anticoagulando con citrato o EDTA y procesadas dentro de las 4 horas de ser extraídas. El plasma se congeló a -20°C hasta su uso. La manipulación se realizó en cámara de flujo laminar y el material fungible fue descontaminado en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, autoclavado y eliminado por cremación.

### 4.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC) fueron aisladas mediante centrifugación en gradientes de densidad utilizando Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma diagnostics).

Brevemente, la sangre heparinizada fue diluida en buffer fosfato salino (PBS) (1:1), a temperatura ambiente y depositada sobre una solución de Ficoll-Metrizoato (3:1). Seguidamente se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 min. a 800xg.

La suspensión celular (interfase con PBMC) se lavó 2 veces en PBS, y se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación a 400xg por 10 minutos.

El pellet celular fue incubado con isotiocianato de guanidinio y fenol (Tri-reagent; Sigma), y se extrajo el ARN mediante separación de fases con cloroformo, procedimiento mejorado a partir del método descrito por Chomczynski y Sacchi [Chomczynski-Sacchi, 1987; Fransen, 1998; Verhofstede, 1996;].

El ARN se precipitó a temperatura ambiente con isopropanol (1:1) y se lavó con etanol 75%. El precipitado se resuspendió en 50-100 µL de agua nano pure y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 4.3. RT-PCR con primers específicos para el fragmento de 600pb de la GAPDH (control interno)

Se realizó la transcripción reversa (RT) del ARN extraído utilizando random hexámeros.

El ARN extraído y los random hexámeros fueron incubados a 70°C por 5min (desnaturalizando), estabilizando la reacción a -20°C por 2min. Se adicionó buffer de reacción 1X; DTT 10mM y dNTPs 10mM. Se incubó a 25°C por 5 min añadiendo finalmente 200U de la enzima M-MuLV RT con actividad ribonucleasa H específica (200U/μL; Fermentas). Luego de 10min a 25°C, la mezcla de reacción fue incubada a 42°C por 60 min., a 70°C por 10min y detenida a 4°C. El ADNc obtenido fue almacenado a 4°C hasta su uso. La reacción fue realizada en el termociclador Omn-E Termal Cycler - Hybaid PCR (Hybaid Limited).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 50μL, siendo el mix de reacción: buffer 10X (Fermentas), CIMg<sub>2</sub> (50mM), dNTPs (10mM), Taq DNA polimerasa recombinante (Fermentas) y primers específicos para la GAPDH (20pmol/μL). Los primers empleados amplifican una región altamente conservada de 600 pb del gen de la enzima constitutiva GAPDH. El primer reverse se ubica en la posición 4473-4453pb y el forward en la posición 3361-3383pb. Los primers se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Primers específicos para el fragmento de 600pb de la GAPDH

Reverse	5' -CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG- 3'
Forward	5'-CTG AGA ACG GGA AGC TTG TC- 3'

La PCR consistió en 45 ciclos, un paso previo de 10min. a 95°C: 30 seg. a 95°C (desnaturalización), 30 seg. a 60°C (annealing) y 30 seg. a 72°C (extensión) y un último paso de 10 min. a 72°C (extensión de los templados). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Omn-E Termal Cycler - Hybaid PCR (Hybaid Limited). El producto de la PCR fue almacenado a 4°C. Se realizaron controles positivos y negativos a los efectos de controlar errores en la manipulación y posibles contaminaciones.

#### **4.4. Detección de los fragmentos amplificados: electroforesis de ácidos nucleicos**

##### **4.4.1. Electroforesis en agarosa**

Los amplicones obtenidos se migraron en geles de agarosa al 1% y 2% en buffer TAE 1X [40mM Tris-acetato, 1mM EDTA], teñidos con bromuro de etidio (2 $\mu$ L de BET por cada 50 $\mu$ L de buffer TAE 1X). P.M: ladder de 100pb (Fermentas). Condiciones de corrida electroforética; 50V, 15min, en buffer TAE 1X. Se visualizó en transiluminador.

##### **4.4.2. Electroforesis en acrilamida**

Se realizaron geles de poliacrilamida al 4 y 6% en condiciones no desnaturalizantes (buffer TBE 5X, PSA 10%, TEMED, Buffer de corrida: TBE 0.5X). Condiciones de corrida: 70V-111V, 12-14 mA. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) siendo los pasos: inmersión en solución fijadora (etanol 10% y ácido acético glacial 0.5%) por 10min. en agitador; solución de AgNO<sub>3</sub> al 0.1% durante 10min. en agitador; lavado mínimo con H<sub>2</sub>O destilada y agitación con solución reveladora (NaOH 1.25M, formaldehído 0.5%) hasta ver bandas. La reacción se detuvo con solución fijadora.

#### **4.5. Clonación del control interno en bacterias electrocompetentes**

##### **4.5.1. Purificación del control interno**

La banda correspondiente al control interno fue cortada y eluida de un gel de agarosa al 1%. La purificación de la banda se realizó con el kit GeneClean (Promega).

##### **4.5.2. Ligación del amplicón al vector de clonación pGEM-T-Easy**

El inserto amplificado y purificado se ligó al vector de clonación pGEM-T-Easy (Promega). Mix de reacción: 3 $\mu$ L del producto de PCR; 1 $\mu$ L vector pGEM-T-Easy; 5 $\mu$ L de buffer 2X de ligación rápida y 1 $\mu$ L ADN ligasa del bacteriófago T4, en un volumen final de 10 $\mu$ L. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se almacenó a -20°C hasta su

uso. El vector de clonación pGEM-T-Easy contiene dentro del sitio de clonado múltiple (SCM) una región que codifica para el  $\alpha$ -péptido de la enzima  $\beta$ -galactosidasa por lo que la ligación del inserto en el SCM produce inactivación insercional del  $\alpha$ -péptido permitiendo que los clones recombinantes sean identificados directamente por un cambio de coloración (Figura 6).

#### 4.5.3. Transformación mediante electroporación

Se transformaron bacterias electrocompetentes de la cepa XL1-blue de *E. coli* (40 $\mu$ L) mediante pulsos breves (1ms: 1380V), con el producto de ligación (1 $\mu$ L). Este procedimiento produce la apertura de microporos transitorios en las paredes bacterianas y la incorporación de las moléculas de ADN<sub>r</sub> de interés (pGEM-T-Easy-inserto) [Luque, 2002].

Las bacterias transformadas se incubaron con 1mL de LB/Amp., durante 1 hora a 37°C en agitador orbital a 150rpm. Posteriormente se plaquearon en agar LB/Amp.-X-gal (20 $\mu$ L) y 20 $\mu$ L del inductor sintético del operón lac (IPTG). Se incubaron a 37°C durante 24hs.

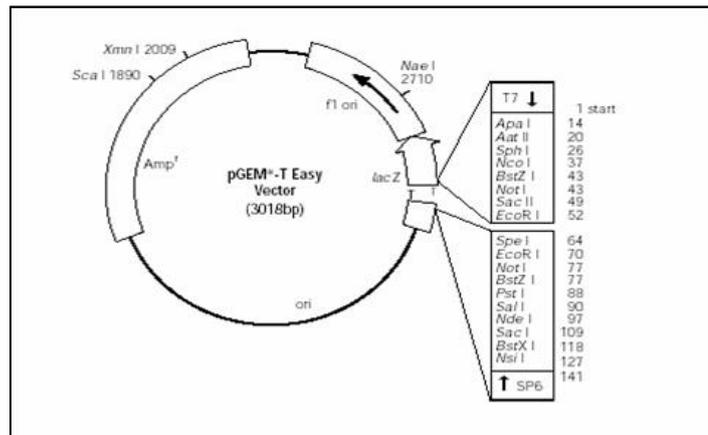


Figura 6: Vector pGEM-T Easy de 3018pb; mapa circular del vector de clonación pGEM-T Easy donde fue insertado el fragmento de 600pb de GAPDH [Promega, 1998]. Se detallan el sitio de clonado múltiple del vector, la región codificante de la  $\beta$ -lactamasa, el sitio de inicio de la transcripción de la polimerasa T7 y SP6, la región del fago f1 y varios sitios de restricción.

#### 4.5.4. Detección y selección de clones transformados

Para la detección de los transformantes se realizó una doble selección (X-gal/Amp.), mediante genes marcadores y genes de resistencia a antibióticos presentes en el vector. Se utilizó el gen marcador lacZ que codifica para la enzima de *E. coli* y el gen de resistencia a ampicilina (Amp.).

La  $\beta$ -galactosidasa transforma el sustrato sintético X-gal, que es naturalmente de color blanco, en un producto de color azul. El plásmido pGEM-T-easy codifica para la porción amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa (subunidad  $\alpha$ ) del gen lacZ. Las bacterias de la cepa XL1-blue utilizadas poseen una delección denominada lac Z  $\Delta$ M15 que consiste en la ausencia de la secuencia que codifica para la porción amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa (146aa).

Debido a que las bacterias de la cepa XL1-blue producen la subunidad  $\omega$  y son defectivas para la subunidad  $\alpha$  y el plásmido determina la subunidad funcional  $\alpha$ , el resultado de la transformación será la obtención de la  $\beta$ -galactosidasa activa con sus dos subunidades  $\alpha$  y  $\omega$ . Cuando se introduce el plásmido pGEM-T-easy en una bacteria de este tipo la  $\beta$ -galactosidasa se vuelve funcional, ya que es complementada en trans.

A este mecanismo de codificación por complementación para  $\beta$ -galactosidasa se denomina  $\alpha$ -complementación. Las bacterias lac<sup>+</sup> que resulten de la  $\alpha$ -complementación son fácilmente reconocidas porque forman colonias azules en presencia de un sustrato cromogénico como es el X-gal. Sin embargo la inserción de ADN en el sitio de policlonado del plásmido produce un fragmento amino terminal que no participa de la  $\alpha$ -complementación, de esta forma las bacterias que hayan incorporado a los plásmidos recombinantes formarán colonias blancas [Promega, 1998].

El vector pGEM-T-easy posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina. Este gen codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa que se secreta en el espacio periplásmico de la bacteria, y cataliza la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico logrando así la detoxificación de la ampicilina. Únicamente las bacterias que hayan incorporado el plásmido serán capaces de crecer en un medio con ampicilina.

De esta forma estamos seleccionando transformantes que incorporaron el plásmido (amp<sup>r</sup>) y que además tienen el inserto (colonias blancas).

#### **4.5.5. Preparación de minicultivos y minipreps**

Aquellas colonias que incorporaron el plásmido recombinante (colonias blancas) fueron incubadas en medio LB/Amp. a 37°C o.n en agitador orbital a 200rpm. Las células fueron centrifugadas durante 30 seg. a 6000xg.

El ADN plasmídico se extrajo mediante lisis alcalina (buffer Tris-Cl-EDTA con RNasa A, buffer de lisis NaOH/SDS y solución de neutralización, acetato de potasio (pH 5.5, 3M) y acético glacial). Se precipitó con etanol 100% y se resuspendió en buffer TE. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

La verificación de la presencia del inserto de la GAPDH en el vector de clonación pGEM-T easy se realizó a través de PCR, digestión enzimática y secuenciación realizadas por el Magíster Julio Da Luz.

#### **4.6. Síntesis de ARN mediante el quit T7 RiboMAX™**

##### **4.6.1. Amplificación del fragmento de la GAPDH con primers T7 y M13**

Previo a la síntesis “*in vitro*”, se realizó una PCR con un volumen final de 50µL, y 2µL de las diluciones preparadas (dil.1/100, 1/1000, 1/10000) a partir de las minipreps. Componentes; buffer 10X y taq polimerasa (Bionova), ClMg<sub>2</sub> (50mM), dNTPs (10mM), primers M13 (reverse) y T7 (forward) (20pmol/µL). La utilización de estos primers asegura la amplificación del fragmento completo de 600pb de la GAPDH, obteniéndose un amplicón de aprox. 800pb que incluye el fragmento de 600pb de interés. Se cuantificó el producto de PCR a 260nm. La conversión de D.O. a µg/mL se basó en la relación: 1 unidad de Abs.<sub>260nm</sub> = 50µg/ml. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

##### **4.6.2. Transcripción “*in vitro*”**

Se realizó la transcripción “*in vitro*” a partir del producto de PCR obtenido mediante el kit T7 RiboMAX™ (T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems) [Promega, 2001].

Se utilizaron dos volúmenes de reacción; 20 y 40µL, para 8 y 16µL de ADN molde respectivamente. El tiempo de incubación fue de 75min. a 37°C. Finalmente se le

adicionó 1U de ADNasa RQ1 (1U/ $\mu$ L) y se incubó a 37°C durante 30min. Se congeló a -20°C.

El ARN de síntesis fue purificado en tubos siliconados con fenol cloroformo isoamil saturado en TE pH 4.5; acetato de sodio 3M pH 5.2 e isopropanol y etanol 75%.

#### **4.7. Estimación de la concentración óptima de ARN de síntesis a adicionar a muestras de plasma**

La presencia e integridad del ARN de síntesis fue analizada en geles de agarosa al 1%, determinando su concentración mediante espectrofotometría.

Para estimar la concentración de ARN control a adicionar en el plasma se adicionaron diferentes concentraciones del ARN de síntesis a un volumen de 500 $\mu$ L de plasma de pacientes VIH-1 negativos, recolectadas y almacenadas a -20°C por un período de tiempo no superior a 1 mes. El procedimiento se realizó en diferentes condiciones: tubos siliconados y no siliconados, presencia y ausencia de albúmina (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L) para evitar la degradación y adsorción inespecífica del ARN en las paredes del tubo y purificación o no del ARN de síntesis previa incorporación al plasma.

Se incubaron durante 5 minutos: 500 $\mu$ L de plasma y 500 $\mu$ L de tri-reactivo para inactivar las RNasas del medio, y por último se adicionó el ARN de síntesis en presencia o ausencia de albúmina.

Se extrajo el ARN de síntesis mediante separación de fases con cloroformo, procedimiento mejorado a partir del método descrito por Chomczynski y Sacchi [Chomczynski-Sacchi, 1987; Fransen, 1998; Verhofstede, 1996;].

El ARN se precipitó a temperatura ambiente con isopropanol (1:1) y se lavó con etanol 75%. El precipitado se resuspendió en 10-20 $\mu$ L de agua nano pure y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La concentración de ARN fue cuantificada a 260nm, y se evaluó la relación 260/280. (La conversión de D.O. a  $\mu$ g/mL se basó en la siguiente relación: 1 unidad de Abs.<sub>260</sub>= 40 $\mu$ g/mL). El límite de detección del espectrofotómetro es de 1,8 a 2,0.

##### **4.7.1. RT-PCR del ARN de síntesis**

Se siguieron los mismos pasos y condiciones que en el ítem 4.3.

#### **4.8. Ensayo DNasa**

La capacidad DNasa de la DNasa RQ1 utilizada en el último paso de la transcripción *in vitro* fue evaluada mediante un ensayo DNasa. Previo al mismo se realizó una transcripción reversa con random primers y amplificación con primers específicos para el fragmento de 600pb de la GAPDH (Tabla 2) a partir del ARN de síntesis.

Se utilizó la enzima M-MuL VRT - H Minus, (M-MuL VRT pero sin actividad ribonucleasa H).

Se realizó un ensayo de DNasa incubando el producto de la RT-PCR con 1U de DNasa RQ1 (1U/ $\mu$ L) por 15min. a 37°C.

#### **4.9. Ensayo RNasa**

La presencia de ARN de síntesis fue evaluada mediante el ensayo de RNasa. Se incubó el ARN de síntesis (37 $\mu$ g) con 1 $\mu$ L de una dilución 1/100 de RNasa 1000X (20mg) a 37°C por 60min. Se realizó la cuantificación del ARN de síntesis previo y posterior al tratamiento con RNasa.

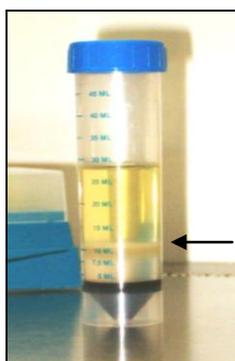
#### **4.10. Puesta a punto de la PCR utilizando SYBRgreen-I**

La PCR fue realizada en un volumen final de 50 $\mu$ L. Se siguió el protocolo especificado en el paso 4.3. Se adicionaron diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (2mM-4mM) y 1mM de SYBRgreen-I. Se utilizaron las siguientes diluciones de los plásmidos: 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000, obtenidos luego de la clonación. La visualización de los amplicones fue realizada en geles de agarosa al 1% sin BET, mediante transiluminador.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Aislamiento de PBMC. Clonación y verificación de la presencia del control interno en el vector pGEM-T Easy

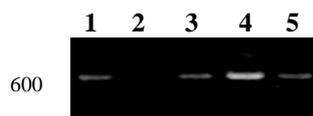
#### 5.1.1. Aislamiento de PBMC



*Figura 7:* Separación y aislamiento de PBMC. Se observan tres fases; plasma, anillo con PBMC (flecha), eritrocitos y granulocitos

**5.1.2. Verificación de la presencia del control interno en el vector de clonación pGEM-T Easy mediante PCR.** La reacción de amplificación se realizó a partir de las diluciones; 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 de las minipreps obtenidas luego de la clonación (Figura 8), utilizando primers específicos para el fragmento de 600pb de la GAPDH (Tabla 1), como se especifica en Materiales y métodos.

En la mayoría de las reacciones el control positivo (producto de 600pb de una PCR a partir de minipreps que presentaban el inserto) ofreció de peso molecular (PM).



*Figura 8:* Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: control positivo y P.M; 600pb, carril 2: control negativo, carril 3: dil. 1/100, carril 4: dil. 1/1000 y carril 5: dil. 1/10.000 de las minipreps obtenidas luego de la clonación.

La presencia del control interno fue confirmada mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación (datos no mostrados).

## 5.2. Transcripción “*in vitro*”

### 5.2.1. Amplificación del control interno con primers M13 y T7 y síntesis de ARN.

La reacción de amplificación se realizó a partir de las diluciones: 1/100 y 1/1.000 de las minipreps obtenidas luego de la clonación. Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 800pb (Figura 9), a partir del cual se realizó la transcripción *in vitro* mediante el quit T7 RiboMAX™, como se detalla en Materiales y métodos.

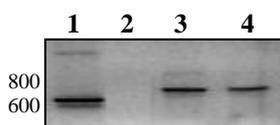


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR con primers M13 y T7. Carril 1: control positivo y P.M. de 600pb, carril 2: control negativo, carril 3: dil. 1/100 y carril 4: dil. 1/1.000 de las minipreps obtenidas luego de la clonación.

La integridad del ARN de síntesis fue analizada en geles de agarosa al 1%. Se obtuvieron productos de transcripción de 500 y 900pb aproximadamente (Figura 10). Las densidades ópticas del producto de la transcripción *in vitro* se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de ARN de síntesis

Volumen del amplicón para Transcripción <i>in vitro</i>	16μL
ARN de síntesis	
Abs.260	1.840
[ARN]μg/μL	7.36

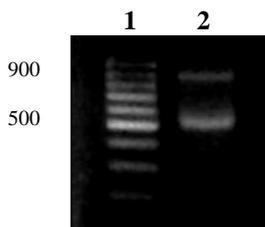


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Productos de Transcripción *in vitro* a partir de 16μL del amplicón y 2μL de DNasa RQ1. Carril 1: P.M. de 100pb, carril 2: ARN de síntesis.

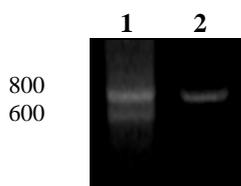
**5.2.2. Ensayo RNasa.** El ensayo de RNasa fue realizado para determinar la cantidad de ARN de síntesis producido a partir del sistema de transcripción *in vitro* (Tabla 4).

Tabla 4: Medida de absorbancia del ARN de síntesis con RNasa

Muestras	Abs. 260	Conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )*
ARN de síntesis (pre-tratamiento c/RNasa)	1.840	7.36
ARN de síntesis (post-tratamiento c/RNasa)	1.796	7.184

\* La conversión de D.O. a  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para el ADN se basó en la relación: 1 unidad de Abs.<sub>260</sub> = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y para el ARN en la relación: 1 unidad de Abs.<sub>260</sub> = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

**5.2.3. Ensayo DNasa.** El ensayo de DNasa fue realizado para evaluar la capacidad DNasa de la DNasa RQ1 utilizada en el último paso de la transcripción *in vitro*. En la Figura 11 se observa el producto de la RT-PCR en ausencia y presencia de DNasa RQ1. En ausencia DNasa RQ1 se observan dos bandas: ADN del control interno a 600pb y ARN de síntesis a 800pb. En presencia de DNasa RQ1, se observa únicamente la banda correspondiente al ARN de síntesis de aproximadamente 800pb.



*Figura 11:* Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: producto de RT-PCR con la enzima M-MuLV RT - H Minus sin tratamiento con DNasa RQ1, carril 2: producto de RT-PCR con la enzima M-MuLV RT - H Minus tratado con 1 $\mu\text{L}$  de DNasa RQ1.

### 5.3. Rendimiento de re-extracción del ARN de síntesis sobre muestras de plasma VIH-1 negativo

Se adicionaron concentraciones diferentes de ARN de síntesis al plasma de individuos VIH-1 negativos y se determinó el rendimiento de re-extracción. El proceso fue realizado en tubos no siliconados (TNS) y en ausencia de albúmina (AA) (Tabla 5).

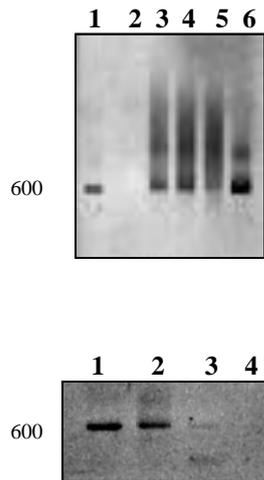
Tabla 5: Determinación del rendimiento de re-extracción a partir de dos concentraciones de ARN de síntesis diferentes

	Tratamiento con 1 $\mu$ L de DNasa	Tratamiento con 2 $\mu$ L de DNasa
[ARN de síntesis] $\mu$ g/ $\mu$ L	8.664	7.36
[ARN de síntesis] $\mu$ g adicionado a 500 $\mu$ L de plasma VIH-1 negativo	64	110.4
Condiciones de Re-extracción	TNS AA	TNS AA
[ARN de re-extracción] $\mu$ g/ $\mu$ L	0.172	0.048
[ARN de re-extracción] $\mu$ g en 20 $\mu$ L	3.44	0.96
Rendimiento (%)	~ 5,4	~ 0.86

TNS: tubos no siliconados; AA: ausencia de albúmina

Las reacciones de RT-PCR (con random primers y primers específicos para el fragmento de 600pb de la GAPDH), realizadas a partir de las concentraciones detalladas en la Tabla 5, no evidenciaron ninguna banda a nivel de los 600pb en geles de agarosa, si se observó una banda tenue a ese nivel en geles de acrilamida (datos no mostrados).

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de la re-extracción, las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en tubos siliconados y en presencia de albúmina. La cantidad de ARN de síntesis de partida fue de 109.5 $\mu$ g. Se omitieron los pasos de cuantificación del ARN de re-extracción con el fin de evitar la pérdida del material durante el procedimiento. Bajo estas condiciones se pudo evidenciar una banda a nivel del control en geles de agarosa (Figuras 12 a. y 12 b.).

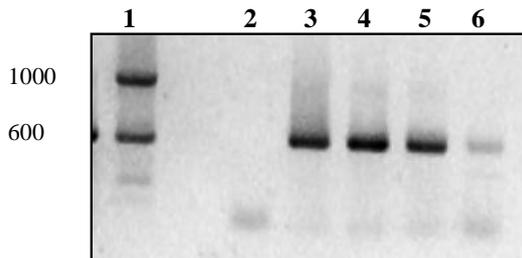


*Figura 12:* a. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: P.M. 600pb, carril 2: control negativo, carril 3, 4 y 5 con 3, 5 y 10 $\mu$ L de ADNc utilizado para la PCR y carril 6: control positivo (dilución plasmídica 1/1.000 con el control interno).

b. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: P.M. de 600pb, carril 2: 1 $\mu$ L de ADNc, carril 3: 1 $\mu$ L de una dil. 1/10 de ADNc utilizados para la PCR, carril 4: control negativo.

#### 5.4. Puesta a punto de la PCR utilizando SYBR green-I

Se observan bandas amplificadas del control interno en geles de agarosa al 1%. Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración 4mM de MgCl<sub>2</sub> y 1mM de SYBRgreen-I (Figura 13). Con concentraciones menores de MgCl<sub>2</sub> (2mM), se obtuvieron bandas poco definidas.



*Figura 13:* Electroforesis en agarosa al 1%. Productos de PCR a partir de diluciones de plásmidos con 4mM de MgCl<sub>2</sub> y 1mM de SYBRgreen-I. Carril 1: P.M. 600pb y 1.000pb, carril 2: control negativo, carril 3: 4  $\mu$ l de dil. 1/10, carril 4: 4  $\mu$ l de dil. 1/100, carril 5: 2  $\mu$ l de dil. 1/1.000, carril 6: 2  $\mu$ l de dil. 1/10.000. Siendo: 1/10, 1/100, 1/10.000 diluciones a partir de las minipreps obtenidas luego de la clonación.

## 6. DISCUSION

La utilización de controles internos en las técnicas de biología molecular es importante para determinar contaminación, errores en la manipulación, funcionamiento incorrecto de los reactivos o equipos, siendo el principal objetivo, evitar informar falsos positivos o negativos durante el ensayo.

Tanto la  $\beta$ -actina como la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) son enzimas constitutivas y se utilizan como controles internos en la evaluación de la eficiencia de diferentes técnicas y en el control de la calidad del material de partida [**Hermankova, 2003; Lewin, 1999; Ponchel, 2003; Resino, 2006; Saksela, 1994**].

La mayoría de los ensayos diagnósticos basados en técnicas de RT-PCR omiten los controles internos específicos de reacción que se utilizan para monitorear la extracción, la RT-PCR y los pasos de detección.

La producción de controles de ARN estables y resistentes a RNasas es técnicamente difícil. La principal estrategia para solucionar estos problemas propone la producción de un control exógeno que es adicionado a la muestra antes de la extracción del ácido nucleico [**Villanova, 2007**].

El objetivo de este trabajo fue el diseño del control interno de las técnicas de extracción de ARN, transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa utilizando un fragmento de 600pb del gen que codifica para la enzima GAPDH.

El diseño consistió en la obtención de un fragmento de ARN de la GAPDH de 600pb, RT-PCR y clonación del fragmento en el vector pGEM-T Easy. Una vez clonado se realizó la síntesis “*in vitro*” del fragmento mediante el quit T7 RiboMAX™. Se determinó la concentración mínima del ARN de síntesis a adicionar en plasma de individuos VIH-1 negativos capaz de ser detectada mediante electroforesis luego de las técnicas de re-extracción y RT-PCR.

Una vez puesto a punto en muestras de pacientes VIH-1 negativos, dicho control sería utilizado como control interno en la cuantificación del VIH-1 en muestras de pacientes VIH-1 seropositivos, objetivo que excedía a esta pasantía.

### **6.1. Clonación y verificación del control interno en el vector pGEM-T Easy**

Se logró la clonación del fragmento de 600 pb de la GAPDH (control interno) en el vector de clonación pGEM-T Easy (Figura 8) y se realizaron diluciones: 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 de las minipreps obtenidas.

### **6.2. Transcripción “in vitro”: Síntesis del ARN del control interno mediante el quit T7 RiboMAX™**

La síntesis “*in vitro*” fue realizada con el quit T7 RiboMAX™, este quit optimiza no solo el tiempo de síntesis de ARN sino también la cantidad de producto obtenido.

Previo a la síntesis “*in vitro*” se realizó una amplificación del fragmento de la GAPDH clonado en el vector pGEM-T Easy con los primers universales pUC/M13 y T7 para asegurar la transcripción del fragmento completo.

Teniendo en cuenta el tamaño del molde de ADN (~800pb) a partir del cual fue realizada la transcripción “*in vitro*”, se esperaba obtener un único producto de ARN de síntesis de aproximadamente el mismo tamaño.

Sin embargo, en todos los ensayos realizados se obtuvieron dos productos, uno a nivel del ARN de síntesis de ~ 800pb-900pb, y otro fragmento a nivel de los 500pb (Figura 10). Este último podría corresponderse a productos de rondas de transcripción abortivas o productos que hayan adoptado una conformación diferencial durante la corrida electroforética.

### **6.3. Evaluación enzimática: Ensayo RNasa y ensayo DNasa**

El ensayo de RNasa fue realizado para verificar la presencia de ARN luego de la transcripción *in vitro* (Figura 10).

La absorbancia del ARN antes (1.840) y después del tratamiento (1.796) con RNasa fue similar.

La reducción poco significativa de la absorbancia observada (Tabla 4: de 7,36  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a 7,184  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) hace suponer que la mayoría del material presente en el tubo de reacción era: ADN molde y/o nucleótidos libres (deoxinucleótidos y/o ribonucleótidos) en exceso que por su efecto hipercrómico produjeron un aumento de absorbancia de 0,4

(ADN: Producto de PCR con primers M13 y T7; datos no mostrados) a 1,840 (ARN de síntesis: pre-tratamiento c/RNasa).

El ensayo de la DNasa indica que la actividad de la enzima está intacta (Figura 11), por otra parte los valores de absorbancia reportados luego de la síntesis *in vitro*, son bastante mayores que los del ADN molde adicionado (0,4), indicando de esta forma otra fuente de absorbancia en nuestra solución. Como dijimos anteriormente, esta fuente puede ser un exceso de nucleótidos libres.

Si bien la DNasa RQ1 no perdió actividad, podemos pensar que la concentración de RQ1 DNasa (1U o 2U) no fue suficiente para degradar el molde de ADN (16 y 32 $\mu$ g) ya que el quit recomienda utilizar 1U de RQ1 DNasa por  $\mu$ g de ADN molde.

En trabajos anteriores, donde utilizan el mismo quit T7 RiboMAX™ para la transcripción *in vitro* no solo utilizan un exceso de la enzima, 5U de RNase-free DNase, sino que además purifican el ARN de síntesis y lo almacenan a -80°C (Palmer, 2003).

Es probable entonces, que hayamos sobreestimado la concentración del ARN de síntesis de partida.

Con respecto a la concentración de molde para la reacción, el quit T7 RiboMAX™ recomienda un máximo de 1 $\mu$ g y un volumen de 8 $\mu$ L de ADN linear.

En los ensayos que realizamos, adicionamos 8 y 16 $\mu$ L de ADN linear (~2 $\mu$ g/ $\mu$ L) por reacción por lo que estaríamos agregando un exceso de molde (16 y 32 $\mu$ g de ADN molde), pudiendo de esta forma inhibir la reacción de transcripción *in vitro* por un exceso de material de partida.

#### **6.4. Rendimiento de re-extracción del ARN de síntesis sobre muestras de plasma VIH-1 negativo**

Los ensayos de re-extracción en plasma se realizaron a partir de concentraciones ARN de síntesis y condiciones de re-extracción diferentes.

El rendimiento de re-extracción de ARN en los ensayos realizados en tubos no siliconados y en ausencia de albúmina de suero bovino acetilada (Tabla 5), fue relativamente bajo y no se logró amplificación por RT-PCR y visualización del control mediante geles de agarosa, obteniéndose una banda tenue en geles de acrilamida (datos no mostrados).

Por el contrario, los ensayos realizados en tubos siliconados y en presencia de albúmina de suero bovino acetilada (Figuras 12 a. y 12 b.) permitieron la visualización del control en geles de agarosa al 1%. En estos ensayos se omitieron los pasos de purificación para evitar la pérdida del ácido ribonucleico durante la manipulación y por adherencia a las paredes del tubo de reacción.

Obtuvimos resultados negativos al adicionar 20 y 100 veces menos (5 y 1 $\mu$ g) de ARN de síntesis.

No se detectaron bandas del control interno en geles de agarosa al 1% pero se pudo observar una banda tenue a nivel de los 600pb en geles de acrilamida (datos no mostrados).

Podemos indicar así, que las condiciones de re-extracción fueron determinantes para el ensayo de amplificación por RT-PCR.

La baja concentración de ARN de síntesis, la eventual degradación del ARN en el plasma y pérdida del material a través de interacciones inespecíficas con las paredes del tubo pudieron haber influido en el bajo rendimiento de re-extracción obtenido.

Existen otros factores a considerar como el aumento del tiempo de incubación para la transcripción *in vitro*, la omisión de los pasos de purificación, ya sea del ADN molde, del ARN de síntesis y del ARN de re-extracción y la inestabilidad térmica del quit T7 RiboMAX™, entre otros.

### **6.5. Puesta a punto de la PCR utilizando SYBR green-I**

Se logró amplificar el control en agarosa 1%, visualizándose bandas bien definidas cuando adicionamos una concentración 4mM de MgCl<sub>2</sub> y 1mM de SYBRgreen-I (Figura 13). Con concentraciones menores de MgCl<sub>2</sub> (2mM), se veían bandas poco definidas.

## 7. CONCLUSIONES

Pudimos amplificar la banda representativa del control interno cuando adicionamos 109,55µg de ARN de síntesis al plasma de pacientes VIH-1 seronegativos.

Con la adición de concentraciones inferiores a ésta (aproximadamente 100 y 20) obtuvimos una banda muy tenue, visible únicamente en geles de acrilamida.

Estos ensayos nos permiten concluir que la cantidad de ARN mínima visible en geles de agarosa debería ser mayor a 100µg, ya que la gran mayoría se pierde y degrada durante la manipulación.

La falta de reproducibilidad de los ensayos al adicionar concentraciones inferiores de ARN o cuando las condiciones de extracción no eran las óptimas, nos indican una vez más la importancia en la rigurosidad de la manipulación cuando trabajamos en procesos que involucran ARN y de la importancia del uso de reactivos que aseguren la estabilidad de ácido ribonucleico, como el uso de agua destilada desionizada, libre de ribonucleasas y tratada con 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato y DEPC que inactiva las ribonucleasas por modificación covalente.

Posiblemente el haber almacenado el ARN a -20°C y no a -80°C como se establece en los trabajos de Gibellini, 2004 y Palmer, 2003 influyó también en la inestabilidad del mismo, siendo determinante a la hora de obtener resultados.

La adición de SYBRgreen-I en la reacción de PCR no interfirió con la amplificación, pudiéndose detectar los amplicones en geles de agarosa.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.,** A. Lichtman, J. Pober. 2000. *Inmunología Celular y Molecular*. 4<sup>a</sup> Edición. Editorial W. B. Saunders Company. McGraw-Hill Interamericana.
- Ayouba, A.,** C. Cannou, M-T. Nugeyre, F. Barré-Sinoussi, and E. Menu. 2008. Distinct efficacy of HIV-1 entry inhibitors to prevent cell-to-cell transfer of R5 and X4 viruses across a human placental trophoblast barrier in a reconstitution model *in vitro*. *Retrovirology*. 5:31
- Baldwin, C.,** B. Berkhout. 2007. HIV-1 drug-resistance and drug-dependence. *Retrovirology*. 4: 78.
- Barre-Sinoussi, F.** et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-871.
- Binley, J.M.,** S. Ngo-Abdalla, P. Moore, M. Bobardt, U. Chatterji, P. Gallay, D. R. Burton, I. A. Wilson, J. H. Elder and A. de Parseval. 2006. Inhibition of HIV Env binding to cellular receptors by monoclonal antibody 2GI2 as probed by Fc-tagged gp 120. *Retrovirology*. 3:39.
- By Lijun Wu, W. A.** Paxton, N. Kassam, N. Ruffing, J. B. Rottman, N. Sullivan, H. Choe, J. Sodroski, W. Newman, R. A. Koup and C. R. Mackay. 1997. CCR5 Levels and Expression Pattern Correlate with Infectability by Macrophage-tropic HIV-1, *In Vitro. J. Exp. Med.* Vol. 185, N° 9; 1681–1691.
- Cairolì, E.** 2004-2005. Métodos alternativos en la determinación de la carga viral: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real y su aplicación al diagnóstico de los infectados por el VIH. Programa de Apoyo y Vinculación con el Sector Productivo. Proyecto de Vinculación de Iniciativa Universitaria. Universidad de la República Comisión Sectorial de Investigación Científica (C.S.I.C).
- Cayota, A.,** F. Vuillier, D. Scott-Algara and G. Digiero. 1990. Preferential replication of HIV-1 in memory CD4<sup>+</sup> subpopulation. *The Lancet*. Vol. 336. N°. 8720.
- Cayota, A., Cairolì, E.** 2004. *Inmunopatogenia y fisiopatología de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-SIDA)*. Temas de Inmunopatología. Oficina del Libro, FEFMUR. Segunda edición.

- Chinnadurai, R.,** D. Rajan, J. Munich, and F. Kirchhoff. 2007. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Resistant to First- and Second-Version Fusion Inhibitors and Cytopathic in Ex Vivo Human Lymphoid Tissue ▽. *J. Virol.* 81(12): 6563-6572.
- Chomczynski, P.,** N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* Vol.162. N°1. Pages: 156-159.
- Christopherson, C.,** Y. Kidane, B. Conway, J. Krowka, H. Sheppard, and S. Kwok. Feb. 2000. PCR-Based Assay To Quantify Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 38, N°2, p.: 630-634.
- Chun, Tae-Wook,** D. Nickle, S. Justement, D. Large, A. Semerjian, M. Curlin, A. O'Shea, C. Hallahan, M. Daucher, D. Ward, S. Moir, J. Mullins, C. Kovacs, and A. Fauci. November 2005. HIV- infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol. 115, N°11, p. 3250-3255.
- Coffin, J.** 1995. HIV Population Dynamics in Vivo: Implications for Genetic Variation, Pathogenesis, and Therapy. *Science.* 267: 483-489.
- Collins, M.,** B. Irvine, D. Tyner, E. Fine, C. Zayati, Chu-an Chang, T. Horn, D. Ahle, J. Detmer, Lu-Ping Shen, J. Kolberg, S. Bushnell, M. S. Urdea, and D.D. Ho.1997. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/mL *Nucleic Acids Research.* Vol. 25. N° 15: 2979-2984.
- Demeter, L.,** R. Bosch, R. W. Coombs, S. Fiscus, J. Bremer, V. A. Johnson, A. Erice, J. B. Jackson, S.A. Spector, K. M. Squires, M. A. Fischl, M. D. Hughes y S.M. Hammer. Junio 2002. Detection of Replication-Competent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Cultures from Patients with Levels of HIV-1 RNA in Plasma Suppressed to Less Than 500 or 50 Copies Per Milliliter. *J.Clin.Microbiol.* p. 2089-2094.
- Désiré, N.,** A. Dehée, V. Schneider, C. Jacomet, C. Goujon, P-M. Girerd, W. Rozenbaum, and J-C. Nicolas. Apr. 2001. Quantification of Human

Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay. *J.Clin.Microbiol.* p. 1303-1310.

- Dybul, M.,** T-W. Chun, C. Yoder, B. Hidalgo, M. Belson, K. Hertogs, B. Larder, R. Dewar, C. Fox, C. Hallahan, S. Justement, S. Migueles, J. Metcalf, R. Davey, M. Daucher, P. Pandya, M. Baseler, D. Ward and A. Fauci. Dec. 2001. Short-cycle structured intermittent treatment of chronic HIV infection with highly active antiretroviral therapy: Effects on virologic, immunologic, and toxicity parameters. *PNAS.* Vol. 98. No.26. p. 15161-151166.
- Elbeik, T.,** E. Charlebois, P. Nassos, J. Kahn, F. Hecht, D. Yajko, V. Ng, and K. Hadley. Mar. 2000. Quantitative and Cost Comparison of Ultrasensitive Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Viral Load Assay: Bayer bDNA Quantiplex Versions 3.0 and 2.0 and Roche PCR Amplicor Monitor Version 1.5. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 38, N° 3, p.: 1113-1120.
- Facal, J.** 2003. VIH: aspectos fisiopatológicos en: Savio, E., F. Grill, J. Facal, Actualizaciones en Infectología. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Editorial Arena. Cap. 21. p. 161-169.
- Fauci, A.** Julio 2003. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature Medicine.* Vol. 9. N°. 7: 839-843.
- Flint, S.,** L. Enquist, V. Racaniello, A. Skalka, 2004. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. 2<sup>a</sup> Edición. Editorial ASM Press, American Society for Microbiology. Cap. 17; "Human Immunodeficiency Virus Pathogenesis".
- Fransen, K.,** D. Mortier, L. Heyndrickx, C. Verhofstede, W. Janssens, G. van der Groen. Julio 1998. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of seven different methods for extraction (part two). *J. of Virol. Meth.* 76: 153-157.
- Furtado, M.,** L. Kingsley, and S. Wolinsky. Apr. 1995. Changes in the Viral mRNA Expression Pattern Correlate with a Rapid Rate of CD4+ T-Cell Number Decline in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals. *Journal of Virology.* Vol. 69, N°. 4, p.: 2092-2100.
- Gatell Artigas, J. M.,** J.M. Miro Meda y F. Graus Riba. 1997. Infecciones por retrovirus humanos: SIDA en Farreras Rozman. *Medicina Interna.* Edición en CD-ROM. Decimotercera edición. Sección 17; Enfermedades Infecciosas. Parte VIII; Enfermedades producidas por virus, p.: 2530-2541.

- Gibellini, D.,** F. Vitone, E. Gori, M. La Placa, M.C. Re. 2004. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV1 seropositive patients. *J. of Virol. Meth.* 115: 183-189.
- Ginocchio, C.,** S. Tetali, D. Washburn, F. Zhang, and M. Kaplan. Apr. 1999. Comparison of Levels of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma as Measured by the NucliSens Nucleic Acid Sequence-Based Amplification and Quantiplex Branched-DNA Assays. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 37, N° 4, p.: 1210-1212.
- Goulder, P.J.R.,** M. A. Altfeld, E. S. Rosenberg, T. Nguyen, Y. Tang, R. L. Eldridge, M.M. Addo, S. He, J.S. Muckerjee, M.N. Phillips, M. Bunce, S. A. Kalams, R. P. Sekaly, B.D. Walker, and C. Brander. 2001. Substantial Differences in Specificity of HIV-specific Cytotoxic T Cells in Acute and Chronic HIV Infection. *J. Exp. Med.* Vol. 193. N° 2: 181-193.
- Griffith, B.,** M. Rigsby, R. Garner, M. Gordon, and T. Chacko. Dec. 1997. Comparison of the Amplicor HIV-1 Monitor Test and the Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus RNA in Plasma, Serum, and Plasma Subjected to Freeze-Thaw Cycles. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 35, N° 12, p.: 3288-3291.
- Haddad, A.,** Reyes\_Terán, G., et al. 2003. HIV Medicine. Adaptado de [www.hivmedicine.com](http://www.hivmedicine.com) Hoffmann-Kamps.
- Hatse, S.,** D. Huskens, K. Princen, K. Vermeire, G. J. Bridger, E. De Clercq, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz and D. Schols. 2007. Modest Human Immunodeficiency Virus Coreceptor Function of CXCR3 Is Strongly Enhanced by Mimicking the CXCR4 Ligand Binding Pocket in the CXCR3 Receptor. *Journal of Virology.* Vol. 81, N° 47; p. 3632-3639.
- Hermankova, M.,** J. Siliciano, Y. Zhou, D. Monie, K. Chadwick, J. Margolic, T. Quinn, and R. Siliciano. July 2003. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression in Latently Infected Resting CD4+ T Lymphocytes In Vivo. *Journal of Virology.* Vol. 77, N°13, p. 7383-7392.
- Ho, D.,** A. Neumann, A. Perelson, W. Chen, J. Leonard and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-126.

- Hözl, G., M. Stöcher, V. Leeb, H. Stekel, and J. Berg.** Mar. 2003. Entirely Automated Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA in Plasma by Using the Ultrasensitive COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Test and RNA Purification on the MagNA Pure LC Instrument. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 41. Nº 3. p.: 1248-1251.
- Ibarra, C.,** 2001. Factores inmunitarios protectivos del huésped contra la infección por el VIH-1 y la progresión a SIDA: quimiocinas y sus receptores. Tesis doctoral.
- Ito, Y., J-C., Grivel, and L. Margolis.** May 2003. Real -Time PCR of Individual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants in Coinfected Human Lymphoid Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.41, Nº 5, p. 2126-2131.
- Iwatani, Y., S. K. Song, L. Wang, J. Planas, H. Sakai, A. Ishimoto, and M. W. Cloyd.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu modifies viral cytopathic effect through augmented virus release. *Journal of General Virology*. 78, 841-846.
- Klein, S., S. Karsten, B. Rüter, C. Klebba, M. Pape, O. Ottmann, D. Hoelzer, W. Roth.** 2003. Comparison of TaqMan™ real-time PCR and p24 Elisa for quantification of in vitro HIV-1 replication. *Journal of Virological Methods*. Vol. 107, p.: 169-175.
- Kovacs, J. A., R. A. Lempicki, I. A. Sidorov, J. W. Adelsberger, I. Sereti, W. Sachau, G. Kelly, J. A. Metcalf, R. T. Davey, Jr., J. Falloon, M. A. Polis, J. Tavel, Randy Stevens, L. Lambert, D. A. Hosack, M. Bosche, H. J. Issaq, S. D. Fox, S. Leitman, M. W. Baseler, H. Masur, M. Di Mascio, D. S. Dimitrov, and H. Clifford Lane.** 2005. *J Clin. Invest.* 115(8): 2139-2148.
- Levy, J.A. Hoffman, A.D., Kramer, S.M, Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., Oshiro, L.S.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 225 (4664): 840-2
- Lewin, S., M. Vesanen, L. Kostrikis, A. Hurley, M. Duran, L. Zhang, D.Ho and M. Markowitz.** July 1999. Use of Real-Time PCR and Molecular Beacons To Detect Virus Replication in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals on Prolonged Effective Antiretroviral Therapy. *American Society for Microbiology*. Vol. 73, No. 7. p. 6099-6103.

- Lewinski, M. K.,** D. Bisgrove, P. Shinn, H. Chen, C. Hoffmann, S. Hannehalli, E. Verdin, C. C. Berry, J. R. Ecker and F. D. Bushman. 2005. Genome-Wide Analysis of Chromosomal Features Repressing Human Immunodeficiency Virus Transcription. *J. Virol.* 79(11): 6610-6619.
- Luque, J.,** A. Herráez. 2002. *Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud.* Editorial Gráficas Marte, S.A. Elsevier Science. Cap.16. p.211-212.
- Mackay, I.,** K. Arden A. Nitsche. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research.* Vol. 30, No.6: 1292-1305.
- Martinez-Picado J.,** M.P. DePasquale, N. Kartsonis, G.J. Hanna, J. Wong, D. Finzi, E. Rosenberg, H.F. Günthard, L. Sutton, A. Savara, C.J. Petropoulos, N. Hellmann, B.D. Walker, D.D. Richman, R. Siliciano, and R.T. D'Aquila. 2000. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *PNAS.* Vol. 97. N°20: 10948-10953.
- Mellors, J. C.** Rinaldo, P. Gupta, R. White, J. Todd, L. Kingsley. 1996. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* 272: 1167-1170.
- Mulder, J.,** N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield and S. Kwok. Feb.2004. Rapid and Simple PCR Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma: Application to Acute Retroviral Infection. *J.Clin.Microbiol.* 32: 292-300.
- Murphy, D. G., C., L. Côté,** M. Fauvel, P. René, and J. Vincelette. 2000. Multicenter Comparison of Roche COBAS AMPLICOR MONITOR Version 1.5, Organon Teknika NucliSens QT with Extractor, and Bayer Quantiplex Version 3.0 for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J. of Clinical Microbiology,* p.4034-4041, Vol. 38. N°. 11
- Molina, J.** 2003. Fármacos antirretrovirales en: Savio, E., F. Grill, J. Facal, Actualizaciones en Infectología. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Editorial Arena. Cap. 24. p. 195-214.
- Natarajan, V.,** R.A.Lempicki, I. Sereti, Y. Badralmaa, J.W. Adelsberger, J.A. Metcalf, D.A. Prieto, R. Stevens, M.W. Baseler, J.A. Kovacs, H.C. Lane. 2002. Increased peripheral expansion of naive CD4+ T cells in vivo after IL-2 treatment of patients with HIV infection. [Proc Natl Acad Sci U S A.](#) 6; 99(16):10712-7.

- Nelson, L. Michael, A.H. Steven, S. Kwok, K. Dreyer, J. Wang, C. Christopherson, J. P. Spadoro, K. K. Y. Young, V. Polonis, F. E. McCutchan, J. Carr, J. R. Mascola, L. L. Jagodzinski and M. L. Robb.** Mayo.1999. Development of Calibrated Viral Load Standards for Group M Subtypes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Performance of an Improved AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test with Isolates of Diverse Subtypes. *J.Clin.Microbiol.* 37: 2557-2563.
- Nora, T., F. Bouchonnet, B. Labrosse, C. Charpentier, F. Mammano, F. Clavel, and A.J. Hance.** 2008. Functional diversity of HIV-1 envelope proteins expressed by contemporaneous plasma viruses. *Retrovirology.* 5:23.
- Nowicki, M., L. Benning, J. Bremer, W. Meyer III, C. Hanson, D. Brambilla, S. Silver, A. Kovacs, and The Women's Interagency HIV-1 Study Collaborative Study Group.** Oct. 2001. Longitudinal Variability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Viral Load Measurements by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification and NucliSens Assays in a Large Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol. 39, N° 10, p.: 3760-3763.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, AS. Fauci.** 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328: 327-35.
- Palmer, S., M. Kearney, F. Maldarelli, E. Halvas, C. Bixby, H. Bazmi, D. Rock, J. Falloon, R. Davey, Jr., R. Dewar, J. Metcalf, S. Hammer, J. Mellors, and J. Coffin.** Jan. 2005. Multiple, Linked Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations in Treatment- Experienced Patients Are Missed by Standard Genotype Analysis. *American Society for Microbiology.* Vol. 43, N°1, p. 406-413.
- Palmer, S., A.P. Wiegand, F. Maldarelli, H. Bazmi, J.M. Mican, M. Polis, R.L. Dejar, A. Planta, S. Liu, J.A. Metcalf, J.W. Mellors, and J. Coffin.** Oct.2003. New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J.Clin.Microbiol.* 41:4531-4536.
- Pastore, C., R. Nedellec, A. Ramos, O. Hartley, J. L. Miamidian, J. D. Reeves, and D. E. Mosier.** 2007. *J. Virol.* 81(15): 8165-8179.

- Pautas VIH SIDA MSP.** Infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-SIDA). Guías para diagnóstico, tratamiento antiretroviral y monitorización adultos y embarazadas. Organización Panamericana de la Salud. Ministerio de Salud Pública. Programa Prioritario ITS-SIDA. Centro Internacional de Cooperación Técnica en VIH y SIDA. Uruguay 2006.
- Plantier, J-C.,** M. Gueudin, F. de Oliveira, F. Damond, V. Lemée, F. Brun-Vézinet, and F. Simon. Dec. 2004. Rapid Discrimination between Human Immunodeficiency Virus Type 2 Groups A and B by Real-Time PCR. American Society for Microbiology. p. 5866-5870.
- Popovic, M.,** Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science. 224 (4648): 497-500.
- Programa Nacional VIH-SIDA.** Situación epidemiológica del VIH-SIDA en el Uruguay. Unidad de Vigilancia Epidemiológica Sector VIH-SIDA. Ministerio de Salud Pública, Uruguay. 30 de abril de 2005.
- Promega Corporation.** 1998. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems. Technical Manual N°. 042. [www.promega.com](http://www.promega.com).
- Promega Corporation.** 2001. T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express Large Scale RNA production Systems. Technical Bulletin N°. 298. [www.promega.com](http://www.promega.com).
- Resino, S.,** E. Seoane, A. Pérez, E. Ruiz-Mateos, M. Leal and M. Muñoz-Fernández. July 2006. Different profiles of immune reconstitution in children and adults with HIV-infection alter highly active antiretroviral therapy. BMC Infectious Diseases. 6: 112.
- Rius, C.,** G. Binefa, y J. Casabena. 2004. Epidemiología de la Infección por el VIH/sida y su relación con otras infecciones de transmisión sexual. Perspectivas de futuro. Formación Médica Continuada. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2004; 22(7): 419-29.
- Robin, L. D.,** H.C. Highbarger, M.D.Sarmiento, J.A.Todd, M.B. Vasudevachari, R. T. Davey, Jr., J.A. Kovacs, N. P. Salzman, H.Clifford Lane, and M. S. Urdea. Marzo1994. Application of Branched DNA Signal Amplification to Monitor Human Immunodeficiency Virus Type 1 Burden in Human Plasma. The J. of Infectious Diseases. 170:1172-9.

- Rucker, J.,** A. Edinger, M. Sharron, M. Samson, B. Lee, J. F. Berson, Y. Yi, B. Margulies, R. G. Collman, B. J. Doranz, M. Parmentier and R. W. Doms. 1997. Utilization of Chemokine Receptors, Orphan Receptors, and Herpesvirus-Encoded Receptors by Diverse Human and Simian Immunodeficiency Viruses. *Journal of Virology*. Vol. 71, No. 12; p. 8999–9007.
- Saha, B.,** B. Tian, P. Bucy. 2001. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe. *Journal of Virological Methods*. 93. p.: 33-42.
- Saksela, K.,** C. Stevens, P. Rubinstein, and D. Baltimore. February 1994. Human immunodeficiency virus type 1 mRNA expression in peripheral blood cells predicts disease progression independently of the numbers of CD4+ lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Medical Sciences*. Vol. 91, pp. 1104-1108.
- Shepard, R.,** J. Schock,, K. Robertson, D. Shugars, J. Dyer, P. Vernazza, C. Hall, M. Cohen, and S. Fiscus. Apr. 2000. Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Different Biological Compartments. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38, N°4, p.: 1414-1418.
- Schuurman, R.,** D. Descamps, G. Weverling, S. Kaye, J. Tijnagel, I. Williams, R. VAN Leeuwen, R. Tedder, C. Boucher, F. Brun-Vezinet, and C. Loveday. Dec. 1996. Multicenter Comparison of Three Commercial Methods for Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 34, N°12, p.: 3016-3022.
- Stevenson, M.** 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*. Vol. 9. N° 7: 853-860.
- Streicher, H.** et al. 2000. Cap. 157 in in Mandell. *Principles and Practice of Infectious Diseases*.
- Valentin, A.,** M. Rosati, D. Patenaude, A. Hatzakis, L. Kostrikis, M. Lazanas, K. Wyvill, R. Yarchoan and G. Pavlakis. May. 2002. Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *PNAS*. Vol.99:7015-7020. N°10
- Verhofstede, C.,** K. Fransen, D. Marissens, R. Verhelst, G. van der Groen, S. Lauwers, G. Zissis, J. Plum. Marzo 1996. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *J. of Virol. Meth.* 60: 155-159.

- Villanova, G. V.,** D. Gardiol, M. A. Taborda, V. Reggiardo, H. Tanno, E. D. Rivadeneira, G. R. Perez and A. A. Giri. Nov. 2007. Strategic Approach to Produce Low-Cost, Efficient, and Stable Competitive Internal Controls for Detection of RNA Viruses by Use of Reverse Transcription –PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. P. 3555-3563. Vol. 45, No. 11
- Weller, I.,** I. Williams. June 2001. ABC of AIDS. Antiretroviral drugs. *Biological Molecular Journal (BMJ)*. Vol. 322: 1410-1412.
- Wei, X.,** S. Ghosh, M. Taylor, V. Johnson, E. Emini, P. Deutsch, J. Lifson, S. Bonhoeffer, M. Nowak, B. Hahn, M. Saag and G. Shaw. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type I infection. *Nature* 373: 117-122.
- Weusten, J.,** W. Carpay, T. Oosterlaken, M. van Zuijlen and P. van de Wiel. 2002. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. *Nucleic Acids Research*. Vol. 30. N° 6.
- Witt, D.,** M. Kemper, A. Stead, C. Ginocchio, and A. Caliendo. Jan. 2000. Relationship of Incremental Specimen Volumes and Enhanced Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA with Nucleic Acid Amplification Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.38, N°1, p.: 85-89.
- Won, D.,** J. Y. Park, J. M. Kim, and H-S, Kim. 2001. Comparison of the Reverse Transcription- PCR with the Branched DNA Assay for Measurement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Levels in Plasma of Korean Patients. *Yonsei Medical Journal*. Vol. 42, N° 2, p.: 204-208.
- Youle, M.,** S. Emery, M. Fisher, M. Nelson, L. Fosdick, G. Janossy, C. Loveday, A. Sullivan, C. Herzmann, H.Wand, R. T Davey, Jr., M. A Johnson, J. A Tavel, and H. Clifford Lane. 2006. A Randomised Trial of Subcutaneous Intermittent Interleukin-2 without Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Patients: The UK–Vanguard Study. *PLoS Clin Trials*. 1(1): e3.
- Zhao, Y.,** M. Yu, J. Millar, M. Chen, E. Bremer, W. Kabat, and R. Yogev. Feb. 2002. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA by Using TaqMan Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 40 N° 2. p.: 675-678.

