

Antivirograma, sensible, rápido y fácil de interpretar por un método de bioluminiscencia para el VIH-1

Palabras clave: VIH-1, mutaciones, antivirograma, bioluminiscente, antirretrovirales.

Key words: HIV-1, mutations, antivirogram, bioluminescent, antiretrovirals.

Recibido: 12/11/2012
Aceptado: 10/01/2013

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
www.medigraphic.com/patologiaclinica

Lara HH,* Ixtepan-Turrent L,* Rivera-Silva G,* González-Salazar F,* Moreno-Treviño G*

* Departamento de Ciencias Básicas, División de Ciencias de la Salud (DICS), Universidad de Monterrey. San Pedro Garza García, Nuevo León, México.

Correspondencia:
Dr. Humberto Herman Lara Villegas
Universidad de Monterrey
División de Ciencias de la Salud (DICS)
Departamento de Ciencias Básicas
Morones Prieto 4500 Pte.
San Pedro Garza García,
66238, Nuevo León, México.
Tel: 821 51444
E-mail: humberto.lara@udem.edu.mx

Resumen

Objetivo: Demostrar que el método desarrollado es el más sensible, que se detectan 10 células/pozo, infectadas con el VIH-1 y que es posible cuantificar resistencias en pacientes seropositivos. **Método:** Para comparar tres ensayos fenotípicos cuantificamos sus sensibilidades. Primero cocultivamos las células HeLa-CD4-LTR/ β -gal con células PBMC infectadas a diferentes diluciones 1:2 comenzando de 4,000 por pozo para conocer cuál es la cantidad mínima de células que se requieren en el ensayo para poder detectar la infección al virus. Día 1. En placa de 96 pozos, se colocan las células HeLa-CD4-LTR/ β -gal (5×10^4) en 50 μ L de medio DMEM. A las 24 horas se agregaron los siguientes antirretrovirales (ARVs): Abacavir, Didanosina, Lamivudina, Tenofovir, Efavirenz, Nevirapina, Enfuvirtide, Amprenavir, Atazanavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir y Saquinavir. En dilución 1:2 en dosis respuesta. Después se agregaron los PBMCs infectados y los controles. Se colocaron en una incubadora de 37 °C por 24 horas y se leyeron los resultados, agregando el reactivo de luciferasa a los 96 pozos en el día tres del ensayo.

Resultados: Se cuantificó la inhibición de la infección por los antirretrovirales (IC_{50}) en forma sensible, rápida y específica.

Abstract

Objective: To demonstrate that our assay is sensitive capable to detect 10 HIV infected cells per well and that is feasible to quantify HIV-1 resistance in seropositive patients.

Method: To compare 3 different phenotypic assays by quantifying their sensitivities, first we co-cultivated HeLa-CD4-LTR/ β -gal cells with infected PBMCs at different concentrations diluted 1:2 from 4,000 cells per well in order to elucidate the minimum quantity of cells needed for the assay to be detected as positive. On day one in a 96 well plate we seeded HeLa-CD4-LTR/ β -gal (5×10^4) cells in 50 HeLa-CD4-LTR/ β -gal (5×10^4) of DMEM. 24 h later we added the following antiretrovirals Abacavir, Didanosina, Lamivudina, Tenofovir, Efavirenz, Nevirapina, Enfuvirtide, Amprenavir, Atazanavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, y Saquinavir. To obtain dose response we diluted 1:2 the drugs. Then we added the four patients' PBMCs infected with HIV-1, then it is incubated at 37 °C for 24 h then the plates are readed after the addition of luciferasa to the 96 well plate at day 3.

Results: HIV infection was quantified as very sensitive, rapid and specific. We obtained the IC_{50} for HIVwt OR wild type

Obtuvimos los IC_{50} de virus vírgenes (VIHwt) y resistentes (VIHRV). La sensibilidad es mayor comparada con la prueba por MT-2 (200 veces) y la cuantificación de células azules (30 veces). La prueba cuantificó sensiblemente la infección de las células PBMCs de los pacientes, clasificando sus sensibilidades y resistencias. En los cuatro pacientes se detectó que eran resistentes a los inhibidores de proteasa, levemente resistentes a los ITRAN, moderadamente resistentes a los ITRNN, todos son sensibles a la Enfurtivida y dos pacientes sensibles a Lamivudina.

Conclusiones: En México no existe un antivirograma contra el VIH-1. El antivirograma que probamos es un ensayo bioluminiscente que detecta virus resistentes, y puede cuantificar con exactitud el IC_{50} del VIH-1 para cada antirretroviral. Esto es de gran valor para el médico tratante, pues se le puede guiar para no dar un medicamento que no es eficaz, pero que resulta caro, tóxico, con graves efectos secundarios para el paciente. En México no contamos con pruebas fenotípicas para detectar resistencia a medicamentos contra el VIH-1. Se ha demostrado mejoría clínica en los pacientes seropositivos cuando se conocen sus resistencias; por lo tanto, es prioritario hacer este estudio. A pesar de esto, los médicos continúan prescribiendo a los pacientes seropositivos desconociendo sus resistencias a los medicamentos.

and VIHRV or resistant virus. Our method was more sensitive than the MT-2 assay (by 200 fold) and more sensitive than Blue cells (by 30 fold). The assay quantified the infection by PBMC+ cells from seropositive patients being able to classify the sensitivities and HIV resistance. In four patients was detected resistance to protease inhibitors, light resistance to NRTI, moderate resistance to NNRTI, sensitive to Enfurtivide and two patients sensitive to Lamivudine.

Conclusions: In Mexico there is no antivirogram for HIV-1. The assay that we tested is a Bioluminiscent assay that detect resistant virus and is capable to quantify the IC_{50} of HIV-1 with precision. It is a valuable tool for the physician to be guided to prescript efficient antiretrovirals and not to prescribe a drug that is not efficient and is expensive, toxic and with secondary effects for the seropositive patient

Introducción

La resistencia del VIH-1 contra los antirretrovirales (ARVs), se define como las mutaciones adquiridas por el virus, las cuales mejoran la replicación viral aun en presencia constante de un inhibidor ARV (*cuadro I*).¹

Actualmente, la terapia con los antirretrovirales (ARVs) (*cuadro II*) tiene la capacidad de lograr la disminución en la carga viral y aumentar el número de células del sistema inmune CD4. Se puede concluir que la infección por VIH-1 es tratable en la actualidad, aunque desafortunadamente aún no es prevenible o curable.²

La causa más frecuente de falla en la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) es la aparición de mutaciones virales contra los ARVs (*cuadro III*).

Con el tratamiento prolongado del paciente, el virus desarrolla resistencias (mutaciones) contra los ARVs continuamente administrados. Además,

en forma paulatina se van seleccionando en el organismo del paciente las especies de (VIH-1wt) que constantemente evolucionan como mutantes resistentes (VIH-1VR) a una o varias drogas ARV, generando con el tratamiento constante (presión selectiva) la consecuente resistencia a los ARV. Para atacar esta grave complicación de resistencia viral a los ARVs es necesario realizar un cambio de terapia después de conocer el tipo de resistencia que presenta el VIH-1 del paciente, a fin de administrar al sujeto infectado el medicamento más indicado según su sensibilidad antirretroviral.³

Las resistencias retrovirales contra los ARV son el resultado de la gran dinámica de la replicación del virus en las células del huésped durante la evolución de la enfermedad mientras el paciente recibe los medicamentos por tiempo prolongado. Los retrovirus, al igual que otros patógenos, se logran adaptar al medio adverso debido a la adquisición de diversos mecanismos adaptativos. Por consiguiente, se obtiene la gran variedad genética característica

Cuadro I. Antirretrovirales disponibles en México.

<i>Inhibidores de la transcriptasa reversa análogos a nucleósidos (ITRAN)</i>		<i>Inhibidores de proteasa (IP)</i>	
<i>Nombre genérico</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Nombre genérico</i>	<i>Nombre comercial</i>
Abacavir (ABC)	Ziagen	Amprenavir	Agenerase
Didanosina (ddl)	Videx	Atazanavir	Reyataz
Emtricitabina (FTC)	Emtriva	Darunavir	Prezista
Lamivudina (3TC)	Epivir	Fosamprenavir	Telzer
Estavudina (d4T)	Zerit	Indinavir	Crixivan
Tenofovir (TDF)	Viread	Lopinavir/ritonavir	Kaletra
Zidovudina (AZT)	Retrovir	Nelfinavir	Viracept
Zalcitabina (ddC)	HIVID	Ritonavir	Norvir
		Saquinavir	Invirase/fortovase
		Tipranavir	Aptivus
<i>Combinaciones</i>		<i>Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos (ITRNN)</i>	
AZT + 3TC	Combivir	<i>Nombre genérico</i>	<i>Nombre comercial</i>
ABC + 3TC	Kivexa	Efavirenz (EFV)	Sustiva
TDF + FTC	Truvada	Nevirapina (NVP)	Viramune
AZT + 3TC + ABC	Trizivir		
<i>Inhibidores de fusión (IF)</i>			
<i>Nombre genérico</i>	<i>Nombre comercial</i>		
Enfuvirtide (T-20)	Fuzeon		

Cuadro II. Ensayo de MT2. Ensayo realizado mediante el cocultivo de células MT-2 (5×10^4). Dilución 1:2 a partir de 2×10^4 de células infectadas con VIH-1 (PBMC+). Realizado por triplicado. Después de tres días de cocultivo se hace conteo de sincitias, tomando como el 100% al control positivo. Los negativos no generan sincitias.

<i>Número de PBMCs+</i>	<i>Porcentaje de infectividad por conteo de sincitios de MT-2</i>		
40,000	80	60	80
20,000	40	40	40
10,000	0	0	0
5,000	0	0	0
2,500	0	0	0
1,250	0	0	0
0	0	0	0

del VIH-1, la cual desarrollan en su organismo los pacientes crónicamente infectados por el retrovirus. Los virus ARN no poseen los componentes correctores que contienen las ADN polimerasas; estos correctores ayudan a preservar fielmente (sin mutaciones) la estructura genética de los organismos que tienen ADN de doble cadena. En consecuencia, los virus ARN de nueva generación presentaran diferencias del virión parental en una media de un nucleótido.⁴

Con la aplicación actual de modelos estadísticos y matemáticos se concluye que una mutación puntual del virus del VIH-1 tiene la capacidad de surgir hasta en 10,000 ocasiones cada 24 horas en los pacientes infectados por el VIH-1. Además otros autores han demostrado diferencias en el VIH, denominadas «cuasiespecies» en más de 25% entre las variantes virales de un mismo paciente. Cuando

algunas mutaciones se producen en puntos críticos del genoma viral, éstas pueden afectar aspectos del comportamiento de los virus, tales como virulencia, replicación, citotoxicidad y su respuesta o resistencia al tratamiento antirretroviral. Para que se produzcan resistencias a un agente antirretroviral que bloquea la actividad de una enzima viral específica (retrotranscriptasa, proteasa, o integrasa), el virus debe estar en presencia constante del inhibidor ARV y debe mutar específicamente contra el ARV específico sin que afecte la capacidad infectiva viral. Las mutaciones puntuales pueden afectar la capacidad de la enzima para seleccionar o no un determinado sustrato. Asimismo, muchas de las mutaciones que se producen durante la dinámica de replicación intrínseca del virus, con o sin presión selectiva, pueden considerarse silenciosas o “neutras” (es decir, no afectan a la cualidad replicativa viral) o ser defectivas, afectando parcial o completamente a la replicación viral.⁵

Las mutaciones del VIH-1 se clasifican en: primarias y secundarias. Las mutaciones virales primarias surgen habitualmente en las fases iniciales del desarrollo de las resistencias a los ARVs, y están ligadas específicamente al ARV que las causa. En cambio, las mutaciones virales secundarias se van acumulando en el genoma viral en el momento que ya han aparecido una o más mutaciones primarias. Las mutaciones secundarias virales poseen una mínima o ninguna relación con las resistencias virales a los ARVs, aunque en general sí afectan, mejorando la capacidad replicativa del VIH-1, cuando se desarrollan en conjunción con las mutaciones primarias.^{6,7}

Los virus mutantes tienen ventaja por su gran capacidad replicativa frente a los virus salvajes o «*wild type*» (VIH-1WT) debido a la constante y permanente presión selectiva del tratamiento ARV que, por consiguiente, pueden llegar a establecerse como la cuasiespecie dominante.

El desarrollo de mutantes resistentes virales es un proceso muy activo y constante, en el cual las diversas variantes del VIH-1 coexisten simultáneamente en un mismo paciente infectado. Los

retrovirus mutantes se pueden diferenciar como la cuasiespecie dominante o, por el contrario, una cuasiespecie puede ser poco dominante tras la falta de presión selectiva constante del fármaco.^{8,9}

Las pruebas diagnósticas para detectar las resistencias virales a medicamentos se pueden realizar en forma genotípica, mediante el análisis con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las mutaciones, las cuales confieren resistencias virales contra diversos ARVs, o también fenotípicamente, determinando en cultivo celular la sensibilidad del virus (IC_{50}) a diferentes ARVs. Hay grandes diferencias entre ambos ensayos y ambos tienen sus ventajas y desventajas.

Los ensayos genotípicos pueden ser más rápidos, menos laboriosos y más económicos, aunque más difíciles de interpretar, por lo que requieren de un experto para la interpretación de las mutaciones. Además, las mezclas de virus con cuasiespecies de diferentes variantes virales que no se detectan pueden ser las analizadas por el genotipo. Otra desventaja es que hay un desconocimiento de cuáles son las mutaciones que ofrecen resistencias a diferentes inhibidores; lo anterior se suma al desconocimiento del efecto de las resistencias cruzadas.^{10,11}

Los ensayos fenotípicos, en cambio, cuantifican la capacidad infectiva del VIH-1 aislado del paciente en estudio, calculando el IC_{50} de los ARVs (*cuadro I*) y comparándolo con el IC_{50} del VIH-1WT de referencia.

La resistencia fenotípica requiere del aislamiento y propagación del VIH-1 a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP o PBMC) del paciente infectado. La replicación del virus se cuantifica en presencia de diversas concentraciones de ARV (dosis respuesta) después de infectar las células con un inóculo fijo aislado del paciente. Posteriormente, la concentración de droga capaz de inhibir la replicación viral al 50% (IC_{50}) o 90% (IC_{90}) se determina para cada aislado. Sin embargo, en su forma tradicional, esta técnica fue relativamente costosa, consumía tiempo debido

al cultivo viral y utilizaba virus aislados derivados de las CMPS infectadas y no del plasma del paciente infectado.¹²⁻¹⁴

Hay diferentes pruebas para cuantificar el IC_{50} de un ARV contra el VIH-1, las primeras pruebas ampliamente utilizadas y aun en uso, como el ensayo de células MT-2, las cuales, al ser infectadas por el VIH-1, presentan sincitias y se pueden cuantificar por microscopia óptica, aunque en este artículo nosotros demostramos que son poco sensibles.¹⁵⁻¹⁸ En esta prueba se cocultivó, junto con las células PBMC infectadas con VIH-1; se requirieron de más de 2,000 células PBMCs infectadas para que la sincitia se hiciera presente (*cuadro II*).

Otra prueba muy utilizada es la de las células azules o prueba de cMAGI; estas células, al ser infectadas por el VIH-1, transcriben la betagalactosidasa, por lo que al ser expuesta al X-gal, que es un reactivo que reacciona de azul, el núcleo de la célula infectada se teñirá de azul; se cuantifican las células azules por pozo. En nuestro estudio se requirieron de 300 células PBMCs infectadas para que las células azules comenzarán a visualizarse (*figura I*). Por último, el estudio que proponemos con cocultivo de PBMCs del paciente infectado es el más sensible por ser un bioensayo de luminiscencia, pues con 10 células PBMCs infectadas, la prueba detecta la luciferasa producida por la betagalactosidasa (*figura 2*).

En Israel nuestro grupo científico obtuvo buenos resultados cocultivando los PBMCs de los pacientes infectados y superinfectando las células con un adenovirus reportero.^{19,20} De esta forma no hay que esperar el cultivo viral, ahorrándonos dos semanas y teniendo el resultado al tercer día.

Actualmente, algunos ensayos fenotípicos se basan en una tecnología recombinante donde algunas regiones de la transcriptasa inversa y de la proteasa se amplifican mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del ARN del plasma, insertando dentro un clon de VIH de laboratorio carente de los mismos genes. Se determina el IC_{50} de la muestra viral y el resultado se expresa relacionán-

dolo al tipo original de la cepa de referencia. De esta forma, los ensayos fenotípicos proporcionan una determinación directa del virus del paciente para medir la susceptibilidad antiretroviral y el formato es fácil de interpretar, comparado con el usado para los ensayos de resistencia antimicrobiana tradicional. Es más, los ensayos fenotípicos cuentan directamente las interacciones entre las mutaciones. El tiempo de ensayo²¹ es considerablemente menor, debido a que este acercamiento elimina la necesidad de obtener un aislamiento primario.

Una relación entre los ensayos genotípicos y fenotípicos se realiza con el fenotipo virtual, el cual es simplemente un estimado probabilístico del fenotipo real derivado del genotipo. La genotipificación del paciente VIH positivo se lleva a cabo en todas las mutaciones asociadas con resistencia a cada droga. Posteriormente, se investiga una gran base de datos donde se almacenan los genotipos y fenotipos actuales para las muestras previas que asemejan el patrón mutacional en la muestra del paciente. El software recupera los fenotipos que coinciden con el patrón dado de mutación y produce un fenotipo virtual donde, por cada droga, el cambio medio de IC_{50} representa el promedio de la mitad del cambio para todos los tipos en la base de datos.²²⁻²⁴

Limitaciones de las pruebas de resistencia viral. Los estudios diagnósticos de resistencia viral presentan en general ciertas limitaciones. Sobre todo debido a que son relativamente insensibles a la detección de cuasiespecies virales en cantidades menores a 10–20% del virus circulante. De esta forma, una minoría de la población viral resistente pudiera escapar a la identificación en los ensayos.

Los ensayos genotípicos están disponibles en pocos laboratorios, en tanto que los ensayos fenotípicos están limitados a muy pocos laboratorios que ofrecen pruebas de susceptibilidad de drogas para VIH-1 como un servicio comercial en Estados Unidos. Incluso en México todavía no contamos con este tipo de servicio de referencia virológica.

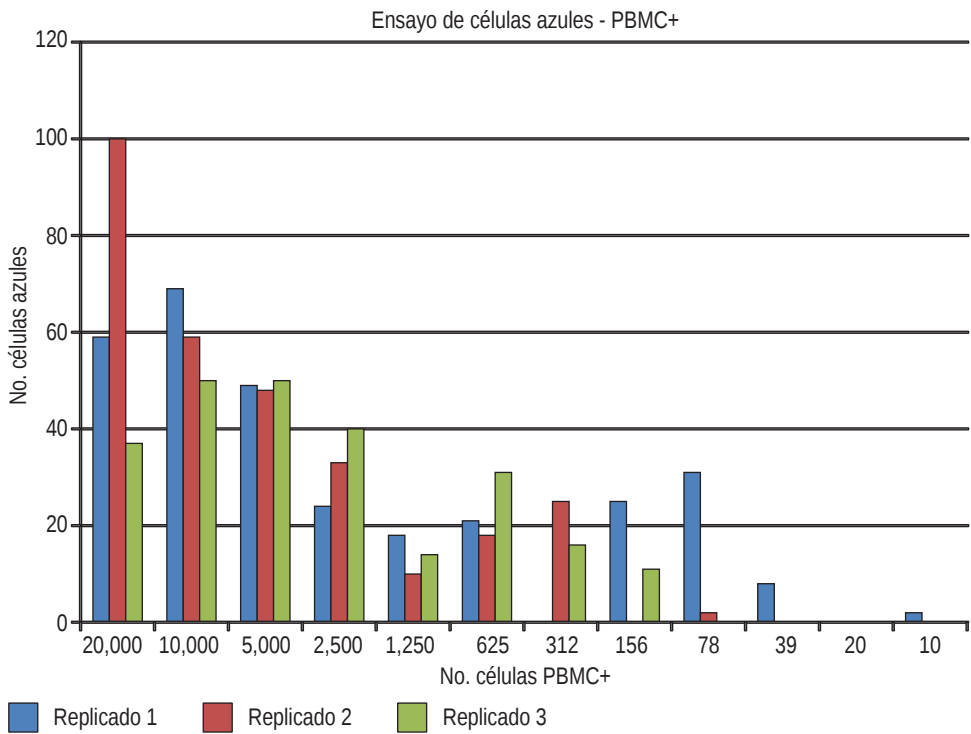


Figura 1.

Ensayo de células azules –PBMC+. Ensayo realizado con células HeLa/CD4-LTR-beta-gal (5 x 10⁴). Dilución 1:2 a partir de 2 x 10⁴ células infectadas con VIH-1 (PBMC+). Realizado por triplicado. Cuento basado en el máximo número de células azules obtenido del control positivo.

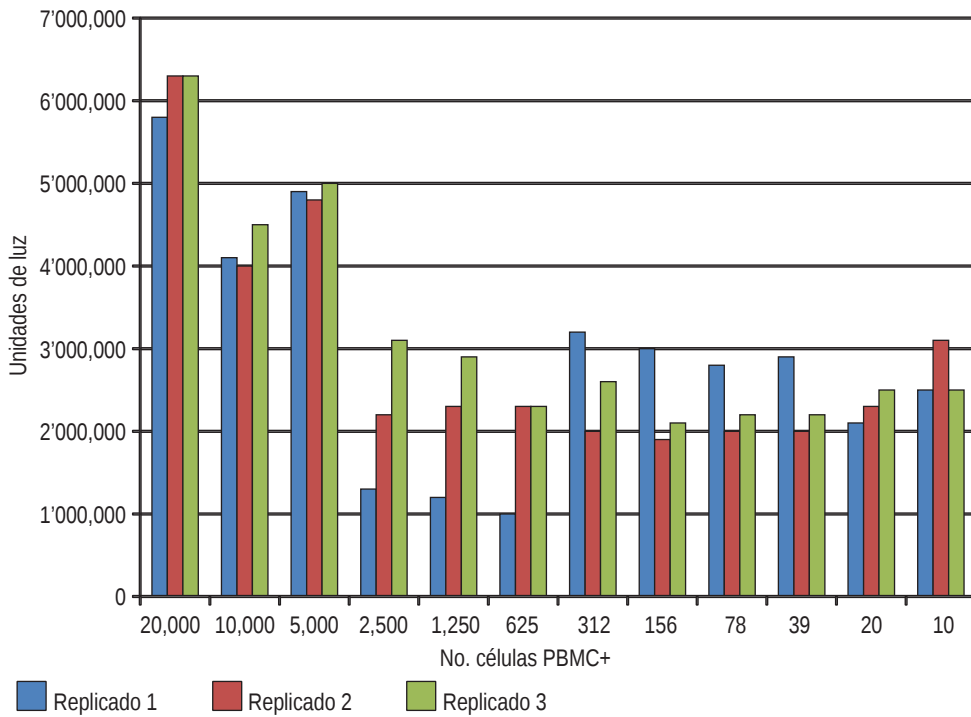


Figura 2.

Ensayo de cuantificación de betagalactosidasa por luminiscencia de células PBMC+. Ensayo realizado en células HeLa/CD4-LTR-beta-gal (5 x 10⁴). Dilución 1:2 a partir de 2 x 10⁴ células infectadas con VIH-1 de PBMC+. Estudio realizado por triplicado. Lectura en luminómetro de unidades de luz (UL).

Además, en las técnicas particularmente relacionadas con la detección del monitoreo de especies, existen variaciones significativas interlaboratorio. La dificultad en la interpretación de los resultados genotípicos crea la necesidad de hacer continuamente una base de datos de resistencias a drogas actuales y medicamentos modernos por especialistas en el tema. Después de una prolongada falla virológica se originan patrones mutacionales complejos, haciendo difícil la interpretación de ensayos genotípicos. Para complicarlo aún más, algunas mutaciones pudieran restaurar la susceptibilidad de drogas y pueden²⁵ incluso conferir hipersusceptibilidad (en caso de que no haya presión selectiva a ARVs).

Lo más importante es que, no obstante que las limitaciones de ambas pruebas de resistencias antivirales están bien establecidas, los resultados de una amplia variedad de estudios científicos han validado las pruebas de resistencia viral, debido a su utilidad en el tratamiento efectivo contra el VIH-1.^{12-14,26} Por lo que es imperativo continuar trabajando para un antivirograma que esté disponible en México lo antes posible.

Material y métodos

1. Cepas virales. El VIH-1IIB, la cepa utilizada como «*wilde type*», y también los virus resistentes a los diferentes antirretrovirales fueron proporcionados por el Dr. R. Gallo y el Dr. M. Popovic.

2. Líneas celulares. Las células indicadoras HeLa/CD4-LTR-beta-gal fueron proporcionadas por el Dr. Michael Emerman. Las células MT-2 fueron proporcionadas por el Dr. Douglas Richman. Se cultivaron en 90% de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS, penicilina, estreptomina y neomicina. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de muestras de sangre con EDTA por centrifugación estándar de células sobre Histo-paque (Sigma), se lavaron y se resuspendieron en medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS. Las células PBMC (VIH-1(+), PBMC+, fueron infectadas con VIH-1IIB.

3. Comparación de diferentes ensayos fenotípicos.

Ensayo de MT-2. El ensayo de MT-2 (ACTG, 2004) se llevó a cabo para células PBMCs de pacientes infectados. Estos ensayos se hicieron por triplicado.

En una placa de 96 pozos, se agregó la línea celular MT-2 (5×10^4) con 50 μ L de medio RPMI 1640. En otra placa de 96 pozos, se hizo una dilución 2:1 de células PBMCs+ infectados con VIH-1 en 50 μ L de medio RPMI 1640, iniciando la dilución a partir de 2×10^4 células. Las células PBMCs infectadas fueron transferidas a la placa con las células MT-2, y se cocultivaron, dejándolas a 37 °C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. Los cocultivos de células MT-2 y PBMCs

Cuadro III. Tratamiento antirretroviral (TARGA) en pacientes sin tratamiento previo.

Situación clínica	Primera opción	Segunda opción
CD4 > 350 con síntomas de SIDA (PTI, Kaposi, Linfoma)	2 ITRAN* + EFV	2 ITRAN* + ATZ/r, FOS/r, SQV/r
CD4 200-350	2 ITRAN* + EFV	2 ITRAN* + ATZ/r, FOS/r, SQV/r**
CD4 100-200 sin evidencia clínica de enfermedad avanzada	2 ITRAN* + EFV	2 ITRAN* + ATZ/r, FOS/r, LPV/r, SQV/r**
CD4 < 100 o evidencia clínica de enfermedad avanzada	2 ITRAN* + LPV/r	2 ITRAN* + EFV 2 ITRAN* + ATZ/r, FOS/r, SQV/r**
En caso de mujer con potencial reproductivo	2 ITRAN* + ATZ/r, NFV, LPV/r, SQV/r	

inoculados fueron monitoreados hasta por tres días para el desarrollo de efectos citopáticos (CPE) típicos en el control positivo, por ejemplo formación de sincitias grandes, las cuales fueron analizadas por evaluación microscópica por dos observadores diferentes.

Los resultados se muestran como positivos (+), si se observó formación de sincitias; y como negativos (-), cuando se observó ausencia de sincitias (*cuadro III*).²⁷

Ensayo de conteo de células azules o ensayo cMAGI. El método (Imgenex, 2008) por el cual se llevó a cabo este ensayo, para detección o sensibilidad a las células PBMCs+. Los ensayos se hicieron por triplicado. A una placa de 96 pozos se agregaron las células HeLa/CD4-LTR-beta-gal (5×10^4) con 50 μ L de medio DMEM. Pasadas unas horas, en otra placa de 96, se hizo una dilución 2:1 de células PBMCs+ en 50 μ L de medio RPMI 1640, iniciando la dilución a partir de 2×10^4 células. Las células PBMCs+ fueron transferidas a la placa con las células HeLa/CD4-LTR-beta-gal, y se dejaron 24 horas a 37 °C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. Se removió el medio libre de la placa con células HeLa/CD4-LTR-beta-gal y PBMCs+. Se añadieron 20 μ L por pozo de la solución fijadora, la cual está compuesta de 0.05% de glutaraldehído en fosfato buffer salino (PBS), con un pH de 7.4. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 15 minutos. Se removió la solución fijadora y se lavaron las células (3X) con 100 μ L de PBS por pozo. Se añadió a cada pozo 20 μ L de la solución de tinción X-Gal, la cual está compuesta de: X-Gal (1 mg/mL), 5% de ferricianuro potásico (K₃[Fe(CN)₆]) 35 nM, 5% de ferrocianuro potásico (C₆FeK₄N₆) 35 nM, 2% de cloruro de magnesio (MgCl₂) 2mM y 83% de PBS. Se incubó 24 horas a 37 °C y se lavó con PBS 1X. Las células se examinaron con microscopio de contraste. Los resultados se muestran positivamente si hay tinción de color azul en el núcleo de las células. Se calculó el por-

centaje de células teñidas del control positivo en la población total al contar el número de células teñidas contra células por cada pozo, siendo el 100% para el control positivo (*figura 1*).^{28,29}

Ensayo de cuantificación de β -Galactosidasa por luminiscencia (Beta-Glo). En una placa opaca de 96 pozos, se agregaron y cultivaron las células HeLa/CD4-LTR-beta-gal (5×10^4) en 50 μ L de medio DMEM. Posteriormente en otra placa transparente de 96 pozos, se hizo una dilución 2:1 de células PBMCs+ en 50 μ L de medio RPMI 1640, iniciando a partir de 2×10^4 células. Las células PBMCs+ fueron transferidas a la placa opaca que contenía las células HeLa/CD4-LTR-beta-gal, y se cultivaron por 24 horas a 37 °C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. La placa opaca se equilibró a temperatura ambiente y se le añadió un volumen de 50 μ L (1:1 con el volumen del medio de cultivo en cada pozo) del reactivo de Beta-Glo. Se mezclaron los contenidos de la muestra por 30 segundos, usando un Agitador de placas. Se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente, y se midió usando un luminómetro automatizado para microplacas. La luminiscencia detectada es expresada en unidades de luz (UL). Los resultados fueron analizados (la luminiscencia de fondo fue restada de las lecturas) (*figura 2*).³⁰⁻³²

Comparación de VIH-1WT y VIH-1RV en la prueba de resistencia a diferentes antirretrovirales mediante el ensayo de bioluminiscencia. A una placa opaca de 96 pozos, se agregaron las células HeLa/CD4-LTR-beta-gal ($5 \times 10^2 \times 10^4$) con 50 μ L de medio DMEM. Posteriormente, se les infectó con los virus resistentes (VIH-1RV), en 50 μ L de medio RPMI 1640, o 2×10^4 células PBMCs por pozo. Y también se les infectó con virus silvestres (VIH-1WT) en 50 μ L de medio RPMI 1640. Se añadió el antirretroviral diluido 2:1 (dosis respuesta) y dependiendo de su mecanismo de acción para tener su IC₅₀ de referencia con una concentración

superior a ésta, diluyendo 2:1, incluyendo además un control sin antirretroviral. El antirretroviral inhibidor de fusión (Enfuvirtide); los antirretrovirales ITRAN (Abacavir, Didanosina, Lamivudina, y Tenofovir) y los antirretrovirales ITRNN (Efavirenz y Nevirapina), los antirretrovirales inhibidores de la proteasa (Saquinavir, Amprenavir, Indinavir, Lopinavir y Ritonavir). Se dejaron 24 horas a 37 °C en una incubadora húmeda de 5% de CO₂. Se colocó la placa opaca de 96 pozos en el luminómetro automatizado lector de microplacas, se añadió 100 µL del reactivo del ensayo de bioluminiscencia a cada pozo. La luminiscencia detectada se expresó en unidades de luz (UL). Los resultados fueron analizados (la luminiscencia de fondo fue restada de las lecturas).²⁸

Antivirograma para pacientes en TARGA.

Se recolectó la sangre con EDTA de cuatro pacientes en TARGA, previo consentimiento informado. Su sangre infectada fue tratada con todas las precauciones universales de bioseguridad. Se separaron sus PBMCs con el método de ficoll-Hystopaque. Después de lavar los PBMCs en medio de cultivo χ^2 , en una placa de 96 pozos se agregaron las PBMCs a 2 x 10⁴ y se cocultivaron con la línea celular HeLa/CD4-LTR-beta-gal (5 x 10⁴) en 50 µL de medio DMEM por 24 horas en incubadora a 37 °C a 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron los ocho ARVs siguientes; antirretroviral inhibidor de fusión (Enfuvirtide); los antirretrovirales ITRAN (Abacavir, Didanosina, Lamivudina, y Tenofovir); y los antirretrovirales ITRNN (Efavirenz y Nevirapina), los antirretrovirales inhibidores de la proteasa (Saquinavir, Amprenavir, Indinavir, Lopinavir y Ritonavir), los cuales se diluyen 2:1 para cuantificar dosis respuesta. Veinticuatro horas después de la incubación a 37 °C a 5% CO₂ se agregaron 100 µL de reactivo Beta-Glo como el fabricante lo indica, a los 30 minutos se leyó en un Luminómetro Promega.

El IC₅₀ del paciente se comparó con los IC₅₀ de referencia con virus salvaje (VIH-1WT) que hicimos previamente. Los IC₅₀ de los pacientes con menos de cinco veces el IC₅₀ del control, son sensibles. Entre cinco y 10 veces son levemente resistentes. Entre 10 a 100 veces el IC₅₀ del paciente es resistente moderado, y si es más de 100 veces, es resistente severo (*cuadro V*).

4. Análisis estadístico. Los resultados se hicieron por triplicado y se ingresaron en una base de datos, donde fueron analizados con el Software estadístico SigmaPlot for Windows Versión 10.0 (2006 Systat Software, Inc), con el que se les sometió a regresión no lineal.

5. Pacientes. Después de ser apropiadamente informados, a los cuatro pacientes se les pidió consentimiento informado.

Resultados

Sensibilidad del ensayo MT-2. El cocultivo de las células MT-2 con las PBMCs infectadas por VIH-1 resultó ser la prueba menos sensible, siendo positivos los pozos con 2,000 células infectadas (PBMCs), en menos de esa cantidad, la infección de las CMSP no fue detectada por las células MT-2 y no produjo sincitias (*cuadro II*).

Sensibilidad de las células azules o prueba de cMAGI. El estudio de células azules que cuantifica las células infectadas fue sensible pues detectó la infección con más de 312 células por pozo, aunque menos de esta cantidad no pudo detectar infección por VIH-1 de las PBMCs (*figura 1*).

Sensibilidad del bioensayo de luciferasa que mide betagalactosidasa. Es un ensayo muy sensible, ya que es capaz de detectar positivos a partir de 10 células infectadas de PBMCs (*figura 2*) en menos de 24 horas.

Antivirograma contra el VIH-1 en pacientes seropositivos. Después de realizar los IC₅₀ con todas las ARVs disponibles de los cuatro pacientes seropositivos, todos fueron muy resistentes

contra los inhibidores de proteasas, fueron moderadamente resistentes a los ITRNN, levemente resistentes a los ITRAN con dos de los pacientes levemente resistentes a Lamivudina y dos casos sensibles a esta droga. Los cuatro pacientes fueron sensibles al Enfuvirtide, cabe destacar que nunca habían sido tratados con este ARV inhibidor de fusión (*cuadro IV*).

Discusión

La importancia de un antivirograma que sea rápido (tres días), sensible (detecta a partir de 10 células infectadas por el VIH-1 (PBMCs) (*figura 2*), específico (solamente reacciona al Tat/Betagalactosidasa producida por el VIH-1), económico y fácil de interpretar es prioridad para los profesionales del laboratorio clínico y los médicos tratantes de pacientes infectados con VIH-1 que están en tratamiento TARGA³³ (*cuadro V*). El VIH-1 se replica

rápidamente, se adapta y muta con gran facilidad, por lo que el médico tratante requiere del antivirograma como una herramienta indispensable no sólo para prolongar la vida del paciente multirresistente a ARVs, sino para que mantenga su calidad de vida. Actualmente los estudios para cuantificar la infectividad o la inhibición de la infectividad por los ARVs, así como para determinar con exactitud el IC₅₀ del virus contra los ARVs se han perfeccionado; anteriormente eran más laboriosos y mucho menos sensibles, como hemos demostrado en este artículo (ensayo de sincitias, cuantificación de células azules, etcétera).

En este estudio comparamos nuestro método contra el estudio de sincitias para el MT-2 (*cuadro II*).^{27,34,35} y el de las células azules (*figura I*).^{28,29,36} Nuestro método detectó a partir de 10 células infectadas; mientras que para células azules detectó después de 30 y requirió de 200 veces menos células que con el estudio de sincitos del MT-2.

Cuadro IV. Antivirograma del VIH-1 en cuatro pacientes con tratamiento TARGA. Se hicieron IC₅₀ de los ocho antirretrovirales (ARVs) contra las PBMCs+ de pacientes seropositivos (2×10^4) y se comparan con los IC₅₀ de VIH_{wt}. Si el valor se encuentra hasta cinco veces el IC₅₀ del wt, es sensible; de 10 a 100 es moderado; y de 100 en adelante se considera resistencia severa al ARV.

ARV	Mecanismo de acción	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Lamivudina	ITRAN	Sensible	Sensible	Resistencia leve	Resistencia leve
Abacavir	ITRAN	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa
Didanosina	ITRAN	Resistencia moderada	Resistencia leve	Resistencia leve	Resistencia moderada
Tenofovir	ITRAN	Resistencia moderada	Resistencia moderada	Resistencia moderada	Resistencia moderada
Efavirenz	ITRNN	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia moderada
Nevirapina	ITRNN	Resistencia moderada	Resistencia moderada	Resistencia moderada	Resistencia leve
Amprenavir	IP	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa
Indinavir	IP	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa
Lopinavir	IP	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa
Ritonavir	IP	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa
Saquinavir	IP	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa	Resistencia severa
Enfuvirtide	IF	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Cuadro V. Tratamiento TARGA en los cuatro pacientes seropositivos del estudio.

	Edad	Grupo	Terapia antirretroviral			
			IF	ITRAN	ITRNN	IP
Paciente 1	25	CT	-	-	Efavirenz	Atazanavir, ritonavir
Paciente 2	23	CT	-	-	Efavirenz	Atazanavir, ritonavir
Paciente 3	29	CT	-	Tenofovir	-	Lopinavir, ritonavir
Paciente 4	33	CT	-	Tenofovir, emtricitabina	Efavirenz	-

Con lo que demostramos la gran sensibilidad de los resultados (*figura 2*).^{30-32,37}

Se hicieron IC₅₀ de ocho diferentes ARVs con resultados similares a los publicados y se hicieron también IC₅₀ de virus resistentes para cuantificarlos por nuestro método.

Finalmente se tomaron muestras de cuatro pacientes multitratados con ARVs (*cuadro V*) y se pudo conocer su perfil de resistencias. Se encontraron resistencias a los ARVs, con excepción de la Lamivudina y a todos ITRAN y con excelente eficacia (no resistencia) a Enfuvirtide, resistencia moderada a los ITRNN y resistencia grave a todos los inhibidores de proteasas (*cuadro IV*), lo que se explica el porqué los pacientes nunca han recibido tratamiento con inhibidores de fusión.

La metodología que proponemos para el antivirograma con el estudio del IC₅₀ del virus del paciente es rápida, muy sensible, específica, repetible y sobre todo disponible en México, donde aún no se ha llevado a cabo un estudio estadístico amplio y confiable de resistencias fenotípicas del VIH-1.

Conclusiones

El ensayo que proponemos es muy sensible, reproducible, fácil de interpretar y no es caro (*figura 2*). Por lo que está justificado hacer un estudio clínico en la población infectada por VIH-1 y valorar qué resistencias son más frecuentes en México, cuáles ARV son aún eficaces, si es que alguno ya no es

eficaz. Valorar si este estudio puede ser comparado con resistencias genotípicas.

Referencias

- Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, de LA, Palmisano L, Paraskevis D et al. European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev.* 2011; 13 (2): 77-108.
- Al-Harthi L, Kashanchi F. Mechanisms of HIV-1 latency post HAART treatment area. *Curr HIV Res.* 2011; 9 (8): 552-553.
- Huang T, Xu Z, Chen L, Cai YD, Kong X. Computational analysis of HIV-1 resistance based on gene expression profiles and the virus-host interaction network. *PLoS One.* 2011; 6 (3): e17291.
- Whitney JB, Lim SY, Wainberg MA. Evolutionary mechanisms of retroviral persistence. *AIDS Rev.* 2011; 13 (4): 234-239.
- Smyth RP, Davenport MP, Mak J. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* 2012.
- Zhao GL, Yu W, Cai YM, Wang F, Hong FC, Jiang WN et al. [Primary drug resistance of HIV-1 infected men who have sex with men in Shenzhen, China]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2012; 92 (17): 1165-1169.
- Gaspareto KV, Mello FM, Dias JR, Meneguetti VA, Storti ME, Ferreira JL et al. Genetic diversity and primary resistance among HIV-1-positive patients from Maringa, Parana, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012; 54 (4): 207-213.
- Marconi V, Bonhoeffer S, Paredes R, Lu J, Hoh R, Martin JN et al. Viral dynamics and in vivo fitness of HIV-1 in the presence and absence of enfuvirtide. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008; 48 (5): 572-576.
- Nowak MA. What is a quasispecies? *Trends Ecol Evol.* 1992; 7 (4): 118-121.
- Niu JL, Xing H, Liao LJ, Zhong P, Ma PF, Wang YC et al. [The study of an in-house method for drug resistance genotyping testing on HIV-1 strains prevailing in China]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2012; 26 (1): 66-69.
- Weber IT, Harrison RW. Molecular mechanics analysis of drug-resistant mutants of HIV protease. *Protein Eng.* 1999; 12 (6): 469-474.
- Jiao L, Li H, Li L, Zhuang D, Liu Y, Bao Z et al. Impact of Novel Resistance Profiles in HIV-1 Reverse Transcriptase on Phenotypic Resistance to NVP. *AIDS Res Treat.* 2012; 2012: 637263.

13. Armenia D, Vandenbroucke I, Fabeni L, Van MH, Cento V, D'Arrigo R et al. Study of genotypic and phenotypic HIV-1 dynamics of integrase mutations during raltegravir treatment: A refined analysis by ultra-deep 454 pyrosequencing. *J Infect Dis.* 2012; 205 (4): 557-567.
14. Visseaux B, Charpentier C, Hurtado-Nedelec M, Storto A, Antoine R, Peytavin G et al. In vitro phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to CCR5 inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (1): 137-139.
15. He XY, Zou P, Qiu J, Hou L, Jiang S, Liu S et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2,5-dimethyl-N-(3-(1H-tetrazol-5-yl)phenyl)pyrroles as novel potential HIV-1 gp41 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19 (22): 6726-6734.
16. Katritzky AR, Tala SR, Lu H, Vakulenko AV, Chen QY, Sivapackiam J et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship of a novel series of 2-aryl 5-(4-oxo-3-phenethyl-2-thioxothiazolidinylidenemethyl)furan as HIV-1 entry inhibitors. *J Med Chem.* 2009; 52 (23): 7631-7639.
17. Hanson CV, Crawford-Miksza L, Sheppard HW. Application of a rapid microplaque assay for determination of human immunodeficiency virus neutralizing antibody titers. *J Clin Microbiol.* 1990; 28 (9): 2030-2034.
18. Montefiori DC, Robinson WE Jr, Mitchell WM. In vitro evaluation of mismatched double-stranded RNA (ampligen) for combination therapy in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1989; 5 (2): 193-203.
19. Borkow G, Lara HH, Ayash-Rashkovsky M, Tavor E, Lapidot A, Bentwich Z et al. Adenovirus expressing a bioluminescence reporter gene and cMAGI cell assay for the detection of HIV-1. *Virus Genes.* 2004; 29 (2): 257-265.
20. Axelrod JH, Honigman A. A sensitive and versatile bioluminescence bioassay for HIV type 1 based on adenoviral vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999; 15 (8): 759-767.
21. Jia Z, Xu S, Nie J, Li J, Zhong P, Wang W et al. Phenotypic analysis of HIV-1 genotypic drug-resistant isolates from China, using a single-cycle system. *Mol Diagn Ther.* 2011; 15 (5): 293-301.
22. De WH, Van MH, Mostmans W, Thys K, Vandenbroucke I, Van E, V et al. HIV-1 nucleotide mixture detection in the *virco*((R))TYPE HIV-1 genotyping assay: A comparison between Sanger sequencing and 454 pyrosequencing. *J Virol Methods.* 2011; 175 (1): 129-132.
23. Schutten M. Resistance assays. 2006.
24. Talbot A, Grant P, Taylor J, Baril JG, Liu TF, Charest H et al. Predicting tipranavir and darunavir resistance using genotypic, phenotypic, and virtual phenotypic resistance patterns: an independent cohort analysis of clinical isolates highly resistant to all other protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54 (6): 2473-2479.
25. De RA. Virological and immunological response to antiretroviral therapy in HIV-1 infected children: genotypic and phenotypic assays in monitoring virological failure. *New Microbiol.* 2004; 27 (2 Suppl 1): 45-50.
26. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs.* 2012; 72 (9): e1-25.
27. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2005; 3: 6.
28. Borkow G, Lara HH, Ayash-Rashkovsky M, Tavor E, Lapidot A, Bentwich Z et al. Adenovirus expressing a bioluminescence reporter gene and cMAGI cell assay for the detection of HIV-1. *Virus Genes.* 2004; 29 (2): 257-265.
29. Zussman A, Lara L, Lara HH, Bentwich Z, Borkow G. Blocking of cell-free and cell-associated HIV-1 transmission through human cervix organ culture with UC781. *AIDS.* 2003; 17 (5): 653-661.
30. Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza-Trevino EN, Badillo-Almaraz JJ, Rodriguez-Padilla C. Antiviral mode of action of bovine dialyzable leukocyte extract against human immunodeficiency virus type 1 infection. *BMC Res Notes.* 2011; 4: 474.
31. Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza Trevino EN, Singh DK. Use of silver nanoparticles increased inhibition of cell-associated HIV-1 infection by neutralizing antibodies developed against HIV-1 envelope proteins. *J Nanobiotechnology.* 2011; 9: 38.
32. Lara HH, Ayala-Nunez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2010; 8: 1.
33. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs.* 2012; 72 (9): e1-25.
34. Borkow G, Lara HH, Lapidot A. Mutations in gp41 and gp120 of HIV-1 isolates resistant to hexa-arginine neomycin B conjugate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 312 (4): 1047-1052.
35. Borkow G, Vijayabaskar V, Lara HH, Kalinkovich A, Lapidot A. Structure-activity relationship of neomycin, paromomycin, and neamine-arginine conjugates, targeting HIV-1 gp120-CXCR4 binding step. *Antiviral Res.* 2003; 60 (3): 181-192.
36. Borkow G, Lara HH, Covington CY, Nyamathi A, Gabbay J. Deactivation of human immunodeficiency virus type 1 in medium by copper oxide-containing filters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (2): 518-525.
37. Lara HH, Ixtepan-Turrent L, Garza-Trevino EN, Rodriguez-Padilla C. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. *J Nanobiotechnology.* 2010; 8: 15.