

03072  
5  
24

**Proyecto Académico de Especialización, Maestría  
y Doctorado en Biotecnología.**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado**

**Tesis para obtener el Grado de Maestría en Biotecnología**

**"Utilización de Mecanismos de Amplificación : PCR para  
la detección temprana del Virus de la Inmunodeficiencia Humana"**

**Presenta la Q.B.P. Laura García Cabrera.**

1993



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado**

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

UNAM-CCH

Of. No. EMDR/019/93

QBP. LAURA GARCIA CABRERA  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA  
P r e s e n t e

Los miembros de la Comisión Académica reunidos en su sesión ordinaria del día 24 de febrero del presente año, conocieron su solicitud para asignación de Jurado de Examen para optar por el grado de MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA, con la réplica oral de la tesis intitulada "Utilización de mecanismos de amplificación: PCR para la detección temprana del virus de la inmunodeficiencia humana".

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Paul Modesto Lizardi López
VOCAL	Dr. Guillermo Ruiz-Palacios y Santos
SECRETARIO	Dr. Carlos Larralde Rangel
SUPLENTE	Dr. Carlos Federico Arias Ortiz
SUPLENTE	Dr. Miguei Angel Ceballos

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de febrero de 1993  
LA COORDINADORA DE SEDE

*Amelia Farres Gonzalez-Saravia*  
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo.

AFGS-139.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## Resumen

Se desarrolló un formato de hibridación en microplaca : ELCHA (Enzyme linked-Hydroxyapatite-Assay), para detectar y cuantificar productos de PCR (pPCR) específicos de VIH-1 en pacientes infectados, asintomáticos y sintomáticos. El ensayo emplea hibridación en solución con oligonucleótidos marcados en el extremo 3' con dUTP biotinilada, los híbridos formados entre el pPCR y el oligonucleótido detector se capturan con esferas de hidroxapatita, la cantidad de oligonucleótido detector unido se cuantifica mediante un sistema enzimático colorimétrico con avidina-peroxidasa. Se construyó una curva tipo de concentración conocida de DNA proviral de VIH-1 por  $\mu\text{g}$  de DNA celular. Este método cuantitativo no-isotópico se utilizó para medir la carga proviral en pacientes infectados por VIH-1, su correlación con los niveles de los linfocitos T  $\text{CD}_4^+$  y la progresión a SIDA. Nuestros datos mostraron que el curso de la enfermedad se asocia con la carga proviral. Un incremento en la carga proviral coincide con un decremento en la cuenta de linfocitos T  $\text{CD}_4^+$  del paciente. La carga proviral podría ser un marcador con valor predictivo de progresión a SIDA.

Este método podría ser útil también para cuantificar la cantidad de RNA viral en todas las fases de la infección por VIH-1.

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to the author of the document, is located at the bottom center of the page.

# **Contenido**

**I.Introducción General**

**II.Epidemiología de VIH**

**III.Biología Molecular y Mecanismo de Infección de VIH**

**IV.Método de PCR**

**V.Objetivos**

**VI.Material y Métodos**

**VII.Resultados**

**VIII.Discusión**

**IX.Conclusiones**

**X.referencias**

## I. Introducción.

Al inicio de la década de los 80's en el Hospital General de San Francisco California, USA, se reportaron varios casos de pacientes jóvenes homosexuales con una clase de síndrome poco común. Los pacientes con este síndrome se caracterizaban por algunas infecciones oportunistas, por ejemplo neumonía causada por *Pneumocystis carinii*, alteraciones en órganos linfoides como las linfadenopatías crónicas y neoplasias del tipo de sarcoma de Kaposi. Aparentemente estos pacientes fueron víctimas de desórdenes inmunológicos. Posteriormente se reportó el mismo síndrome en pacientes hemofílicos, receptores de sangre y sus derivados, y en drogadictos intravenosos. Esta enfermedad se le conoce como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida **SIDA** (1).

El virus de la inmunodeficiencia humana (**VIH**) se le reconoce como el agente causal de SIDA (2,3). El VIH es un retrovirus de humanos que causa destrucción progresiva principalmente de los linfocitos T  $CD_4^+$ , así como de otras células mononucleares; puede afectar también células de del sistema nervioso central (4,5). La transmisión entre humanos puede ocurrir por exposición a fluidos corporales, principalmente por vía sexual, transfusiones sanguíneas e infección perinatal (1,4).

La detección de los pacientes infectados con VIH en la población en general, se realiza mediante pruebas serológicas enfocadas a la

búsqueda de anticuerpos dirigidos a proteínas antigénicas de VIH. Esta búsqueda se realiza con métodos bien establecidos, como son el ensayo de ELISA y de Western blot. Existen métodos alternativos más sofisticados como el co-cultivo de VIH en líneas celulares leucémicas, ensayos para la detección de VIH por actividad de su transcriptasa inversa, ensayos de hibridación con sondas de DNA/RNA y mecanismos de amplificación exponencial de DNA y RNA por el método de PCR y Q- $\beta$  replicasa respectivamente (6).

Aunque extensas investigaciones han permitido conocer gran parte de la epidemiología y patogenia de VIH, el tratamiento es todavía inefectivo. Para el diseño de nuevas drogas anti-retrovirales se necesita conocer aún más de la patogénesis del virus, con el fin de poder tener un control de su propagación dentro del huésped y lograr una intervención específica en un punto clave de su ciclo replicativo. Actualmente, se encuentran disponibles inhibidores de la replicación retroviral, como lo son el Azida-timidina (AZT), di-desoxiinosina (ddI) y di-desoxicidina (ddC), estos inhibidores actúan como análogos de desoxinucleótidos parando la elongación de la cadena de DNA, desafortunadamente el problema con estos inhibidores es su alta toxicidad y el desarrollo de cepas mutantes resistentes. En pacientes que han recibido AZT por periodos prolongados la efectividad antiretroviral se ve claramente disminuida, estos pacientes presentan aislamientos de VIH que han mutado a variantes de VIH resistentes a AZT. Se han realizado alineamientos de la secuencia que codifica para la transcriptasa inversa

entre cepas susceptibles y resistentes a AZT y se encontró variación en tres o cuatro aminoácidos, los cuales son comunes entre las variantes resistentes de VIH. Se ha observado también que el desarrollo de cepas mutantes resistentes es más común para AZT que para ddI y ddC (1).

## **II. Epidemiología de VIH.**

El SIDA ha tomado una gran importancia en el área científica, social y de salud pública. Desde los primeros reportes clínicos, más de 132 000 casos de SIDA se han reportado en los Estados Unidos, y cerca de la mitad de los pacientes han muerto como resultado de esta enfermedad. Por otro lado, se conoce que entre 1.5 y 3 millones de Americanos están ahora infectados con VIH pero aún no presentan sintomatología de la infección. A principios de los 90's la Organización Mundial de la Salud estimó que de 8 a 10 millones de personas en todo el mundo, de los cuales 3 millones corresponde a mujeres y niños, están infectados actualmente con VIH, de este total, el 25 % corresponde al continente Americano, el 5 % a Europa, el 60 % a Africa y un 5 % corresponde a Asia, Oceanía Nueva Zelanda y Australia. El porcentaje de pacientes infectados que han progresado a SIDA se invierte ya que el 50 % de pacientes con progresión a SIDA corresponden al continente Americano y un 25 % a Africa. Por otro lado, la estadística predictiva más conservadora estima que de 40 a 100 millones de personas portarán el VIH para el año 2000 (1). En México se estima que aproximadamente 100 000 personas portan el VIH y se reportó hasta Febrero de 1993 más

de 10 000 casos de SIDA (comunicación personal).

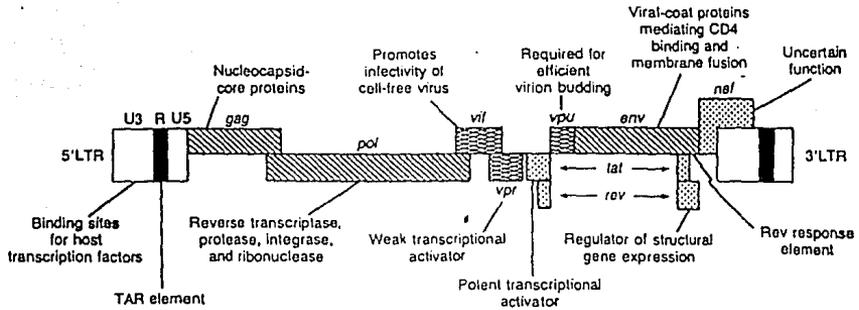
Se mencionó que las principales vías de transmisión son el contacto sexual, transfusiones sanguíneas y de madre a hijo, aunque la incidencia de SIDA en individuos homosexuales ha captado la mayor atención pública, más del 60% de los casos de infección por VIH ha sido adquirida por ruta heterosexual a través de individuos bisexuales.

El SIDA ha causado una crisis internacional por lo que el diseño de nuevos anti-retrovirales y vacunas para prevenir esta infección representa todo un reto, principalmente el desarrollo de una vacuna podría ofrecer un solución preventiva determinante para detener esta epidemia (1,7).

### III. Biología Molecular y Mecanismo de Infección de VIH.

VIH es un miembro prototipo de la subfamilia Lentiviridae familia Retroviridae que afecta a humanos, cuya característica principal es la de cambiar lenta y progresivamente al azar sus proteínas de membrana a través de mutaciones (1,6). VIH tiene 2 cadenas sencillas de RNA como genoma el cual está asociado a una DNA polimerasa-RNA dependiente, la transcriptasa inversa (TI) que sintetiza un DNA complementario (cDNA) o provirus de VIH (8).

Organización genómica de VIH. Los genes estructurales son *gag* ( p24 proteína del core ), *pol* ( transcriptasa inversa ), y *env* ( gp41, gp120, gp160 proteínas de la envoltura). El VIH solo contiene 9 kilobases (kb) de genoma, dentro del cual posee 6 genes reguladores adicionales, *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev*, y *nef*, figura 1. En estudios realizados se reportó que algunos genes reguladores podrían funcionar como activadores o supresores transcripcionales, por ejemplo, los productos de los genes *tat*, *rev* y *vpr* se asocian con actividad trans-activadora y cis-activadora para la misma expresión de los genes reguladores así como de los genes estructurales, se ha observado también que el producto del gene *vpu* es necesario para el ensamble correcto de las proteínas estructurales de un nuevo virión, por otro lado el gene *vif* codifica para una proteína promotora de infectividad en células libres de virus. Probablemente la función de estos genes reguladores, en este momento poco conocida, es la causa de la compleja patogenicidad de VIH (9,10).



**Figura 1. Organización genómica de VIH. En el diagrama se muestran 9 genes conocidos y su función primaria reconocida. En el extremo 5' y 3' tiene secuencias LTR (long terminal repeats sequences) conteniendo secuencias reguladoras reconocidas por varios factores transcripcionales del huésped.**

El DNAc o provirus formado por la actividad de la TI dentro de la célula huésped durante la infección puede integrarse al genoma celular, donde puede permanecer por varios años replicándose al mismo tiempo que la célula huésped se duplica, produciéndose una "infección viral persistente" y "latencia clínica" del paciente, o expresarse para formar nuevos viriones infectivos, induciéndose una "infección activa o productiva" (11,12). En el periodo de latencia clínica aproximadamente 1 de cada  $10^6$  linfocitos T  $CD_4^+$  contienen provirus de VIH y 1 de cada 9 de estos linfocitos conteniendo el provirus presenta replicación viral; por otro lado se ha visto que la síntesis de proteínas no es suficiente para ensamblar viriones completos que puedan infectar células vecinas (13). En diferentes investigaciones se ha reportado una actividad replicativa retroviral en la fase de latencia y de infección activa por VIH, esta actividad retroviral se expresó como la cantidad de las diferentes poblaciones de RNA's y DNA proviral, por lo que algunos investigadores no están de acuerdo con la hipótesis de que VIH esté asociado con un periodo de latencia viral verdadera, si no que se piensa que es solo un periodo de latencia clínica (13,14).

Se conoce que la infección por VIH progresa lentamente de la infección asintomática a SIDA, también se conoce que los linfocitos T  $CD_4^+$  son el principal blanco de VIH (15,16). El nivel de estas células es el mejor factor predictivo de dicha progresión (17,18), la determinación de los niveles circulantes de estos linfocitos T  $CD_4^+$  /  $\mu$ L se realiza en un citómetro de flujo, pero este equipo está limitado solo a algunos

laboratorios y hospitales debido a su alto costo. Existen otros marcadores alternativos con valor predictivo, los cuales son : i) Concentración de la proteína retroviral p24 en suero, este antígeno es una pobre medida de la progresión de la enfermedad, debido a que en algunos pacientes los niveles séricos de p24 fluctúan a lo largo de la infección ; ii) Co-cultivo viral cuantitativo, cuyos resultados están influenciados por la naturaleza selectiva de las líneas celulares utilizadas para el co-cultivo *in vitro* ; iii) Niveles séricos de la proteína  $\beta$ -2 microglobulina. Esta proteína está presente sobre la superficie de macrófagos y linfocitos T y B circulantes, se expresa cuando el sistema inmune es activado, los niveles séricos de esta proteína podrían reflejar el grado de activación del sistema inmune durante cualquier infección no solo para VIH (17,19,20,21,22,23), por último, iv) El PCR cuantitativo para la determinación de carga proviral de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Sabemos que después de que VIH ha penetrado al huésped, los provirus pueden estar integrados al genoma celular o en forma libre, dependiendo de factores intrínsecos, los provirus podrían permanecer con un nivel basal de replicación durante varios años o podrían transcribirse todas las poblaciones de mRNA's para sintetizar todas las proteínas estructurales y formar nuevos viriones infectantes (24,25,26). De acuerdo a este razonamiento, cuando el virus se está replicando activamente la cantidad de nuevas células infectadas se incrementará y el número de copias de provirus o la "carga proviral" podría incrementarse también. El PCR cuantitativo para determinar la carga proviral de VIH podría ser una

mejor herramienta para conocer la relación entre el número de provirus y la evolución de la infección, es decir como un marcador con valor predictivo de progresión a SIDA.

#### IV. Método de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que ha sido utilizada para la amplificación exponencial *in vitro* de escasas moléculas de DNA. El PCR fue descrito por primera vez por Saiki R. y col. (27) en 1985, para estudiar la anemia falciforme y actualmente se utiliza en varias pruebas de diagnóstico en humanos (28,29).

El método de PCR requiere principalmente de : I un par de primers ó iniciadores específicos de DNA que determinarán la longitud del fragmento que se desea amplificar, II desoxinucleótidos trifosfatados dNTP's y de una enzima termoc estable, III Taq polimerasa la cual incorpora cada dNTP complementario al DNA molde, (28,29,30,31). En la figura 2 se muestra un diagrama de PCR.

Actualmente, el PCR es acoplado a ensayos de hibridación para detectar los templados de DNA amplificados. Estos sistemas estan disponibles para una variedad de virus y bacterias patógenas. Algunos de los ensayos de hibridación utilizan oligonucleotidos "sondas" marcadas con isótopos radioactivos con una sensibilidad alrededor de  $10^5$  a  $10^7$  copias de DNA o RNA; algunos otros han utilizado "sondas" marcadas con moléculas no-isotópicas acoplados a sistemas enzimáticos con una sensibilidad de  $10^4$  copias de DNA o RNA (31,32,33). Dada la necesidad

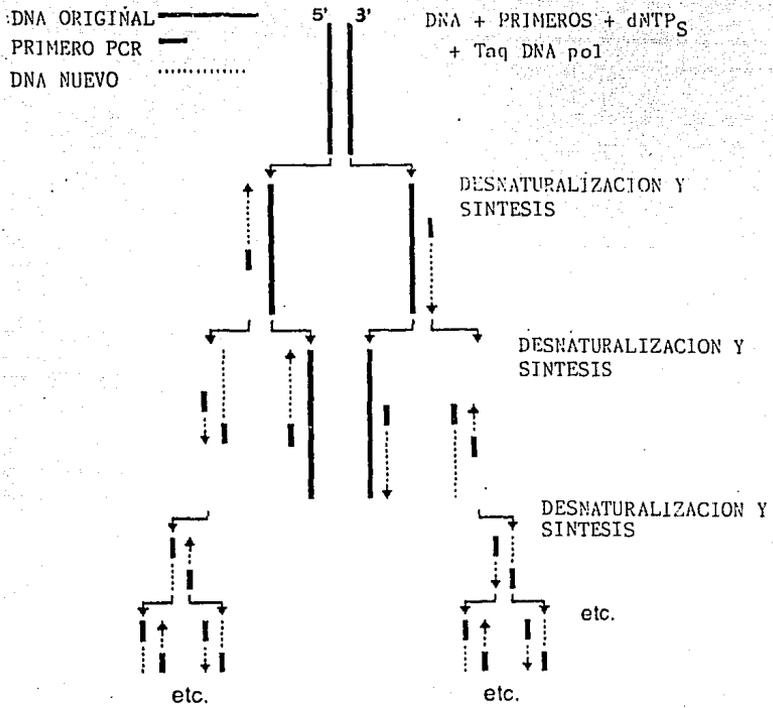


Figura 2. Diagrama del método de PCR.

de aumentar la sensibilidad se han desarrollado poderosos sistemas de detección y cuantificación de productos de PCR (pPCR) del tipo enzimático-colorimétrico (34,35,36). El PCR ya ha sido utilizado para detectar DNA proviral de VIH presente en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes recientemente infectados (37). Estos estudios han demostrado que PCR podría detectar unas cuantas moléculas de DNA de VIH presentes en  $10^6$  células mononucleares no infectadas (38).

En la presente tesis, se desarrolló un formato cuantitativo de hibridación en solución en microplacas de 96 pozos, del tipo enzimático-colorimétrico acoplado a PCR. El método de PCR cuantitativo se utilizó para medir la carga proviral en pacientes asintomáticos y sintomáticos portadores de VIH y su correlación con los niveles de los linfocitos T  $CD_4^+$  y la progresión a SIDA.

## **V.Objetivos**

I. Desarrollar y estandarizar un método de PCR acoplado a un formato de hibridación en solución para detectar y cuantificar el número de copias de DNA proviral de VIH en CMSP de pacientes infectados con el virus.

II. Validar el método de acuerdo a ensayos de hibridación tipo Southern blot y diagnóstico clínico.

III. Correlacionar la carga proviral con los niveles de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> de pacientes asintomáticos y sintomáticos infectados con VIH.

## VI. Material y Metodos.

**Población en estudio.** Un total de 69 pacientes infectados por VIH y 10 pacientes sanos fueron seleccionados de acuerdo a los criterios de el Centro del Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta Georgia, USA (39,40). Estos pacientes se clasificaron en 4 grupos de la siguiente manera: I) 15 pacientes de SIDA ; II) 42 pacientes VIH-infectados asintomáticos con cuentas de células T  $CD_4^+$   $< 500/\mu L$ , donde 15 estaban recibiendo AZT y 15 ddI, y 12 sin antivirales ; III) 12 pacientes VIH-infectados asintomáticos con cuentas de células T  $CD_4^+$   $> 500/\mu L$ , donde unicamente tres estaban recibiendo ddI ; IV) 10 pacientes sanos no-infectados por VIH. La cuenta de células T  $CD_4^+$  se determinó simultaneamente a la toma de sangre por citometría de flujo en el laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología. Del total de pacientes, se seleccionó 30 pacientes, de los cuales 15 estaban recibiendo AZT y 15 ddI, con la finalidad de determinar la efectividad de los anti-retrovirales en la progresión de la enfermedad. Todos los pacientes fueron reclutados en el Instituto Nacional de la Nutricion "Salvador Zubiran" de 1991 a 1993.

Se Utilizaron como controles positivos de VIH. Dos kb de RNA recombinante del gene *pol* de VIH tipo 1 (HIV-1 RNA assay, de Gene-Track Systems), DNA proviral recombinante de VIH tipo 1 (Gene Amplimer HIV-1 reagents, de Perkin Elmer-Cetus), y DNA celular de CMSP obtenidas de pacientes de SIDA. Los controles negativos fueron DNA placentario humano libre de VIH (Gene Amplimer HIV-1 reagents, de Perkin Elmer-Cetus) y DNA celular de CMSP de pacientes no infectados por VIH.

**Preparación de las muestras.** Quinientas copias de DNA proviral recombinante de VIH tipo 1 y de DNA placentario humano se resuspendieron directamente en 10  $\mu L$  de agua esteril libre de nucleasas y se utilizaron

directamente para PCR. Para las quinientas copias de las 2 kb de RNA recombinante del gene *pol* de VIH tipo 1, primero se obtuvo el cDNA por ensayo de transcripción inversa utilizando como primeros el par *pol* y en el mismo tubo de reacción se continuó el PCR (31). Las CMSP fueron obtenidas de 10 mL de sangre total, (tanto de pacientes infectados con VIH como de pacientes sanos), por centrifugación a 2000 x g durante 40 min. en un gradiente de densidad de Ficoll-hypaque (Sorval RT 6000 B centrifuge, de Du Pont). 10<sup>6</sup> CMSP fueron contadas en un Hemocitómetro y lisadas en solución A (KCl 100 mM, tris-HCL 10 mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM) y solución B (tris-HCL 10 mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, tween 20 1%, NP 40 1%) mezcladas vol/vol. Se adicionó Proteinasa K 120 µg/mL (Sigma Chemicals Co.). Se incubaron los tubos de lisis a 60°C por 1h y se inactivaron a 90°C durante 5 min. (41). Se ajustaron los lisados a una concentración de 1µg de DNA celular en un volumen de 10 µL de agua libre de nucleasas por el método de fluorimetría (TKO-100 mini-Fluorometer, de Hoefer Scientific Instruments).

**Selección de Primeros y Sondas.** Se analizaron todas las secuencias reportadas (24 secuencias reportadas en el año de 1989) de DNA proviral de VIH tipo 1 (42,43,44,45) en el programa analizador de genes PC GENE (46) para seleccionar regiones conservadas por análisis de alineamientos y homología. Después de seleccionar la región conservada se analizó, en el mismo programa, formación de estructura secundaria y el contenido de guanina/citocina. Se seleccionó un fragmento conservado de 168 pares de bases (bp) del gene *gag* en la posición 1416-1584 del genoma, compartiendo homología del 90% entre VIH tipo 1 y VIH tipo 2. Para distinguir VIH-1 del tipo 2, se seleccionó un segundo fragmento conservado de 180 bp del gene *pol* VIH-1 específico en la posición 2379-2559. Se seleccionaron dos pares de primeros para amplificar los fragmentos seleccionados de *gag* y *pol*. Par *gag*, se le denominó NG +

5'TCAATGAGAAGCTGCAGAATGGGAT3' y NG - 5'TCTCCTACTGGGATAGGTGG3', y par *pol*, se le denominó NP + 5'TACAGGAGCAGATGATACAG3' y NP - 5'ATTATGTTGACAGGTGTAGG3'. También se diseñaron 4 "sondas" internas para identificar cada cadena de cada fragmento de DNA amplificado. Sondas *gag*, se les denominó SG+ 5' CATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGA 3', SG- 5'TCATCCATCTCTATTTGTTCTGAAAGGGTACTAGTTC 3' , y sondas *pol*, se les denominó SP+ 5'CAGGAAGATGGAAACCAAAAAATGATAGGGGAATGGAGG3' SP- 5'TACTGTACCTATAGCTTTATGTCCACAAAGATTTCTATGAGT3' (47). La secuencia y posición de los primeros y "sondas" sobre el genoma de VIH tipo 1 se muestran en la figura 3, en la tabla 1 se resumen los primeros y sondas seleccionados en nuestro laboratorio y los publicados posteriormente. Los primeros y sondas se sintetizaron por el método de fosforamidita triéster (48) y se purificaron por electroforesis en geles de agarosa al 4% y electroelución (33) en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos.

**PCR.** En este estudio se estandarizó un PCR de dos pasos de acuerdo a los métodos reportados por R. Saiki y col. y D. Kellogs y col.(28,30). Las temperaturas de incubación se establecieron de acuerdo a la concentración de sales y la temperatura de disociación y asociación ( $T_m$ ) de los primeros (47). El PCR de dos pasos finalmente se realizó de la siguiente manera : i) 10  $\mu$ L de cada muestra conteniendo 1  $\mu$ g de DNA celular y 10  $\mu$ L conteniendo 500 copias de cada control se amplificaron en una mezcla de 50  $\mu$ L de reacción o PCR-mix de KCL 50 mM, tris-base 10 mM (pH 8.4),  $MgCl_2$  1.5 mM y 100  $\mu$ g/ml gelatina autoclaveada, 100  $\mu$ molas / 50  $\mu$ L de reacción de cada dNTP, 1 U / 50  $\mu$ l de reacción de Taq polimerasa, se utilizó primero 0.5  $\mu$ molas del par *gag* por 10 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1.5 min., aplamiento de primeros a 60°C por 1.5 min. y extension de la cadena a 72°C por 1.5 min.,ii) se adicionó después 0.5  $\mu$ molas del par *pol* hasta completar 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min.,

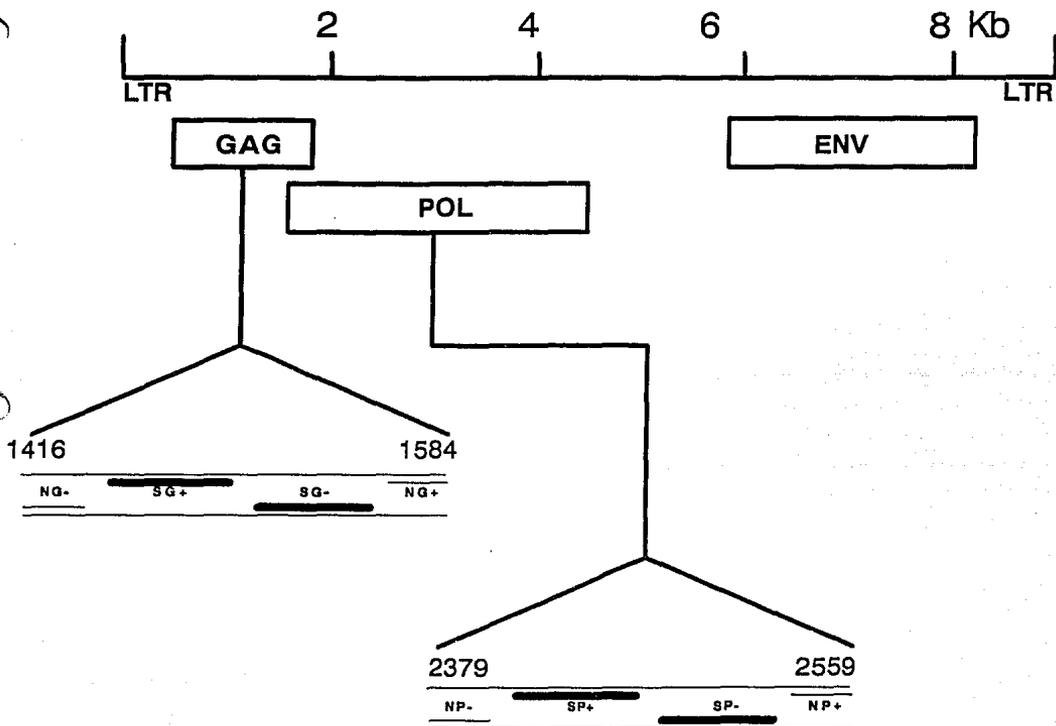


Figura 3. Localización de primers y sondas en el genoma de VIH-1.

## A

PRIMERS y SONDAS	POSICIÓN EN EL GENOMA	VIH
NG+ PRIMER 1	1416 - 1442	1,2
NG- PRIMER 2	1585 - 1564	1,2
SG+ SONDA INTERNA 1	1451 - 1490	1,2
SG- SONDA INTERNA 2	1521 -1560	1,2
NP+ PRIMER 3	2380 - 2399	1
NP- PRIMER 4	2559 - 2539	1
SP+ SONDA INTERNA 3	1516 - 1556	1
SP- SONDA INTERNA 4	2435 - 2474	1

## B

PRIMERS y SONDAS	POSICION EN EL GENOMA	VIH
SK38 (+)	1541 - 1578	1
SK39 (-)	1665 - 1638	1
SK19 (+)	1595 - 1635	1
SK145 (+)	1366 - 1395	1,2
SK101 (-)	1506 - 1482	1,2
SK150 (-)	1507 - 1480	1,2
SK102 (+)	1403 - 1435	1,2

Tabla 1. A) Primers y Sondas diseñadas para la amplificación y detección secuencias de DNA de VIH-1, B) Primers y Sondas disponibles comercialmente.

acoplamiento de los primeros a 50°C por 1 min. y extensión de la cadena a 72°C por 1 min., para nuestras condiciones de PCR y tipo de muestra, nosotros encontramos que en 25 ciclos el PCR se detiene en su fase logarítmica de amplificación, donde la cantidad de DNA amplificado es proporcional a la cantidad original de DNA.

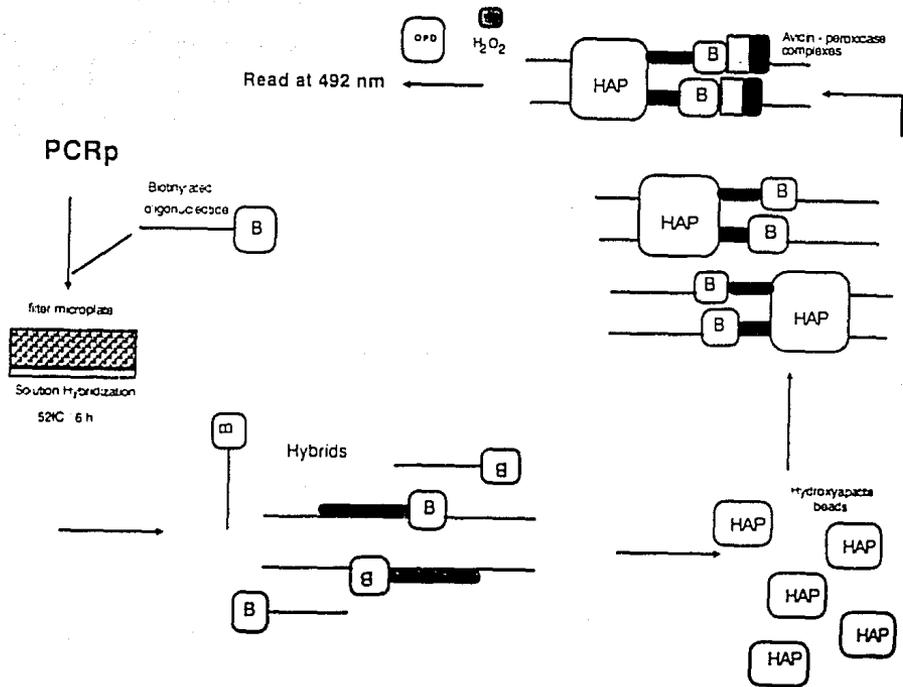
**Ensayo de Hibridación tipo Southern blot.** Alícuotas de 10 µL de producto de PCR (pPCR) fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 3% en solución de TBE ( tris-base 50 mM, ácido bórico 50 mM, EDTA 1 mM) a 120 volts durante 1 h para identificar las bandas correspondientes al fragmento de 168 bp de *gag* y 180 bp de *pol* después de teñir el gel con bromuro de etidio ; se tomó fotografía del gel. El DNA separado en el gel se transfirió a membranas de nylon en una solución de NaOH 0.5 M, incubándose durante toda la noche en el cuarto frío. Las membranas de nylon con el DNA transferido se colocaron dentro de bolsas de plástico estériles donde se adicionó 2 picomolas /mL de SG+/SG- y SP+/SP- marcadas previamente con  $\alpha$  P<sup>32</sup> dCTP por el método de 3' transferasa terminal, en la solución de hibridación (SSC 6.6X, 5% de solución Denhardt, 0.1% de triton x-100), se incubó a 50°C durante 16 h. Se realizaron tres lavados, uno con la solución de hibridación 2X a la temperatura de hibridación durante 30 min, el segundo se realizó con la solución de hibridación 1X y SDS al 0.1 % durante 15 min. y el tercero con la solución de hibridación 0.1X y SDS al 0.1%. Los autorradiogramas se desarrollaron en placa de rayos X a - 70°C por 1 h (31,32,49).

**ELCHA, Enzyme-Linked-Capture-Hydroxyapatite-Assay.** Se transfirieron 50 µL de cada pPCR a una microplaca de 96 pozos con fondo de filtro durapore (0.22 µM Filter Microplates, de Millipore Corporation), se adicionó en cada pozo 2 picomolas de las sondas SG+/SG- y SP+/SP- marcadas previamente con bio-11-dUTP (GIBCO BRL) en el extremo 3' con transferasa terminal (32), en 50 µL de la solución de hibridación ( vease Southern blot) y se incubó la microplaca a 50°C

durante 4 h. Se capturaron los híbridos con 100  $\mu\text{L}$  de hidroxapatita saturada (HAP) (Sigma Chemicals Co.) (31,49), se realizaron 3 lavados por aspirado a través de las membranas de la microplaca en el Sistema Multi-Screen Assay (Millipore Corporation) con la solución de KP-SDS (5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% SDS, pH 6.8) para eluir oligonucleótidos sin hibridar. Los complejos de HAP-híbridos se saturaron con una solución al 3% de albúmina sérica bovina-libre de nucleasas (GIBCO BRL) para eliminar uniones no específicas posteriores (31). Se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de una dilución 1: 30 000 de conjugado de avidina-peroxidasa (Sigma Chemicals Co.) en solución de KP-SDS a cada pozo de la microplaca y se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente. se realizaron 3 lavados con la solución KP-SDS de la misma manera que los primeros lavados. La reacción colorida se desarrollo adicionando 100  $\mu\text{L}$  a cada pozo, de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.3%, 1.0  $\mu\text{g}$  de ortofenilen-diamina como cromógeno (Sigma Chemical Co.) en 10  $\mu\text{L}$  solución de KP-SDS esteril. La reacción se detuvo con 1M W/V de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , las alíquotas coloridas se aspiraron de la microplaca con fondo de filtro a una microplaca estandar en el Sitema Multi-Screen Assay para leer a 492 nm en el lector Reader Microelisa System (Organon Teknika). En la figura 4 se muestra un diagrama de ELCHA.

Se construyó una curva tipo para cuantificar la carga proviral por  $\mu\text{g}$  de DNA celular en la muestras procesadas. Para determinar la concentración de DNA proviral expresado en número de copias de VIH-1, i) se realizaron diluciones seriadas y por quintuplicado del DNA proviral recombinante de VIH-1. ii) Se determinó la concentración de cada dilución por fluorometría ( TKO Mini-Fluorometer, de Hoefer Scientific Instruments) y utilizando el número de Avogadro (50). ii) Se mezcló cada dilución con 1  $\mu\text{g}$  de DNA celular de CMSP no-infectadas con VIH. Todas las diluciones se proceraron para PCR-ELCHA.

**Validación del ensayo.** Para validar y determinar la variabilidad inter-ensayo



**Figura 4.** Diagrama del método de PCR-ELCHA. El oligonucleótido biotinilado hibrida con el pPCR complementario, se capturan los híbridos formados con esferas de hidroxapatita, y la cantidad de oligo detector unido es cuantificado a través de una reacción colorimétrica.

de ELCHA contra Southern blot, se seleccionaron 15 de nuestras muestras, 9 de pacientes de SIDA y 6 de individuos no-infectados. Las 15 muestras fueron distribuidas al azar y ensayadas por triplicado por los dos métodos de análisis de pPCR descritos aquí, PCR-Southern blot y PCR-ELCHA. Después de la validación interensayo, el total de las muestras de la población en estudio se preparó para la determinación de la carga proviral por el método cuantitativo validado de PCR-ELCHA.

**Análisis Estadísticos.** Se analizó por tablas de contingencia los datos obtenidos de ELCHA contra Southern blot y ELCHA contra cuadro clínico para el cálculo de sensibilidad y especificidad (51,52,53). La media y desviación estandar (S.D.) de las lecturas de D.O. y el número de copias de VIH-1 por  $\mu\text{g}$  de DNA celular, y la correlación de la carga proviral con el diagnóstico clínico y el número de células T  $\text{CD}_4^+$  se analizaron a través de el paquete estadístico True-Epistat Software Program (54). Los datos de la curva tipo de concentración de provirus de VIH-1/ $\mu\text{g}$  de DNA celular se graficaron utilizando una regresión polinomial semilogarítmica y para la carga viral de VIH-1 comparada con cada grupo de pacientes, se realizó una gráfica de distribución, ambas gráficas se obtuvieron a través del paquete graficador SIGMA-Plot Software Graphic Program (55). Se graficó también el número de copias de VIH-1 versus cuentas de células T  $\text{CD}_4^+$  con el paquete graficador Harvard Graphics Software Program (56).

## VII. Resultados

Los **primeros** y **sondas** se seleccionaron de regiones conservadas de VIH-1. De acuerdo al análisis en el Programa PC GENE, el par *gag* resultó ser 90% homólogo a el gene *gag* de VIH-2 y el par *pol* fué 100% VIH-1 específico, y el 88% específico de VIH-1 toda la región seleccionada de 180 bp de *pol*. Aunque las condiciones de PCR fueron un poco diferentes entre el par *gag* y el par *pol* dentro del mismo tubo de reacción, el PCR en dos pasos resultó ser 100% específico, ambos pares de primeros no reaccionaron con DNA placentario humano ni con DNA de CMSP de individuos no-infectados. Ninguno de nuestros controles reaccionó únicamente a el par *gag* o *pol*, cabe aclarar que hasta la fecha, en México no se ha reportado ningún caso de infección por VIH-2. El par *gag* será valorado posteriormente para comprobar *in vitro* su reactividad cruzada utilizando una línea celular infectada con VIH-2.

La sensibilidad y especificidad de ELCHA comparada con Southern blot fue del 100% respectivamente, tabla 2. El corrimiento electroforético en geles de agarosa de los pPCR, la hibridación tipo Southern blot y el autorradiograma correspondiente muestran una banda de 168 bp para el fragmento amplificado del gene *gag* y de 180 bp para el del gene *pol*, figura 5. La media y desviación estandar de las lecturas de D.O. después de la validación interensayo fue de  $\bar{x} = 1.085$ , S.D. = 0.401 para el grupo de SIDA y de  $\bar{x} = 0.108$ , S.D. = 0.034 para el grupo control. El punto de corte fue definido como dos veces la media más una vez la S.D. de las lectura de D.O. del grupo control, punto de corte = 0.250.

En la figura 6 se muestra la curva tipo de concentración de DNA proviral de VIH-1. El límite de detección del ensayo, de acuerdo a la curva, fue una lectura de D.O. de 0.290 - 1.950, lo que corresponde de 15 - 1065 copias de DNA proviral de VIH-1/  $\mu\text{g}$  de DNA celular. La determinación de la carga proviral o número de copias de VIH-1 para cada pPCR procesado por ELCHA se obtuvo por

## 1r grupo

MUESTRA	1 ensayo	2 ensayo	3 ensayo
1	0.191	0.130	0.118
2	0.177	0.205	0.185
3	0.487	0.210	0.110
4	0.452	0.442	0.444
5	0.953	0.544	0.452
GENOMA DE VIH-1	0.875	0.778	0.765
DNA PLACENTARIO	0.100	0.108	0.105
BLANCO	0	0	0

## PCR - ELCHA

		+	-	
Southern blot	+	6	0	= 6
	-	1	8	= 9

Sensibilidad = 100%  
Especificidad = 89%

## 2o grupo

MUESTRA	1 ensayo	2 ensayo	3 ensayo
6	0.091	0.200	0.084
7	0.084	0.205	0.140
8	0.456	0.909	0.518
9	0.499	0.585	0.705
10	0.448	0.490	0.570
GENOMA DE VIH-1	0.806	0.777	0.778
DNA PLACENTARIO	0.102	0.099	0.115
BLANCO	0	0	0

## PCR - ELCHA

		+	-	
Southern blot	+	9	0	= 9
	-	0	6	= 6

Sensibilidad = 100%  
Especificidad = 100%

## 3r grupo

MUESTRA	1 ensayo	2 ensayo	3 ensayo
11	0.170	0.085	0.084
12	0.080	0.100	0.190
13	> 2	1.821	N.D.
14	0.491	0.482	0.509
15	0.768	0.803	0.866
GENOMA DE VIH-1	0.875	0.841	0.829
DNA PLACENTARIO	0.140	0.100	0.103
BLANCO	0	0	0

## PCR - ELCHA

		+	-	
Southern blot	+	8	0	= 8
	-	0	6	= 6

Sensibilidad = 100%  
Especificidad = 100%

Tabla 2. A) Lecturas de D.O. de un total de 15 muestras en grupos de 5, ensayados por triplicado para determinar la variabilidad interensayo, análisis de datos en tablas de contingencia. N.D. no-determinado. B) Lecturas de D.O. por muestra ensayada por triplicado después de la validación, punto de corte = 0.250, análisis de datos en tablas de contingencia.

B

DIAGNOSTICO	NUMERO DE ENSAYO		
	1	2	3
NO-INFECTADO	0.170	0.085	0.142
NO-INFECTADO	0.080	0.100	0.190
SIDA	>2	1.821	ND
SIDA	0.491	0.482	0.509
SIDA	0.768	0.803	0.866
GENOMA DE VIH-1	0.875	0.841	0.829
DNA PLACENTARIO	0.140	0.100	0.103
BLANCO	0	0	0

		PCR - ELISA		
		+	-	
Southern blot	+	8	0	= 8
	-	0	6	= 6

Sensibilidad = 100%  
 Especificidad = 100%

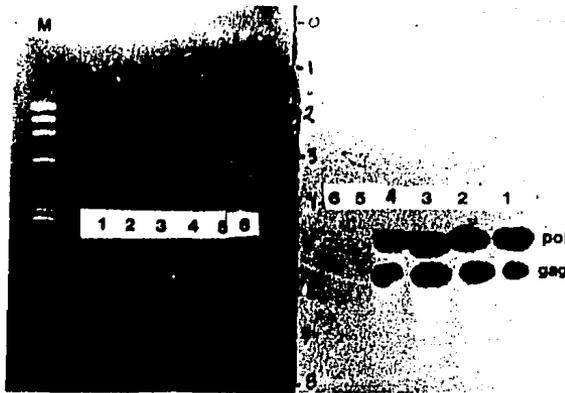


Figura 5. Corrimiento electroforético de los productos amplificados de los genes *gag* y *pol* y autorradiograma correspondiente a la hibridación tipo Southern blot. Línea 1,2,3, DNA de pacientes de SIDA; línea 4, genoma recombinante de VIH-1; línea 5, DNA de CMSP de paciente no-infectado por VIH-1; y línea 6 DNA placentario. M, marcador de peso molecular phi X 174.



interpolación de las lecturas de D.O. sobre la curva tipo.

Se analizó la carga proviral por grupo de pacientes con y sin anti-retroviral y por paciente recibiendo AZT o ddI. La media y desviación estandar de la carga viral por grupo de pacientes fue: **número de copias de VIH-1**  $\bar{x}$  = 425.0, S.D. = 349.29 and **CD<sub>4</sub><sup>+</sup>**  $\bar{x}$  = 36.86, S.D. = 26.99 para el grupo I ; **número de copias de VIH-1**  $\bar{x}$  = 109.35, S.D. = 81.23 and **CD<sub>4</sub><sup>+</sup>**  $\bar{x}$  = 223.3, S.D. = 119.31 para el grupo II ; **número de copias de VIH-1**  $\bar{x}$  = 74.0, S.D. = 21.52 and **CD<sub>4</sub><sup>+</sup>**  $\bar{x}$  = 367.0, S.D. = 97.0 para el grupo Ila ; **número de copias de VIH-1**  $\bar{x}$  = 60.11, S.D. = 32.7 and **CD<sub>4</sub><sup>+</sup>**  $\bar{x}$  = 611.67, S.D. = 90.519 para el grupo III, los tres pacientes de este grupo que recibían ddI no fueron incluidos por ser un grupo muy pequeño para analizarse estadísticamente. Los resultados de los diferentes grupos en conjunto presentan un incremento progresivo en la carga proviral coincidiendo con la progresión a SIDA, figura 7. El número de copias de VIH-1 para esos grupos presentó una diferencia significativa, (prueba ANOVA para grupos)  $P < 0.0001$ . Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la carga proviral entre los pacientes de cada grupo de manera individual. Esos pacientes se mantienen con un número similar de copias de VIH-1, figura 7. Para evaluar el efecto anti-retroviral se graficó el número de copias provirales y los niveles de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> comparados con pre-tratamiento, 28 y 56 días post-tratamiento con AZT, 10 de los pacientes ya habían recibido tratamiento previo con AZT, en este grupo se observó una disminución progresiva de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> al mismo tiempo que se observó un aumento en la carga proviral, (prueba de ANOVA de muestras repetidas)  $P = 0.585$ , figura 8A. Este hallazgo es compatible con resultados previos (comunicación personal) en los cuales el AZT no tiene efecto sobre la carga proviral directamente además del desarrollo de cepas virales resistentes en pacientes previamente tratados con AZT, en estos sujetos el efecto de AZT sobre los niveles de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> es mínimo. En contraste a lo observado con AZT los pacientes que recibieron ddI mostraron



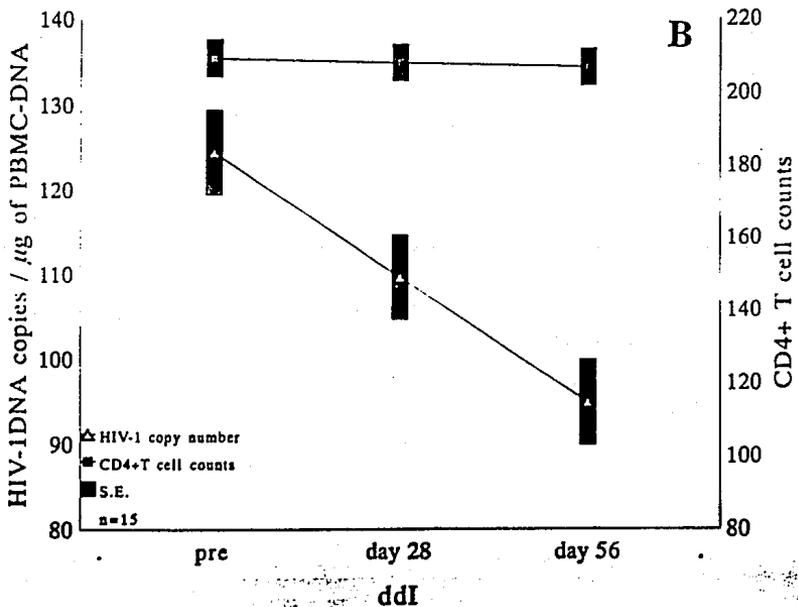
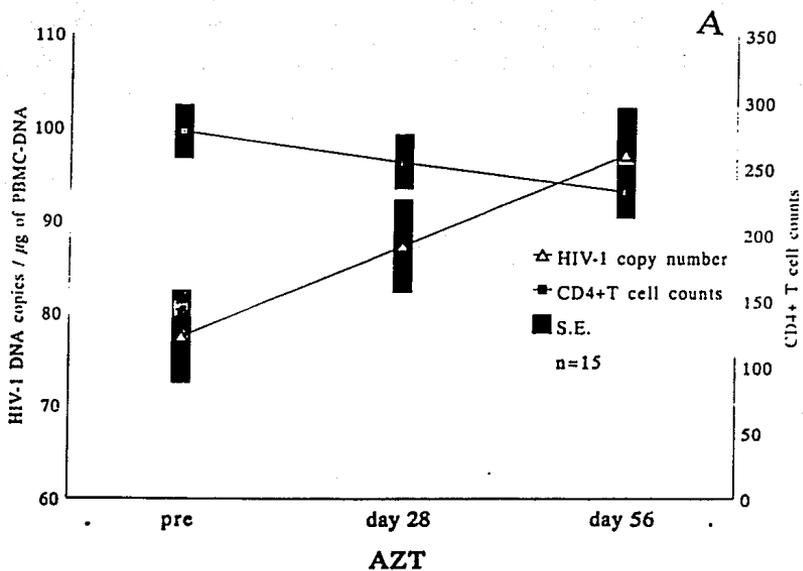


Figura 8. Efecto de anti-retrovirales. A) Grupo de pacientes recibiendo AZT. B) Grupo de pacientes recibiendo ddi.

una marcada disminución en la carga proviral que estadísticamente es significativa al mismo tiempo que mantenían una cuenta de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> estable, (prueba de ANOVA de muestras repetidas) P = 0.078, figura 8B. Cabe agregar que 10 de estos pacientes habían recibido tratamiento previo con AZT.

El coeficiente de correlación (Pearson's R) entre el número de copias de VIH-1 por paciente y cuentas de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> fue de R = - 0.551, p < 0.00001, mostrando una correlación lineal inversa, es decir un aumento en la carga proviral de VIH-1 coincide con una disminución en los niveles de las células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> y con la progresión a SIDA, figura 9.

### VIII. Discusión

El método de PCR-ELCHA tiene la ventaja, sobre PCR-hibridación tipo Southern blot, de ser un método cuantitativo no-isotópico, además de reducir el tiempo de proceso hasta por 2 días. Aunque el PCR-ELCHA mostró ser un método sensible, específico y reproducible, se recomienda construir a cada ensayo la curva tipo de concentraciones conocidas de DNA proviral debido a la naturaleza exponencial del PCR, donde algunas variaciones en la eficiencia de amplificación pueden resultar en algunos cambios en el rendimiento de los pPCR.

Los métodos de detección de anticuerpos dirigidos a antígenos virales por el método de ELISA y Western blot quedan limitados a diagnóstico de laboratorio para la población en general, ya que su aplicación en el área de investigación es solo de apoyo a otros métodos alternativos.

El PCR es un método más rápido y sensible que la determinación de virus circulantes en plasma utilizando el método de cultivo en dilución punto final descrito por Coomb y col.(60), donde se reporta un porcentaje alto de resultados negativos en pacientes VIH-1+ asintomáticos. En nuestro estudio el PCR-ELCHA

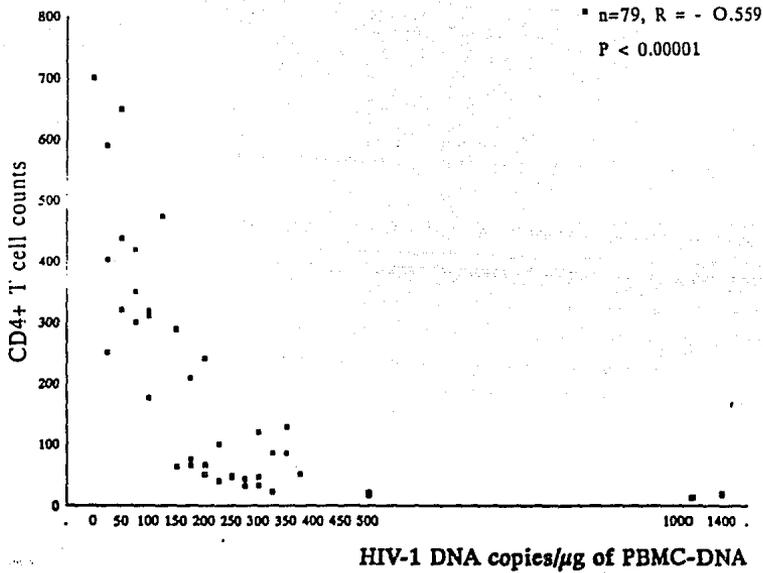


Figura 9. Correlación entre la carga proviral de VIH-1 y las cuentas de células TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>.

dió resultados positivos en todos los grupos estudiados.

La cuantificación de la carga proviral utilizando el método de PCR-ELCHA provee una poderosa herramienta para el estudio de la historia natural de la infección por VIH-1. Nosotros observamos que el número de copias provirales de VIH-1 correlaciona positivamente con la progresión de la enfermedad. En los grupos estudiados, un aumento en la carga proviral coincide con una disminución en la cuenta de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. En estudios realizados por Lefrere y col. (57), se reportó que las concentraciones de antígeno p24 disminuyen en ciertos individuos unos meses antes de llegar a SIDA, sugiriendo la posibilidad de una disminución de la replicación viral en esta fase. Más tarde, Genesca y col (58) observaron que muchos de los pacientes VIH+ asintomáticos con niveles de CD<sub>4</sub><sup>+</sup> abatidos tenían una baja en la carga viral en sus CMSP. Sin embargo, nosotros no observamos este fenómeno, por el contrario y de acuerdo con Oka y col. (38) quienes reportaron que individuos con niveles de CD<sub>4</sub><sup>+</sup> abatidos tenían una carga proviral elevada.

La frecuencia de provirus de VIH en CMSP observada en nuestro estudio fue de 1/450 a 1/2400 para el grupo I (SIDA), de 1/1700 a 1/4000 para el grupo II (asintomáticos CD<sub>4</sub><sup>+</sup> <500) y de 1/5000 a 1/7800 para el grupo III (asintomáticos CD<sub>4</sub><sup>+</sup> >500), de acuerdo a estudios realizados por Simmonds y col. (59) la frecuencia de provirus fue de 1/700 a 1/3300 en pacientes sintomáticos y de 1/6000 a 1/80000 en pacientes asintomáticos. Otros estudios han reportado una mayor frecuencia de provirus de VIH (1/200 a 1/400) en pacientes sintomáticos pero una menor frecuencia (1/5000) en pacientes asintomáticos (20,58).

La carga proviral parece estar directamente asociada con la disminución progresiva del estatus inmunológico y deterioramiento clínico. Como la carga proviral es inversamente relacionada a las cuentas de CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, la cuantificación de la misma a través de PCR-ELCHA podría ser utilizada como un predictor de progresión de la enfermedad en individuos infectados por VIH-1. Cabe aclarar que

durante este estudio pudimos observar en nuestros pacientes que la carga proviral podría ser un mejor marcador de evolución a SIDA que las cuentas de las células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, debido a que algunos pacientes con carga proviral alta y con cuentas de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> bajas progresaban a SIDA y algunos pacientes con cuentas de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> bajas pero con una carga proviral moderada permanecían estables. Para apoyar esta hipótesis es necesario continuar con un estudio de seguimiento en una población abierta mayor. La carga proviral podría también reflejarnos el número de nuevas células huésped infectadas por VIH-1.

La determinación de la carga proviral podría ser de interés en el monitoreo de anti-retrovirales en etapas tempranas de la infección asintomática donde se piensa puede tener mayor efecto que en las etapas avanzadas (57). En este estudio observamos efecto anti-retroviral en 30 pacientes asintomáticos con niveles de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> <500 pero >100, 15 AZT y 15 ddI, de los cuales 10 de cada grupo ya habían recibido tratamiento previo con AZT. En nuestros resultados preliminares claramente pudimos observar un efecto anti-retroviral en el grupo que recibía ddI, mostrando una disminución en la carga proviral y manteniendo cuentas de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> estables, a diferencia de los pacientes que nuevamente recibieron AZT no pudimos observar efecto anti-retroviral. Pensamos que este fenómeno podría estar relacionado a variantes mutantes de VIH-1 resistentes a AZT y el tratamiento con un anti-retroviral diferente podría tener un mejor efecto debido a una respuesta emergente del huésped. Es necesario continuar el este estudio de seguimiento por periodos largos de tratamiento para ambos anti-retrovirales para observar su efecto en la carga proviral y cuantificar paralelamente la carga de RNAs mensajeros como marcador de replicación viral. El monitoreo de pacientes asintomáticos y la evaluación de nuevas drogas podría ser estudiado a través de PCR-ELCHA y para un estudio mas profundo, la determinación de las subpoblaciones de RNAs de VIH-1 para estudios de terapeuticos, patogénesis, replicación viral e historia natural de

la infección productiva es necesario unicamente modificar el ensayo en un paso de transcripción inversa antes de utilizar el PCR-ELCHA.

### **IX. Conclusiones**

- I. Se desarrolló y estandarizó un método de PCR-Cuantitativo no-isotópico confiable y reproducible.
- II. PCR-ELCHA nos permite cuantificar la carga proviral de VIH-1
- III. La carga proviral en CMSP es inversamente proporcional a los niveles de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> y correlaciona bien con la evolución clínica.
- IV. La medición de la carga proviral puede servir como un marcador pronóstico de la infección.
- V. Los datos preliminares sugieren que la carga proviral en CMSP puede servir como parametro de la actividad antiviral *in vivo* de fármacos eficaces contra la infección por VIH-1.

## X. Referencias

1. Mak T, Wigzell H. AIDS : ten years later. **FASEBJ 1991; 5 :2338-9.**
2. Barre-Sinoussi F, Cherman J, Rey F. Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency Syndrome (AIDS). **Science 1983;220:868-71.**
3. Gallo R, Salahuddin S, Popovic M. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. **Science 1984;224:500-3.**
4. Rosenberg Z, Fauci A. Immunopathogenesis of HIV infection. **FASEBJ 1991;5:2382-90.**
5. Merrill J, Chen I. HIV-1 macrophages glial cells and cytokines in AIDS nervous system disease. **FASEBJ 1991;5:2391-7.**
6. De vita V, Hellman S, Rosenberg S. In AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and prevention. Lippincott Co. Philadelphia 1988.
7. Blatner W. HIV epidemiology : past, present and future. **FASEBJ. 1991;5:2340-48.**
8. Ou C, Kwok S, Mitchel S. DNA amplification for direct of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. **Science 1988;239:295-7.**
9. Greene W. The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. Review article. **N Engl J Med 1991;324:308-17.**
10. Gelderblom H, Hausmann H. Fine Structure of HIV and Immunolocation of structural proteins. **Virology 1987;156:171-6.**
11. Bangham C, McMichel J. Why the long latent period? **Nature 1990;348-88.**
12. Arriego S, Wetsman S, Rosenblatt J, Chen I. Analysis of *rev* gene function on HIV type 1 replication in lymphoid cells by using Quantitative Polymerase Chain Reaction Method. **J Virol 1989;63:4875-81.**
13. McCune J. HIV-1 The infective process *in vivo*. **Cell 1991;64:351-63.**

14. Michel N, Vahey M, Burke D. Viral DNA and RNA expression correlate with the stage of Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 1 infection in humans: Evidence for viral replication in all stages of HIV-1 disease. **J Microbiol** 1992;66:310-16.
15. Gallo R. Mechanism of disease induction of HIV. **JAIDS** 1990;3:380-9.
16. Shnittman S, Psallidopoulos M, Lane H. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is aT cell that maintains expression of CD<sub>4</sub>. **Science** 1989;245:305-8.
17. Fahey J, Taylor J, Deteds R. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. **N Engl J Med** 1990;322:166-72.
18. Moss A, Bachetti P, Osmond D. Seropositivity of HIV and the development of AIDS or AIDS related condition: three-year follow up of the San Francisco General Hospital cohort. **Br Med J** 1988;296:745-50.
19. Cao Y, Valentina F, Hojvat S. Detection of HIV antigen and specific antibodies to HIV core and envelope proteins in sera patients with HIV infection. **Blood** 1987;70:575-80.
20. Ho D, Moudgil T, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. **N Engl J Med** 1989;321:1621-5.
21. Meyerhans A, Cheymier K, Albert J. Temporal fluctuations in HIV quasispecies *in vivo* are not reflected by sequential HIV isolations. **Cell** 1989;58:1901-10.
22. Kin K, Kasahara T, Iroh Y. Beta 2-microglobulin production by highly purified human T and B lymphocytes in cell culture stimulated with various mitogens. **Immunology** 1979;36:47-54.
23. Hofman B, Wang Y, Cumberland W. Serum beta 2-microglobulin level increases in HIV infection: realltion to seroconversion, CD<sub>4</sub> T cell fall and prognosis. **AIDS** 1990;4:207-14.

24. Bangham CR, Mc Michel J. Why the long latent period? **Nature** 1990;**348**:388.
25. Horsburgh CR, Ou CY, Jason J. Duration of HIV infection before detection of antibody. **Lancet** 1989;**ii**:637-40.
26. Mc Cune JM, HIV-1 the infective process *in vivo*. **Cell** 1991;**64**:351-63.
27. Saiki R, Scharf S, Faloona F. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 1985;**230**:1350-4.
28. Innis M, Gelfand D, Sninsky J. In PCR protocols : a guide to Methods and applications. **Academy press** 1990.
29. Eisenstein B. The Polymerase Chain Reaction a new mwthod for using molecular genetics for medical diagnosis. **N Engl J Med** 1990;**332**:178-183.
30. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S. Primer directed enzymatic amplifications of DNA with a thermoestable DNA polymerase. **Science** 1988;**239**:487-91.
31. Ausubel F, Brent R, Kington R. Current Protocols in Molecular Biology. Greene and Wiley Interscience 1990.
32. Keller G, Manak M. Radioactive labeling Proceeds and Hybridization Formats, In DNA probes. Stockton press 1990.
33. Maniatis F. Synthetic oligonucleotide probes, In Molecular Cloning a Laboratory Manual. Stockton press 1989.
34. Kemp D, Smith D, Foote S. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reaction. **Proc Natl Sci USA** 1989;**86**:2423-7.
35. Keller G, Huang D, Manak. A sensitive non-isotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. **Anal Biochem** 1989;**177**:27-32.
36. Yolken R, Shuoja H, Perman J. Persistant diarrhea and fecal shedding of retroviral nucleic acid in children infected with Human Immunodeficiency Virus. **J Infect Dis** 1991;**164**:61-6.
37. Loche M, Mach B. Identification of HIV infected seronegative individuals by

direct diagnostic test based on hybridization to amplified viral DNA. **Lancet 1988;ii:418-21.**

38. Oka S, Urayama K, Yoshiro H. Quantitative Analysis of Human Immunodeficiency Virus type 1 DNA in asymptomatic carriers using the PCR. **Biochem & Bioph Res Comm 1990;167:1-7.**

39. In Centers for Disease Control. Clasification system for HIV-infectious Morbidity and Mortality. Weekly Rep 1990;36:334-339.

40. Pinching A. Retrospective Analysis for the evaluation of the propoust WHO Staying of HIV infection State of the Art. Global Program on AIDS, second meeting of the Staring comitee on clinical research and drug development. Geneve 1991.

41. Higuchi P. Simple and Rapid preparation of samples for PCR. In PCR technology principles and applications for DNA amplification. Stockton press 1989.

42. Meyers G. Human retroviruses and AIDS. Acopilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences. **Los Alamos National Laboratory 1989;I:A3-19.**

43. Ratner L, Haseltine N. Complete Nucleotide Sequence of AIDS viruses. **Nature 1985;313:277-80.**

44. Sanchez-Pescador R, Power M, Barr P. Nucleotide Sequence and Expression of an AIDS-asociated Retroviruses. **Science 1985;227:484-92.**

45. Benn S, Rutledge R. Genomic Heterogeneity of AIDS Retroviral Isolates from North America and Zaire. **Science 1985;230:949-52.**

46. Bairoch A. PC-GENE: The Nucleic acid and Protein Sequence Analysis Software System. University of Geneve, Intelligenetic Inc and Genofit S.A. Centre for ICGEBC 1989.

47. Keller G, Manak M. Probes Selection, DNA probes. Stockton press 1990.

48. Gatt M. Introduction to modern methods of DNA synthesis. DNA Synthesis 1989.

49. Davis L, Dibner M, Battey JF. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Co. 1986.
50. Barrow G. Physical Chemistry. McGraw-Hill Book Co. 1966.
51. Hoel P. Elementary Statistics. 5th Ed John Wiley and Sons Inc 1981.
52. Brwner W, Neuman T, Cummings S. Designing a New Study; III Diagnostic Tests, **Design Clin Res 1988;ii:6-15.**
53. Calva J, Ponce de Leon S, Como leer revistas Medicas; II para aprender sobre una prueba diagnostica. **Rev Inv Clin 1988;40:73-83.**
54. Tracy L, Gustafson M. True-Epistat. Copyright 1987, Epistat Services 1989.
55. Jandel S. SIGMA-Plot V 5.0. Scientific Graphic System. Jandel Corporation 1992.
56. Harvard Graphics V 3.0. Software Publishing Co. Bitstream Inc. Copyrigh 1991.
57. Lefrere J, Courauce A, Lambin P. Clinical and biological features in the 12 month preceding onset of AIDS in HIV-infected people. **JAIDS 1989;2:100-1.**
58. Ganesca J, Wang R, Alter H. Clinical correlation and genetic polymorphism of the human immunodeficiency virus proviral DNA obtained after PCR amplifications. **J Infect Dis 1990;162:1025-30.**
59. Simmonds P, Balfe P, Peutherer J. Human Immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of PBMC and at low copy numbers. **J Virol 1990;64:864-72.**
60. Coombs R, Colier A, Allain J. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med 1989;321:1626-31.**