

HIV-1 RNA en Líquido Cefalorraquídeo y Plasma: su Relación en Enfermedades Neurológicas

Tesista: *Bioquímica Adriana M. Rigoni*
Alumna Maestría Microbiología Molecular
UNSAM- ANLIS Inst. Dr. Carlos Malbran
9na Cohorte.

Director: *Dra. Natalia Laufer*
Médica Infectóloga
Investigador Asistente- CONICET
Instituto Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA-INBIRS

Introducción

Virus de la inmunodeficiencia humana

Clasificación

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es un retrovirus que pertenece al género *Lentivirus* incluido en la familia *Retroviridae*. Dicha familia se caracteriza por presentar una enzima que cataliza la transcripción del DNA de doble cadena a partir del RNA genómico [Coffin et al, 1997].

Estructura viral

El virión es una partícula esférica, envuelta, de aproximadamente 100 a 120 nm de diámetro. Las glicoproteínas gp41 (TM, transmembrana) y gp120 (SU, superficie) se hallan asociadas a la envoltura lipídica, de origen celular. La primera es una proteína transmembrana mientras que la segunda se encuentra relacionada a la gp41 en la cara externa de la envoltura viral [Flint et al, 2004]. Ambas proteínas interactúan entre sí de manera no covalente y formando trímeros en la superficie viral. La envoltura está recubierta de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II. La cápside consta de 60 caras triangulares formadas por la proteína estructural p17 (MA, matriz). Dentro de la misma se encuentra la nucleocápside, constituida por la proteína p24 (CA, cápside), que contiene el genoma viral. Asociadas al mismo se encuentran las proteínas p7 (NC, nucleocápside) y la transcriptasa reversa (RT, *Reverse Transcriptase*). Otras proteínas estructurales incluyen a la proteasa (PR) y la integrasa (IN), las cuales, junto a la RT, son codificadas por el gen *pol*.

El genoma viral está constituido por dos cadenas equivalentes de RNA monocatenario con polaridad positiva de aproximadamente 9.2 kb protegidas por la nucleocápside viral. Cada una de las cadenas se encuentra constituida por dos secuencias repetitivas terminales (LTR), tres genes estructurales característicos de los retrovirus (*gag*, *pol*, *env*) y seis genes reguladores (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*).

Dentro de los lentivirus humanos existen dos tipos: HIV-1 y HIV-2. El HIV-1 es el más ampliamente distribuido alrededor del mundo mientras que HIV-2 está restringido a algunas regiones del Centro y Oeste África donde es endémico [Requejo et al, 2006].

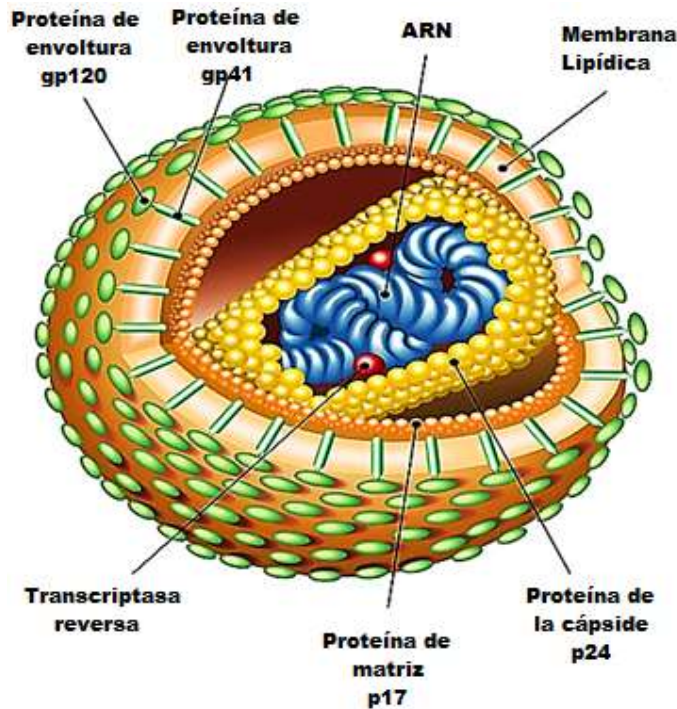


Figura 1: Estructura del virus HIV.

<https://www.healthtap.com/topics/human-immunodeficiency-virus>

La secuenciación del genoma de diferentes HIV-1 aislados, procedentes de diversas regiones, han demostrado una amplia diversidad [Pathak et al, 1990]. Dentro del HIV-1 se han identificado tres grupos distintos: M (el de mayor entidad filogenética), O (*Outlier*) y N (no M, no O) [Requejo et al, 2006]. El grupo M presenta una distribución pandémica y está integrado por al menos 11 subtipos genéticos (A-K). Los subtipos C y B junto con diversas formas recombinantes inter-subtipo son las de mayor prevalencia a nivel global [Requejo et al, 2006].

El mecanismo de generación de la variabilidad de HIV-1 es similar a la de otros retrovirus. La falta de función correctora en las enzimas virales con actividad de transcriptasa reversa implicadas en la replicación lleva a altas tasas de error con la continua generación de variantes (aproximadamente de 10^4 por base y por ciclo de replicación). Las mutaciones incorporadas por la RT viral incluyen sustituciones de aminoácidos por mutaciones puntuales, cambios en el marco de lectura, inserciones y deleciones [Requejo et al, 2006].

Replicación viral.

El ciclo replicativo del HIV comienza con la unión del virus a la célula huésped. Se trata de una unión específica que se inicia con la interacción de la

glicoproteína gp120 de la envoltura viral con el receptor CD4 de la célula huésped [Klatzmann et al, 1984], en la cual intervienen varios correceptores, siendo los más importantes los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4. A partir de esta unión, se produce un cambio conformacional que permite la exposición de un péptido presente en la gp41 que media la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula blanco [Jacobo-Molina et al, 1993; Chan et al, 1998]. Finalmente se produce la liberación de la NC al citoplasma celular y el desnudamiento. Una vez que el virus logra evadir los mecanismos de defensa intracelulares, ocurre la transcripción inversa del genoma viral, catalizado por la enzima viral RT, la cual convierte al genoma viral en una molécula de DNA doble cadena (dcDNA). Este DNA bicatenario puede circularizarse o permanecer de forma lineal, migrando hacia el núcleo celular donde puede integrarse al DNA de la célula hospedadora por acción de la enzima integrasa viral. El DNA viral (vDNA) integrado se denomina provirus. La integrasa media la inserción o integración irreversible del vDNA del HIV en el DNA genómico del huésped. Esta integración se requiere para mantener al genoma del HIV en la célula infectada y para que haya una expresión eficiente de todas las proteínas virales permitiendo la generación de nuevos virus. La integrasa actúa en las tres etapas muy específicas y coordinadas que se requieren para la integración. Inicialmente, *ensambla* secuencias específicas dentro de la región terminal repetida larga (LTR) de cada uno de los extremos del DNA del HIV-1 que ha sido retrotranscrito en su totalidad. En el contexto de este complejo (denominado complejo pre-integración o PIC), la integrasa cataliza las subsiguientes reacciones enzimáticas: *procesamiento final de 3'*, que elimina el dinucleótido terminal 3' de cada uno de los extremos del DNA viral y la *transferencia de cadenas* que se produce por el acoplamiento covalente del DNA viral con el DNA del huésped. [Engelman et al, 1991; Lesbats et al, 2016].

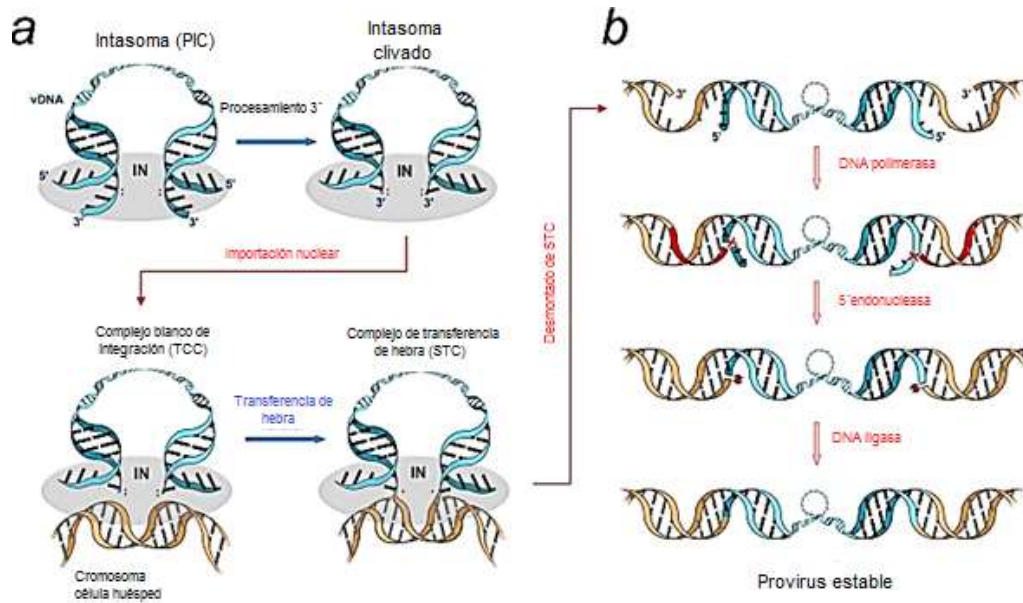


Figura 2: Integración del DNA viral. Reacción catalizada por la IN (a, flecha azul) y las enzimas de la célula huésped (b, flechas rojas). El PIC contiene un multímero de IN (oval, en gris) ensamblada en la región terminal del vDNA. Siguiendo el procesamiento 3' y la entrada nuclear, el PIC clivado une el DNA cromosómico formando un complejo vDNA-IN -DNA huésped (TCC). La inserción del extremo 3' del vDNA en el DNA del huésped resulta en la formación del STC (complejo de transferencia de cadena) con el semi-integrado vDNA. La formación del estable provirus requiere luego del desensamble del STC y la reparación de la cadena por la acción secuencial de una DNA polimerasa, 5' endonucleasa y DNA ligasa. Los puntos rojos representan iones de magnesio en los sitios activos del PIC. Adaptado y traducido de Lesbats, A. Engelman, Cherepanov, P, 2016.

Cuando la célula es activada, el provirus inicia la síntesis de 2 tipos de RNA: el RNA mensajero (RNAm), que será usado para traducir las proteínas estructurales y accesorias y el RNA que constituirá el genoma de la progenie viral.

Las proteínas de envoltura, clivadas y glicosiladas, se ubican en la membrana de la célula huésped. Por otro lado, las proteínas estructurales se ensamblan con el RNA viral cerca de la membrana celular y adquieren la envoltura durante el proceso de brotación. Esta puede producirse de forma lenta, conservando la integridad celular o rápida, conduciendo a la lisis de la célula hospedadora [Fields et al,1996].

Infección por HIV

Vías de transmisión

Si bien se ha detectado la presencia del HIV en todos los fluidos orgánicos, las vías de transmisión se encuentran bien definidas y están circunscriptas a las vías: sexual, parenteral y perinatal. El riesgo de transmisión estará influenciado por factores virales (cantidad y tipo de inóculo) y del huésped.

Historia natural de la infección

La infección por HIV puede ser dividida en forma esquemática para su estudio en los siguientes estadios (algunos de estos estadios ocurren en forma simultánea):

- Transmisión viral.
- Infección primaria por HIV (también llamada infección aguda por HIV o síndrome de seroconversión agudo)
- Seroconversión.
- Período clínico latente con o sin linfadenopatía generalizada persistente (LGP).
- Infección por HIV temprana sintomática (previamente conocida como "complejo relacionado al sida" y luego denominado como Clase B de la clasificación de 1993 del CDC -Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-).
- Sida (condiciones indicadoras de sida según la clasificación de 1987 y su revisión en 1993 del CDC, que incluye un recuento de LT-CD4+ por debajo de 200 células/ μ L independientemente de la presencia o ausencia de síntomas. Cabe destacar que en nuestro país no se utiliza el recuento de LT-CD4+ para definir sida. Dentro de esta misma categoría se incluye a la infección por HIV avanzada caracterizada por recuentos de LT-CD4+ por debajo de 50 células/ μ L.

Infección primaria por HIV — La infección primaria sintomática por HIV ocurre en aproximadamente el 30% de los pacientes y ha sido reportada en todos los grupos vulnerables

La presencia de síntomas y una enfermedad prolongada (mayor de 14 días) se correlacionan con una progresión acelerada a sida [Pedersen et al, 1989; Niu et al, 1993]. Esta progresión dentro de los tres años de la seroconversión es sustancialmente mayor (78 versus 10%) en aquellas personas que presentan síntomas agudos con una duración mayor de 14 días que las que están asintomáticas o presentan síntomas leves [Pedersen et al, 1989].

Luego de la seroconversión, hay una marcada variabilidad en la progresión de la enfermedad en ausencia de tratamiento antirretroviral [Mellors et al, 1995; Lavreys et al, 2006]. En un estudio prospectivo de 218 trabajadoras sexuales en Kenia, con una media de seguimiento de 4,6 años, se correlacionó la progresión acelerada a muerte en aquellas que presentaban mayores niveles de viremia al alcanzar el estado de equilibrio (“*set point*” viral), niveles menores de LT-CD4+, y la presencia de una infección primaria sintomática [Mellors et al, 1995].

Luego de aproximadamente 6 meses de infección, los niveles plasmáticos de viremia alcanzan un estado de equilibrio (“*set point*”) y los linfocitos T-CD8+ juegan un rol crítico en alcanzar ese equilibrio y enlentecer la disminución continua del compartimiento de LT-CD4+ [Pantaleo et al, 1997; Musey et al, 1997].

Seroconversion — En la mayoría de los pacientes comienzan a detectarse anticuerpos específicos para el HIV dentro de las 3 a 6 semanas de la exposición [Lindback et al, 2000].

Una pequeña proporción de los seroconvertidores presentan una respuesta inmune significativa y un control virológico temprano en la infección. Un análisis de 2176 pacientes con seroconversión HIV documentada, reportó que 145 sujetos (7%) controlaron espontáneamente la viremia [Madec et al, 2005].

Periodo clínico latente — El período de infección temprana por HIV se extiende desde la seroconversión hasta aproximadamente los seis meses siguientes a la transmisión del HIV. Durante el período de infección asintomática, los pacientes generalmente no presentan datos positivos en el examen físico, a excepción de linfadenopatías [Pantaleo et al, 1993].

Estudios virológicos en pacientes con infección asintomática por HIV muestran altas tasas de replicación del HIV y destrucción de un promedio de 10^9 LT-CD4+ por día [Wei et al, 1995; Hoet al, 1995]. La muerte y el reemplazo celular se

encuentran en un balance estrecho durante este período, y se obtiene un estado de equilibrio relativo del recuento de LT-CD4+ y viremia plasmática a pesar de las tasas marcadamente altas de recambio de HIV y LT-CD4+ [Henrard et al, 1995].

Infección temprana sintomática por HIV — Este estadio de infección por HIV, es conocido como “Clase B” según la clasificación de 1993 del CDC. Ejemplos de entidades clínicas comprendidas en la clase B se describen en la **Tabla 1**. Aunque estas enfermedades se pueden ver en asociación con muchas otras patologías, son más frecuentes y severas cuando están asociadas a la infección por HIV. Las entidades de la clase B no son condiciones asociadas al sida.

Sida — La definición de sida ha cambiado desde el inicio de la epidemia. La definición de 1987 incluía condiciones indicativas de severa inmunosupresión especialmente inmunidad mediada por células [CDC, 1987]. En cambio, la clasificación revisada tiene tres rangos de recuentos de LT-CD4+ y usa una matriz de nueve categorías que se excluyen mutuamente.

La definición de sida del CDC de 1993, incluye todas las enfermedades marcadoras de sida de la versión de 1987 y agrega tres nuevas: neumonía bacteriana recurrente, cáncer invasivo cervical y tuberculosis pulmonar [CDC, 1992]. El cambio más significativo fue la inclusión en la clasificación de todos los pacientes con LT-CD4+ por debajo de 200 células/ μ L independientemente de la presencia o ausencia de síntomas.

Aproximadamente 30% de los pacientes presenta enfermedades marcadoras de sida con recuentos de LT-CD4 mayores a 200 células/ μ L [Boletín VIH-SIDA, n°33, 2016]. Los pacientes con infección por HIV avanzada presentan un recuento de LT-CD4+ muy bajos, generalmente por debajo de 100 a 50 células/ μ L. La media de supervivencia es de 12 a 18 meses en ausencia de terapia antirretroviral [Yarchoan et al, 1991; Easterbrook et al, 1993]. La mayor parte de los pacientes que fallecen de complicaciones relacionadas a la infección por HIV, presentan recuentos de LT-CD4+ en este rango.

Tabla 1: Estadios clínicos de la infección por el HIV [Henrard et al,1995].

| Estadio Clínico A | Estadio Clínico B | Estadio Clínico C |
|---|--|---|
| <p>Las siguientes manifestaciones constituyen el estadio clínico "A" de la enfermedad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infección o Síndrome retroviral agudo (SRA) • Infección asintomática • Linfadenopatía generalizada persistente (LGP) | <p>El estadio clínico "B" comprende manifestaciones clínicas que denotan progresión de la enfermedad, pero que por sí solas no clasifican al paciente como enfermo de SIDA, es decir que no están en el estadio "A" ni en el "C". Estas condiciones clínicas son:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sintomático (sin condición A ni B) • Candidiasis orofaríngea o vaginal, persistente por más de un mes o que responde pobre-mente al tratamiento. • Leucoplasia vellosa de la lengua • Displasia cervical severa o carcinoma "in situ" • Enfermedad pélvica inflamatoria • Herpes Zoster en más de un dermatoma, o por más de dos episodios • Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI) • Neuropatía periférica • Listeriosis • Angiomatosis bacilar • Síndromes constitucionales (alguno de los siguientes): Síndrome de Fiebre prolongada de origen desconocido por más de un mes Diarrea Crónica de más de un mes. | <p>Entidades definidoras de SIDA:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Candidiasis de los bronquios, tráquea, o pulmones • Candidiasis esofágica • Cáncer cervical invasivo • Coccidioidomicosis diseminada • Criptococcosis extrapulmonar • Criptosporidiasis crónica intestinal (durante más de un mes) • Citomegalovirus en cualquier órgano excepto hígado, bazo, o ganglios linfáticos • Retinitis por citomegalovirus • Encefalopatía asociada al HIV • <i>Herpes simplex</i> causando ulceraciones crónicas por más de un mes, bronquitis o neumonía • Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar • Isosporiasis crónica por más de un mes • Sarcoma de Kaposi • Linfoma de Burkitt, inmunoblástico, o linfoma primario de cerebro • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pulmonar o extrapulmonar • <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> o <i>M. kansasii</i> extrapulmonar • Otras especies de micobacterias diseminadas o extra pulmonares • Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> • Neumonía recurrente (más de dos episodios en un año) • Leucoencefalopatía multifocal progresiva • Septicemia recurrente por <i>Salmonella spp.</i> • Toxoplasmosis cerebral • Síndrome de Emaciación ("<i>Wasting syndrome</i>") con pérdida de peso de más de 4.5kg, o más del 10% del peso habitual. |

HIV en sistema nervioso central (SNC)

Introducción

La infección por HIV es sistémica y compromete múltiples órganos y tejidos. El SNC representa un ambiente favorable para el establecimiento y compartimentación viral que además de ser blanco de la patogénesis, se constituye en un escenario de potencial establecimiento de virus latentes, lo cual representa un desafío en su erradicación. En el SNC, esta situación puede llevar a una disfunción neurocognitiva, la cual puede ser estudiada a partir de autopsias, indirectamente a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) o por medio de modelos animales [Bednar et al, 2015].

Poco después de producirse la infección por HIV, el virus ingresa en el SNC a través de las células mononucleares (monocitos y LT-CD4+) y se establece en los macrófagos perivasculares y las células de la microglia [Schouten et al, 2011]. La replicación del HIV en estas células lleva a la activación del sistema inmune, al aumento de expresión de moléculas de adhesión en tejidos vasculares, que a su vez facilita el tránsito del HIV a través de la barrera hematoencefálica (BHE), y a la producción de proteínas virales por un lado e inflamatorias por otro, que eventualmente pueden llevar a un declive cognitivo y a la disfunción motora en algunos pacientes [Schouten et al, 2011]. La compartimentación viral en el SNC, incluyendo en el LCR, comienza durante el primer año de producida la infección [Satinder et al, 2013]. El SNC, entonces, puede ser un sitio potencial de replicación independiente para el HIV. Las variaciones genéticas y las presiones selectivas asociadas, pueden llevar a un incremento en la prevalencia de variantes divergentes respecto a aquellas asociadas a otros compartimentos [Satinder et al, 2013]. Numerosos estudios han relacionado secuencias específicas del HIV-1, principalmente en la región *gp120*, con el desarrollo de desórdenes neurocognitivos asociados a HIV [Lindback et al, 2000]. Entre ellos, aquellos que asocian tanto tropismo en macrófagos/microglia con genotipos específicos (R5 o X4) [Satinder et al, 2013; Swanstrom et al, 2012].

La infección primaria por HIV (PHI, por sus siglas en inglés) se caracteriza por presentar un temprano y alto pico de RNA de HIV en plasma [Lindback et al, 2000; Fiebig et al, 2003], el cual está asociado con síntomas clínicos en al menos dos tercios de los individuos estudiados [Schacker et al, 1996; Hecht et al, 2002]. Un pequeño grupo de pacientes desarrollan desórdenes neurológicos

alrededor del momento de la seroconversión que incluyen meningitis, encefalitis, mielopatías, neuropatías y poliradiculopatías [Carne et al,1985; Castellanos et al, 1994].

Existe evidencia de que todas las personas que viven con HIV presentarán, independientemente de su estadio clínico, infección en el SNC por este retrovirus. El cuadro podría agravarse aún más frente a la presencia de infecciones oportunistas (IO) en el SNC tales como criptococosis y tuberculosis meníngea. En Argentina, a pesar de un sistema público y de la seguridad social que proveen drogas antirretrovirales en forma gratuita, estas patologías siguen presentándose, entre otras razones, debido a la dificultad al acceso al sistema de salud, la irregular adherencia al tratamiento de los pacientes y al diagnóstico tardío de la infección.

En años recientes, se comenzó a utilizar una nueva terminología, para clasificar a un amplio espectro de desórdenes clínicos y cognitivos, desde alteraciones de menor magnitud (dolor de cabeza, pérdida ligera de memoria, menor velocidad psicomotriz, menor velocidad en el procesamiento de ideas) a presentaciones más severas (disfunción motora, alteración del comportamiento y personalidad, demencia), asociados a la presencia del virus HIV en el SNC [Schouten et al, 2011]. Estudios neuropsicológicos han confirmado que esta discapacidad cognitiva ocurre actualmente en una sustancial proporción de pacientes (15 a 55 %, según diferentes autores), la cual ha sido llamada HAND (del inglés, *HIV-Associated Neurocognitive Disorder*) [Schouten et al, 2011]. HAND se ha convertido en la principal complicación neurológica asociada a la infección por HIV. La Demencia asociada a HIV (HAD, por sus siglas en inglés), incluye un amplio conjunto de signos y síntomas que abarcan deficiencia motora, cognitiva y de comportamiento debido a la replicación activa del virus en SNC [Satinder et al, 2013] y se considera el estadio más grave de HAND. En la década del 90, afectaba entre un 20 a 30 % de los pacientes con avanzada inmunosupresión o sida, sin embargo, ésta comenzó a ser una complicación inusual en nuestros días debido principalmente a la introducción de la terapia antirretroviral combinada (cART de sus siglas en inglés) [Schouten et al, 2011] Sin embargo, esta presentación no ha sido erradicada y cohortes de seguimiento de individuos HIV positivos en EEUU han reportado que el 5 % de los pacientes estudiados reúnen los criterios de HAD a pesar del cART [MacArthur et al, 1993; Becker et al, 2015].

Cuantificación del HIV-1 en SNC y sangre

El LCR provee una ventana simple y accesible al estudio del comportamiento del HIV en el SNC. El espacio ocupado por el LCR y el parénquima cerebral deben observarse como dos compartimentos separados, pero en permanente interacción. El grado de interacción entre ambos puede ser diferente de acuerdo a la situación clínica, lo que requiere cierta precaución al pretender interpretar eventos que ocurren en el parénquima cerebral en función de los hallazgos en el LCR. En ciertas circunstancias el LCR puede ser un reflejo exacto de los fenómenos que ocurren en el parénquima, ya que la infección viral en el tejido se traslada directamente al LCR, como se propone en el modelo de *infección autónoma* (se detallará más adelante), a través de los macrófagos perivasculares. En otro contexto el LCR puede presentar una situación similar al parénquima cerebral, aunque no necesariamente idéntica, ya que el comportamiento del HIV en este fluido puede estar influenciado por el pasaje de células inmunes, citoquinas y drogas antirretrovirales.

La presencia del HIV-1 en plasma y LCR puede ser detectada y cuantificada (Carga Viral, CV) a través de técnicas moleculares [DeBiasi et al, 2004]. Niveles de RNA HIV-1 plasmáticos pueden ser medibles luego de un breve período post exposición llamado fase de eclipse (3.1 a 8.1 días) [Fiebig et al, 2003]. En cambio, RNA HIV-1 y DNA proviral han sido detectados en distintos compartimentos del SNC durante los primeros meses post infección; la detección más temprana en SNC fue reportada al octavo día posinfección [Spudich et al, 2013]. Los niveles en plasma del RNA del HIV-1 reflejan el estatus de la replicación sistémica del virus [Christo et al, 2005]. Generalmente los niveles de RNA del HIV-1 en LCR suelen ser diez veces menores en valor absoluto con respecto al plasma y suele existir una correlación entre la carga viral en el LCR y el plasma, en los individuos bajo terapia cART [Spudich et al, 2012].

Modelos de intercambio del virus entre sangre-SNC

En el año 2005, Spudich et al, publicaron un estudio donde conceptualizaron los cambios que sufre el SNC, mediante un modelo de intercambio del HIV y linfocitos, entre los compartimentos del SNC e intravascular, que varía de acuerdo al estadio clínico de la infección. El modelo se basa en dos tipos de infección, que ellos denominaron: *infección transitoria* e *infección autónoma* [Spudich et al, 2005].

Infección transitoria: se refiere a la infección sostenida por el tránsito de las células LT de corta vida CD4+ dentro del SNC a partir de sangre. Estos linfocitos T infectados pueden liberar HIV al líquido circulante. La infección se basa entonces en la infección sistémica que presiona la entrada del virus al SNC.

Infección autónoma: se refiere a la infección que es sostenida dentro del SNC por células de larga vida y que no requieren el continuo ingreso desde sangre. Este tipo de infección se asume como “compartimentada” y es sostenida principalmente por células del linaje de monocitos y macrófagos en vez de linfocitos. Cuando este tipo de infección es acompañada por pleocitosis, las células reactivadas infectadas son empujadas al SNC y pueden coexistir ambos tipos de infección.

Se reportó que la *infección transitoria* ocurre dentro de los primeros estadios de la infección sistémica, pero puede conducir hacia a la *infección autónoma* a medida que se desregulariza el sistema inmune. Esta hipótesis se basa en la dinámica del virus cuando se administra cART a sujetos cursando la fase temprana de infección. En ellos se evidenció una rápida caída de la carga viral en LCR equivalente a la observada en plasma a pesar del pasaje limitado de algunos de los antirretrovirales a través de la barrera hematoencefálica. Esto indicaría que, incorporando el modelo de *infección transitoria*, cuando se produce la supresión de la infección sistémica, disminuye la tasa de entrada de linfocitos activados al SNC, reduciendo el influjo de estas células y decreciendo la carga viral en SNC. La evolución de la *transitoria* a la *infección autónoma* en estadios más avanzados de la infección, explicaría la menor disminución de la carga viral en SNC con respecto a la plasmática [Christo et al, 2007]. La infección en el SNC puede ser *amplificada* por la entrada de células T infectadas activadas, las cuales aumentan el tránsito a través de la barrera endotelial de citoquinas y otras moléculas inflamatorias. La *infección amplificada* puede oscurecer la subyacente *infección autónoma* y puede responder más rápidamente al tratamiento sistémico [Spudich et al, 2005].

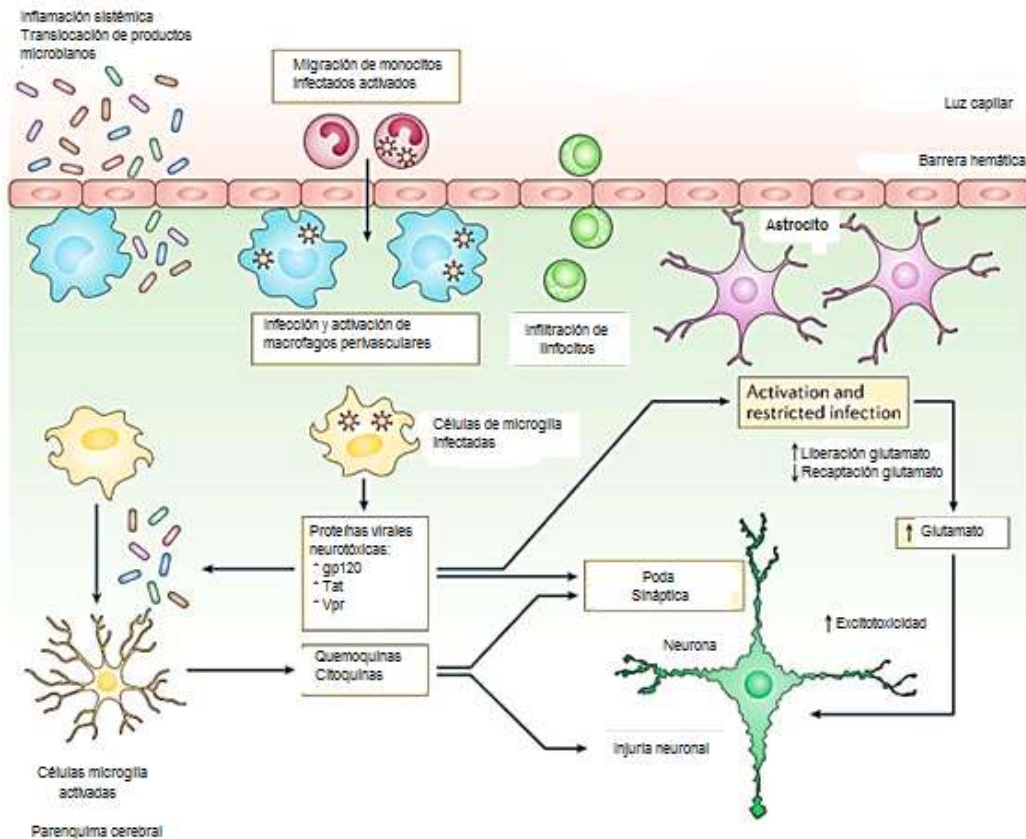


Figura 3: Mecanismos neuropatogénicos que contribuyen a los desórdenes neurocognitivos asociados a HIV (HAND). Macrófagos y células de la microglia infectadas por HIV liberan proteínas neurotóxicas virales que gatillan la activación de astrocitos, lo cual resulta en un aumento en la liberación de glutamato y la captura del glutamato reducido. Niveles aumentados de glutamato extracelular causa disturbios bioenergéticos neuronales que conducen a aberrantes sinapsis e injuria neuronal. Además, la inflamación sistémica y los productos de translocación microbiana llevan a la activación de la microglia y al aumento de la producción de quimioquinas y citoquinas que contribuyen a la injuria neuronal. Adaptado de Williams, D. W. et al. *Curr. HIV Res.* 12, 85-96, 2014. [Saylor et al, 2016]

Factores que afectan la carga viral en SNC y sangre

Numerosos estudios se han llevado a cabo para poder establecer si existe o no una relación entre la carga viral de HIV en plasma y LCR frente a los trastornos neurológicos asociados al virus [Christo et al, 2005, 2007; Spudich et al 2005]. Sin embargo, diferentes escenarios contribuyen a que no se haya podido establecer una relación clara entre ellos (tipo de hospedador, ruta de infección, compartimentación del virus, infecciones oportunistas asociadas, tratamiento antirretroviral recibido, entre otros) [Spudich et al, 2012]. Sin embargo, autores han concluido que la magnitud de la diferencia entre los valores de RNA de HIV en el plasma y en el LCR puede variar en función de dos factores principalmente:

el grado de inmunosupresión y la presencia de pleocitosis en el LCR. Spudich et al, en un estudio prospectivo con 100 pacientes, demostró que la relación carga viral en plasma / carga viral en LCR tiende a ser baja (5 a 20) en individuos con altos recuentos en sangre periférica de LT-CD4+ y en aquéllos con pleocitosis en el LCR (definida como recuento de leucocitos en el LCR > 4 células/mL). Comparativamente, el cociente tiende a ser mayor (100 a 1000) en individuos con recuentos bajos de LT-CD4 + en sangre periférica, en los cuales la pleocitosis en el LCR es menos común [Spector et al, 1993]. También demostró que la carga viral de HIV en LCR no se relaciona con el recuento de células LT-CD4+ plasmático, pero que recuentos < 50 células/ μ L está asociado con una baja prevalencia de pleocitosis y altas diferencias de carga viral entre plasma y LCR.

Evidencias de poblaciones compartimentadas en SNC y sangre

Se han observado diferentes variantes virales de HIV en SNC y sangre, lo cual puede deberse a que las mismas pueden originarse por rutas diferentes [Tang et al, 2000; Pillai et al, 2006].

Se han descrito tres posibles escenarios al comparar las variantes virales encontradas en LCR y a nivel plasmático. El estado de equilibrio (cuando el virus en sangre y en LCR son muy similares), *compartimentado* (cuando ambas poblaciones son distintas, indicando evolución separada en ambos compartimientos) y dentro de éste, la *amplificación clonal* (donde una simple variante es mayormente amplificada en uno de los compartimientos). La amplificación clonal y compartimentación del HIV-1 subtipos B y C en LCR han sido descritos usando análisis filogenéticos evaluando la región del gen *env* en adultos [Olivieri et al, 2009; Harrington et al, 2009] y en niños [Sturdevant et al, 2012]. Otros estudios han encontrado los mismos patrones de amplificación clonal y compartimentación al evaluar las regiones de los genes *pol*, *tat* y *nef* [Olivieri et al, 2009; Churchill et al, 2013]. El uso de drogas antirretrovirales y su penetración en el SNC son potenciales mecanismos de selección de diferentes cepas de HIV-1, ya que diferentes fenotipos de resistencia pueden observarse entre las cepas circulantes en plasma y en LCR [Swanstrom et al, 2012]. Aún más, el recambio diferencial de los linfocitos en circulación versus los macrófagos de larga vida media en SNC puede ser una de las razones que contribuyan a la presencia de variantes virales diferentes en ambos compartimientos [Spudich et al, 2012].

Las poblaciones virales compartimentadas, genéticamente distintas de las poblaciones virales replicando en la periferia, pueden ser detectadas en SNC/LCR a lo largo de todo el curso de la infección [Harrington et al, 2009]. Como se mencionó anteriormente, dos tipos de compartimentación han sido definidos, la primera es la amplificación clonal, la cual consta de una rápida expansión de variantes genéticamente similares conduciendo a una población viral en LCR de baja complejidad. Estas poblaciones requieren altos niveles de LT-CD4+ para entrar, por ello utilizan correceptores CCR5 (R5- trópicas). Durante la infección primaria (PHI), estas poblaciones clonalmente amplificadas han sido detectadas tempranamente, entre 2 a 6 meses post infección [Sturdevant et al, 2015]. Existe una segunda y más compleja forma de compartimentación viral en LCR, que generalmente está conformada por virus macrófagos-trópicos, que corresponden a infecciones de mayor tiempo, indicativo de un período prolongado de aislada replicación y evolución [Bednar et al, 2015]. Cabe aclarar que el SNC contiene 4 tipos de macrófagos: microglia, macrófagos perivasculares, macrófagos meníngeos y macrófagos del plexo coroideo, como así también otras células de larga vida, como monocitos circulantes y astrocitos. Dada la baja tasa de recambio de estas células, son poblaciones en SNC donde el virus puede permanecer latente (definido como provirus integrado, pero transcripcionalmente silente). Dado que estos virus adaptados a macrófagos, generalmente usan el correceptor CCR5, son llamados R5 macrófagos trópicos (M trópicos) [Bednar et al, 2015]. La infección en macrófagos en SNC ha sido implicada en desórdenes neurológicos en pacientes HIV [Schnell et al, 2010; Sturdevant et al, 2012] y la mayor evidencia de infección en macrófagos ha sido vista en SNC de pacientes infectados cursando HAND [Power et al, 1994; Rossi et al, 2008; Schnell et al, 2009].

HAND, patogénesis y avances

Habiendo descripto la compleja relación entre el HIV y el SNC, es tiempo de detallar los avances realizados en los últimos 20 años con respecto a la infección por este retrovirus.

Distintos avances han mejorado dramáticamente el cuidado y el pronóstico de individuos infectados por HIV. A través de los cuales se modificó el curso de una infección limitante, (con baja expectativa de vida, presencia de complicaciones malignas e infecciones oportunistas fatales) hacia una infección crónica que

puede ser manejada clínicamente y que presenta una mejoría sustancial en la calidad y expectativa de vida [Fauci et al, 2015].

Se pudo establecer la relación directa que existe entre la replicación del HIV y la subsecuente progresión inmunológica y clínica. Este hallazgo enfatizó la necesidad de suprimir completamente la replicación en orden de controlar la progresión de la enfermedad [Saylor et al, 2016].

El segundo gran avance fue el desarrollo y empleo de cART, el cual puede proveer una supresión efectiva y sistémica de la replicación del virus. La introducción de cART a mediados de los '90 resultó en una disminución del 50% en la tasa de mortalidad por sida, de la tasa de transmisión materno-infantil, de la incidencia de infecciones oportunistas, y de la incidencia de HAD, la cual disminuyó en un 40-50% [Maschke et al, 2000].

El tercer avance importante en el manejo de los pacientes infectados por HIV, es la posibilidad de monitorear el estatus del paciente a través de medidas confiables de los niveles de RNA-HIV en plasma, el recuento de LT-CD4+ y determinar los perfiles de resistencia a las drogas antirretrovirales. La carga viral es usada, no sólo para confirmación de diagnóstico de infección [www.msal.gov/sida] sino también para monitorear la supresión viral sistémica en los pacientes tratados y la determinación de los perfiles de resistencia es usado en el monitoreo del posible desarrollo de resistencias a los antirretrovirales (ARVs) y elegir el régimen cART de mayor efectividad para un paciente dado [DHHS, 2016]. Las técnicas en biología molecular han proporcionado la plataforma necesaria para estos estudios.

El avance de suma relevancia en el cuidado de los individuos infectados, es la recomendación de iniciar cART en todo sujeto con diagnóstico de infección por HIV, independientemente del recuento de LT-CD4+. Esta recomendación está avalada por los resultados publicados por Strategic Timing of Antirretroviral Therapy (START), el cual demostró los beneficios de un temprano inicio de cART [The INSIGHT START Study Group, 2015]. En este estudio internacional de más de 4.600 pacientes naive de tratamiento, con recuentos de LT-CD4+ > 500 células/ μ L, el inmediato inicio de cART resultó en un menor número de presentación de eventos relacionados y no relacionados con sida a diferencia de la cantidad presentados en aquellos pacientes con recuentos celulares menores a 350 células/ μ L.

Sin embargo, a pesar de todos estos conocimientos adquiridos en estos años, se asume que cART no es la única opción para prevenir o detener la progresión a HAND, ya que permanece como la mayor causa de trastorno cognitivo en pacientes HIV+, aún en aquellos que se encuentran bajo cART [Tozzi et al, 2007; Heaton et al, 2010]. Distintas hipótesis han planteado que la persistencia del proceso inflamatorio en SNC, aun cuando la replicación viral sistémica ha sido suprimida por tratamiento antirretroviral, está directamente relacionada a la presentación de HAND [Saylor et al, 2016]. Saylor et al, publicaron en 2016 una recopilación de los últimos avances en HAND en la era cART, enfatizando que la proporción de pacientes que sufren este desorden no ha variado con respecto a la era pre-cART, aunque la presentación más frecuente es la más moderada (70 % de todos los HAND) [Heaton et al, 2010]. El recuento de LT-CD4+ permanece fuertemente asociado con la presentación de HAND, aún en pacientes virológicamente suprimidos por cART [Heaton et al, 2011]. Por el contrario, HAD, es mucho menos prevalente en pacientes recibiendo tratamiento antirretroviral, y cuando ésta ocurre, no suele estar asociada a severa inmunosupresión (bajo recuento de LT-CD4+ y alta carga viral en LCR y sangre) como solía estar relacionada en la era pre-cART [Heaton et al, 2011]. De hecho, los autores describen los nuevos factores de riesgo para aquellos pacientes HIV+ de desarrollar HAND con cART. Se detallan en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1: Factores de riesgo para HAND en era cART

| |
|---|
| Edad avanzada |
| Bajo recuento de LT-CD4+ |
| Uso de drogas ilícitas |
| Hepatitis C |
| Enfermedades Cerebrovasculares |
| Diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, obesidad |
| Desordenes de sueño: insomnio, apnea obstructiva del sueño, fragmentación del sueño |
| Comorbilidad psiquiátrica: ansiedad, depresión mayor, desorden bipolar |

Adaptado y traducido de Saylor et al [Saylor et al, 2016]

Finalizando, HAND sería actualmente la más importante forma de desorden neurocognitivo en pacientes infectados con HIV alrededor del mundo. Dos escenarios disímiles entre sí contribuyen a este hecho. Por un lado, el aumento en la expectativa de vida de los pacientes bajo cART, hecho que aumenta el riesgo de desarrollar el síndrome. Y por el otro lado, el tratamiento disponible por el momento, si bien puede suprimir la replicación viral, no ha podido suprimir el desarrollo de este desorden.

En conclusión, se abre un nuevo camino en el diagnóstico de trastornos neurológicos asociados a HIV, que incluye biomarcadores de la inmunidad y el daño neurológico, además de los estudios moleculares. Nuevas metodologías en biología molecular, asociadas a bioingeniería nos podrían ayudar a estudiar la presencia de HIV en los compartimientos tisulares usados como reservorios y la dinámica de la infección de este retrovirus.

Hipótesis central a desarrollar

El estudio a nivel molecular del HIV presente en LCR en paralelo con el presente en sangre periférica, en pacientes infectados por HIV-1 podría ser una importante herramienta para el entendimiento de los mecanismos y la dinámica de la infección en el SNC, dado que el mismo corresponde a un compartimiento tisular aislado.

Se plantea como hipótesis que en individuos HIV positivos con manifestaciones neurológicas, las variantes virales en sangre periférica no se correlacionarán con las variantes halladas en el SNC, evaluado este compartimiento a través del estudio del LCR. Por lo cual será necesario que dichos parámetros sean evaluados en paralelo a fin de determinar el manejo y tratamiento óptimo de estos sujetos.

Materiales y métodos

Se enrolaron 12 pacientes adultos HIV-1 positivos que ingresaron al Hospital Magdalena V. de Martínez, entre octubre 2015 y junio del 2017, con sospecha de enfermedad neurológica y a quienes el médico tratante indicó la realización de una punción lumbar con el fin de filiar el cuadro clínico.

Paralelamente se realizó la extracción de sangre, dentro de las 24 horas de realizada la punción lumbar, para medición de CV HIV-1 en plasma y recuento de LT-CD4. Ambas muestras, fueron derivadas al Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA INBIRS (ex Centro Nacional de Referencia para el SIDA). Aquellas muestras que resultaron en cargas virales detectables, fueron separadas para la determinación de mutaciones asociadas resistencia a ARVs por secuenciación poblacional.

La información recolectada de los pacientes incluyó sexo, edad, uso de terapia antirretroviral y síntomas neurológicos. Los estudios bioquímicos incluyeron hemograma, recuento de LT-CD4, parámetros bioquímicos de rutina (glucemia, perfil renal y hepático), estudios serológicos (VDRL, hepatitis B, C, Citomegalovirus, Epstein Bar y Toxoplasmosis) y en LCR se determinó glucorraquia, proteinorraquia, recuento celular, tinción de Gram, tinta china para criptococo, cultivo para bacterias/hongos y diagnóstico viral directo (cuando fue solicitado). Para el desarrollo de la presente investigación se respetaron las normas de bioseguridad institucionales, nacionales e internacionales vigentes para el envío y procesamiento de fluidos biológicos.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Municipal Materno Infantil de San Isidro " Dr. Carlos Gianantonio". Todos los pacientes recibieron un formulario de Consentimiento Informado que les fue explicado y firmaron en forma libre y voluntaria. En el caso de no hallarse el paciente consciente, un familiar directo asintió al estudio. En el Consentimiento Informado se explicó claramente el desarrollo y los estudios de la presente investigación. Los resultados de las cargas virales del plasma y el LCR, así como los perfiles de resistencia, estuvieron disponibles tanto para el paciente como para el médico tratante a fines de iniciar o modificar el tratamiento antirretroviral cuando lo consideraran oportuno.

Laboratorio de biología molecular

1-Determinación de carga viral

El RNA de HIV-1 fue cuantificado a partir de plasma centrifugado y LCR sin centrifugar, muestras recolectadas por duplicado, mediante el equipo Abbott Real Time HIV-1 (Illinois, USA). Se recolectaron 10 ml de sangre periférica en tubos BD Vacutainer® PPT™ (Becton Dickinson and Company, N. Jersey, USA),

y hasta 1,0 ml de LCR en tubos tapa a rosca Crio-Vial ExtraGene (ExtraGene, Taiwán) de cada paciente, que fueron conservados a -70°C hasta su procesamiento. El procesamiento de ambas muestras se realizó en paralelo.

Se utilizaron reactivos Abbott Real Time HIV-1 y el equipo Abbott M2000 Real Time System, el cual incluye dos instrumentos, el *m2000rt* (real time PCR) y *m2000sp* (extracción automatizada) (Illinois-USA). El ensayo Abbott Real Time HIV-1 utiliza la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con la detección de fluorescencia homogénea en tiempo real. El sistema automatiza una serie de pasos en el procesamiento, como el pipeteo, el cual ayuda a reducir el tiempo manual requerido para la preparación de la muestra y su posible contaminación. El diseño de la sonda fluorescente, doble cadena parcial, permite la detección de distintos subtipos del grupo M y cepas del grupo O. [Lesley, 2009]

Dicho ensayo está estandarizado frente al patrón vírico del Virology Quality Assurance (VQA) Laboratory del AIDS Clinical Trial Group (Grupo de Ensayo clínico del SIDA) [Yen-Lieberman et al, 1996], y frente al primer patrón Internacional para RNA del HIV-1 (97/656) de la OMS [Holmes et al, 2001; Davis et al, 2003].

El proceso involucró los siguientes pasos:

1- Preparación de la muestra: se introduce en cada una de ellas una secuencia de RNA no relacionada con la secuencia diana del HIV-1. Esta secuencia de RNA no relacionado se amplifica simultáneamente por RT-PCR y sirve como control interno (IC) para demostrar que el proceso se ha realizado correctamente para cada muestra. La secuencia del IC procede del gen de hidroxipiruvato reductasa de la planta de la calabaza y se utiliza en una partícula Armored RNA® que ha sido diluida en plasma humano negativo.

2- Extracción y purificación: concentrar las moléculas de RNA target posibilitando que el RNA sea accesible a la amplificación y eliminando los posibles inhibidores de la amplificación del extracto. El instrumento Abbott *m2000sp* utiliza la tecnología de partículas magnéticas para capturar los ácidos nucleicos y lava las partículas de los componentes de la muestra no ligados. Los ácidos nucleicos ligados se eluyen y se transfieren a la placa de 96 pocillos. Los ácidos nucleicos están listos para la amplificación. El control interno (IC) se lleva a cabo a lo largo de todo el protocolo de preparación de muestra, junto con los calibradores, los controles y las muestras.

3- RT- PCR: el sistema Abbott *m2000sp* combina los componentes de los reactivos de amplificación Abbott Real Time HIV-1 (reactivo de oligonucleótidos HIV-1), Thermostable rTth Polymerase Enzyme (enzima polimerasa *Thermus thermophilus* DNA Polimerasa, rTth termoestable) y reactivo de activación. Luego, dispensa la mezcla resultante en la placa de reacción óptica de 96 pocillos de Abbott junto con las alícuotas de las muestras de ácidos nucleicos preparadas en el sistema Abbott *m2000sp*. Después de la colocación manual del sello óptico, la placa está lista para ser transferida al sistema Abbott *m2000rt*.

Reactivos:

- Enzima Polimerasa termoestable, *Thermus thermophilus* rTth, 2,9 a 3,5 U/ul, en solución tamponada.
- Oligonucleótidos HIV-1: 4 primers, 2 sondas y 1 oligonucleótido extintor de fluorescencia, dNTPs en solución tamponada con colorante de referencia. Conservantes: ProClin 300 al 0,1 % y ProClin 950 al 0,15 %
- Reactivo de activación: solución de cloruro de Manganeso 30mM. Conservantes ProClin 300 al 0,1 % y ProClin 950 al 0,15 %

El RNA diana se convierte en cDNA durante la reacción de la amplificación en el sistema Abbott *m2000rt*, debido a la actividad de la transcriptasa reversa de la polimerasa rTth DNA termoestable. En primer lugar, los primers inversos del HIV-1 y del control interno hibridan (*annealing*) con sus dianas correspondientes y se elongan durante un periodo de incubación prolongado. Después del paso de desnaturalización, en el que la temperatura de reacción se eleva por encima de la temperatura de fusión del producto cDNA: RNA de cadena doble, un segundo primer hibrida con la cadena cDNA y mediante la actividad de la DNA polimerasa de la enzima rTth se elonga hasta crear un producto de DNA de cadena doble.

Durante cada serie de termociclado, los productos amplificados se disocian en cadenas sencillas a temperaturas elevadas permitiendo la hibridación (*annealing*) y la elongación de los primers a medida que desciende la temperatura. La amplificación exponencial del producto se consigue mediante la repetición de ciclos de ascenso y descenso de la temperatura, dando lugar a una amplificación de las secuencias diana de un mínimo de mil millones de veces. La amplificación de ambas dianas (HIV-1 y control interno) tiene lugar simultáneamente en una misma reacción.

Los primers hibridan con una región de la IN del gen *pol* del genoma del HIV-1, región altamente conservada [Myers et al, 1994].

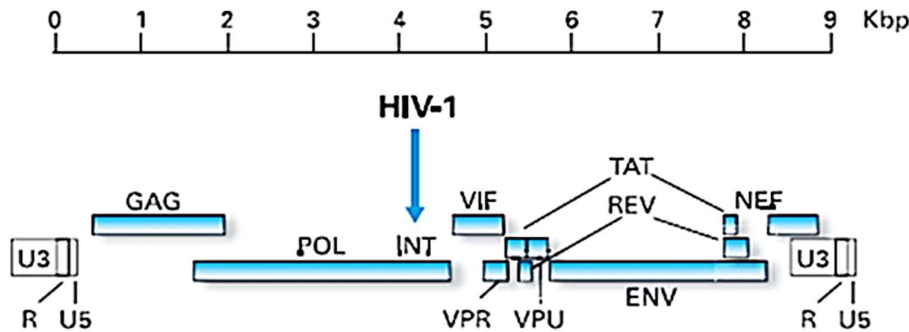


Figura 4: Mapa del genoma del RNA HIV. <https://www.molecular.abbott/us>

4- Durante los ciclos de lectura de amplificación en el sistema Abbott *m2000rt*, la temperatura se reduce para permitir la detección de la fluorescencia de los productos amplificados cuando las sondas del HIV-1 y del control interno hibridan con las dianas respectivas (detección de la fluorescencia en tiempo real).

La sonda que hibrida con el cDNA HIV-1 consiste en dos fragmentos de DNA de diferente longitud: la más larga es complementaria al DNA target y está unida covalentemente a un marcador fluorescente en el extremo 5', mientras que el fragmento más corto une la molécula extintora (quencher) en el extremo 3'. La ventaja del uso de este tipo de sondas es su aumentada tolerancia a las disparidades (*mismatches*), lo cual es particularmente útil en virus con alta tasa de mutaciones como el HIV [Lesley, 2009]. En ausencia de cDNA de HIV-1, la sonda fluorescente de HIV-1 se extingue, ya que el extintor de fluorescencia está próximo al fluoróforo por lo cual se impide la emisión de fluorescencia. En presencia de secuencias de diana de HIV-1, la sonda HIV-1 hibrida preferentemente con la secuencia diana, separándose del oligonucleótido extintor de fluorescencia y permitiendo la detección de la fluorescencia.

La sonda de control interno es un oligonucleótido de DNA de cadena sencilla con un fluoróforo en el extremo 5' y un extintor de fluorescencia en el extremo 3'. En ausencia de secuencia diana de control interno, la sonda fluorescente es extinguida. En presencia de secuencias diana de control interno, la sonda

hibrida con las secuencias complementarias separando el fluoróforo y el extintor de fluorescencia y permitiendo la emisión y detección de la fluorescencia.

Las sondas específicas de HIV-1 y de control interno están marcadas cada una con un fluoróforo distinto, lo que permite la detección simultánea de los dos productos amplificados en cada ciclo. El ciclo de amplificación por el que el sistema Abbott *m2000rt* detecta una señal fluorescente es proporcional al log de la concentración de RNA del HIV-1 presente en la muestra original.

5- Para la determinación cuantitativa de las concentraciones de RNA del HIV-1 de las muestras y de los controles se requiere una curva de calibración. Para generar una curva de calibración se procesan dos calibradores del ensayo en replicados de 3. La pendiente y la ordenada en el origen de la curva de calibración se calculan a partir de la concentración de RNA del HIV-1 asignada y la mediana del ciclo umbral observado para cada calibrador y se almacenan en el instrumento. La concentración de RNA del HIV-1 en muestras y controles se calcula a partir de la curva de calibración almacenada, y los resultados se comunican automáticamente a la estación de trabajo del *m2000rt*. En cada procesamiento deben incluirse un control negativo, un control positivo bajo y un control positivo alto Abbott Real Time HIV-1 para verificar la validez del procesamiento. El sistema *m2000* verifica que los controles se sitúen dentro de los intervalos de valores asignados.

Controles de calidad:

- Control de calidad interno: Armored RNA no infeccioso con secuencias de control interno en plasma humano negativo. Plasma humano negativo analizado, no reactivo para HBsAg, RNA de HIV, RNA de HCV, ni DNA de HBV, ni reactividad frente a anticuerpos HIV1/2, ni anti-HCV.
- Control negativo: plasma humano negativo analizado para HBsAg, RNA de HIV, RNA de HCV, DNA de HBV, ni reactividad de anticuerpos anti HIV-1/2, ni anti HCV.
- Control positivo bajo: Armored RNA no infeccioso con secuencias de HIV-1 en plasma humano negativo. Ídem consideraciones del plasma humano al control negativo.
- Control positivo alto: Armored RNA no infeccioso con secuencias de HIV-1 en plasma humano negativo. Ídem consideraciones sobre el plasma humano.

2- Determinación de resistencia a antirretrovirales por genotipificación

Método *validado por el laboratorio (“in house”)*

Genotipificación: detección de las mutaciones en las regiones del gen *pol*, codificantes para la *retrotranscriptasa* (codones 1 a 255) y la *proteasa* (codones 1 a 99) por secuenciación. Se realizó de acuerdo a los siguientes pasos:

- Purificación de RNA HIV-1 a partir de las muestras de plasmas y LCRs con columnas de purificación QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Alemania).
- Retrotranscripción del RNA viral y amplificación del cDNA obtenido en dos rondas de PCR diseño *in-house*, Termociclador Mastercycler® Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- Corrida electroforética en gel agarosa al 1% y revelado por luz UV, para verificación del producto obtenido (banda de 1192 pb).
- Secuenciación: se realizó por electroforesis capilar con el equipo Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer (Foster City, California, USA) sobre la porción de cDNA amplificado anteriormente.

El procesamiento y análisis de secuencias obtenidas se realizó mediante la utilización del programa RECall (<http://pssm.cfenet.ubc.ca/home/index>) y el envío de las mismas a la base de datos de la Universidad de Stanford (HIV Drug Resistance Database, Standford University).

Debido a que no se detectan mutaciones primarias en el gen de la *integrasa* en individuos sin experiencia con inhibidores de la IN (InIN), independientemente de su exposición a otros agentes antirretrovirales o a la duración de la enfermedad por HIV-1 [Hazuda, 2010], los pacientes de este estudio no calificaban para realizar la secuenciación de este gen, el cual no se realiza rutinariamente.

2.1 Purificación

El kit QIAamp Virus Spin (Quiagen, Hilden, Alemania) es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice (tecnología QIAamp) para aislar y purificar los ácidos nucleicos virales procedentes de muestras biológicas [QIAamp®, 2014].

El procedimiento está diseñado para evitar la contaminación cruzada entre muestras, y para poder manipular con seguridad muestras potencialmente infecciosas. El procedimiento es especialmente adecuado para el procesamiento simultáneo de múltiples muestras. Los ácidos nucleicos virales se eluyen en

tampón de elución (AVE), quedando listos para su utilización en reacciones de amplificación o almacenarse a -20°C .

El procedimiento comprende 4 etapas:

- Lisis de las partículas de virus presentes en la muestra, con proteasa y tampón de lisis (AVL) que garantizan conjuntamente la inactivación de las RNAsas.
- Unión de los ácidos nucleicos virales del lisado a la membrana de una columna QIAamp
- Lavado de la membrana
- Elución de los ácidos nucleicos virales de la membrana

Unión de los ácidos nucleicos a la membrana de la columna QIAamp Spin: Para optimizar la unión del RNA viral a la membrana de la columna QIAamp primero se añade etanol 96° a los lisados. Cada uno de los lisados se aplica entonces a una columna QIAamp spin y, a medida que la atraviesa, los ácidos nucleicos virales se adsorben sobre la membrana de gel de sílice.

Eliminación de los contaminantes residuales: Mientras que los ácidos nucleicos virales se mantienen unidos a la membrana de la columna QIAamp, los contaminantes se eliminan de manera eficaz primero con tampón de lavado 1 (AW1), después con tampón de lavado 2 (AW2).

Elución de los ácidos nucleicos puros: Los ácidos nucleicos virales se eluyen de la membrana de la columna QIAamp usando el AVE. Las sales y el pH garantizan que las proteínas y otros contaminantes que pueden inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas posteriores no se retengan en la membrana QIAamp.

Tampón de elución AVE con ARN transportador: El ARN transportador (RNA *carrier*) tiene dos funciones. En primer lugar, potencia la unión de los ácidos nucleicos virales a la membrana QIAamp, especialmente si en la muestra hay pocas moléculas diana. En segundo lugar, la adición de grandes cantidades de RNA transportador reduce las posibilidades de degradación del RNA viral en el caso poco frecuente de que las moléculas de RNAsa no se desnaturalicen por efecto de las sales caotrópicas y del detergente del tampón de lisis. Si no se añade RNA transportador al tampón, la recuperación del RNA viral puede ser menor.

2.2 Retrotranscripción

Luego de la extracción del RNA viral se procedió a la Retrotranscripción del mismo, según el siguiente protocolo:

| Mix One Step RT-PCR Reaction | Volumen |
|--|----------|
| Agua purificada DEPC tratada | 2,00 ul |
| 50% solución Sucrosa -Blue | 2,00 ul |
| 2X Mix de reacción | 10,00 ul |
| 5 nM MgSO ₄ | 3,20 ul |
| CP1 25 uM | 0,20 ul |
| RT3.1 25uM | 0,20 ul |
| SuperScript™ III RT/Platinum Taq HiFi Mix Enzima | 0,40 ul |
| Volumen de reacción por muestra | 18,00 ul |

5': CP1 GAAGGGCACACAGCCAGAAATTGCAGGG (forward)

3': RT3.1 GCTCCTACTATGGGTTCTTTCTCTAACTGG (reverse)

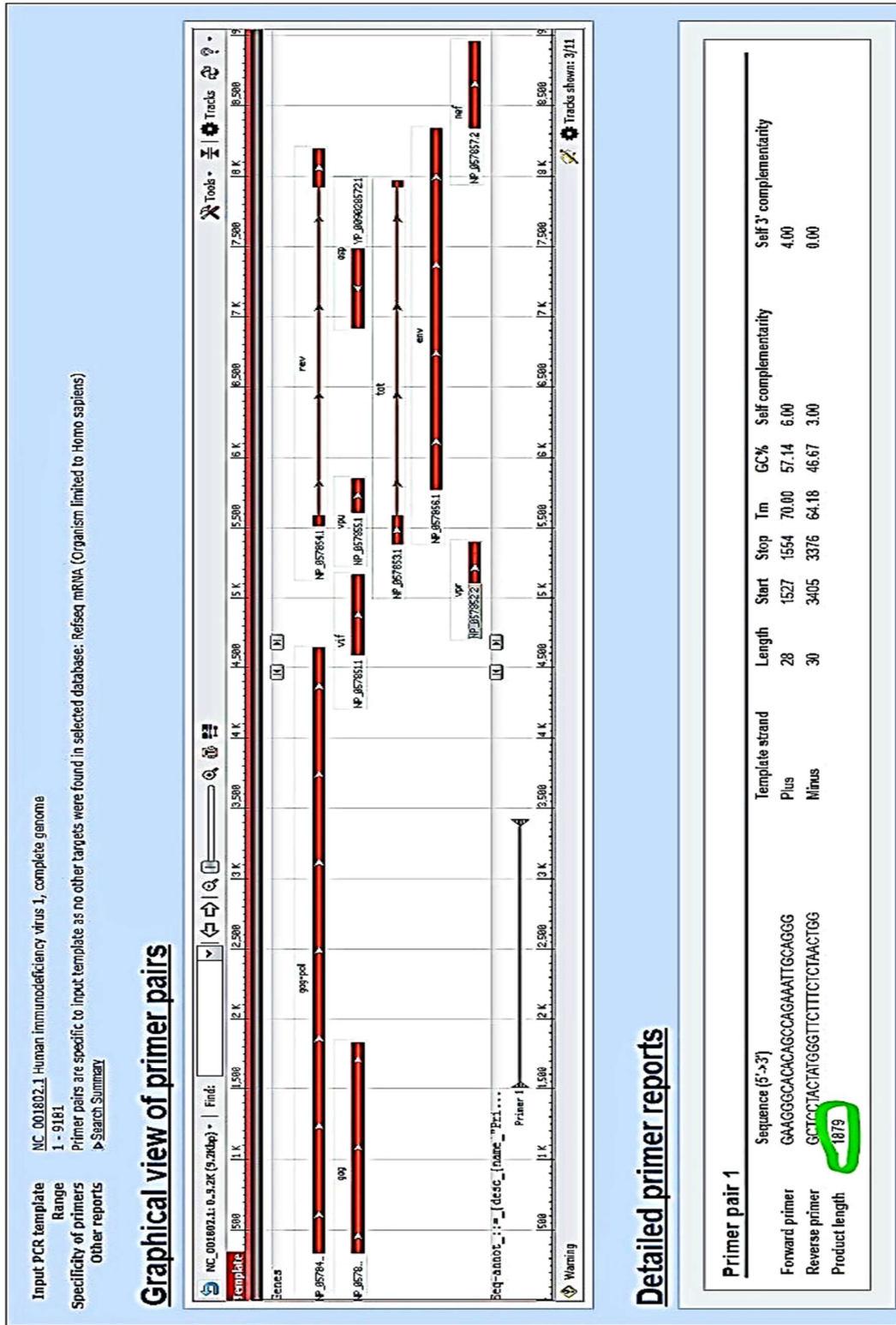
Se incluyó control positivo de RT (Positivo1) (RNA de una muestra que haya sido positiva en una reacción anterior) y control negativo de RT (Negativo1) (agua).

Transferir 18 µl de "Mix One-Step RT-PCR" a cada tubo de 0,2 ml. Se agrega 2 ul del RNA extraído y se lleva a Termociclador Mastercycler® Eppendorf (Hamburgo, Alemania), donde se corre el programa PORT1stM, que consta de los siguientes ciclos:

- 30 min a 52°C
 - Desnaturalización 2 min a 94°C
 - Desnaturalización 15 seg a 94°C
 - Annealing 30 seg a 55°C
 - Extensión 1,5 min a 68°C
 - Extensión extra 5 min a 68°C
 - Forever 4°C
- 40 ciclos de amplificación

Tiempo total de reacción 3 hs 30 min

Figura 5: Captura de pantalla de Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), primera ronda de PCR para genotipificación, se observa la porción a amplificar del gen *pol* con los primers CP1 y RT3.1. Se obtiene un amplicón de 1879 pb.



2.3 Amplificación y control del producto obtenido

Segundo round de PCR: el protocolo fue el siguiente:

| Mix 2nd Round | Volumen |
|------------------------------|----------|
| Agua purificada DEPC tratada | 29,46 ul |
| Buffer 10X (sin Cl2Mg) | 4,20 ul |
| 25 nM Cl2Mg | 4,90 ul |
| dNTPs 25 mM | 0,34 ul |
| 1F 25 uM | 0,40 ul |
| NE1 25 uM | 0,40 ul |
| Ampli Taq | 0,30 ul |
| Volumen total por reacción | 40,00 ul |

5': 1F CAGACCAGAGCCAACAGCCCC (forward)
3': NE1 CCACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC (reverse)

Agregar 40 µl de "2nd Round Mix" a cada tubo de 0,2 ml y dispensar 2 µl del producto obtenido en el primer round en el tubo.

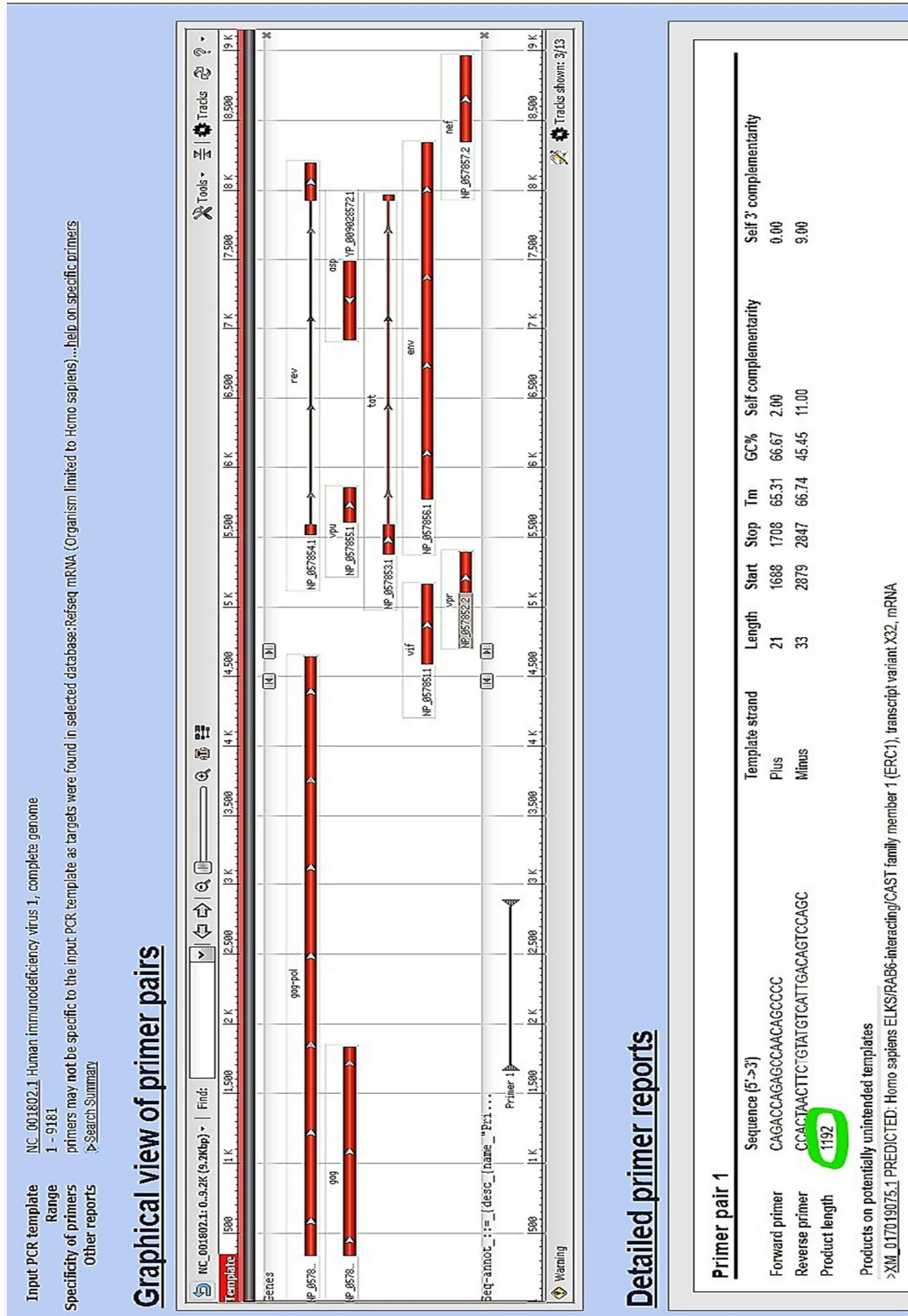
Se incluyó controles positivos de retrotranscripción y primera ronda de PCR (P1) y segunda ronda de PCR (P2) (producto de una reacción de RT-1ra ronda que haya sido positivo en una reacción anterior) y controles negativos de retrotranscripción y 1ra ronda de PCR (N1) y 2da ronda de PCR (N2) (agua).

Ejecutar el programa POL2nd en cicladores Mastercycler® Eppendorf (Hamburgo, Alemania), el cual consta de los siguientes ciclos:

- 2 min a 94°C
 - Desnaturalización 15 seg a 94°C
 - Annealing: 30 seg a 55°C
 - Extensión 1,5 min a 72°C
 - Desnaturalización 15 seg a 94°C
 - Annealing 30 seg a 55°C
 - Extensión 1,5 min a 72°C
 - Extensión extra 7 min a 72°C
 - Forever a 4°C
- } 10 ciclos de amplificación
- } 25 ciclos de amplificación

Duración aproximada 2 hs 55 min

Figura 6: Captura de pantalla de Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), segunda ronda de PCR para genotipificación, se observa el producto obtenido utilizando los primers 1F y NE1. Se obtiene un amplicón de 1192 pb.



Una vez terminada la amplificación, se realiza un control del producto obtenido, por medio de la visualización bajo luz ultravioleta del mismo a posteriori de una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% conteniendo bromuro de etidio en buffer TBE 1X y los controles negativos de RT-1ra ronda de PCR (N1) y 2da ronda de PCR (N2).

Debe observarse una única banda de 1192 pb por cada muestra.

2.4 Secuenciación

Para realizar la secuenciación, se utilizó 6 primers, a saber: 5A, NE1, BR, 2A, 6B y A35, debido al tamaño del fragmento del gen *pol*. Por medio de estos primers se realizaron 6 reacciones de amplificación por muestra a secuenciar.

El protocolo fue el siguiente:

| Reacción Secuenciación | Vol/tubo |
|------------------------|----------|
| Big Dye™ | 0,3 uL |
| Buffer | 2,1 uL |
| Primer 2 uM | 2,6 uL |
| Dil 1:16 del cDNA | 1,0 uL |
| Volumen final | 6,0 uL |

BigDye™ Terminator Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) es una mezcla de reactivos especialmente diseñada para secuenciación basada en el método de Sanger. El reactivo contiene mezcla de DNA polimerasa, dNTPs y de ddNTPs (dideoxinucleótidos trifosfatos) marcados con colorantes fluorescentes, que al ser incorporados a la cadena en crecimiento detienen la polimerización. Soporta repetidos rounds de desnaturalización, annealing y pasos de síntesis, similares a PCR, y es posible usar en equipos comerciales térmicamente estables [BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit User Guide].

Con los reactivos descritos se prepara la placa para secuenciar, la cual se lleva a termociclador Mastercycler® Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y se ejecuta el programa de amplificación para secuenciación V3SEQ el cual consta de los siguientes ciclos:

- Desnaturalización: 10 seg 96° C
 - Annealing: 5 seg 50° C
 - Extensión: 55 seg 60° C
- | | |
|--|----------------------------|
| | 25 ciclos de amplificación |
|--|----------------------------|

Las muestras fueron luego secuenciadas en el equipo Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer (Foster City, California, USA), el cual utiliza tecnología de electroforesis capilar basada en detección por fluorescencia, el cual provee rápida y alta resolución en la separación de los fragmentos de DNA. Con esta tecnología se puede detectar de manera diferencial cada uno de los dideoxinucleótidos que se adicionan al final de un fragmento en polimerización. Durante una corrida, el sistema realiza:

- Preparación del capilar inyectando solución del polímero fresco bajo alta presión.
- Electrocinéticamente inyecta la muestra dentro del capilar usando bajo voltaje por unos segundos
- Eleva el voltaje hasta que el mismo sea constante. Un campo eléctrico alto es creado dentro del capilar, entre ánodo y cátodo, el cual arrastra las partículas de cDNA cargadas negativamente. Los fragmentos más pequeños marcados con los fluorocromos migran más rápidamente que los más largos y llegan antes al detector. Para asegurar la óptima separación y desnaturalización de los fragmentos, la corrida es controlada térmicamente durante todo el transcurso de la misma.
- En la celda de detección, los colorantes unidos a los cDNA son excitados por un haz de luz laser, una parte de este es absorbido por el colorante y emitido en una longitud de onda mayor en todas direcciones. La luz fluorescente es capturada por el instrumento óptico, mientras es bloqueado el láser. Cuatro diferentes colorantes son usados para determinar las bases A, C, G, T. El software genera un electroferograma por cada colorante, basado en la migración de los fragmentos de cDNA de la corrida y genera un resultado primario preliminar. Luego, el electroferograma es ajustado para compensar las pequeñas diferencias de movilidad debido a los colorantes y el instrumento realiza un segundo análisis. [Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide]. Se genera así un archivo por cada muestra analizada.

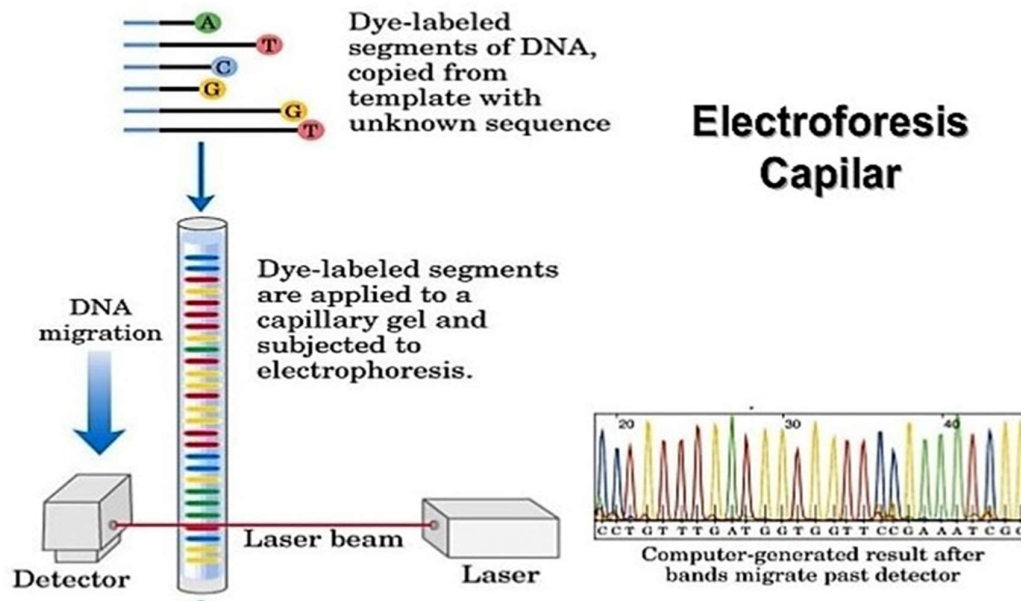


Figura 7: Fundamento de la electroforesis capilar aplicada a secuenciación. https://es.slideshare.net/davian02/sds-page?next_slideshow=1

El análisis de secuencias obtenidas se realizó mediante la utilización del programa RECall (<http://pssm.cfenet.ubc.ca/home/index>) y el envío de las mismas a la base de datos de la Universidad de Stanford (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequenceInput>) (HIV Drug Resistance Database, Standford University).

3- Recuento de LT-CD4

Se recolectó 5 ml de sangre entera periférica en tubo BD Vacutainer® K2 EDTA 7,2 mg (Becton Dickinson and Company, N. Jersey, USA), al momento de la extracción de sangre para carga viral. Se utilizó BD FACSCalibur™ Flow Cytometer BD Biosciences (Becton Dickinson, New Jersey, USA), el cual permite la lectura simultánea de 4 colores.

Se realizó el recuento con BD Multitest™ CD3/CD4/CD45/CD8, el cual es un reactivo de inmunofluorescencia directa tetracromático que se utiliza con un citómetro de flujo equipado adecuadamente para identificar y determinar los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos maduros humanos (CD3⁺), subpoblaciones de linfocitos T supresor/citotóxico (CD3⁺ CD8⁺) y

subpoblaciones de linfocitos T colaboradores/inductores (CD3⁺ CD4⁺) en sangre entera anticoagulada con edta con eritrocitos lisados.

Cuando se añade la sangre entera al reactivo, los anticuerpos marcados con el fluorocromo, se unen específicamente a los antígenos de superficie de los leucocitos. Cuando las células marcadas pasan por el láser del citómetro, difractan y refractan la luz y en este mismo detector se mide la fluorescencia

Se utilizaron los tubos BD Trucount™ para poder determinar el recuento absoluto de leucocitos en sangre. El método consiste en añadir el anticuerpo monoclonal apropiado y un volumen conocido de sangre entera, directamente en el tubo. El pellet liofilizado en el tubo se disuelve, liberando un conocido número de microsferas fluorescentes. Durante el análisis, el número absoluto (células/ μ L) de células positivas en la muestra, se determina por comparación de los eventos celulares con los eventos de las esferas. Mediante el software 1 BD MultiSET™ se obtienen los resultados.

Laboratorio de análisis clínicos

Se recolectó hasta 10 ml de sangre por paciente, en tubos Nipro (Nipro Medical Corporation, Osaka, Japón): 2,5 ml en tubos con anticoagulante EDTA tripotásico y el resto en tubo/s sin anticoagulante. Las muestras de sangre extraídas fueron analizadas con los siguientes reactivos y equipamiento:

- Hemograma: Recuento de glóbulos blancos, rojos y plaquetas, hematocrito, fórmula leucocitaria, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina y hemoglobina corpuscular media (HCM): Contador Hematológico Abbott CELL-DYN Ruby (Abbott, Abbott Park, Illinois, USA)
- Glucemia, perfil renal y hepático: glucemia, bilirrubina total y fraccionada, aspartato amino transferasa (TGO), alanina amino transaminasa (TGP), fosfatasa alcalina (FAL), urea y creatinina. Todas realizadas por método enzimático por fotometría, equipo CMD 800i, Weiner-lab (Wiener lab Group, Rosario, Argentina)
- Estudios serológicos: VDRL (método floculación manual, reactivo Wiener lab, Rosario, Argentina); HBsAg, Anti-HCV IgG (Método electroquimioluminiscencia, equipo ARCHITECT i1000SR, Abbott (Abbott, Abbott Park, Illinois, USA); Citomegalovirus IgM, EBV VCA IgM y

Toxoplasmosis IgG e IgM (Método ELFA, equipo mini VIDAS®, bioMerieux, France)

- LCR: recuento celular con Cámara de Neubauer; tinción de Gram (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), tinta china (método manual con tinta negra Parker), glucorraquia y proteinorraquia (Glucemia Enzimática AA liq y Proti U/LCR, equipo CMD800i y CMD250, Wiener lab Group, Rosario, Argentina). Los cultivos bacterianos se realizaron por sembrado manual en placas agar chocolate (Agar Chocolate-Polivitex®, bioMerieux, France), Agar sangre oveja (bioMerieux, France), Agar EMB Levine (medio de cultivo para preparar de Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), Caldo tioglicolato (medio base para preparar de Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), Agar Glucosado Saboureaud (medio base para preparar de Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina). Las identificaciones y pruebas de sensibilidad de los *Cryptococcus neoformans* fueron realizadas en equipo Vitek®2 Healthcare (bioMerieux, France).

Análisis de los datos

Se realizó regresión lineal para evaluar la correlación de variables cuantitativas (Correlación bivariado de Spearman). Los valores de la carga viral fueron procesados como logaritmo decimal de dicho valor, de acuerdo al análisis estadístico a realizar. Se utilizaron asimismo estadísticas descriptivas, los resultados fueron expresados en porcentajes, medias o medianas (junto con el rango de datos) según correspondiera. Se utilizó programa IBM SPSS Statistics versión 24 (IBM SPSS).

Resultados

Características de la población

Las **Tablas 2 y 3** resumen las características de la población estudiada. La edad media fue de 37 años (Rango 22 a 54) y el 66 % eran de sexo femenino (n=8). Cuatro de los pacientes estudiados desconocían su infección por HIV y fueron diagnosticados en el momento de ingreso al Hospital, dos de ellos cursaban Criptococcosis meníngea, mientras que los otros dos presentaban trastorno cognitivo moderado asociado a HIV (HAND). Los casos 2 y 8 corresponden al mismo paciente, que ingresó bajo dos situaciones clínicas diferentes, separadas por un periodo de 7 meses entre un evento y otro, por lo que fueron analizados como casos independientes. El 50% de los pacientes eran naive de cART; sólo 3 de los 12 pacientes (25%) se encontraban bajo tratamiento cART al momento del ingreso al estudio y los otros 3 habían abandonado sus tratamientos por un periodo mayor a un año, uno de ellos había abandonado también el tratamiento para tuberculosis pulmonar.

Se diagnosticó un solo caso de demencia asociado a HIV (HAD), fue el paciente n° 12, con diagnóstico de infección por HIV-1 seis años antes de ingresar al estudio, y quien no recibió tratamiento cART.

Ninguno de los pacientes estudiados se encontraba coinfectado por HCV, HBV, *T. pallidum*. Tampoco fueron detectados anticuerpos IgM anti Citomegalovirus, Toxoplasmosis y VCA Epstein-Bar.

Cuatro pacientes (entre ellos 2 bajo terapia cART) presentaron síndromes meníngeos: náuseas (50 %), cefaleas (50%), vómitos (25 %), y convulsiones (25 %), que se acompañaba de fiebre en 3 de los casos. No se relacionaron con infecciones oportunistas relacionadas a HIV en SNC.

Entre los tres pacientes con criptococcosis meníngea, todos ellos presentaron fiebre y cefaleas.

Tabla 2: Describe las presentaciones clínicas en cada uno de los pacientes

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Edad media (Rango) | 37 (22-54) |
| Sexo (n) | |
| Masculino | 4 |
| Femenino | 8 |
| Pre existente cART | |
| Si, en tratamiento | 3 |
| Si, abandono | 3 |
| No | 6 |
| Presencia de Coinfecciones (n) | |
| HCV, CMV, EBV, Sífilis | 0 |
| Diagnóstico HIV en internación (n) | |
| Si | 4 |
| No | 8 |
| Infecciones oportunistas en SNC (n) | |
| Criptococcosis meníngea | 3 |
| Tuberculosis meníngea | 0 |
| Toxoplasmosis meníngea | 0 |
| Trastornos neurológicos (n) | |
| HAD | 1 |
| Trastornos cognitivos-HAND | 3 |
| Síndromes meníngeos-convulsiones | 4 |
| Otro: Abuso drogas y TEC | 1 |

Medición de cargas virales en LCR y plasma

De los 12 pacientes estudiados, sólo uno presentaba carga viral (CV) no detectable en plasma, mientras que en dos muestras de LCR, la determinación estuvo por debajo del límite de detección. La mediana de la CV en plasma fue de $5,05 \log_{10}$ copias/ml (rango $<1,60-6,38 \log_{10}$), mientras que la mediana de CV en LCR fue de $3,72 \log_{10}$ copias/ml (Rango $<1,60-5,75 \log_{10}$). La mediana de CV en plasma para los pacientes sin tratar ($n=9$) fue de $5,38 \log_{10}$, mientras que en los tratados ($n=3$) fue de $2,02 \log_{10}$. A excepción de un paciente (Paciente n°8) todas la CVs en plasma fueron mayores a CVs en LCR (**Tabla 3**). La mediana de la relación CVplasma/CV LCR fue de 1,39 (rango 0,80-3,24) mientras que la mediana de la diferencia CV plasma - CV LCR fue de $1,29 \log_{10}$ copias/ml (rango $0,49-3,63 \log_{10}$). Se observa una correlación directa entre las CVs de ambos compartimientos de todos los pacientes ($r = 0,739$; $p = 0,01$). (**Figura 8**).

Tabla 3. Resultados de las Cargas virales asociados a los diagnósticos, LT-CD4 y Leucocitos en LCR y Plasma

| Numero de Paciente | CV _{plasma} (log _{10c/ml}) | CV _{LCR} (log _{10c/ml}) | CV _{plasma} -CV _{LCR} (log _{10c/ml}) | CV _{plasma} /CV _{LCR} | LT-CD4+ (cel/uL) | Leucocitos LCR (cel/ml) | Fecha conocida de infección (años) |
|--------------------|--|---|---|---|---------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 5.25 | 1.62 | 3.63 | 3,24 | NR | 3 | Diagnóstico en internación |
| 2 | 6.24 | 5.75 | 0.49 | 1,09 | 45 | NR | Diagnóstico en internación |
| 3 | 6.38 | 4.44 | 1.94 | 1,44 | 18 | 2 | Diagnóstico en internación |
| 4 | 2.25 | <1.60 | >0.65 | >1,40 | 849 | 4 | 7 |
| 5 | 2.21 | <1.60 | >1.61 | >1,38 | 353 | 72 | 9 |
| 6 | 5.02 | 3.54 | 1.42 | 1,42 | 11 | 1 | Diagnóstico en internación |
| 7 | 5.75 | 3.38 | 1.70 | 1,70 | 22 | 1 | 7 |
| 8 | <1.60 | 2.01 | >0.41 | <0,80 | 123 | 52 | 0,7 |
| 9 | 4.78 | 3.90 | 0.88 | 1,23 | 65 | 1 | 2 |
| 10 | 4.55 | 2.10 | 2.45 | 2,17 | 15 | 2 | 3 |
| 11 | 5.05 | 4.13 | 0.92 | 1,22 | 361 | 2 | 8 |
| 12 | 5.39 | 4.02 | 1.37 | 1,34 | 11 | 12 | 6 |

Nota. NR: no realizado

Tabla 4. Características fisicoquímicas del LCR relacionadas con diagnóstico y sintomatología

| Paciente | Edad/Sexo | LCR | | | Diagnostico | Sintomatología al ingreso |
|----------|-----------|-------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|---|
| | | Proteínas (mg/dl) | Glucorraquia (mg/dl) | Rec. celular (cel/ml) | | |
| 1 | 22/M | 26 | 45 | 3 | HAND | Confusión, fluctuación en atención y el nivel de conciencia |
| 2 | 40/F | - | - | - | Criptococcosis meningea | Fiebre, cefalea, fotofobia, pérdida de peso, |
| 3 | 42/M | 64 | 46 | 2 | HAND | Ansiedad, cambios de humor, confusión, desorden motor |
| 4 | F/37 | 61 | 99 | 4 | Síndrome meningeo | Convulsiones, cefaleas |
| 5 | 33/F | 58 | 42 | 72 | Síndrome meningeo | Fiebre, cefaleas (Bajo tercer esquema cART) |
| 6 | 33/F | 12 | 53 | 1 | Criptococcosis meningea | Fiebre, cefaleas, alteración en el lenguaje, dificultad motora, pérdida de peso |
| 7 | 40/F | 15 | 41 | 1 | Síndrome meningeo | Fiebre, cefaleas, fotofobia (tercer esquema cART abandonado) |
| 8 | 40/F | 92 | 65 | 52 | Criptococcosis meningea | Fiebre, cefalea, fotofobia. (bajo terapia cART, primer tratamiento) |
| 9 | 32/M | 78 | 52 | 1 | TEC. Abuso de drogas | Comportamiento errático, dificultad en el habla, confusión, desorientación |
| 10 | 54/F | 26 | 58 | 2 | Síndrome meningeo | Fiebre, cefaleas, complicaciones sistémicas (candidiasis oral, neumonía) |
| 11 | 40/F | 77 | 31 | 2 | HAND | Cefaleas, mareos, cambio en el humor, pérdida de memoria. |
| 12 | 36/M | 181 | 32 | 12 | HAD | Delirio, alucinaciones, agresión |

En dos pacientes la CV en LCR se encontraba por debajo del límite de detección (40 copias/mL), estos individuos se encontraban recibiendo tratamiento antirretroviral y con LT-CD4+ > 200 cel/ μ L. Los individuos que presentaban mayores diferencias entre CV plasma y CV LCR (CV plasma- CV LCR, expresado en log₁₀), fueron aquellos con recuentos de LT-CD4+ menor a 50 cel/ μ L.

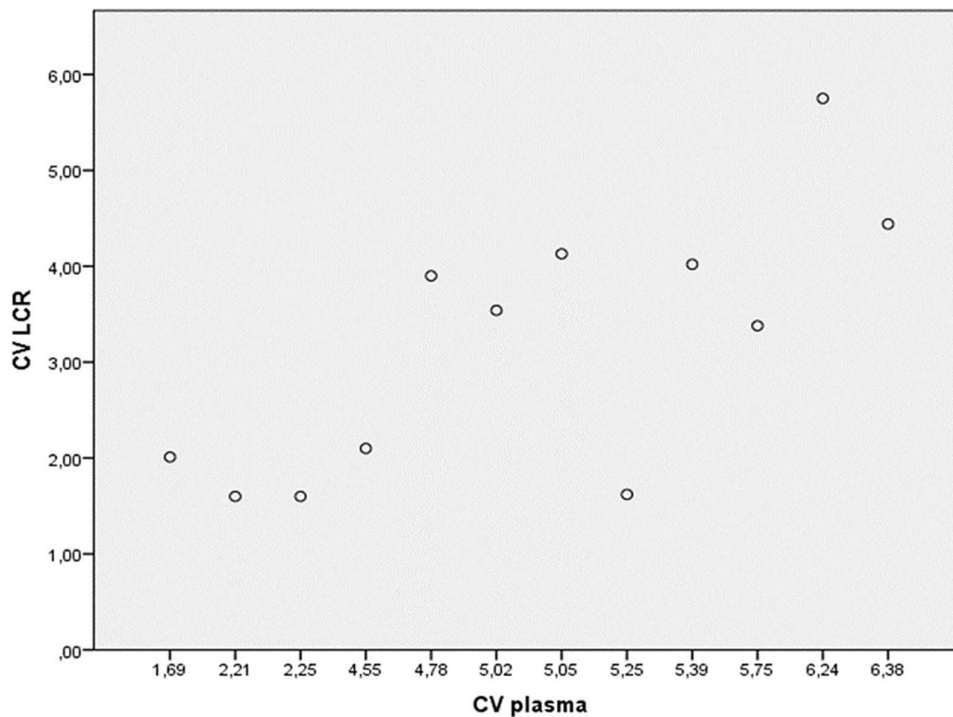


Figura 8: Correlación entre CV plasma y CV en LCR

Medición de LT-CD4

El recuento de LT-CD4+ se realizó en 11 de los 12 pacientes estudiados, siendo la mediana 45 cel/ μ L (Rango 11- 849). Solo 3 de los pacientes tenían recuento de LT-CD4+ mayores a 200 cel/ μ L. No hubo correlación entre la CV en plasma ni CV en LCR con el recuento de LT-CD4+, ni tampoco entre la relación CVplasma/CV LCR y el recuento de LT-CD4+. Se observó una correlación inversa entre la diferencia de la CV plasma – CV en LCR con respecto al recuento de LT-CD4+ en sangre periférica ($r = -0,62$; $p = 0,05$) (**Figura 9**).

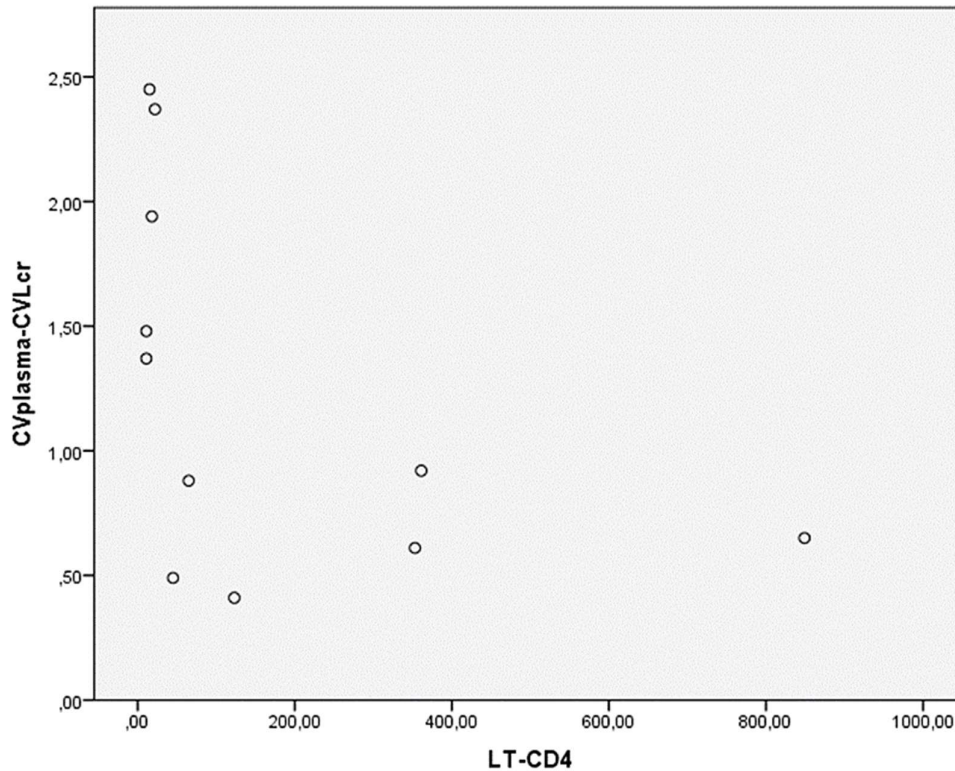


Figura 9: Correlación entre CV plasma-CV LCR y LT-CD4

Valores en LCRs

Se procesaron 11 LCRs para estudios fisicoquímicos, siendo el recuento de leucocitos, mediana 2 cel/ml (rango 1-72 cel/ml), el 27,3 % presento pleocitosis (n=3). El 63,6 % de los pacientes (n=7) presentó hiperproteinorraquia (valor normal hasta 45 mg/dl), mediana 61 mg/dl (Rango 12 - 181). La mediana de glucorraquia fue de 46 mg/dl (rango 31-99 mg/dl), el 45,5% presentó hipoglucorraquia (n=5) (valor normal 50-60 % del valor de glucemia). Los recuentos de leucocitos en LCR no mostraron diferencias significativas por diagnostico neurológico. No se observó correlación entre el recuento celular en LCR, la proteinorraquia y la glucorraquia con la CV en plasma ni con la CV en LCR.

Los cultivos bacterianos resultaron negativos para todas las muestras analizadas. Solo una muestra de LCR se analizó para virus, realizado en otra Institución, (JC, EBV, CMV y Herpes) siendo todos ellos negativos (Paciente 10). Los diagnósticos de criptococcosis meníngea fueron confirmados mediante cultivo, tipificación y sensibilidad en el Laboratorio del Hospital.

Resistencia en las poblaciones estudiadas

Secuencias pareadas de RNA HIV-1 de plasma y LCR fueron obtenidas partir de 7 de los 12 individuos estudiado. En la **Tabla 5** se detalla el listado de los pacientes con los resultados obtenidos, con las mutaciones relevantes encontradas y las resistencias que ellas conllevan y estatus de tratamiento en cada uno de los individuos.

En el Paciente 10, no se amplificaron los genes de la RT y P del RNA HIV-1 en LCR, a pesar de presentar valores de CV por encima del límite de detección y que el procedimiento se realizó por duplicado. No se evidenciaron a nivel plasmático mutaciones relevantes que se asocien a resistencias en las secuencias de dichos genes. En los pacientes 4, 5 y 8 las CVs en alguno de los dos compartimientos estudiados eran menores a los límites de detección del método empleado, por lo tanto, no se estudiaron muestras pareadas de los mismos. Dichos pacientes se encontraban bajo terapia cART.

En 5 de las 7 muestras pareadas se detectaron mutaciones relevantes que confieren resistencia a ARVs. De los cuales, 3 provenían de pacientes naive de tratamiento y 2 habían abandonado previamente un tratamiento basado en Inhibidores nucleósidos de la Retrotranscriptasa (NRTIs) y con Inhibidores no Nucleósidos de la Retrotranscriptasa (NNRTI): Emtricitabine (TFC) + Tenofovir (TDF) + Efavirenz (EFV). En las cinco muestras se encontraron mutaciones de la RT, en cuatro confiriendo resistencia a NNRTs y en una secuencia confiriendo resistencia a NNRTs y a NRTIs. En cuatro muestras se evidenció el mismo patrón de mutaciones en los RNA HIV-1 de ambos compartimientos, a excepción de las muestras del paciente 6. En este paciente se detectó una población de virus plasmático con mutación en la región de la RT, 138A/E, confiriendo resistencia a Rilpivirine (RPV) y respuesta reducida a Etravirina (ETR), que no se detectó en LCR.

EFV y Neviparina (NEV), ambos NNRTIs fueron los fármacos frente a los cuales se detectaron las mayores tasas resistencia (4 de 5 muestras), tanto en pacientes naive como en pretratados. Estos datos se encuentran en correlación con los hallados a nivel nacional, y se asocian al alto uso de estas drogas como primera línea de tratamiento en nuestro país.

No se detectó mutaciones en el gen de la Proteasa (PI) en ninguna de las secuencias estudiadas.

Tabla 5: Resultados de Mutaciones relacionadas a Resistencia en virus HIV-1 de plasma y LCR

| Paciente N° | Tipo de muestra | Tratamiento previo | Tratamiento actual | PI | NRTI | NNRTI | Resistencia adquirida |
|-------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|----------|----------|------------------------------|---|
| 1 | LCR Plasma | No | No | NR NR | NR NR | NR NR | --- --- |
| 2 | LCR Plasma | No | No | No No | No No | No No | No No |
| 3 | LCR Plasma | No | No | No No | No No | V179D, Y188L V179D, Y188L | R a EFV, NEV, RPV. Respuesta reducida a ETR Idem |
| 4 | LCR Plasma | Si AZT+3TC+EFV | Si AZT+3TC+EFV | NA NA | NA NA | NA NA | --- --- |
| 5 | LCR Plasma | Si AZT+3TC+RTV+ATZ | Si AZT+3TC+RTV+ATZ | NA NA | NA NA | NA NA | --- --- |
| 6 | LCR Plasma | No | No | No No | No No | No 138A/E | No R a RPV, reducida respuesta a ETR |
| 7 | | Abandono FTC+TDF+EFV | No | | | | |

| | | | | | | | | |
|----|---------------|---------------------------|---------------------|----------|----------|--------------------------------|--|---|
| 7 | LCR Plasma | | | | No | 62V, 70E, 98G 62V, 70E, 98G | 179D, 184V, 190A 179D, 184V, 190A | R a 3TC, FTC, EFV, NEV, RPV Rta reducida a ABC, TDF, ddi, ETR Ídem |
| 8 | LCR Plasma | Si 3TC+ AZT+ TDF | Si 3TC+ AZT+ TDF | NA NA | NA NA | NA NA | NA NA | --- |
| 9 | LCR Plasma | Abandono FTC+ TDF+ EFV | No | No No | No No | 103N, 225H 103N, 225H | R a EFV y NEV Ídem | |
| 10 | LCR Plasma | Abandono FTC+TDF+EFV | No | NA No | NA No | NA No | --- | |
| 11 | LCR Plasma | No | No | No No | No No | No No | --- | |
| 12 | LCR Plasma | No | No | No No | No No | 103N, 100I/L 103N, 100I/L | R a EFV, NEV, RPV. Rta reducida ETR Ídem | |

Nota: NR: no realizado; NA: no amplífico. AZT: Zidovudine; EFV: Efavirenz; NEV: Nevirapine; RPV: Rilpivirine; ETR: Etravirine; 3TC: Lamivudine; FTC: Emtricitabine; ABC: Abacavir; TDF: Tenofovir; ddi: Didanosine; PI: inhibidor de la Proteínasa; NRTI: inhibidor nucleósido de la Retrotranscriptasa; NNRTI: inhibidor no nucleósido de la Retrotranscriptasa,

Discusión

La hipótesis planteada inicialmente en esta cohorte de 12 individuos infectados por HIV-1 con manifestaciones neurológicas no fue corroborada. El estudio y la cuantificación de las variantes virales a nivel de sangre periférica se correlacionaron con los hallazgos a nivel del SNC, no observándose diferencias en las mutaciones asociadas a resistencia en las mismas en ambos compartimientos.

Determinación de carga viral

Pacientes bajo tratamiento cART

Como era esperable, los individuos bajo cART presentaron una mediana de CV plasmática significativamente menor que aquellos que no recibían tratamiento. En dichos pacientes, el control de la carga viral en LCR pudo resultar del control del compartimiento plasmático, con la reducción de la CV plasmática y consecuentemente la reducción de la cantidad de virus que ingresa a SNC, sumado al control a nivel local dada la penetración a través de la BHE de los medicamentos ARTs utilizados. Es de gran utilidad, que en los pacientes bajo cART, al menos dos de los medicamentos suministrados crucen la BHE, tal como lo hacen Lamivudina (3TC), Zidovudina (AZT) y Efavirenz (EFV) [Enting et al, 1998; De Luca et al, 2002; Wynn et al, 2002]. Cabe aclarar que los antirretrovirales, en base a sus características químicas (hidroficidad y tamaño molecular) y al efecto que tienen sobre el RNA-HIV-1 en LCR, han sido categorizados de acuerdo a su “grado de penetración estimado” (CPE, por sus siglas en inglés: *estimated penetration effectiveness*). Se genera así un score que resulta de la suma individual de cada una de las drogas utilizadas [Letendre et al, 2008; 2010]. Cuanto mayor es este número, mayor es el beneficio en el paciente, ya que se asocian a disminución en la detección de copias RNA-HIV-1 y de los marcadores de inflamación en LCR [Spudich et al, 2011]. Tres individuos en este estudio se encontraban bajo cART, y todos recibían esquemas que incluían ARV con buena penetración en SNC (3TC, EFV y AZT).

En dos de estos pacientes, que presentaban sintomatología neurológica inespecífica, no se pudo asociar el cuadro a una IO. En ambos casos, el recuento de LT-CD4+ en sangre periférica era mayor a 200 cel/ μ l, y la CV en LCR se encontraba por debajo del límite de detección (40 copias/ml). A nivel de LCR se

evidenciaron signos de inflamación meníngea (proteínorraquia y/o pleocitosis). Sin embargo, la infección por HIV a nivel de SNC no se asocia a pleocitosis ni cefalea [Spudich et al, 2005], por lo cual, para filiar el cuadro neurológico, otros estudios complementarios hubiesen sido necesarios.

Se han desarrollado técnicas para determinar el nivel de RNA HIV-1 en LCR aun cuando los mismos se encuentran por debajo de los límites de detección de los ensayos comerciales. Anderson et al., en un estudio de CHARTER (de sus siglas en inglés: *Central Nervous System HIV Antiretroviral Therapy Effects Research*), utilizaron una versión modificada de un ensayo comercial basado en la amplificación de ácidos nucleicos para medir RNA HIV-1 por debajo de 50 copias/ml [Anderson et al, 2017]. El HIV-1 SuperLow Assay es un proceso validado, de amplificación de copia simple, propiedad de la firma comercial bioMONTR®labs (Triangle Park, NC, USA), el cual es una versión modificada del NucliSENS EasyQ Assay (bioMérieux, France), que permite la amplificación de niveles de HIV-1 RNA tan bajas como 1 copia/ml. La extracción del RNA viral en dicho estudio se realizó por perlas magnéticas (miniMAG System, bioMérieux) y la mix de reacción contó con 25 µL del eluido extraído, 20 µL de primers y 5 µL de 2x de enzima. Se realizó una amplificación isoterma a 41°C de la región *pol/gag*. A partir de 220 individuos seleccionados, los investigadores hallaron que el 42,3 % de los mismos (93 individuos) tenían niveles de RNA-HIV-1 en LCR mayores a 1 copia/ml, y que dichos individuos se encontraban bajo regímenes antirretrovirales de bajo CPE. El mismo ensayo permitió también medir el RNA-HIV-1 de muestras plasmáticas, identificando que 28 pacientes tenían niveles RNA -HIV-1 no detectables, aun cuando, RNA-HIV-1 era cuantificable en LCR. Todos los participantes del estudio fueron sometidos a evaluaciones neuropsicológicas, los resultados más bajos se observaron en quienes sólo presentaban RNA-HIV-1 detectables en LCR, al ser comparados con los que presentaban RNA-HIV-1 en ambos compartimientos. Estos hallazgos demuestran que una proporción de individuos bajo terapia antirretroviral, pueden mantener una viremia de bajo nivel en SNC. La cual está asociada a una pobre penetración de las drogas en dicho compartimiento y a un bajo desempeño en las evaluaciones neuropsicológicas, sugiriendo injuria inducida directa en SNC por el HIV-1. Estos hallazgos sustentan la idea de que ensayos de amplificación de ácidos nucleicos más sensibles pueden tener relevancia clínica.

El otro paciente bajo tratamiento cART cursaba una IO (criptococcosis meníngea) y fue el único caso en el cual se detectó una CV LCR mayor que el nivel de CV hallada en plasma, revelando una amplificación local autónoma del HIV-1. Además, en el LCR se observaron valores elevados de proteinorraquia y presencia de pleocitosis, concordantes con el proceso inflamatorio que cursaba el paciente. Este hallazgo fue reportado también por Cecchini et al, quienes concluyeron que los recuentos de leucocitos en LCR se asocian a los valores de las CVs de HIV-1 en LCR, en pacientes que cursan infección meníngea por *Cryptococcus neoformans* [Cecchini et al, 2009]. Los mecanismos que llevan a que el nivel de carga viral sea mayor en el LCR que en plasma no están completamente dilucidados, pero se ha reportado que pueden estar relacionados con la activación de linfocitos, monocitos y células del parénquima que se encuentran infectados por HIV-1, esta activación podría estimular la replicación viral y llevar a un aumento en el nivel de RNA circulante en LCR.

Pacientes sin tratamiento cART

La media de la CV en plasma y en LCR de los pacientes no tratados fue significativamente más alta que la de los tratados. Los niveles de RNA- HIV-1 en LCR, en general fueron un 1 Log₁₀ menores que los plasmáticos, lo cual se encuentra en concordancia con lo que ha sido descrito previamente [Spudich et al, 2011]. En todos los pacientes, las CVs en LCRs mostraron relación directa con las CVs en plasma, sugiriendo una infección transitoria sostenida por la presión de la infección sistémica. Sin embargo, a excepción del paciente 11, cuyo recuento de LT-CD4+ era de 361 cel/uL, los demás pacientes mostraban severo compromiso inmunológico, por depleción de las células T. Las CVs en LCR no mostraron relación directa con el recuento de LT-CD4+ plasmáticos, lo cual es concordante con otros trabajos publicados [Spudich et al, 2011]. La ausencia de pleocitosis en LCR en este grupo de pacientes es concordante con el bajo recuento de LT-CD4+ plasmático, tal como lo describe la literatura [Spector et al, 1993]. Por lo expuesto, es posible inferir que en dichos individuos la presencia viral dentro del SNC es secundaria a la CV plasmática elevada y por la presencia en dicho compartimiento de células de larga vida como monocitos y macrófagos infectados por el virus.

Con respecto a otros parámetros medidos y/o calculados, no se observaron los mismos resultados publicados por otros autores. Al calcular la relación

CVplasma/CV en LCR, no se encontró relación con el recuento de LT-CD4+ plasmático, como fue descrito previamente [Spudich et al, 2005; Price et al, 2014]. Los autores también postularon que cuanto más comprometido se encuentra el sistema inmune (LT-CD4+ <50 cel/uL), en pacientes con infección de larga data, se observa una alta diferencia entre CVplasma/CV LCR, debido al valor elevado de la CV plasmática sin aumento concomitante de la CV en LCR. Esto no fue evidenciado en este estudio entre pacientes con recuentos de LT-CD4+ por debajo de 50 células/ul, a pesar de que por el estado de deterioro inmunológico se podría suponer que todos los individuos enrolados presentaban una infección por HIV de larga data. La falta de correlación podría deberse a la falta de poder estadístico dado el número de pacientes incluidos.

La presencia del HIV en el SNC por largos periodos de tiempo, puede conducir a HAD en un 20-30 % de los pacientes no tratados o con pobre adherencia a los tratamientos [Spudich et al, 2011]. El deterioro cognitivo y motor en esta enfermedad es atribuido a la replicación viral en SNC y al proceso inflamatorio concomitante. Estas alteraciones pueden verse potenciadas por infecciones oportunistas concomitantes en SNC o alteraciones del medio interno secundarias a otras enfermedades oportunistas sistémicas. Este proceso inflamatorio crónico fue evidenciado en uno de los individuos incluidos en el presente trabajo, a quien se le diagnóstico HAD, y en quien se detectó en el estudio fisicoquímico del LCR niveles muy elevados de proteinorraquia (181mg/dl), asociada a pleocitosis (12 cel/ml), junto con una alta CV de HIV-1 en plasma y LCR. Otros biomarcadores podrían incluirse para detectar la disrupción de la BHE y el proceso inflamatorio en SNC, ya que el aumento de determinados marcadores de inflamación en LCR ha sido asociado a HAND y HAD [Kamat A et al, 2012; Kelder W et al, 1998]. La inflamación del SNC juega un papel crítico en el desarrollo de diferentes alteraciones neurocognitivas. Esto se debe a que se produce un flujo de moléculas inflamatorias, glóbulos blancos, partículas y proteínas virales, que conllevan al deterioro cognitivo de los pacientes debido a la sostenida respuesta inflamatoria.

La única IO en SNC detectada en la población estudiada fue criptococosis meníngea. El estatus inmunológico de estos pacientes se encontraba severamente deteriorado, presentando recuentos de LT-CD4+<50 cel/ μ L.

Las manifestaciones clínicas de la criptococosis pueden presentarse en el contexto de una infección aguda, pero generalmente se producen durante la

reactivación de una infección latente. Las reactivaciones ocurren principalmente en SNC, presentándose tanto como meningoencefalitis o como criptococoma cerebral. Los factores que llevan a la reactivación son cambios en la inmunidad del hospedador, siendo la inmunosupresión y particularmente la infección por HIV, factores importantes de reactivación. En los pacientes sin tratamiento antirretroviral de este estudio, se observó importante depleción de los LT⁻CD4⁺, que debió haber facilitado la reactivación del *Cryptococcus neoformans*. La presencia del HIV-1 en SNC facilitaría la entrada de leucocitos dentro del espacio perivascular y de *Cryptococcus spp* dentro del compartimiento cerebral, generando conjuntamente inflamación y ruptura de la BHE. Todo esto puede favorecer el proceso inflamatorio y conducir a un aumento de la CV HIV-1 en LCRs de pacientes cursando un cuadro de criptococosis meníngea.

Cecchini y colaboradores demostraron la relación directa entre el recuento de leucocitos en LCR y la CV de HIV-1 en una cohorte de 37 pacientes HIV+ cursando meningitis por *Cryptococcus neoformans* [Cecchini et al, 2009]. Si bien el antígeno capsular polisacárido del criptococo inhibe la migración de leucocitos al SNC, los autores postularon que estas células inflamatorias contribuyen a la CV en dicho compartimiento y que la infección crónica por este patógeno, provee un ambiente propicio para el desarrollo de una respuesta inflamatoria sostenida, con una replicación viral independiente de la replicación sistémica. La infiltración de leucocitos (predominantemente linfocitos) constituye así una fuente exógena de virus, contribuyendo a las mediciones aumentadas de carga viral en LCR. Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias significativas en las cargas virales de HIV-1 cuantificadas en LCR y plasma, tampoco se observó correlación entre CVs y recuento de leucocitos en LCR al ser comparadas con los individuos en quienes no se detectaron IO. El estudio de Cecchini et al., no contó con individuos control (sin infección por criptococo), por lo cual las CVs no fueron comparadas con sujetos HIV+ no infectados en SNC por criptococo, como se realizó en este trabajo.

Resistencia

El HIV ha desarrollado diferentes mecanismos para escapar tanto de la presión del sistema inmune como de la presión de los antirretrovirales. La alta tasa de error durante la retrotranscripción por parte de la RT viral (1 sustitución por genoma/ciclo), unida a la elevada población de viriones existentes (hasta 50.000 millones de viriones en todos los reservorios) y la alta tasa de replicación (10^9 - 10^{10} virus por día), favorece la aparición espontánea de cuasiespecies virales. El número de variantes víricas o cuasiespecies distintas presentes en un individuo infectado se estiman entre 5×10^5 a 5×10^{10} , dependiendo del estadio de la infección y de las variaciones individuales [Coffin JM, 1995]. Las mutaciones que confieren resistencias o sensibilidad disminuida a un fármaco antirretroviral, suelen existir en las cuasiespecies antes del inicio del tratamiento y representan un porcentaje bajo con respecto a la población viral total.

En Argentina, desde el año 1992 todos los individuos viviendo con HIV/SIDA tienen derecho a recibir en forma gratuita su tratamiento, volviendo al programa Nacional de ITS y VIH en uno de los más importantes y de más larga trayectoria en América Latina [Bissio et al, 2016].

Sin embargo, el desarrollo de resistencia a los antirretrovirales, no depende únicamente de contar con un programa eficiente de acceso y distribución de los medicamentos. La adherencia de los individuos bajo tratamiento, la presencia de resistencia primaria (virus con mutaciones de resistencia que son transmitidos en las nuevas infecciones), variables farmacocinéticas y genéticas de cada población son algunos de los factores asociados al desarrollo de resistencia. A nivel global, la resistencia a drogas ARVs en HIV-1 evidencia un aumento lento pero constante [Bissio et al, 2016], lo cual es un problema importante en salud pública. Recientemente, niveles preocupantes de resistencia a NNRTIs han sido descriptos, la cual ha aumentado en los últimos años, y se estima que la prevalencia de resistencia transmitida o resistencia a drogas pre-tratamiento puede alcanzar el 15 % en algunas subpoblaciones [Rotryng et al, 2015; Zapiola et al, 2015]. En un estudio multicéntrico realizado en Argentina entre 2014-2015, Bissio et al., determinaron la resistencia a drogas ARVs en sujetos infectados que iniciaban tratamiento. Las mutaciones asociadas a resistencias (MARs), en pacientes naive de tratamiento ARV, se estimaron en un 10 % para NNRTIs, 3 % para NRTIs y de 2 % para PIs, siendo

los porcentajes de MARs, en pacientes pre-tratados similares (11%, 3 % y 2% respectivamente). Las mutaciones más comúnmente encontradas en el estudio fueron: K103N, G190A y K101E, entre las MARs anti NNRTIs y M41L para las MARs anti NRTIs [Bissio et al, 2016].

Teniendo esto presente, en este estudio, se realizó la secuenciación de los RNA-HIV-1 de LCR y plasma en muestras pareadas para comparar los patrones de mutaciones asociadas a resistencia en los genes codificantes de RT y P. Las muestras que pudieron ser secuenciadas y estudiadas procedían de pacientes que no se encontraban bajo terapia cART, pero dos de ellos tenían antecedentes de abandono previo que incluía EFV. Se detectó en las muestras de este individuo la mutación V179D (paciente 7) la cual se puede seleccionar en pacientes recibiendo EFV, y que reduce la susceptibilidad en dos a cinco veces a NPV y EFV y en dos veces a ETR y RPV.

Las mutaciones más frecuentemente detectadas en plasma y LCR fueron aquellas que conferían resistencia a EFV, NVP, RPV y respuesta disminuida a ETR. Si bien el número de secuencias estudiadas fue muy bajo, y la mutación M41L no se evidenció en la población estudiada, las otras MARs observadas son concordantes con las mutaciones encontradas en el trabajo de Bissio y colaboradores.

Se observó, al realizar los estudios de genotipificación, que las poblaciones virales en ambos compartimientos eran concordantes en 6 de las 7 muestras pareadas estudiadas, lo cual implicaría una evolución viral paralela en plasma y LCR. Sólo se detectó una mutación relevante en un aislamiento de RNA- HIV-1 plasmático confiriendo resistencia a RPV y respuesta reducida a ETR, que no se evidenció en la secuencia obtenida de LCR. Es interesante este hallazgo, ya que el paciente era naive de tratamiento. La bibliografía describe que el uso y la penetración de cART en SNC son potenciales mecanismos de selección de cepas HIV [Spudich et al, 2012], de hecho, algunos estudios ya habían demostrado discordancia entre los fenotipos de resistencia en sangre y LCR [Venturi et al, 2000; Haas, 2004]. Sin embargo, como hemos explicado anteriormente, el recambio virus-célula infectada puede ser diferente entre ambos compartimientos [Schnell et al, 2009], con diferentes tipos de células predominantemente infectadas en cada compartimiento (linfocitos en circulación y macrófagos de larga vida en SNC) y por lo tanto la diferente sensibilidad a los ARVs puede ser atribuida a diferente información genética

obtenida como un evento aislado, en vez de representar un fenómeno biológico verdadero [Haas, 2004]. Es decir, en este estudio la mutación detectada en plasma en el codón 138 (mutación asociada a resistencia mayor) no apareció en LCR. Sin embargo, esto podría detectarse más tardíamente debido a ciclos de replicación más lentos en SNC.

En el paciente 10, no fue posible la amplificación de las secuencias de RNA-HIV-1 en LCR, a pesar de dos intentos. Esto pudo deberse a varios motivos tales como baja carga viral, falla de primers al hibridar, inhibidores de la retrotranscriptasa presentes en las muestras y/o causas desconocidas. En la mayoría de los casos, la razón de la falta de resultados de genotipificación es desconocida. La metodología empleada en este estudio es la misma que se utiliza en ensayos clínicos habituales para control de tratamiento en pacientes bajo terapia cART o antes de iniciar uno. Existen técnicas que aumentan la sensibilidad de los estudios de resistencia, como las utilizadas para la secuenciación del gen *pol* en pacientes con muy bajas viremias (menores a 50 copias/ml). Estas técnicas permiten detectar mutaciones esporádicas presentes en cuasiespecies en baja proporción, sin embargo, estas variantes virales no parecen tener impacto clínico en la respuesta al tratamiento. Es importante destacar que el presente trabajo siempre tuvo como finalidad aportar herramientas de relevancia clínica para el paciente y el médico tratante, utilizando metodologías de biología molecular realizadas rutinariamente.

En el caso de los dos pacientes bajo tratamiento antirretroviral de este estudio, el RNA HIV-1 se encontraba por debajo del límite de detección, y no se pudo obtener material genómico para realizar la genotipificación para la búsqueda de variantes asociadas a resistencia a los ARVs. En estos casos, donde la CV es no detectable, una posibilidad de evaluar la presencia de mutaciones que confieren resistencia podría ser la secuenciación de DNA integrado en células sanguíneas periféricas. El DNA integrado nos puede proporcionar información sobre la diversidad y el reservorio viral, ya que éste está presente tanto en las células activamente infectadas como en las que el virus se encuentra en estado de latencia. Sin embargo, podría presentarse discordancias con resultados previos de genotipificación de RNA-HIV-1 plasmático. Dichas diferencias fueron reportadas por diversos autores [Wirten et al, 2010; Delaugerre et al, 2010]. Los investigadores compararon mutaciones presentes en el DNA proviral con otras detectadas previamente en estudios genotípicos convencionales de RNA-HIV-1

plasmático en pacientes bajo tratamiento. La principal discordancia observada se debía a mutaciones detectadas a nivel de RNA plasmático que afectaban a NRTIs y NNRTIs, y que no se evidenciaron en el DNA proviral. Se asume que el fenómeno de dilución de DNA proviral provoca la discordancia en la detección de las mutaciones entre el RNA y el DNA integrado. El reservorio viral puede presentar alta heterogeneidad en las cadenas de DNA integrado, y esa mezcla poblacional lleva a una dilución de las poblaciones resistentes y, por lo tanto, la detección de las mutaciones que confieren resistencia será altamente dependiente de la sensibilidad de la técnica de genotipificación usada. Se estima que poblaciones virales en baja proporción menor a 20-25 % de todos los virus presentes, podrían no ser detectados por las técnicas de genotipificación estándares. Es por eso que, en el contexto de una baja viremia o una viremia no detectable, el uso de la genotipificación del DNA proviral es menos informativo que los resultados históricos (estudios de resistencia realizados en el pasado al mismo individuo) de genotipificación de RNA-HIV-1, técnica que sigue siendo considerada de elección para el monitoreo de resistencia y tratamiento.

En el presente estudio, los resultados de mutaciones asociadas a resistencia detectadas en plasma no difirieron de las observadas en LCR, aún en el contexto de manifestaciones neurológicas secundarias a la infección del SNC por HIV-1. Por lo cual la elección del cART se puede determinar en forma segura mediante el estudio de las cepas halladas a nivel de sangre periférica, asegurándose una buena cobertura de las presentes en SNC.

Conclusión

Los resultados obtenidos en el estudio, han sido de relevancia para los individuos y los profesionales tratantes. Se pudo reconocer la importancia de la presencia de este virus en SNC. La genotipificación de las quasiespecies en ambos compartimientos permitió establecer la relación directa entre ellos y proveyó de información para un futuro tratamiento cART. Se considera que las limitaciones importantes en el presente estudio fueron, el pequeño tamaño muestral y la heterogeneidad de los pacientes estudiados, por lo cual sería inapropiado realizar otro tipo de conclusiones a partir de los datos obtenidos.

Los parámetros estudiados en este proyecto, son de realización rutinaria en laboratorios clínicos y de biología molecular. Se pudo establecer que, en la población evaluada, el estudio de la carga viral y variantes virales de HIV a nivel plasmático permite determinar la presencia de fallo y seleccionar un potencial esquema de drogas antirretrovirales que mantienen su actividad tanto contra los aislamientos virales mayoritarios presentes en plasma y en SNC.

Perspectivas

El análisis de las variantes virales de HIV-1 y la cuantificación de la CV en LCR, pueden ser dos herramientas para optimizar el manejo de los pacientes con manifestaciones neurológicas, sin embargo, se están desarrollando otras técnicas para determinar biomarcadores, que permiten un mejor enfoque de estudio en estos individuos y que pueden evaluar la respuesta del huésped, el daño tisular y una probable asociación entre daño generado e infección por HIV-1 en SNC.

Los siguientes incluyen:

- citoquinas, quimioquinas y neopterinina: moléculas marcadoras de la activación y quimiotaxis de macrófagos.
- Neurofilamento de Cadena Liviana (NFL): importante componente de los axones neuronales que en SNC ha probado ser un indicador muy sensible de daño axonal en una variada cantidad de enfermedades neurodegenerativas.

Por otro lado, los avances en biología molecular, asociados a bioingeniería, han permitido desarrollar la PCR digital (dPCR). La cual es una metodología para la detección y cuantificación de DNA/RNA que ofrece una alternativa a la PCR cuantitativa convencional (Real Time- PCR), por una que es de cuantificación absoluta. Trabaja particionando una muestra de DNA/cDNA o RNA en muchas e individuales alícuotas, en las cuales se realiza PCRs en paralelo. Una sólo molécula puede ser amplificada hasta un millón de veces o más. La Droplet Digital PCR (ddPCR), es actualmente la plataforma más frecuentemente usada en dPCR, la cual se refiere a la formación de una gota que puede contener a la molécula target por microcelda de reacción. Existen hoy en día, numerosos trabajos publicados en los cuales utilizan esta metodología para la cuantificación de HIV-1 DNA (ej: HIV-1 DNA total) y en menor medida de HIV-2

DNA en diferentes compartimientos humanos. La mayoría de dichos estudios están mostrando mayor precisión, exactitud y reproducibilidad, pero similar sensibilidad, cuando son comparados con la PCR cuantitativa para poder estandarizar los análisis para la práctica clínica [Trypsteen et al, 2016].

Resumen

Poco después de producirse la infección por HIV-1, éste ingresa en el SNC y la replicación en este sitio lleva a la activación del sistema inmune y a la producción de proteínas virales e inflamatorias, que eventualmente pueden provocar alteraciones cognitivas y disfunción motora en algunos pacientes. Esta situación puede perdurar durante todo el curso de la infección, aun cuando el individuo reciba tratamiento antirretroviral combinado. Por ello, el estudio molecular del LCR en paralelo con la sangre periférica, podría ser una importante herramienta para el entendimiento de los mecanismos y la dinámica de la infección en el SNC, dado que el mismo corresponde a un compartimiento tisular aislado. Se propuso cuantificar las variantes virales a nivel de sangre periférica y LCR para determinar si correlacionaban entre sí. Para ello se enrolaron 12 pacientes adultos HIV-1 positivos que ingresaron al Hospital Magdalena V. de Martínez, entre octubre 2015 y junio del 2017, con sospecha de enfermedad neurológica y a quienes el médico tratante indicó la realización de una punción lumbar con el fin de filiar el cuadro clínico. En esta cohorte se observó que, a excepción de un paciente, todas las CVs en plasma fueron mayores a CVs en LCR, y que había una correlación directa entre ellas. Los individuos que presentaban mayores diferencias entre CV plasma y CV LCR, fueron aquellos con recuentos de LT-CD4+ menor a 50 cel/ μ L. No se observó correlación entre la CV en plasma ni CV en LCR con el recuento de LT-CD4+ periférico, ni tampoco entre la relación CVplasma/CV LCR y el recuento de LT-CD4+ pero sí se observó una correlación inversa entre la diferencia de la CV plasma - CV en LCR con respecto al recuento de LT-CD4+ en sangre periférica. Los recuentos de leucocitos en LCR no mostraron diferencias significativas por diagnóstico neurológico. Tampoco se observó correlación entre el recuento celular en LCR, la proteinorraquia y la glucorraquia con la CV en plasma ni con la CV en LCR. En este estudio, además se realizó la secuenciación de los RNA-HIV-1 de LCR y plasma en muestras pareadas para comparar los patrones de mutaciones asociadas a resistencia en los genes codificantes de la retrotranscriptasa y proteasa. Secuencias pareadas de RNA HIV-1 de plasma y LCR fueron obtenidas a partir de 7 de los 12 individuos estudiados. No se detectó mutaciones en el gen de la proteasa en ninguna de las secuencias estudiadas y las poblaciones virales en ambos compartimientos eran concordantes en 6 de las 7 muestras estudiadas. Se concluyó que los resultados obtenidos en el estudio fueron de relevancia para los individuos y los profesionales tratantes. Se pudo reconocer la importancia de la presencia de este virus en SNC y la genotipificación de las quasiespecies en ambos compartimientos permitió establecer la relación directa entre ellos y proveyó información para un futuro tratamiento cART. El estudio del compartimiento plasmático tanto para la cuantificación de la carga viral de HIV como para la determinación de variantes de resistencia, sería suficiente para monitorear la respuesta al tratamiento y para definir esquemas cART efectivos.

Referencias

- Anderson AM, Muñoz-Moreno JA, McClernon DR, et al. Prevalence and Correlates of Persistent HIV-1 RNA in Cerebrospinal Fluid During Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2016;215(1):105-113.
- Becker JT, Kingsley LA, Molsberry S, et al. Cohort Profile: Recruitment cohorts in the neuropsychological sub study of the Multicenter AIDS Cohort Study. *Int J Epidemiol.* 2014;44(5):1506-16.
- Bednar MM, Sturdevant CB, Tompkins LA, et al. Compartmentalization, Viral Evolution, and Viral Latency of HIV in the CNS. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015;12(2):262-71.
- Bissio E, Barbás MG, Bouzas MB et al. Pretreatment HIV-1 drug resistance in Argentina: results from a surveillance study performed according to WHO-proposed new methodology in 2014–15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2017;72(2): 504–510.
- Boletín sobre VIH- sida en la Argentina N°33. Año XIX-diciembre 2016. http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000918cnt-2016-11-30_boletin-vih-sida-2016.pdf
- Carne CA, Tedder RS, Smith A et al. Acute encephalopathy coincide with seroconversion for anti-HTLV-III. *Lancet.* 1985;326(8466):1206–8.
- Castellanos F, Mallada J, Ricart C, Zabala JA. Ataxic Neuropathy Associated with Human Immunodeficiency Virus Seroconversion. *Arch Neurol.* 1994;51(3):236.
doi:10.1001/archneur.1994.00540150022010
- Cecchini DM, Cañizal AM, Rojas H, et al. Variables that influence HIV-1 cerebrospinal fluid viral load in cryptococcal meningitis: a linear regression analysis. *Journal of the International AIDS Society.* 2009; 12:33. doi:10.1186/1758-2652-12-33
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1987(36): 15.
- Centers for Disease Control and Prevention, CDC. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep.* 1992 ;41(RR-17):1-19.
- Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition.* Cell, 1998. 93: 681-84.
- Christo P, Greco D, Aleixo A, Livramento J. HIV-1 RNA Levels in Cerebrospinal Fluid and Plasma and their Correlation with Opportunistic Neurological Diseases in a Brazilian AIDS Reference Hospital. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2005; 63(4): 907-13.
- Christo P, Greco D, Aleixo A, Livramento J. Factors Influencing Cerebrospinal Fluid and Plasma HIV-1 RNA Detection Rate in Patients with and Without Opportunistic Neurological Disease During the HAART era. *BMC Infectious Diseases* 2007; 7:147.
- Churchill M, Nath A. Where does HIV hide? A focus on the central nervous system. *Current Opinion in HIV and Aids.* 2013; 8(3):165–69.

- Cinque P, Brew BJ, Gisslen M, Hagberg L, Price RW. Cerebrospinal fluid markers in central nervous system HIV infection and AIDS dementia complex. *Handb Clin Neurol.* 2007; 85:261–300
- Claes M, Albert J, Hansson P, Pehrsson P, Link H, Sönnnerborg A. Cerebrospinal fluid mononuclear cell counts influence CSF HIV-1 RNA levels. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998; 17(3):214-19.
- Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267(5197): 483-89.
- Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE. Retroviruses. 1997. *Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Davis C, Heath A, Best S, et al. Calibration of HIV-1 working reagents for nucleic acid amplification techniques against the 1st international standard for HIV-1 RNA. *J Virol Methods.* 2003; 107(1):37-44.
- DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):903-25.
- De Luca A, Ciancio BC, Larussa D, et al. Correlates of independent HIV-1 replication in the CNS and of its control by retrovirals. *Neurology* 2002; 59:342-47
- Delaugerre C, Charreau I, Braun J et al. HIV-1 genotypic Resistance tests performed in cellular DNA are less informative than those collected from previous plasma RNAs in treatment experienced patients with suppressed viremia: a sub-study of EASIER-ANRS 138 trial. In: Abstracts of the Seventeenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, 2010. Abstract 573, p. 273. Foundation for Retrovirology and Human Health, Alexandria, VA, USA.
- DHHS. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services.2016 Last reviewed. <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>
- Easterbrook PJ, Emami J, Moyle G, Gazzard BG. Progressive CD4 cell depletion and death in zidovudine-treated patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993; 6(8): 927-29.
- Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell.*1991; 20;67(6):1211-21.
- Enting RH, Hoetelmans RM, Lange JM et al. Antiretroviral drugs and the central nervous system. *AIDS* 1998; 12:1941-55
- Fauci AS, Marston HD. Ending the HIV-AIDS pandemic — follow the science. *N Engl J Med.* 2015; 373:2197–99
- Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: Implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 2003; 17:1871–79.
- Fields, B, Fields Virology. Third ed. 1996: Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. New York.

- Flint J, Racaniello VR, Rall GF, Skalka AM. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control. 2004, Washington, D. C.: ASM Press.
- Gorry PR, Taylor J, Holm G et al. Increased CCR5 affinity and reduced CCR5/CD4 dependence of a neurovirulent primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *Journal of Virology*. 2002; 76(12):6277–92.10.1128/jvi.76.12.6277-6292.2002
- Harrington PR, Schnell G, Letendre SL, et al. Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course. *AIDS*. 2009;23(8):907-15.
- Haas DW. Sequence heterogeneity and viral dynamics in cerebrospinal fluid and plasma during antiretroviral therapy. *J Neurovirol 10 Suppl*. 2004; 1: 33–37
- Hazuda D. Resistencia a los inhibidores de la integración del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo I. *Actualizaciones en SIDA*. 2010; 18 (70):135-41
- Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, et al. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology*. 2010;75(23):2087-96.
- Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, et al. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol*. 2010;17(1):3-16.
- Hecht FM, Busch MP, Rawal B, et al. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 2002; 16(8):1119–29
- Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, et al. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *Jama* 1995; 274(7): 554-8.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995. 373(6510): 123-6.
- Holmes H, Davis C, Heath A, et al. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid techniques. *J Virol Meth*. 2001;92(2):141-50
- Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6320-24.
- Joseph SB, Arrildt KT, Swanstrom AE, et al. Quantification of entry phenotypes of macrophage-tropic HIV-1 across a wide range of CD4 densities. *J Virol*. 2014;88(4):1858-69.
- Kamat A, Lyons JL, Misra V, et al. Monocyte activation markers in cerebrospinal fluid associated with impaired neurocognitive testing in advanced HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012;60(3):234-43.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312(5996):767-68.
- Kelder W, McArthur JC, Nance-Sproson T, McClernon D, Griffin DE. Beta-chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in

- cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Annals of neurology*. 1998;44(5):831–35.
- Koot M, Keet IP, Vos AH, De Goede RE, et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Annals of internal medicine*. 1993;118(9):681–88.
 - Lavreys L, Baeten JM, Chohan V, et al., Higher set point plasma viral load and more-severe acute HIV type 1 (HIV-1) illness predict mortality among high-risk HIV-1-infected African women. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(9): 1333-39.
 - Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P. Retroviral DNA Integration. *Chem Rev*. 2016;116(20):12730-57.
 - Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, et al. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol*. 2008;65(1):65-70.
 - Letendre SL, Ellis RJ, Ances BM, McCutchan JA. Neurologic complications of HIV disease and their treatment. *Top HIV Med*. 2010;18(2):45-55.
 - Lindback S, Karlsson AC, Mittler J, et al. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. Karolinska Institutet Primary HIV Infection Study Group. *AIDS* 2000;14(15):2283–91.
 - Lindback S, Thorstensson R, Karlsson AC, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*. 2000;14(15):2333–39.
 - Madec Y, Boufassa F, Porter K, et al. Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverts. *AIDS*, 2005. 19(17): 2001-07.
 - Maschke M, Kastrup O, Esser S, Ross B, Hengge U, Hufnagel A. Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;69(3):376-80.
 - Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR Jr, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med*, 1995. 122(8): 573-79.
 - McArthur JC, Hoover DR, Bacellar H, et al. Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. *Neurology*. 1993; 43:2245–52.
 - Ministerio de Salud de la Nación, Dirección de SIDA y ETS. www.msal.gov/sida
 - Musey L, Musey L, Hughes J, et al., Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 1997. 337(18):1267-74.
 - Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, et al. Human retroviruses and AIDS 1994: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. *Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics (T10)*. New Mexico: 1994.
 - Niu MT, Stein DS, Schnittman SM. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. *J Infect Dis*, 1993. 168(6):1490-501.

- Olivieri KC, Agopian KA, Mukerji J, Gabuzda D. Evidence for adaptive evolution at the divergence between lymphoid and brain HIV-1 nef genes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(4):495-500.
- Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, et al. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(1):254-8.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, 1993. 362(6418): 355-58.
- Pathak VK, Temin HM. Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(16):6019-23.
- Pedersen C, Lindhardt BO, Jensen BL, et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. *BMJ*. 1989;299(6692):154-57.
- Peters PJ, Sullivan WM, Duenas-Decamp MJ, et al. Non-macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes predominate in blood, lymph nodes, and semen: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol*. 2006;80(13):6324-32.
- Peterson J, Gisslen M, Zetterberg H, et al. Cerebrospinal fluid (CSF) neuronal biomarkers across the spectrum of HIV infection: hierarchy of injury and detection. *PLoS One*. 2014;9(12): e116081. Published 2014 Dec 26. doi: 10.1371/journal.pone.0116081
- Power C, McArthur JC, Johnson RT, et al. Demented and nondemented patients with AIDS differ in brain-derived human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences. *J Virol*. 1994;68(7):4643-49.
- Price RW, Spudich SS, Peterson J, et al. Evolving character of chronic central nervous system HIV infection. *Semin Neurol*. 2014;34(1):7-13.
- QIAamp® Viral RNA Mini Handbook, Fourth Edition, December 2014. Quiagen, Hilden, Alemania
- Requejo H. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saúde Pública* 2006;40(2):331-45
- Rossi F, Querido B, Nimmagadda M, Cocklin S, Navas-Martin S, Martin-Garcia J. The V1-V3 region of a brain-derived HIV-1 envelope glycoprotein determines macrophage tropism, low CD4 dependence, increased fusogenicity and altered sensitivity to entry inhibitors. *Retrovirology*. 2008;5:89. Published 2008 Oct 6. 10.1186/1742-4690-5-89
- Rotryng F, Pryluka D, Lapadula P et al. Evolución de la resistencia primaria del HIV-1 en un centro de atención ambulatoria. *Resúmenes del XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, Ciudad de Buenos Aires, 2015*. Abstract 437. Sociedad Argentina de Infectología, Buenos Aires, Argentina. <http://www.sadi2016.com.ar/trabajos/ABS-437.pdf>.
- Satinder D, Bryan P, Irish BP, Nonnemacher MR, Wighdahl B. Genetic Variation and HIV-Associated Neurologic Disease. *Adv Virus Res*. 2013; 87: 183–240.

- Saylor D, Dickens AM, Sacktor N, et al. HIV-associated neurocognitive disorder-pathogenesis and prospects for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12(4):234-48.
- Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and Epidemiologic Features of Primary HIV Infection. *Ann Intern Med*. 1996; 125:257-64.
- Schnell G, Spudich S, Harrington P, Price RW, Swanstrom R. Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 originates from long-lived cells in some subjects with HIV-1-associated dementia. *PLoS Pathog*. 2009;5(4): e1000395
- Schnell G, Price RW, Swanstrom R, Spudich S. Compartmentalization and clonal amplification of HIV-1 variants in the cerebrospinal fluid during primary infection. *J Virol*. 2009; 84(5):2395-407.
- Schouten J, Cinque P, Gisslen M, Reiss P, Portegies P. HIV-1 infection and cognitive impairment in the cART era: a review. *AIDS* 2011, 25(5):561-75.
- Scott LE, Noble LD, Moloi J et al. Evaluation of the Abbott m2000 RealTime Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Assay for HIV Load Monitoring in South Africa Compared to the Roche Cobas AmpliPrep-Cobas Amplicor, Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan HIV-1, and BioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 Assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(7): 2209-17.
- Smit TK, Brew BJ, Tourtellotte W, Morgello S, Gelman BB, Saksena NK. Independent evolution of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance mutations in diverse areas of the brain in HIV-infected patients, with and without dementia, on antiretroviral treatment. *J Virol*. 2004;78(18):10133-48.
- Spector S, Hsia K, Pratt D, et al. Virologic markers of human immunodeficiency virus type 1 in cerebrospinal fluid. The HIV Neurobehavioral Research Center Group. *J Infect Dis*. 1993; 168(1):68-74.
- Spudich SS, Nilsson AC, Lollo ND, et al. Cerebrospinal fluid HIV infection and pleocytosis: Relation to systemic infection and antiretroviral treatment. *BMC Infect Dis*. 2005;5:98, Published 2005 Nov 2. doi:10.1186/1471-2334-5-98
- Spudich S, Gisslen M, Hagberg L, et al. Central nervous system immune activation characterizes primary human immunodeficiency virus 1 infection even in participants with minimal cerebrospinal fluid viral burden. *J Infect Dis*. 2011;204(5):753-60.
- Spudich S, Gonzalez-Scarano F. HIV-1 related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(6): a007120.
- Spudich S. HIV and neurocognitive dysfunction. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2013; 10(3):235-43.
- Sturdevant CB, Dow A, Jabara CB, et al. Central nervous system compartmentalization of HIV-1 subtype C variants early and late in infection in young children. *PLoS Pathog*. 2012;8(12): e1003094
- Sturdevant CB, Joseph SB, Schnell G, Price RW, Swanstrom R, Spudich S. Compartmentalized replication of R5 T cell-tropic HIV-1 in the central nervous system early in the course of infection. *PLoS*

- Pathog.* 2015;11(3): e1004720. Published 2015 Mar 26. doi: 10.1371/journal.ppat.1004720
- Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(12): a007443. Published, doi:10.1101/cshperspect.a007443
 - Tang YW, Huong JT, Lloyd RM Jr, Spearman P, Haas DW. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 RNA sequence heterogeneity in cerebrospinal fluid and plasma. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4637–9.
 - The INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med.* 2015;373(9):795–807.
 - Tozzi V, Balestra P, Bellagamba R, et al. Persistence of neuropsychologic deficits despite long-term highly active antiretroviral therapy in patients with HIV-related neurocognitive impairment: prevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007; 45(2):174–82.
 - Trypsteen W, Kiselinova M, Vandekerckhove L, De Spiegelaere W. Diagnostic utility of droplet digital PCR for HIV reservoir quantification. *J Virus Erad.* 2016;2(3):162-9.
 - Venturi G, Catucci M, Romano L, et al; Antiretroviral Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Protease from Paired Cerebrospinal Fluid and Plasma Samples. *J Infect Dis.* 2000; 181(2):740–45.
 - Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 1995. 373(6510): 117-22.
 - Wirden M, Soulie C, Valantin MA, et al. Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(4): 709–12 doi:10.1093/jac/dkq544 Advance Access publication 26 January 2011.
 - Wynn HE, Brundage RC, Fletcher CV. Clinical implications of CNS penetration of antiretroviral drugs. *CNS drugs* 2002; 16(9):595-609
 - Yarchoan R, Venzon DJ, Pluda JM, et al. CD4 count and the risk for death in patients infected with HIV receiving antiretroviral therapy. *Ann Intern Med*, 1991. 115(3):184-89.
 - Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a quality assurance program for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS Clinical Trial Group Virology Laboratories. *J. Clin Microbiol* 1996; 34(11):2695-701.
 - Zapiola I, Cecchini D, Fernández Giuliano S, et al. Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia en mujeres embarazadas infectadas con HIV: análisis comparativo del periodo 2008-2011 vs 2012-2014. In: Resúmenes del XV Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología, Ciudad de Buenos Aires, 2015. Abstract 275. Sociedad Argentina de Infectología, Buenos Aires, Argentina. <http://www.sadi2016.com.ar/trabajos/ABS-275.pdf>