

DESCRIPCIÓ DE PACIENTS I SELECCIÓ DE MOSTRES

S'han estudiat un total de 3 cohorts de pacients sotmesos a diferents pautes d'interrupcions estructurades del tractament (IET). En la cohort 1 es va realitzar IET, en la cohort 2 i 3 IET més un immunomodulador, hidroxiurea i l'àcid micofenòlic, respectivament.

Tots els pacients es van caracteritzar per presentar una infecció crònica assintomàtica pel VIH-1, tenir uns nivells de cèl.lules de CD4 superior als 500×10^6 cèl.lules/l, i una càrrega vírica superior a les 10.000 còpies/ml en la cohort 1 i 2, i una CV basal < 5000 còpies/ml en la cohort 3.

En tots els pacients es va demanar consentiment informat i els diferents protocols d'estudi van estar aprovats pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic.

Cohort 1. Es compon de 10 pacients que van iniciar TARGA: estavudina (d4T) (30-40mg/12h segons pes corporal) + lamivudina (3TC) (150mg/12h) + ritonavir (RTV) (600mg/12h) o indinavir (IDV), quan el RTV no era tolerat. 8 d'aquest 10 pacients provenen de la cohort espanyola de l'EARTH-1 (García F, 1999) (pacients 12, 72, 107, 156, 157, 169, 170 i 211). Els altres dos pacients (pacients 4 i 226) pertanyien a la cohort EARTH-2 (García F, 2000). Es van determinar els valors de càrrega vírica al llarg de l'any previ a la interrupció del tractament (basal (-52), 2, 4, 8, 16, 32, 52 setmanes). Després d'un any de tractament amb una càrrega vírica < 20 còpies/ml almenys durant els últims 8 mesos, es va iniciar el protocol d'IET i es va fer l'estudi virològic durant el període de seguiment, amb el previ consentiment dels pacients (Figura 11).

Després de cada interrupció, les visites mèdiques es van programar al dia 0, i després setmanalment. La CV plasmàtica, les respostes immunològiques limfoproliferatives i citotòxiques específiques anti-VIH-1 es van realitzar setmanalment durant el període d'interrupció del tractament, i bimensualment durant el període de TARGA. Després de la primera interrupció, es va introduir el mateix regim antirretroviral quan es va detectar una CV > 200

còpies/ml. Després de la segona interrupció, es va reintroduir el mateix règim antirretroviral transcorregut un mes de la primera detecció de CV > 200 còpies/ml, si la CV no disminuïa de manera espontània. En aquest cas, el tractament era reintroduït quan la CV incrementava o no disminuïa en dues determinacions consecutives. Després de la tercera interrupció el tractament únicament es va reintroduir quan la CV va assolir un valor d'estabilització similar al basal o >10000 còpies/ml després de 6 mesos sense TARGA.

Paral·lelament es van seguir 20 pacients sense tractament durant 1 any com a grup control.

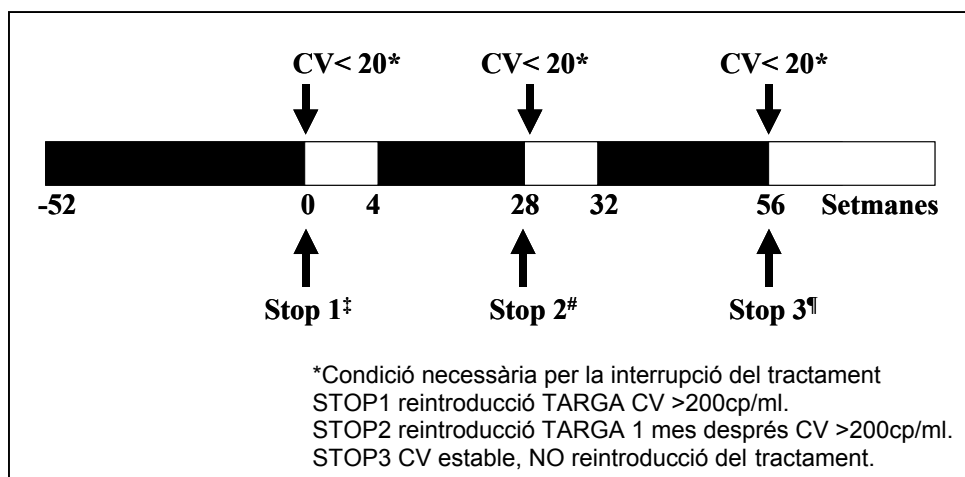


Figura 11. Esquema del tractament de la Cohort 1

Cohort 2. Es compon de 20 pacients procedents de la cohort de l'EARTH-2 tractats amb d4T + didanosina (ddI) + IDV i essent randomitzats al grup de TARGA (n= 10) o grup TARGA + d'hidroxiurea (HU) (n = 10). Aquests pacients presentaven uns nivells de limfòcits T CD4 >500x10⁶ cèl.lules/l i la CV basal, previ al tractament antirretroviral, >5000 còpies/ml. Van se tractats durant un període >= 6 mesos amb estavudina (30-40mg/12h depenent del pes corporal) + lamivudine (150mg/12h) + indinavir (800mh/8h) durant 52 setmanes amb una CV <20còpies/ml durnat un mínim de 32 setmanes. Posteriorment es va

administrar a tots els pacients: estavudina (30-40 mg/12h depenent del pes corporal) + didanosina (150-200 mg dos dosis al dia depenent del pes corporal) + indinavir (800 mg/8hores) i van ser randomitzats al de TARGA (n=10) o al grup de TARGA+HU (500mg/12h) (n=10).

Aquests 20 pacients van ser sotmesos a 5 interrupcions del tractament separats per 8 setmanes del mateix TARGA. En la primera interrupció, el TARGA es va reintroduir quan la CV era > 200 còpies/ml; la duració mitja d'aquesta interrupció va ser de 3 setmanes. El TARGA va ser interromput durant un període fixe de 2 setmanes en la segona, tercera i quarta interrupció. En la cinquena interrupció, el TARGA va ser interromput fins que la càrrega vírica va arribar al punt d'estabilització. La HU es va interrompre durant els períodes de no TARGA de la primera, segona i tercera interrupció, i es va mantenir durant la quarta i cinquena (Figura 12).

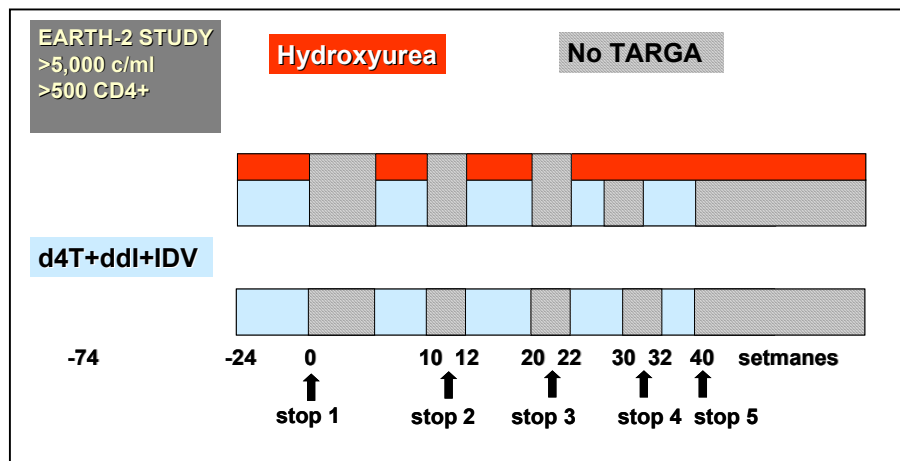


Figura 12. Esquema del tractament de la Cohort 2.

Cohort 3. Es compon de 17 pacients amb un valor de limfòcits T CD4 basal >500x10⁶ cèl.lules/l i la CV basal, previ al tractament antirretroviral, entre 200-5000 còpies/ml. Van ser tractats amb abacavir (ABV) (300 mg dues dosis al dia)+efavirenz (EFV) (600 mg una dosi al dia)+nelfinavir (NFV) (1250 mg dues

dosis al dia) durant 12 mesos (des del dia -365 fins al dia 0). Si presentaven una CV < 20 còpies/ml durant els últims 6 mesos eren randomitzats a:

Grup I: abacavir (ABV) + efavirenz (EFV) + nelfinavir (NFV)

Grup II: abacavir (ABV) + efavirenz (EFV) + nelfinavir (NFV) + micofenolato mofetil (MMF) (0.25 g BID).

Després de 4 mesos de la randomització, es va realitzar teràpia intermitent en els dos grups de pacients. Es va retirar el TARGA, mantenint el MMF en el grup II durant 4 mesos. En tots aquells pacients que els 4 mesos tenien una CV detectable es va re-introduir el TARGA durant 4 mesos més. Després es va realitzar una tercera interrupció (exceptuant el MMF en el grup II) fins que la CV va arribar en el seu valor d'estabilització (6 mesos com a mínim). El tractament es va re-iniciar si la CV superava les 50.000 còpies/ml en dues determinacions seguides (amb una separació mínima de dues setmanes) o si els limfòcits CD4 disminuïen per sota de 350 cèl.lules/mm³ (Figura 13).

Com a conseqüència de la vida mitja llarga de l'efavirenz, aquest es va interrompre, en les diferents IETs, dos dies abans que la resta de fàrmacs de la combinació.

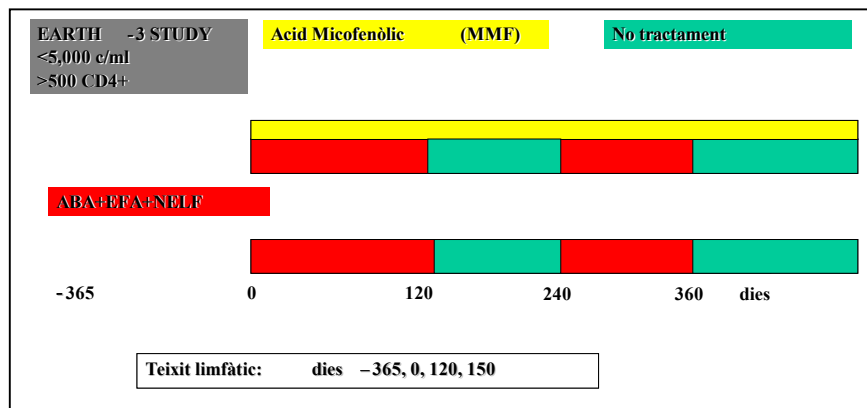


Figura 13. Esquema de tractament de la Cohort 3.

Amb la finalitat d'avaluar el risc de desenvolupar mutacions de resistències durant les IET, es van estudiar un grup de 34 pacients sotmesos a diferents pautes d'IET a l'Hospital Clínic de Barcelona. Aquest grup incloïa els

10 pacients de la cohort 1, 15 pacients de la cohort 2, 5 pacients de la cohort 3 i 5 nous pacients que estaven inclosos en altres protocols d'IET .

Els punts estudiats de cada pacient van ser els següents:

- en plasma (virus ARN): moment basal (abans d'iniciar qualsevol tractament), durant el període de TARGA (abans de ser inclosos en els diferents estudis d'IET), 15 dies després de cada interrupció del tractament.

- en ADN proviral: d'aquells pacients que presentaven mutacions de resistència abans d'iniciar les IET i que no es van tornar a detectar al llarg de les diferents interrupcions del tractament.

MÈTODES

1. PROCESSAMENT DE MOSTRES

1.1 Separació de plasma i de CMSP

MOSTRES

Sang amb anticoagulant EDTA

REACTIUS

1. Dulbecco		Veure preparació de reactius
2. SBF	Ref: ESBW14602F	C.Comercial: Innogenetics
3. DMSO	Ref: D8779-100mL	C.Comercial: Sigma-Aldrich
4. Ficoll Linfocel	Ref: 265629	C.Comercial: Soria Melquizo

PREPARACIÓ DE REACTIUS

1. Dulbecco
 - KCl 200 mgr / L

KH_2PO_4 200 mgr / L

NaCl 8 gr / L

Na_2HPO_4 1400 mgr / L

Ajustar a PH: 7,2

Enrasar a 1 L amb aigua destil·lada. Autoclavar per la seva esterilització.

2. SBF (Sèrum boví fetal)

Descongelar una ampolla de 500 mL

Descomplementar durant 30 min a 56°C en un bany. Agitar periodicament per evitar que precipitin las proteïnes i formin agregacions.

En condicions estèrils:

Una cop fred, aliquotar dins de la cabina en tubs de 50 mL con 45 mL por tub.

Congelar a -20°C

Vigilar SEMPRE que no estigui contaminat.

3. 10% DMSO+ SBF

En condicions estèrils:

En un tub de 50 mL de SBF que contingui 45 mL de SBF descomplementat afegir 5 mL de DMSO.

Mantenir a la nevera i utilitzar fresc.

* Vigilar SEMPRE que no estigui contaminat.

4. Ficoll Linfocel Densitat: 1.077

Preparat comercial que cal conservar a les fosques i a temperatura ambient.

PROCEDIMENT

A) Separació del plasma de la sang total

1. Centrifugar tots els tubs amb anticoagulant 10 min a 1500 rpm.
2. Rotular un tub de 15 mL per pacient per col·locar el plasma.
3. Extraure el plasma (lliure de cèl·lules) dels tubs amb anticoagulant i transferir-lo al tub de 15 mL amb una pipeta pasteur estèril.
5. Centrifugar el plasma 10 min a 2000 rpm, per eliminar les plaquetes.

6. Preparar 5 etiquetes amb: CODI+EXTRACCIÓ, PLASMA + anticoagulant (si no és EDTA) , DATA.
7. Etiquetar 5 tubs de rosca Sarstedt còncics de 1.5 mL.
8. Aliquotar, amb pipeta pasteur estèril, 1 mL de plasma en cada tub.
9. Guardar en caixes marrons de 10 x 21.
9. Emmagatzemar a -80°C .

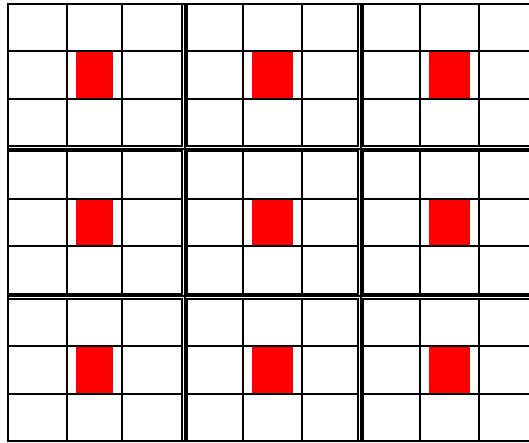
B) Separació de CMSP de sang total per gradient de Ficoll

Obtenció de cèl.lules CMSP mitjançant separació per gradient de ficoll.

El ficoll és un Diatrizoat Sòdic que permet separar les cèl.lules mononucleades (limfòcits + monòcits) dels eritròcits i polimorfonuclears mitjançant centrifugació per gradient de densitat.

1. Amb els codis obtinguts realitzar un llistat de treball dividint les mostres segons el que es requereixi:
P : proliferació immuno **C** : cel.luloteca **NH** : no cèl.lules
2. Centrifugar tots els tubs amb anticoagulant 10 min a 1500 rpm, per procedir a la separació del plasma (veure apartat A).
3. Rotular tubs de 50 mL necessaris segons el llistat de treball.
4. Preparar tubs de 50 mL ambn 15 mL de ficoll per l'obtenció de CMSP.
Preparar tants tubs com ficolls es tinguin que realitzar depenent del volum de sang obtingut de l'extracció.
5. Transferir la sang (lliure de plasma) màx.10 mL per cada ficoll ; dels tubs amb anticoagulant amb una pipeta pasteur a un tub de 50 mL. Afegir Dulbecco fins un volum final de 30 mL amb pipeta de 25 mL i barrejar.
Dil.luir la sang amb dulbecco en una proporció 1:2 o 1:3
6. Amb la mateixa pipeta de 25 mL decantar cuidadosament la sang sobre un tub de 50 mL que contingui 15 mL de ficoll, a la raó d' 1 part de Ficoll por 2 parts de sang dil.luida. És molt important que la sang no quedi barrejada amb el ficoll.
*Col.locar el tub amb ficoll inclinat, recolsar la pipeta a la paret del tub i decantar la sang lentament quedant dues capes diferenciades.

7. Realitzar un màxim de 6-8 ficolls per persona , d' una vegada, per evitar que el procès es demori i la sang es barregi amb el ficoll.
8. Centrifugar els tubs, immediatament després de realitzar el ficoll, durant 30 minuts a 2000 rpm i a temperatura ambient (TA).
9. Després de la centrifugació, extraure i descartar el sobrenadant amb una pipeta de 10 mL (sense arribar a la monocapa).
Amb la mateixa pipeta de 10 mL recollir la monocapa de PBMC, tenint compte de no recollir restes de ficoll, i col.locar-lo en un altre tub estèril de 50 mL.
D'un mateix pacient, col.locar els CMSP obtinguts de 2 ficolls en un mateix tub de rentat.
10. Afegir PBS o Dulbecco fins 50 mL per rentar i centrifugar durant 10 minuts a 1500 rpm.
11. Descartar el sobrenadant, donar un cop al tub per resuspendre el sediment abans d'afegir el Dulbecco.
12. Afegir PBS o Dulbecco fins 50 mL per rentar i centrifugar durante 10 minuts a 1500 rpm.
13. Descartar el sobrenadant, donar un cop al tub per resuspendre el sediment abans d' afegir el Dulbecco.
14. Resuspendre el sediment en 10 mL de PBS o Dulbecco amb una pipeta de 10 mL, barrejar bé i recollir una alíquota (uns 200 µL) que passarem a un tub eppendorf (A).
En un tub eppendorf (B) posar 10 µL de Trypan Blue + 10 µL sèrum fisiològic.
15. Pipetejar 10 µL de l'eppendorf (A) i transferir-los a l'eppendorf (B), barrejar.
16. Carregar la cambra desetxable i comptar 9 quadres (1 quadre dels 9).
Cambra: Hycor Kova Glasstic Slide 10 with grids Ref: 87144



Càlcul del N° CMSP/mL viables:

(N° Cèl.lules comptades / 9) x 9 x 3 x 10000 x 10 mL

9 : quadrats comptats

9: quadrants

3: factor de dil.lució

10000: volum superfície de la cambra

10: volum final on estan resuspeses les cèl.lules.

17. Congelació de cèl.lules

a) Cèl.lules no viables:

- Preparar etiquetes amb: CODI+EXTRACCIÓ, SEDIMENT, DATA
- Etiquetar 3 tubs per pacient (tubs de rosca Sarstedt cònic).
- Posar en el tub el volum corresponent a 2×10^6 , centrifugar 5 min a 1500 rpm i descartar el sobrenadant.
- Guardar en caixes marrons de 10 x 21, al costat dels plasmies.
- Emmagatzemar a -80°C .

b) Cèl.lules viables:

- Preparar etiquetes amb: CODI+EXTRACCIÓ, CMSP, DATA
- Etiquetar n° tubs segons els milions obtinguts i guardar en el congelador (criotubs CELLSTAR)
- Posar en el tub 10×10^6 de cèl.lules viables min i màx. 3 tubs.

- Centrifugar les cèl.lules 5 min a 1500 rpm. Descartar el sobrenadant i donar un cop al tub per resuspendre el sediment.
- Afegir 1 mL de SFB+10% DMSO (guardat a la nevera) per tub a congelar, afegir lentament, en agitació i aliquotar. Col.locar els tubs en el frosty i congelar a -80°C .
- Comprovar que el Frosty conté isopropanol en el seu interior.
- A las 48 h guardar en nitrogen.

1.2. Introducció de les dades a la base de dades.

Introduir les dades i aliquotes dels pacients inclosos en els diferents estudis.

2. QUANTIFICACIÓ DE L'ARN VIH-1

2.1 En plasma

La concentració de l'ARN del VIH-1 en plasma es va determinar emprant la tècnica de RT-PCR quantitativa amb l'assaig comercialitzat Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ,USA) seguint les instruccions del fabricant amb un límit de quantificació de 20 còpies/ml. Les mostres amb una quantificació <20 còpies/ml es van tornar a analitzar emprant un mètode descrit per Schockmel i col. amb un límit de detecció de 5 còpies/ml, detallat a continuació.

- centrifugar 1ml de plasma a 4°C durant 80 minuts a $50.000\times g$
- preparar el volum del tampó de lisis i els estàndars interns (IQS) necessaris per l'experiment (150 μl per tub), ajustar la quantitat de l'IQS per aconseguir la mateixa concentració que l'estàndar d'Amplicor per la reacció de PCR (per exemple: 8.8 ml tampó de lisis + 100 μl d'IQS).
- descartar el sobrenadant amb una punta de filtre per aerosols estèril deixant aproximadament 100 μl .
- afegir 150 μl del tampó de lisis que conté l'IQS.
- afegir 450 μl del tampó de lisis sense l'IQS.

- agitar 5 seg i incubar 10 minuts a temperatura ambient.
- afegir 650 µl d'isopropanol 100% i agitar.
- centrifugar 15 min a 16.000 rpm.
- descartar el sobrenadant i afegir 1ml d'EtOH 70% i agitar.
- centrifugar 5 min a 16.000 rpm.
- descartar el sobrenadant. Fer un pols a la centrifuga i descartar novament el sobrenadant emprant una punta estèril amb filtre per aerosols.
- col.locar els tubs a temperatura ambient durant 5 min per evaporar l'EtOH. Una manera de realitzar aquest pas és col.locant els tubs en una cabina de fluxe llaminar que ha estat amb llum ultraviolada tota la nit. A més a més mai es realitza aquest protocol en pacients que han estat amb càrregues virals plasmàtiques superiors a 1000 còpies/ml per evitar possibles problemes de contaminació.
- afegir 55 µl del tampó eluient i agitar.
- utilitzarem 10 µl d'ARN per fer l'amplificació i detecció.

2.2 En teixit limfàtic

De tots els individus amb amígdales accessibles es va biopsiar el teixit amigdalari i es van guardar en nitrogen líquid. La càrrega vírica en teixit limfàtic es va determinar utilitzant el NucliSens HIV-1 RNA QT Assay (Organon Teknika, Turnhout, Belgium). La quantificació es va expressar amb còpies per mil.ligram de teixit.

La peça ha de pesar entre 8-12mg, quantitats inferiors tindrien una repercussió en el límit de sensibilitat de la tècnica i quantitats superiors podrien provocar inhibicions durant el procés.

2.2.1 Preparació de la mostra.

- afegir 1ml de tampó de lisis que conté tiocianat de guanidina.
- homogenitzar amb els morters disgregant al màxim la peça.
- Conservar a -70°C fins la seva posterior utilització.

2.2.2 Extracció de l'àcid nucleic.

- passar 900 µl d'un nou tub de tampó de lisis a un ependorf i afegir-li 50 µl de la mostra previamente lisada i homogenitzada.
- afegir 50 µl de sílica, agitar i incubar 10 min a TA.
- centrifugar 1 min a 13.000 rpm i descartar el sobrenadant.
- afegir 1ml de sol.lució de rentat. Centrifugar 1 min i descartar el sobrenadant. Repetir aquest pas una segona vegada.
- afegir 50 µl del tampó d'el.lució i agitar.
- incubar en un bany sec a 56°C durant 2 min.
- extreure 5 µl, tenint en compte no aspirar sílica i posar-ho en un tub per la posterior amplificació.

2.2.3 Amplificació.

- reconstituir els primers amb 120 µl del diluent de primers.
- als 5 µl de l'àcid nucleic extret previamente afegir 10 µl del primer reconstituït. Barrejar.
- incubar a 65°C durant 5 min i després a 41°C 5min.
- reconstituir en gel els enzims amb 55 µl del diluent per enzims.
- afegir 5 µl de l'enzim reconstituït.
- incubar a 41°C durant 1h 35 min.
- congelar a -20°C.

2.2.4 Detecció i quantificació.

- atemperar els reactius i preparar un bany maria a 41°C.
- preparar en tubs ependorf les dil.lucions de la sonda (sol.lució hibridació) : 130 µl sol.lució oligo-bead + 130 µl de sonda (WT, Qa, Qb, Qc). S'utilitzarà perquè el sistema pugui fer una recta a partir de la qual s'extrapolerà el valor de la mostra problema.
- en tubs ependorf fer la dil.lució 1/20 de la mostra en un volum de 100 µl.
- preparar un blanc: 20 µl sol.lució WT + 5 µl diluent de detecció.
- incubar en el bany maria a 41°C durant 30 min. Agitar de tant en quan.

- afegir 300 µl de tampó de detecció en cada tub de reacció.
- Col·locar els tubs en el carrusel de la màquina que farà la lectura en el següent ordre:
 - primera posició 300 µl de la sol·lució de referència.
 - segona posició el blanc
 - a partir de la tercera posició posar les mostres en l'ordre establert per la llista de treball.

El resultat es dona en còpies VIH-1/mg teixit.

Exemple

Volumen: 0.05 ml (dil de la mostra 1/20)

Pes biopsia: 10 mg

$X = \text{pes biopsia} \times 0.05 \text{ ml}$

$\text{cp} \times (X) = \dots\dots\dots \text{cp/mg teixit}$

2.3 En LCR

La concentració de l'ARN del VIH-1 en LCR es va determinar emprant la tècnica de RT-PCR quantitativa de Cobas Amplicor HIV-1 Monitor (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ, USA) seguint les instruccions que es descriuen a continuació amb un límit de quantificació de 20 còpies/ml.

- 150 µl de mostra
- afegir 150 µl del tampó de lisis que conté l'IQS.
- afegir 450 µl del tampó de lisis sense l'IQS.
- agitar 5 seg i incubar 10 minuts a temperatura ambient.
- afegir 650 µl d'isopropanol 100% i agitar.
- centrifugar 15 min a 16.000 rpm.
- descartar el sobrenadant i afegir 1ml d'EtOH 70% i agitar.
- centrifugar 5 min a 16.000 rpm.
- descartar el sobrenadant. Fer un pols a la centrífuga i descartar novament el sobrenadant emprant una punta estèril amb filtre per aerosols.

- col·locar els tubs a temperatura ambient durant 5 min per evaporar l'EtOH. Una manera de realitzar aquest pas és col·locant els tubs en una cabina de fluxe llaminar que ha estat amb llum ultraviolada tota la nit.
- afegir 55 µl del tampó eluent i agitar.
- utilitzarem 10 µl d'ARN per fer l'amplificació i detecció.

2.4 Càlcul del temps de duplicació de la càrrega viral.

Amb el programa Prism Graph Pad v.3 es fa una transformació de les dades (la CV i els dies) d'exponencial a linial:

$$Y = \ln(Y) \quad \text{éssent "Y" la CV}$$

Es fa la regressió linial:

$$\ln Y = a + bt \quad \begin{array}{l} \text{éssent "a" la Y per l'interval de temps} \\ \text{"b" la pendent} \end{array}$$

$$t_{1/2} = 0.69/b$$

3. ESTUDI DEL GEN ENV

Amplificació de l'ARN del VIH-1 mitjançant la transcripció inversa (RT) i reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

3.1 Extracció de l'ARN pel mètode de QIAgen.

L'extracció de l'ARN es va realitzar a partir d'1ml de plasma de cada mostra que es va centrifugar a 50.000 xg 1 hora a 4°C. Es va treure el sobrenadant i es va realitzar l'extracció amb els reactius comercials (QIAamp Viral RNA kit, Qiagen, Hilden, Alemanya) seguint les intruccions del fabricant.

PREPARACIÓ

- Assegurar-se que s'ha afegit l' etanol als tampons de rentat AW1 i AW2.
- Assegurar-se que el tampó AVL conté el Carrier ARN.

- Escalfar el tampó AVL en el bany sec a 56°C per desfer els cristalls, agitar-lo periodicament.

A) LISI

- Dispensar 1 mL de plasma a un tub eppendorff estèril i rotulat.
- Ultracentrifugar 1 hora a 23000 rpm 4°C.
- Decantar el sobrenadant amb la pipeta (deixar uns 50-100 µL en el tub per deixar intacte el sediment aconseguït durant la centrifugació).
- Afegir 330 µL de Tampó de Lisis AVL i fer un vòrtex.
- Incubar 10 min a T^a ambient i fer un pols.
- Afegir 280 µL d'etanol absolut i fer un vòrtex i un pols.

B) UNIÓ DE L'ARN i RENTAT

- Transferir el volum total a la columna ubicada en el seu corresponent recol.lector.
- Centrifugar 2 min a 13000 rpm a T^a ambient.
- Decantar el contingut del tub col.lector i insertar la columna novament en el tub col.lector.
- Rentar la membrana de nitrocel.lulosa on està unit l'ARN amb el tampó AW1.
- Centrifugar 2 min a 13000 rpm a T^a ambient.
- Decantar el contingut del tub col.lector i insertar la columna novament en el tub col.lector.
- Rentar la membrana amb 500 µL del tampó AW2.
- Centrifugar 3 min a 13000 rpm T^a ambient.
- Decantar el contingut del tub col.lector i insertar la columna novament en el tub col.lector.
- Rentar una segona vegada amb 500 µL del tampó AW2.
- Centrifugar 3 min a 13000 rpm a T^a ambient.
- Decantar el contingut del tub col.lector i insertar la columna novament en el tub col.lector.

- Centrifugar 1 min sense afegir cap tampó a 13000 rpm a T^a ambient, simplement per eliminar possibles restes d'etanol continguts en el tampó que podrien donar problemes d'inhibició durant el procés d'amplificació.

C) EL.LUCIÓ

- Col·locar la columna en un ependorff estèril.
- Afegir 60 µL de tampó d'el·lució AVE, previament escalfat per millorar l'eficiència d'el·lució del material genètic contingut a la membrana.
- El·lucir centrifugant a 13000 rpm a T^a ambient durant 2 min.
- Passar el contingut en un tub de rosca Sarstedt cònic
- Emmagatzemar a -80°C.

3.2 Transcripció inversa (RT)

La transcripció inversa es va realitzar a partir de 5 µl d'ARN i 20 µl de la barreja tamponada que es descriu a continuació, durant 1 hora a 42°C.

Composició de la barreja tamponada en un volum final 20 µl:

Concentracions finals:

1.5 µM	Primer extern antisentit ED12 5'-AGTGCTTCCTGCTCCCAAGAACCCAAG-3'
1X	Tampó HF Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).
2.5 mM	MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).
1 mM	dNTPs (10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
0.45U/µl	AMV (Avian Myeloblastosis Virus) (Promega, Promega Corporation, Madison, USA).
1 U/µl	Rnasin (Promega, Promega Corporation, Madison, USA).
5 mM	DTT (Dithiothreitol) (Promega, Promega Corporation, Madison, USA).

3.3. Reacció en cadena de la polimerasa 1 (PCR1).

La PCR1 es va realitzar a partir dels 25 µl de volum de la RT i 75 µl de la barreja tamponada que es descriu a continuació en un volum final de 100 µl:

Concentracions finals:

0.5 µM	Primer extern sentit C2-2S 5'-CAATGTACACATGGAATTAGGCCA-3'
1x	Tampó HF Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).
2 mM	MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).
0.035 U/µl	Taq Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

La reacció es va realitzar en un termociclador a les següents condicions de temps i temperatura:

2min a 94°C, 30 cicles x [30sec a 94°/30sec a 59°C/1min a 68°C], 10min a 68°C.

3.4 Reacció en cadena de la polimerasa 2 (PCR2).

La PCR2 es va realitzar a partir de 5 µl de volum de la reacció de la PCR1 i 95 µl de la barreja tamponada que es descriu a continuació en un volum final de 100 µl:

Concentracions finals:

0.5 µM	Primer intern sentit C2F-M 5'-TCTAAGCTTACTTCTCCAATTGTCCCTC-3'
0.5 µM	Primer intern antisentit Wea 5'-TCTAAGCTTCACTTCTCCAATTGTCCCTC-3'
1x	Tampó HF Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).
2 mM	MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).
1 mM	dNTPs (10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

0.035 U/ μ l Taq Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

La reacció es va realitzar en un termociclador a les següents condicions de temps i temperatura:

2min a 94°C, 30 cicles x [30sec a 94°/30sec a 51°C/1min a 68°C], 10min a 68°C.

Les mostres es van analitzar en gels d'agarosa a l'1% amb una concentració de 5 μ g/ml de bromur d'etidi (Br Et).

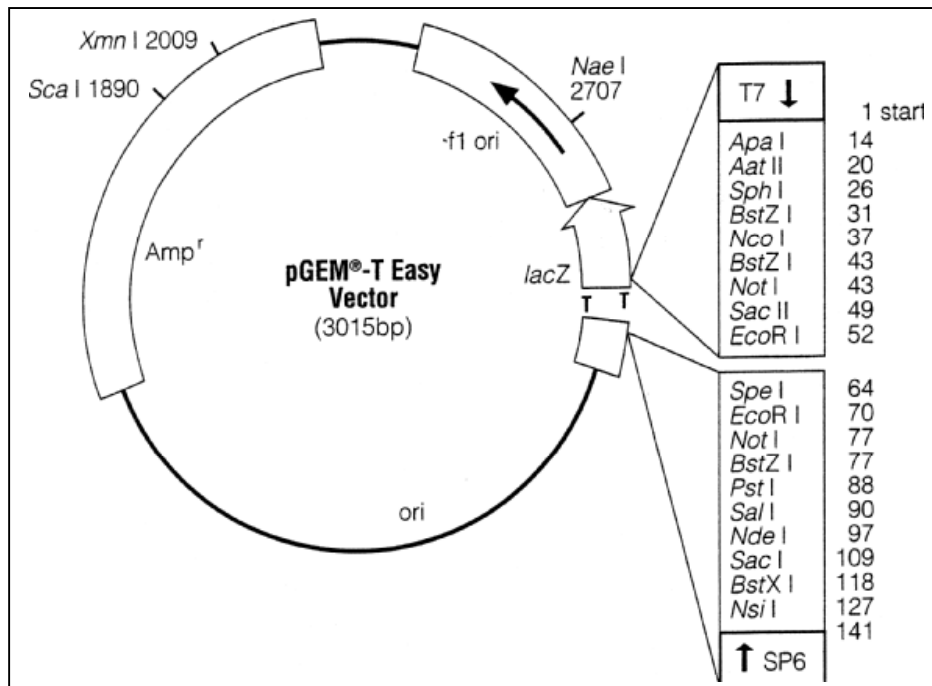
3.5 Purificació del productes de PCR.

Els fragments amplificats es van purificar amb QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del fabricant.

Es va realitzar un segon gel d'agarosa a la mateixa concentració d'agarosa 1%, per comprovar la presència del fragment amplificat previament.

3.6 Clonació.

La clonació es va realitzar amb pGEM-T Easy System (Promega, Madison, WI, USA) seguint les instruccions del fabricant.



- Centrifugar les cèl.lules 5 min a 1500 rpm. Descartar el sobrenadant i donar un cop al tub per resuspendre el sediment.
- Afegir 1 mL de SFB+10% DMSO (guardat a la nevera) per tub a congelar, afegir lentament, en agitació i aliquotar. Col.locar els tubs en el frosty i congelar a -80°C .
- Comprovar que el Frosty conté isopropanol en el seu interior.
- A las 48 h guardar en nitrogen.

1.2. Introducció de les dades a la base de dades.

Introduir les dades i aliquotes dels pacients inclosos en els diferents estudis.

2. QUANTIFICACIÓ DE L'ARN VIH-1

2.1 En plasma

La concentració de l'ARN del VIH-1 en plasma es va determinar emprant la tècnica de RT-PCR quantitativa amb l'assaig comercialitzat Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ,USA) seguint les instruccions del fabricant amb un límit de quantificació de 20 còpies/ml. Les mostres amb una quantificació <20 còpies/ml es van tornar a analitzar emprant un mètode descrit per Schockmel i col. amb un límit de detecció de 5 còpies/ml, detallat a continuació.

- centrifugar 1ml de plasma a 4°C durant 80 minuts a $50.000\times g$
- preparar el volum del tampó de lisis i els estàndars interns (IQS) necessaris per l'experiment (150 μl per tub), ajustar la quantitat de l'IQS per aconseguir la mateixa concentració que l'estàndar d'Amplicor per la reacció de PCR (per exemple: 8.8 ml tampó de lisis + 100 μl d'IQS).
- descartar el sobrenadant amb una punta de filtre per aerosols estèril deixant aproximadament 100 μl .
- afegir 150 μl del tampó de lisis que conté l'IQS.
- afegir 450 μl del tampó de lisis sense l'IQS.

- Centrifugar les cèl.lules 5 min a 1500 rpm. Descartar el sobrenadant i donar un cop al tub per resuspendre el sediment.
- Afegir 1 mL de SFB+10% DMSO (guardat a la nevera) per tub a congelar, afegir lentament, en agitació i aliquotar. Col.locar els tubs en el frosty i congelar a -80°C .
- Comprovar que el Frosty conté isopropanol en el seu interior.
- A las 48 h guardar en nitrogen.

1.2. Introducció de les dades a la base de dades.

Introduïr les dades i aliquotes dels pacients inclosos en els diferents estudis.

2. QUANTIFICACIÓ DE L'ARN VIH-1

2.1 En plasma

La concentració de l'ARN del VIH-1 en plasma es va determinar emprant la tècnica de RT-PCR quantitativa amb l'assaig comercialitzat Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ,USA) seguint les instruccions del fabricant amb un límit de quantificació de 20 còpies/ml. Les mostres amb una quantificació <20 còpies/ml es van tornar a analitzar emprant un mètode descrit per Schockmel i col. amb un límit de detecció de 5 còpies/ml, detallat a continuació.

- centrifugar 1ml de plasma a 4°C durant 80 minuts a $50.000\times g$
- preparar el volum del tampó de lisis i els estàndars interns (IQS) necessaris per l'experiment (150 μl per tub), ajustar la quantitat de l'IQS per aconseguir la mateixa concentració que l'estàndar d'Amplicor per la reacció de PCR (per exemple: 8.8 ml tampó de lisis + 100 μl d'IQS).
- descartar el sobrenadant amb una punta de filtre per aerosols estèril deixant aproximadament 100 μl .
- afegir 150 μl del tampó de lisis que conté l'IQS.
- afegir 450 μl del tampó de lisis sense l'IQS.

Esquema del vector de clonació. Punts de referencia de la seqüència del vector pGEM-T Easy:

Lloc d'iniciació de la transcripció de la Polimerasa ARN T7	1
Loc d'iniciació de la transcripció de la Polimerasa RNA SP6	141
Promotor de la Polimerasa ARN T7 (-17 a +3)	2999-3
Promotor de la Polimerasa ARN SP6 (-17 a +3)	139-158
Regió de clonatge múltiple	10-128
Codoó d'inici lacZ	180
Seqüències de l'operó lac	2836-2992, 166-395
Operó lac	200-216
Regió codificadora β -lactamasa	1337-2197
Regió fag f1	2380-2835
Lloc d'unió del primer sentit pUC/M13	2956-2972
Loc d'unió del primer antisentit pUC/M13	176-192

3.6.1 Lligació.

El pGEM-T Easy Vector System està optimitzat per ser utilitzat a una proporció molar d' Insert d'ADN control : vector de 1:1, podent-se utilitzar proporcions compreses entre 8:1 fins a 1:8. En aquest treball va ser necessari l'optimització d'aquestes proporcions.

El pGEM-T Easy Vector és aproximadament de 3Kb i està a una concentració de 50ng/ μ l. Per calcular la quantitat de ng de l'insert necessaris per la lligació es va aplicar la següent fórmula:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{Kb insert}}{\text{Kb vector}} \times \text{proporció molar insert} = \frac{\text{ng insert}}{\text{vector}}$$

en el nostre cas:

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times 0.65 \text{ Kb insert}}{3.0 \text{ Kb vector}} \times \frac{3}{1} = 32.5 \text{ ng insert d'ADN}$$

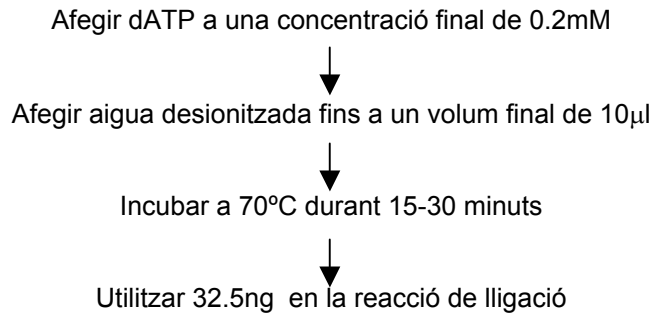
Previ al procés de clonació es van preparar els productes de PCR2 purificats, aquesta preparació consisteix en l'adició d'unes cues poli-A.

Es comença afegint 1-7 μ l (depenent de la concentració) del producte purificat de PCR2 generat per una polimerasa d'alta fidelitat de còpia (Expand High Fidelity)



S'afegeix 1 μ l Taq Polymerasa i tampó 10X amb MgCl₂





Les reaccions de lligació es van preparar amb un control positiu (CP) i un control negatiu (CN).

La reacció es va realitzar emprant el volums següents:

	Mostra	CP	CN
Tampó lligació 2X	5µl	5µl	5µl
PGEM-T Easy Vector	1µl	1µl	1µl
Producte de PCR	X	-	-
Control de l'insert	-	2µl	-
ADN lligasa	1µl	1µl	1µl

Aigua desionitzada fins un volum final de 10 µl per cada mostra. Per una màxima eficiència de la lligació es van deixar les mostres tota la nit a 4°C.

3.6.2 Transformació.

Es van preparar plaques de Petri amb medi LB/IPTG/X-Gal/Ampicilina (veure apartat 3.6.3). Es van descongelar amb gel cèl.lules competents d'alta eficiència JM 109 (Promega, Promega Corporation, Madison, USA) i es van transferir 50 µl d'aquestes a cada un dels vials amb 2 µl de la reacció de lligació incloent també un control positiu de transformació que es proporciona amb els reactius del fabricant. El volum de la barreja de reacció es va barrejar suaument i es van deixar les mostres en gel durant 20 min. A continuació, les

cèl.lules van ser sotmeses a un xoc tèrmic en un bany d'aigua a 42°C durant 45-50 segons.

Immediatament després, es van tornar a col·locar les mostres en gel durant 2 minuts i a continuació se li van afegir 950 µl de medi SOC (veure apartat 3.6.3) a temperatura ambient per deixar-les finalment a l'incubador de 37°C amb agitació a 130 revolucions per minut (r.p.m) durant una hora. Transcorregut el temps d'incubació, es van afegir 50 µl i 100 µl de cada cultiu a les plaques amb antibiòtic i es van deixar en un incubador a 37°C durant tota la nit perquè les colònies creixessin.

3.6.3 Medis de cultiu.

Medi LB líquid

Bactotripton	10 g
Extracte de llevadura	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O estèril	1000 ml

Medi LB per plaques

Bactotripton	10 g
Extracte de llevadura	5 g
NaCl	5 g
Bacto Agar	15 g
H ₂ O estèril	1000 ml

Autoclavar. Un cop hagi disminuït la temperatura a uns 50°C afegir:

X-Gal 2%	120 µl (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactopiranosido).
IPTG 1mmol	160 µl (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido).
Ampicilina 50mg/mL	1 ml

Medi SOC

Bactotripton	2 g
Extracte de llevadura	0.5 g
NaCl 1M	1 g
KCl 1M	0.25 ml

Mg ²⁺ 2M	1 ml
Glucosa 2M	1 ml
H ₂ O estèril	1000 ml

Medi BH

(DIFCO, Becton, Dickinson and Company Saprks, Maryland 21152 USA)

3.7 Minipreparacions

Es seleccionen col.lònies individuals amb l'insert (col.lònies de color blanc) mitjançant una nansa estèril i es deixen créixer durant tota la nit en un incubador a 37°C en agitació (130 r.p.m) en un volum final de 4 ml de medi líquid Brain Heart (BH) (veure apartat 3.6.3). 24 hores més tard es realitza la extracció del plàsmid amb Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) seguint les instruccions del fabricant.

3.8 Seqüenciació

Com a pas previ a la seqüenciació, es mesura la concentració d'ADN de les mostres analitzant 2 µl de cadascuna d'elles (conjuntament amb un ADN de concentració coneguda) en gels d'agarosa al 2% amb una concentració de 5µg/ml de bromur d'etidi (Br Et).

Per realitzar la seqüenciació es va utilitzar BigDye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit versió 2.0 (Perkin Elmer Applied Biosystem, Warrington, UK) seguint les instruccions del fabricant.

Composició de la barreja de seqüenciació per un volum final de 20 µl:

8 µl de la barreja del kit

1 µl primer 10 mM (C2F-M o Wea)

C2F-M 5'-TCTAAGCTTACTTCTCCAATTGTCCCTC-3'

Wea 5'-TCTAAGCTTCACTTCTCCAATTGTCCCTC-3'

X µl DNA /10-40 ng producte de PCR/ 200-500 ng producte de la Miniprep).

X µl H₂O (per un volum final de 20 µl).

La reacció es va realitzar en un termociclador amb les següents condicions de temps i temperatura:

[10 seg a 96°C/ 5 seg a 50°C/4 min a 60°C] x 25; 4°C

El producte de la reacció de seqüenciació es purifica mitjançant precipitació amb etanol al 70%.

A cada mostra se li afegeixen 16 µl d'H₂O desionitzada i 64 µl d'etanol al 95%. Es barregen les mostres amb un vòrtex i es deixen a temperatura ambient durant 15 minuts. Posteriorment se centrifuguen a 13.000 r.p.m durant 20 minuts. S'aspira el sobrenedant i se li afegeixen 250 µl d'etanol al 70%. A continuació es tornen a barrejar amb el vòrtex, es centrifuguen novament a 13.000 r.p.m durant 10 minuts, s'aspira el sobrenedant i els precipitats es deixen assecar a temperatura ambient durant aproximadament 30 minuts. Les mostres es van seqüenciar en un seqüenciador 3100 ADN (Applied Biosystems, Westerland, Germany) i els electroferogrames obtinguts es van analitzar amb el programa informàtic Sequencher v.3.0 (GeneCodes Corporation).

3.9 Anàlisi de les quasiespècies.

Les seqüències de tots els clons de cada mostra de cadascun dels pacients de l'estudi del gen *env* es van alinear amb el programa CLUSTAL W 1.6 i es va obtenir la seqüència consens per cada mostra amb el programa Sequencher v 3.0

De cada mostra de cadascun dels pacients es van estudiar les següents variables utilitzant el programa informàtic MEGA sempre que fos apropiat:

Entropia de Shanon: Indica el nombre de seqüències diferents, a nivell de nucleòtid per aminoàcids (nt o aa), o de grups de seqüències diferents que apareixen en un moment determinat.

Es calcula a partir de la següent fórmula:

$$S = - \sum (p_i \ln p_i)$$

On p_i és la freqüència de cada tipus de seqüència diferent que trobem en la quasiespècie. La entropia normalitzada (S_n) es calcula com $S_n = S/\ln N$, on N

és el nombre total de seqüències que hem obtingut en cadascuna de les quasiespècies.

Distància genètica: Indica quant diferents són dos seqüències nucleotídiques, o un grup de seqüències nucleotídiques, entre elles.

Taxa de fixació de mutacions: Indica el ritme al que la seqüència o grup de seqüències va incorporant canvis a nivell de nucleòtids o aminoàcids al llarg del temps.

Per la construcció i anàlisi dels arbres filogenètics de cada mostra de cadascun dels pacients s'utilitza el paquet de programes PHYLIP.

3.10 Inferència de la utilització del correceptor.

La inferència de la utilització del correceptor utilitzat pel virus al infectar les cèl.lules s'ha basat en les càrregues i el tipus d'aminoàcids que se situen a les posicions 11 i 25 de la regió V3 del gen *env* com s'ha descrit previament (Chesebro B i col., 1996; Xiao L i col., 1999). Així es pot inferir que el virus utilitza el correceptor CCR5 per infectar, quan a la posició 11 de la regió V3 existeixen residus de càrrega neutre (majoritàriament serines i glicines), i a la posició 25 de la mateixa regió la càrrega dels residus és negativa, (majoritàriament àcid glutàmic i aspàrtic), i la càrrega neta del loop V3 és $<+5$. D'altra banda, inferim que el virus utilitza el correceptor CXCR4 per infectar les cèl.lules quan els residus de les posicions 11 i 25 tenen càrrega positiva (majoritàriament arginina i lisina) i el loop V3 té una càrrega neta positiva $\geq +5$. Es va utilitzar la càrrega neta de la regió V3 com a criteri primari per discriminar entre un virus X4 o R5.

4. DETERMINACIÓ DE LES MUTACIONS DE RESISTÈNCIA GENOTÍPIQUES EN ELS ANTIRRETROVIRALS EN EL GEN *POL*

4.1 Estudi de l'ARN del virus

L'ARN del VIH-1 es va retrotranscriure en ADN complementari i es va amplificar per RT-PCR utilitzant el TruGene HIV-1 assay (Visible Genetics, Totonto, Canada). Pas que produeix un amplicó de 1.3 Kpb que inclou la

proteasa i els primers 318 aminoàcids de la transcriptasa inversa. Els productes amplificats es seqüencien al mateix temps en tres parts: proteasa completa, inici de la RT (aminoàcids 39-142), i una segona part de la RT (aminoàcids 135-244). Aquest procés utilitza la reacció de seqüència CLIP, es genera una seqüència marcada en ambdòs sentits. Cada reacció de seqüenciació es carrega en un seqüenciador MicroGene Cliper. Per cada mostra seqüenciada, les 6 seqüències resultants són "based-called". L'anomenament de les bases es realitza amb el programa de GeneObjects (Visible Genetics Inc., Versió 3.0 1998, Toronto, Canadà) i l'aliniament de seqüències es va fer amb el programa GeneLibrarian (Visible Genetics Inc.). Les seqüències resultants de cada mostra es van comparar amb una base de dades que conté les mutacions descrites que confereixen resistència.

4.2 Estudi de l'ADN proviral.

4.2.1 Extracció de l'ADN

Les extraccions de l'ADN proviral es van realitzar a partir de 2×10^6 cèl.lules amb els reactius comercials (QIAmp Viral DNA minikit, Qiagen, Hilden, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant. Finalment l'ADN va ser eluït en 50 μ l d'aigua tractada DEPC (dietilpirocarbonat) i congelat a -20°C fins a la seva utilització.

4.2.2 Quantificació de l'ADN d'una dil.lució 1/10 de la mostra extreta (7 μ L ADN + 63 μ L H_2O).

4.2.3 Amplificació de l'ADN proviral

La **PCR1** per l'amplificació de la proteasa i de la retrotranscriptasa es van realitzar per separat a partir de 20ng d'ADN quantificat a l'apartat anterior en un volum final de 100 μ l de la barreja tamponada que es descriu a continuació:

Concentracions finals:

a. Barreja tamponada per la PCR1 proteasa

0.5 μ M Primer extern sentit 5'PR1

0.5 μ M Primer extern antisentit 3' PR1

(Descrits per Boucher i col., 1996)

1x	Tampó HF Expand amb 15mM MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).
1 mM	dNTPs (10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
0.035 U/μl	Taq Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).

b. Barreja tamponada per la PCR1 retrotranscriptasa

0.5 μM	Primer extern sentit RT-18
0.5 μM	Primer extern antisentit RT-21 (Descrits per Boucher i col., 1996)
1x	Tampó HF Expand amb 15mM MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).
1 mM	dNTPs (10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
0.035 U/μl	Taq Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).

La reacció es va realitzar en un termociclador a les següents condicions de temps i temperatura:

5min a 94°C, 30 cicles x [1min a 95°/ 1:30sec a 55°C/ 2min a 68°C], 10min a 68°C.

La PCR2 es va realitzar a partir de 5μl de la PCR1 en un volum final de 100 μl de la barreja tamponada que es descriu a continuació:

Concentracions finals:

a. Barreja tamponada per la PCR2 proteasa

0.5 μM	Primer intern sentit 5'PR2
0.5 μM	Primer intern antisentit 3'PR2 (Descrits per Boucher i col., 1996)
1x	Tampó HF Expand amb 15mM MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).
1 mM	dNTPs (10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
0.035 U/μl	Taq Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).

b. Barreja tamponada PCR2 retrotranscriptasa.

0.5 μ M	Primer intern sentit RT-19
0.5 μ M	Primer intern antisentit RT-20 (Descrits per Boucher i col., 1996)
1x	Tampó HF Expand amb 15mM MgCl ₂ (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).
1 mM	dNTPs (10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
0.035 U/ μ l	Taq Expand (Roche, Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).

La reacció es va realitzar en un termociclador a les següents condicions de temps i temperatura:

5min a 94°C, 30 cicles x [1min a 95°/ 1:30sec a 55°C/ 2min a 68°C], 10min a 68°C.

Les mostres es van analitzar en gels d'agarosa a l'1% amb una concentració de 5 μ g/ml de bromur d'etidi (Br Et).

Els fragments amplificats es van purificar amb QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del fabricant.

4.2.4 Seqüenciació

Es van realitzar els mateixos passos que en l'apartat 3.8 però en aquest cas la composició de la barreja de seqüenciació per un volum final de 20 μ l va ser:

8 μ l de la barreja del kit

1 μ l primer 10 mM (RT-19 i RT-20 per la retrotranscriptasa i 3'PR2 i 5'PR2 per la proteasa Descrits per Boucher i col., 1996)

X μ l DNA /10-40 ng producte de PCR.

X μ l H₂O (per un volum final de 20 μ l).

5. ASSAIG DE PROLIFERACIÓ LIMFOCITÀRIA

Aquests estudis van ser supervisats per la Dra Montse Plana al Laboratori d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Les cèl.lules mononucleades de sang perifèrica (CMSP) s'obtenen fent un Ficoll-Hypaque basat en una separació per gradient de densitat. Les cèl.lules

es renten dues vegades amb PBS i es resuspenen a la concentració de 2×10^6 /ml amb medi X-VIVO 10 (BioWhittaker, Maryland). Les cèl.lules es procesen fresques o criopreservades en 90% FCS i 10% DMSO no transcorregudes 4 hores de la recol.lecció.

Els cultius de proliferació es fan per triplicat a una concentració de 2×10^5 /pouet durant 7 dies, en microplaques de 96 pouets (TPP, Europa). Les cèl.lules es cultiven en presència o absència de mitògens Pokeweed (PWM) 10 μ g/ml (Sigma, St Louis, MO), toxoide Tetanus 2750U, antigen CMV 10 μ g/ml, proteïnes recombinants del VIH-1 (gp24 and gp160) 5 μ g/ml (Protein Sciences, Conneticut, MD, USA). Posteriorment, durant les darreres 18h s'incorpora al cultiu la timidina tritiada (Betaplate LKB Wallac, Sweden). Els resultats s'expressen com mitja de comptes per minut (CPM). L'índex d'estimulació (IS) es va calcular per cadascuna de les mostres com: cpm de les cèl.lules amb estímul/ cpm de les cèl.lules sense estímul. Es va definir com a resposta antigen específica positiva quan es tenien més de 3000 cpm i un IS superior a 3.

6. RESPOSTA CEL.LULAR T CD8 ESPECÍFICA ANTI-VIH-1

Aquests estudis van ser supervisats per la Dra Montse Plana al Laboratori d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

El mètode de quantificació de l'alliberament de citoquines per part de les cèl.lules T CD8 específiques d'antigen ha estat previament d'escrit per Ortiz GM i col 1999. L'assaig ELISPOT basat en la detecció de diferents pèptids del virus VIH-1 (gag, pol, env, nef) restringits pels diferents antígens del MHC de classe I atenent al tipatge HLA de l'individu o de construccions del virus vaccinia (Ortiz GM, 1999) que s'utilitzen per mesurar la quantitat d'interferó γ (IFN- γ) alliberat per part de les cèl.lules T CD8, induït per l'antigen.

7. GENOTIPATGE HLA

Aquests estudis van ser supervisats per la Dra Montse Plana al Laboratori d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

El locus HLA es va tipar molecularment amb l'ADN genòmic extret a partir de les CMSP o a partir de la sang total emprant el reactiu QIAmp Blood Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). Els al·lels del gen HLA classe I van ser tipats utilitzant SSO (RELI™ Dynal, Madrid, Spain). La definició de l'al·lel es va assignar automàticament amb el programa RELI™ SSO Pattern matching (Dynal, Madrid, Spain) i va ser revisat de forma manual.

8. POLIMORFISMES SDF1-3'A, CCR5Δ32 i CCR2

Aquests estudis van ser supervisats per la Dra Montse Plana al Laboratori d'Immunologia de l'Hospital Clínic de Barcelona.

L'ADN genòmic es va aïllar a partir de CMSP o a partir de sang total (Qiagen kits, Qiagen, Hilden, Germany). SDF-1-3'A es va analitzar per RFLP emprant els primers SDF-F 5'-CAGTCAACCTGGGCAAAG CC-3' i SDF-R 5'- AGGTTTGGTCCTGAGAGTCC -3' i l'enzim MspI, essent el seu lloc de restricció eliminat per la mutació G-A de la variant SDF1-3'A. L'anàlisi per PCR de la delecció CCR5Δ32 es va realitzar emprant els primers que amplifiquen el fragment que conté la delecció de 32 parells de bases i que han estat previament descrits per Dean M i col., 1996. Els polimorfismes (46295) es van analitzar per PCR-RFLP emprant l'enzim FokI previament descrit (Altfeld Mc i col., 2001; Price DA i col., 1999).

9. FARMACOCINÈTICA I FARMACODINÀMICA

El perfil farmacocinètic de l'àcid micofenòlic (MPA) (de l'àrea sota la corba, AUC_{0-12h}) es va mesurar a partir de mostres de sang contingudes amb tubs amb l'anticoagulant EDTA recollides al dia 0 (previ a l'administració del MMF), 20, 40 min i a les 1, 2, 4, 6, 8, 10 i 12h després de la dosi de MMF del matí. L'eficàcia del tractament amb MMF es va valorar mesurant la capacitat

de la mostra dels pacients a l'hora d'inhibir la resposta de la línia cel.lular CEM. Aquesta resposta CEM es va mesurar abans de l'administració del MMF i als 7, 28, 120 i 150 dies posteriors a la interrupció del TARGA després de la randomització.

Les concentracions plasmàtiques del MPA es van analitzar amb una mètode basat en HPLC previament descrit (Brunet M i col., 1999).

La resposta CEM es va mesurar emprant la línia cel.lular CEM, que es va obtenir de la Col.lecció Americana de Cultius Cel.lulars (ATCC) (Rockville, MD). És una línia cel.lular T humana limfoblastoide obtinguda a partir de d'un buffy coat d'una dona de 40 anys d'edat amb un diagnòstic de leucèmia limfoblàstica aguda. Es va utilitzar el subclon CEM.2b. Aquest clon l'anomenarem CEM a partir d'ara i al llarg de tot el treball. Les cèl.lules CEM es van cultivar en RPMI-1640 (Bio-Whittaker) suplementat amb 10% SBF i gentamicina. Les cèl.lules es van fer créixer a 37°C, 5% de CO₂. En presència del sèrum del pacient les cèl.lules es van resuspendre en el medi RPMI-1640 que contenia SBF 10% inactivat. Es van sembrar 2.10⁸ cèl.lules/L i 100µl del sèrum del pacient en plaques microtiter de 96 pouets (TPP). Es va afegir timidina - ³H transcorregudes 24h del cultiu i la seva incorporació es va mesurar 24h més tard en un comptador de centillatge Beckman.

Per tal de provar que l'efecte del MPA en l'activitat IMPDH i la proliferació cel.lular eren reversibles en el nostre model, es van activar cèl.lules CMSP de donants sans amb PHA + IL-2 i les cèl.lules CEM en divisió es van cultivar amb MPA durant un període de 2 a 8 hores. A les 2, 4 i 8 hores el MPA es va eliminar rentant les cèl.lules resuspeses en un medi que contenia PHA+IL-2. La timidina - ³H es va afegir a les 24h i es va mesurar 24h més tard.

Les cèl.lules CEM que es dividien espontàniament es van tractar de la mateixa manera però sense afegir PHA ni IL-2. Tots els cultius de proliferació es van fer per triplicat.

10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Les comparacions entre els grups es van realitzar amb els test de X^2 per les variables categòriques i amb els tests t-Student o Mann-Whitney per les variables quantitatives.

El càlcul del risc de desenvolupar mutacions de resistència és va realitzar per pacient i també es va fer a partir del nombre de cicles estudiats amb mutacions de resistència durant les IET.

ESQUEMA D'ESTUDI

Els estudis de dinàmica viral en pacients sotmesos a IET es van analitzar en les tres cohorts. La correlació d'aquesta dinàmica amb la proliferació cel.lular i resposta cel.lular dels limfòcits T CD8 citotòxica es va analitzar únicament en els pacients de les cohorts 1 i 2.

L'estudi de l'evolució del virus a partir del gen *env*, que és el que codifica per les proteïnes de l'envolta, es va realitzar en els pacients de la cohort 1.

Per respondre, si el fet de realitzar IET incrementa el risc de desenvolupar mutacions de resistència als antirretrovirals es van analitzar 114 cicles d'IET en un total de 34 pacients sotmesos a IETs.

