



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de

Buenos Aires

Argentina

Scandizzo, Hilda Emilia; Bernstein, Judith Celina

Detección de anticuerpos anti-R7V en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia
humana

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 43, núm. 1, marzo, 2009, pp. 37-42

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53516745007>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Detección de anticuerpos anti-R7V en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana

Detection of anti-R7V antibodies in patients infected with the human immunodeficiency virus

► Hilda Emilia Scandizzo^{1*}, Judith Celina Bernstein^{2**}

-
1. Bioquímica.
 2. Médica Infectóloga.

* Sector de Inmunoserología del Laboratorio del Hospital Zonal General de Agudos Mi Pueblo. Progreso 240. Florencio Varela (CP 1888).

** Unidad de Infectología. Hospital Zonal General de Agudos Mi Pueblo. Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Resumen

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) incorpora antígenos celulares a la superficie viral durante el proceso de gemación, entre ellos la β_2 -microglobulina perteneciente al Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I. El epitope R7V derivado de la β_2 -microglobulina se encuentra en la superficie del virión y es capaz de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes anti-R7V, cuya presencia se relaciona con la no progresión de la enfermedad. Se utilizó el método ELISA para el análisis de muestras provenientes de la población de pacientes VIH positivos durante el periodo junio-2006 a junio-2007 obteniéndose los siguientes resultados: De 12 pacientes no progresores asintomáticos en un período promedio de 5 años (rango 2-13 años), 5 (41%) fueron positivos para anti-R7V; de 14 pacientes progresores que recibían terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), 2 (14%) fueron positivos para anti-R7V. Se observó una diferencia en los resultados obtenidos en los dos grupos, aunque estadísticamente no fue significativa (OR 4,29; 0,49-53,56; p=0,11) como para establecer una concordancia entre la no progresión y la presencia de anti-R7V. En la medida que puedan estudiarse mayor número de pacientes es factible pueda demostrarse la correlación entre la no progresión y la presencia de anticuerpos anti-R7V, lo que constituye un desafío en el desarrollo de nuevos alcances terapéuticos.

Palabras clave: anticuerpos anti-R7V * pacientes no progresores * prueba de ELISA

Summary

The Human Immunodeficiency Virus incorporates cellular antigens to its viral surface during the budding process, among them β_2 -microglobulin which is part of the Major Histocompatibility Complex Class I. The R7V epitope derived from β_2 microglobulin is present on the virion surface and is able to induce the formation of neutralizing antibodies against R7V, whose presence is associated with non-progression of the illness. ELISA test was

performed for testing of samples from our population of HIV-positive patients during the June-2006 to June-2007 period, and the following results were obtained: 5 (41 %) of 12 non-progressor patients, asymptomatic for a period of 5 years average (range 2-13 years) were positive for anti-R7V; 2 (14%) of 14 progressor patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) were positive for anti-R7V. A difference was observed between the results of the two groups but it was not statistically different (OR 4.29; 0.49-53.36; p=0.11) to establish a concordance between non-progression of the disease and the presence of anti-R7V antibodies. The correlation between non progression and the presence of anti-R7V will be proved, as larger numbers of patients are tested, which represents a challenge for the development of new therapies.

Key words: *anti-R7V antibodies * non-progressor patients * ELISA test.*

Introducción

La característica principal de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es la inmunodeficiencia provocada por el déficit progresivo, cualitativo y cuantitativo de los linfocitos T, los cuales tienen en su superficie la molécula CD4 que funciona como principal receptor del VIH (1).

El mecanismo por el cual el VIH penetra en la célula huésped se inicia con la unión de la glicoproteína de envoltura gp120 del virus con ciertos epitopes de la molécula CD4 de la célula (2), lo cual induce cambios conformacionales en la gp120, promoviendo una interacción más eficiente con su respectivo correceptor (receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4) (3). Luego del enlace la gp41 del virus inserta su grupo amino terminal en la membrana celular y a continuación se lleva a cabo la fusión que permite al virus penetrar en la célula (4). Durante el proceso de fusión algunos epitopes virales quedan temporalmente expuestos y pueden inducir la formación de anticuerpos neutralizantes (5). La aparición de anticuerpos neutralizantes suele observarse aproximadamente a partir de las ocho semanas posteriores a la infección por VIH (6). El VIH replica dentro de la célula huésped e independientemente de su tropismo o genotipo incorporará durante el proceso de gemación proteínas de la membrana celular de la célula huésped a su envoltura tales como proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) Clase I y II, o proteínas de adhesión como la molécula intracelular de adhesión tipo I (ICAM-1) que puede facilitar la adhesión a otras células huésped (7)(8). La β 2-microglobulina está ligada en unión no covalente a la cadena α del CMH clase I y el estudio de péptidos derivados de la secuencia aminoácida de la β 2-microglobulina permitió seleccionar el epitope llamado R7V, un heptámero (RTPKIQV), capaz de bloquear la neutralización del VIH cuando se mezcla con anticuerpos neutralizantes conocidos (9). Este péptido R7V se utilizó para desarrollar una prueba de ELISA que permite detectar la presencia de an-

ticuerpos anti-R7V en pacientes infectados por el VIH. La presencia de los anticuerpos neutralizantes anti-R7V es fuertemente asociada a la no progresión de la enfermedad (10)(11). En la actualidad no se ha demostrado si la presencia de anticuerpos neutralizantes en los pacientes no progresores (NP) representan parte de la protección o son el reflejo de mantener un sistema inmune relativamente intacto(12).

El elevado grado de mutación del virión, especialmente a nivel de sus proteínas de envoltura, significa que es muy difícil pero no imposible producir anticuerpos protectores (7). Un anticuerpo ideal es aquel que mantendrá su actividad protectora contra un diverso panel de virus aislados primarios y estará dirigido hacia epitopes conservados de las proteínas de envoltura, que no se alteren en respuesta a presiones selectivas. La β 2-microglobulina está presente en todas las células y es una proteína altamente conservada, por lo cual no existe el problema de variabilidad de las glicoproteínas virales. Los anticuerpos dirigidos contra el péptido R7V no producen reacciones autoinmunes, ya que se ha demostrado que este epitope se encuentra encriptado sobre la superficie celular (8). El objetivo de este trabajo fue la detección de anticuerpos neutralizantes anti-R7V en pacientes VIH positivos, especialmente en pacientes no progresores para tratar de establecer la relación entre la no progresión clínica y la presencia de estos anticuerpos, ya que de comprobarse esta concordancia permitiría en el futuro avanzar sobre nuevas terapias. Se incluyeron en las determinaciones a mujeres embarazadas asintomáticas que fueron diagnosticadas durante el control prenatal de rutina y cuyos hijos no nacieron infectados por el VIH (14).

Materiales y Métodos

La prueba de ELISA para la búsqueda de anticuerpos anti-R7V consiste en una técnica de enzimoinmunoensayo en microplaca (Anti-R7V ELISA, IVAGEN, Nimes, Francia). El péptido R7V está fijado covalen-

temente en el fondo de cada vial de la microplaca y la presencia de anticuerpos se detecta por un conjugado enzimático (anti-IgG humana de cabra unida a peroxidasa de rábano picante). La prueba se compone de tres pasos: 1) El suero o plasma del paciente, los controles y calibradores del equipo se diluyen con el *buffer* provisto y distribuyen en los viales de la microplaca de la siguiente manera: A1: Blanco (*buffer* diluyente); B1 y C1: Control negativo por duplicado; D1, E1 y F1: Calibrador por triplicado; G1 y H1: Controles positivos por duplicado; y por último las muestras por duplicado. Se cubren las placas con material adhesivo para evitar evaporaciones y se incuban a 37 °C durante 30 min. Si hay anticuerpos anti-R7V presentes en la muestra del paciente son capturados por el péptido R7V fijado en los viales. Posteriormente se procede al aspirado y a una serie de cuatro lavados de la microplaca en la lavadora de placas, con una solución de *buffer* fosfato -Proclin 300 para eliminar el material no fijado. 2) Se añade a cada vial el conjugado y se incuba nuevamente la placa cubierta para permitir la unión del conjugado al anti-R7V, capturado en la primera incubación. Luego, se aspira y lava profundamente la placa para eliminar el material no unido. La peroxidasa unida, indicadora de la presencia de anticuerpos anti-R7V, se detecta con la adición del sustrato enzimático (cromógeno) 3,3', 5,5' tetrametilbencidina (TMB). Se deja reposar la placa destapada durante 10 min a temperatura ambiente; se detiene la reacción con el agregado de ácido clorhídrico diluido. La densidad óptica de cada vial se lee en lector de microplacas a DO 450 nm.

CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN

Para que la prueba sea válida se deben tener en cuenta los siguientes parámetros: la densidad óptica (DO) del blanco debe ser <0,100. La lectura del blanco debe restarse a todas las DO obtenidas.

DO control negativo <0,200

DO calibrador < DO control positivo

DO calibrador > 2,5 x DO control negativo.

Cada DO de las muestras se compara con la DO del calibrador, de la siguiente manera:

R = DO muestra / DO Cal

Si R < 0,8 : anti-R7V negativo

Si R 0,8-1,2 : ZONA GRIS, resultado no concluyente

Si R > 1,2: anti-R7V positivo.

Se definió como paciente no progresor (NP) a aquel asintomático que mantiene un recuento de linfocitos CD4+ y carga viral con valores estables. Se consideró paciente progresor (PP) a aquel que presenta progresión clínica, descenso del recuento de linfocitos CD4+ en un 30-50% del valor absoluto respecto al ba-

sal en dos mediciones en el mismo citómetro de flujo con al menos dos meses de diferencia y aumento de la carga viral mayor a 0,5-1 log₁₀ copias o fracaso en lograr el descenso deseado(13).

Se estudiaron 11 pacientes NP que no recibían medicación al momento de ser analizados; 14 PP que recibían terapia antirretroviral de gran eficacia (TARGA), 1 paciente NP que recibía TARGA (coinfectado con el virus de la hepatitis C), 1 PP sin TARGA por fallo en la adherencia, y por último 9 embarazadas que fueron diagnosticadas durante el embarazo cuando se les realizó el análisis de rutina para VIH junto a sus respectivos hijos recién nacidos.

Resultados

Los resultados obtenidos fueron: DO Control negativo 0,100; DO Control positivo 1,110 y DO Cal 0,610, los cuales cumplían las reglas establecidas anteriormente. De 11 pacientes NP sin tratamiento al momento de ser estudiados (Tabla I) y 1 paciente NP que recibía TARGA, coinfectado con virus de la hepatitis C (Tabla II), 5 (41%) fueron positivos para anti-R7V. De 14 PP que recibían TARGA (Tabla III) sólo 2 (14%) resultaron positivos; en 1 PP sin TARGA por fallo en la adherencia (Tabla IV) se obtuvo un resultado negativo. De las 9 embarazadas y sus respectivos hijos recién nacidos, 1 (11%) resultó positiva y el resultado de la prueba en el neonato fue en zona gris debido a los anticuerpos maternos (Tabla V). Los resultados en zona gris deben ser repetidos con nuevas muestras en el futuro. A las pacientes embarazadas se les realizó la búsqueda de anti-R7V antes de comenzar la profilaxis antirretroviral indicada para disminuir el riesgo de transmisión vertical.

El paciente NP con TARGA recibía como tratamiento 2 drogas que actuaron como inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NRTI) y 1 inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa (NNRTI). La paciente progresora sin TARGA presentó como enfermedad marcadora una Lesión Intraepitelial Escamosa (SIL) de Alto Grado-CIN III originada por la infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV). Dentro del grupo de PP que recibían TARGA, se obtuvieron 2 resultados positivos para anti-R7V; 1 es hijo de madre infectada, cuya enfermedad marcadora fue parotiditis recurrente y el otro paciente presentó infección por *Pneumocystis jiroveci*. Ambos recibían 2 NRTI + 1 NNRTI. El resultado en la zona gris de este grupo correspondió a una paciente que presentó tuberculosis pulmonar-candidiasis esofágica - neumonía bacteriana recurrente y síndrome de desgaste asociado al VIH; cumplía tratamiento con 2 NRTI + 1 NNRTI.

Tabla I. Prevalencia de anticuerpos anti-R7V en pacientes no progresores que no reciben terapia antirretroviral de gran actividad, según parámetros epidemiológicos y de laboratorio.

Sexo	CD4	Carga Viral	LT	Edad	Año diagnóstico	Vía de transmisión	R	Anti-R7V
F	238	1300	1081	57	2004	desconocido	0,68	NEGATIVO
F	799	152	2159	62	2004	contacto sexual	0,57	NEGATIVO
F	315	3450	1260	36	2005	contacto sexual	0,78	NEGATIVO
F	354	13208	1475	34	2004	contacto sexual	1,32	POSITIVO
F	467	53041	1729	40	2002	contacto sexual	1,33	POSITIVO
F	355	<50	2210	38	1998	contacto sexual	1,83	POSITIVO
M	210	18501	1750	30	2005	desconocido	0,62	NEGATIVO
M	338	51848	1865	35	2002	contacto sexual	0,34	NEGATIVO
M	259	6982	1992	46	2003	contacto sexual	0,50	NEGATIVO
M	434	7754	1730	34	1996	uso de drogas end.	0,61	NEGATIVO
M	320	<50	2285	43	1994	uso de drogas end.	1,9	POSITIVO

Referencias: (CD₄) cel/mm³. (LT) Linfocitos Totales cel/mm³ (Carga Viral) copias/mL.

Tabla II. Dosaje de anticuerpos anti-R7V en paciente no progresor que recibe terapia antirretroviral de gran actividad; parámetros epidemiológicos y de laboratorio.

PACIENTE NO PROGRESOR QUE RECIBE TARGA						
Sexo	Edad	Diagnóstico	CD4	LT	CV	Modo de transmisión
F	32	Año 2000	270	1620	<50	Uso de drogas end. POSITIVO R=1,42

Referencias: (CD₄) cel/mm³ (LT) cel/mm³ (Carga Viral) copias/mL

Tabla III. Prevalencia de anticuerpos anti-R7V en pacientes progresores que reciben terapia antirretroviral de gran actividad, según parámetros epidemiológicos y de laboratorio.

Sexo	Edad	Año Diagnóstico	CD4	LT	Carga Viral	Vía de Transmisión	R	Anti-R7V
F	39	2003	412	2060	<50	contacto sexual	0,25	NEGATIVO
F	39	2005	162	1350	<50	contacto sexual	0,41	NEGATIVO
F	32	1992	742	3372	<50	contacto sexual	0,41	NEGATIVO
F	37	2003	46	Sin datos	3651	contacto sexual	0,28	NEGATIVO
F	32	2000	34	Sin datos	197155	uso de drogas end.	1,12	ZONA GRIS
F	13	1997	349	1938	<50	HMI	1,27	POSITIVO
F	42	1992	105	1166	9400	contacto sexual	0,47	NEGATIVO
F	39	1996	162	1157	21093	contacto sexual	0,65	NEGATIVO
F	33	2000	17	1062	>500.000	uso de drogas end.	0,46	NEGATIVO
M	45	2000	55	Sin datos	114.330	uso de drogas end.	0,59	NEGATIVO
M	34	2005	94	1175	5320	contacto sexual	1,28	POSITIVO
M	10	1997	970	4041	<50	HMI	0,53	NEGATIVO
M	42	1999	154	Sin datos	<50	contacto sexual	0,47	NEGATIVO
M	40	1992	266	2216	14315	uso de drogas end.	0,38	NEGATIVO

Referencias: (HMI) Hijo de madre infectada. (CD₄) cel/mm³ (LT) cel/mm³ (Carga Viral) copias/mL

Tabla IV. Dosaje de anticuerpos anti-R7V en paciente progresor sin terapia antirretroviral de gran actividad; parámetros epidemiológicos y de laboratorio.

PACIENTE PROGRESOR QUE NO RECIBE TARGA						
Sexo	Edad	Diagnóstico	CD4	LT	CV	Modo de transmisión
F	37	Año 2003	285	1425	81517	Contacto sexual NEGATIVO R=0,41

Referencias: (CD₄) cel/mm³ (LT) cel/mm³ (Carga Viral) copias/mL

Tabla V. Prevalencia de anticuerpos anti-R7V en pacientes embarazadas asintomáticas diagnosticadas en el control prenatal y en sus respectivos neonatos.

Edad	Anti-R7V	Anti-R7V HMI
30	NEGATIVO R=0,48	NEGATIVO R=0,47
21	POSITIVO R=1,44	ZONA GRIS R=0,98
31	ZONA GRIS R=0,91	NEGATIVO R=0,42
30	NEGATIVO R=0,63	NEGATIVO R=0,47
29	ZONA GRIS R=0,98	NEGATIVO R=0,25
26	NEGATIVO R=0,28	NEGATIVO R=0,20
22	NEGATIVO R=0,43	NEGATIVO R=0,07
29	ZONA GRIS R=1,16	NEGATIVO R=0,29
36	NEGATIVO R=0,42	NEGATIVO R=0,07

Referencias: (HMI) Hijo de madre infectada.

Discusión y Conclusiones

Como resultado del análisis a la población estudiada, de 12 NP, 5 (41%) resultaron positivos y de 14 PP, 2 (14%) fueron positivos, para anti-R7V, lo cual permite concluir que existe una diferencia entre los resultados de los dos grupos, si bien ésta no es aún estadísticamente significativa (OR 4,29; 0,49-53,36; p=0,11) de forma tal que permita establecer una concordancia entre la presencia de anti-R7V y la no progresión de la enfermedad. En la medida que puedan testearse mayor número de pacientes se podrá establecer una conclusión más certera, como se ha comunicado en estudios multicéntricos realizados en otros países, donde se investiga el desarrollo de terapias de inmunización pasiva con anti-R7V en pacientes en fallo con tratamiento antirretroviral de gran actividad, a raíz de comprobar la correlación entre pacientes NP y presencia de anticuerpos anti-R7V. La detección de anticuerpos neutralizantes en pacientes VIH positivos constituye un desafío en el devenir de nuevos alcances terapéuticos.

CORRESPONDENCIA

HILDA EMILIA SCANDIZZO

Comité de Docencia e Investigación del Hospital Mi Pueblo
Progreso 240, 1888 FLORENCIO VARELA
Buenos Aires
Correo electrónico: emiliascandizzo@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Del Rio C, Curran JW. Epidemiología y prevención del SIDA y de la infección por VIH. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica. 6º ed. Madrid: Elsevier; 2006. p. 1477-96.
2. Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 infection. En: Hoffman C, Rockstroh JK, Kamps BS (eds). HIV Medicine 2006. Paris, Cagliari, Wuppertal: Flying Publisher; 2006, p 61-86.
3. Yi Y, Isaacs SN, Williams DA, Frank I, Schols D, De Clercq E, et al. Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) strains: Two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J Virol* 1999; 73 (9): 7117-25.
4. Lusso P. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 2006; 25: 447-56.
5. Zipeto D, Matucci A, Ripamonti C, Scarlatti G, Rossoilio P, Turci M, et al. Induction of human immunodeficiency virus neutralizing antibodies using fusion complexes. *Microbes Infect* 2006; 8: 1424-33.
6. Paranjape RS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res* 2005; 121: 240-55.
7. Haslin C, Chermann JC. Anti-R7V antibodies as therapeutics for HIV-infected patients in failure of HAART. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 621-4.
8. Brodsky FM. Presentación de antígeno y complejo principal de histocompatibilidad. En: Stites DP, Terr AI. Inmunología Básica y Clínica. 9º ed. México DF: Manual Moderno; 2000. p. 91-104.
9. Galéa P, Le Contel C, Chermann JC. A novel epitope R7V common to all HIV-1 isolates is recognized by neutralizing IgG found in HIV-infected patients and immunized rabbits. *Vaccine* 1999; 17 (11-12): 1454-61.
10. Galéa P, Le Contel C, Coutton C, German JC. Rationale for a vaccine using cellular-derived epitope presented by HIV isolates. *Vaccine* 1999; 17: 1700-5.
11. Xu X, Xing H, Gong W, Chen H, Si C, Wang Y, et al. Preliminary investigation on the relation between clinical progress and anti-small monomolecular peptides antibody in individual infected with HIV. *Zhongua Shi*

- Yan He Li Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2002;16 (3): 286-7.
12. Deeks SG, Schweighardt B, Wrin T, Galovich J, Hoh R, Sinclair E, *et al.* Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: Evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* 2006; 80 (12): 6155-64.
13. Barin F, Jourdain G, Brunet S, Ngo-Giang-Huong N, Weerawatgoompa S, Karnchanamayul W, *et al.* Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 2006; 193: 1504-11.
14. Recomendaciones para el seguimiento y tratamiento de la infección por HIV. Comisión de SIDA de la Sociedad Argentina de Infectología. Disponible en <http://www.sadi.org.ar>. Fecha de acceso: 30 de junio de 2007.

Aceptado para su publicación el 16 de diciembre de 2008