

INACTIVACIÓN DEL VIH PARA EL ESTUDIO CIENTÍFICO SIN ENTORNO SEGURO. SITUACIÓN OXIDANTE EN LA INFECCIÓN CON VIH.



Antuña Eduardo¹, González-Blanco Laura¹, Bermejo-Millo Juan Carlos¹, Potes Yaiza¹, Caballero Beatriz¹, Vega-Naredo Ignacio¹, Coto-Montes Ana¹, Boga Riveiro José Antonio²

1. Departamento de Morfología y Biología celular de la Universidad de Oviedo, España.
2. Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

INTRODUCCIÓN

Actualmente, llevar a cabo una labor traslacional efectiva en la investigación de VIH presenta grandes problemas al que se deben enfrentar muchos laboratorios. Uno de estos problemas es la dificultad para extraer las muestras de laboratorios de bioseguridad y trabajar en un sitio distinto sin adulterar la muestra ni alterar sus determinaciones.

Se tiene constancia de numerosas técnicas de inactivación vírica en muestras sanguíneas, pero la mayoría de ellas modifican componentes de la muestra lo que impide el estudio de las mismas. Algunas de estas técnicas de inactivación son por calor a 60°, fijación con formol al 10% o mediante una concentración de 0,2% de Sodio Dodecil Sulfato.

Con el fin de determinar si el tratamiento seleccionado para la desactivación del virus de interés era efectivo y asegurar que el tratamiento mantiene la fiabilidad esperada, se requiere la realización de estudios o análisis sensibles. La medición del estrés oxidativo se lleva a cabo mediante múltiples estudios de fácil aplicación y alta replicabilidad. Por ello, hemos estudiado la Lipoperoxidación (LPO) y la Actividad Antioxidante Total (AAT), lo que nos permitiría, al mismo tiempo, conocer si el estrés oxidativo se altera ante distintos casos de VIH, aun cuando la razón primigenia del estudio sea estudiar si el sistema de bloqueo contamina las determinaciones muestrales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de sangre procedentes de individuos VIH positivos (VIH) y VIH negativos (controles), dentro del mismo rango de edad (30-50 años). Se llevo a cabo una separación diferencial en eritrocitos y plasma, y tanto controles como VIH fueron tratados con Tritón a una concentración del 0,2% para estudiar su inocuidad en las mediciones a realizar. Esto dio lugar a tres grupos experimentales: Controles, Controles + Tritón, y VIH + Tritón.

En las muestras indicadas se determinó la inactivación del virus mediante la ausencia de replicación viral en cultivo de linfocitos humanos. Una vez confirmada la inactivación del virus, las muestras fueron trasladadas al laboratorio cROS de la facultad de Medicina donde se procedió al cálculo de proteínas, estudio de la actividad antioxidante total (AAT) y la lipoperoxidación (LPO) en los tres grupos antes citados, mediante el uso de técnicas espectrofotométricas.

Mediante un análisis estadístico multifactorial ANOVA de doble vía, se determinaron las posibles diferencias significativas en el estudio de estrés oxidativo y el posible efecto diferencial del tratamiento con el detergente en los grupos experimentales.

CONCLUSIONES

El estudio permitió concluir que el Tritón es un producto adecuado para la inactivación del virus VIH en muestras sanguíneas sin interferir en los estudios espectrofotométricos realizados. Los estudios mostraron un incremento de la AAT en VIH que era suficiente para impedir un la LPO, aun cuando esta capacidad pudiese verse comprometida al avanzar la edad de los individuos.

AGRADECIMIENTOS

J.C. B-M. is a FISS pre-doctoral fellow at the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) (FI18/00149).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo demostró la inactivación completa del VIH en las muestras tratadas con Tritón al 0,2%. En las dos mediciones espectrofotométricas realizadas no se observaron diferencias entre el grupo control y el control tratado con Tritón al 0,2% lo que demostró que este método no interfería en los ensayos realizados al tiempo que permitía neutralizar el VIH.

El estudio de la AAT mostró el grupo control presentaba una significativamente menor actividad antioxidante que el grupo de VIH. El incremento de la defensa antioxidante es un claro indicativo de que los individuos positivos para este virus disparan su defensa antioxidante para tratar de reducir el incremento de radicales libres, muy habitual ante tratamientos continuos, típico de enfermedades crónicas como la infección por VIH (Figura 1 izquierda). Al tratarse de pacientes jóvenes estos cuentan con capacidad de respuesta antioxidante efectiva, aunque incremento exacerbado por el tratamiento antiviral debería de ir reduciéndose paulatinamente con la vida del individuo, algo que deberá ser comprobado en estudios posteriores.

La LPO no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados, aún ante la existencia de una clara tendencia al alza en los individuos VIH en comparación con los controles con el mismo tratamiento inactivamente (Figura 1 derecha). Esto mostró que la subida de la defensa antioxidante era efectiva y suficiente para impedir un daño oxidativo a los lípidos en las personas tratadas contra la infección por VIH, aun cuando la tendencia observada en la LPO podría vaticinar un daño efectivo a medida que la edad de los individuos fuese incrementándose al tiempo que se mantenía el tratamiento antiviral.

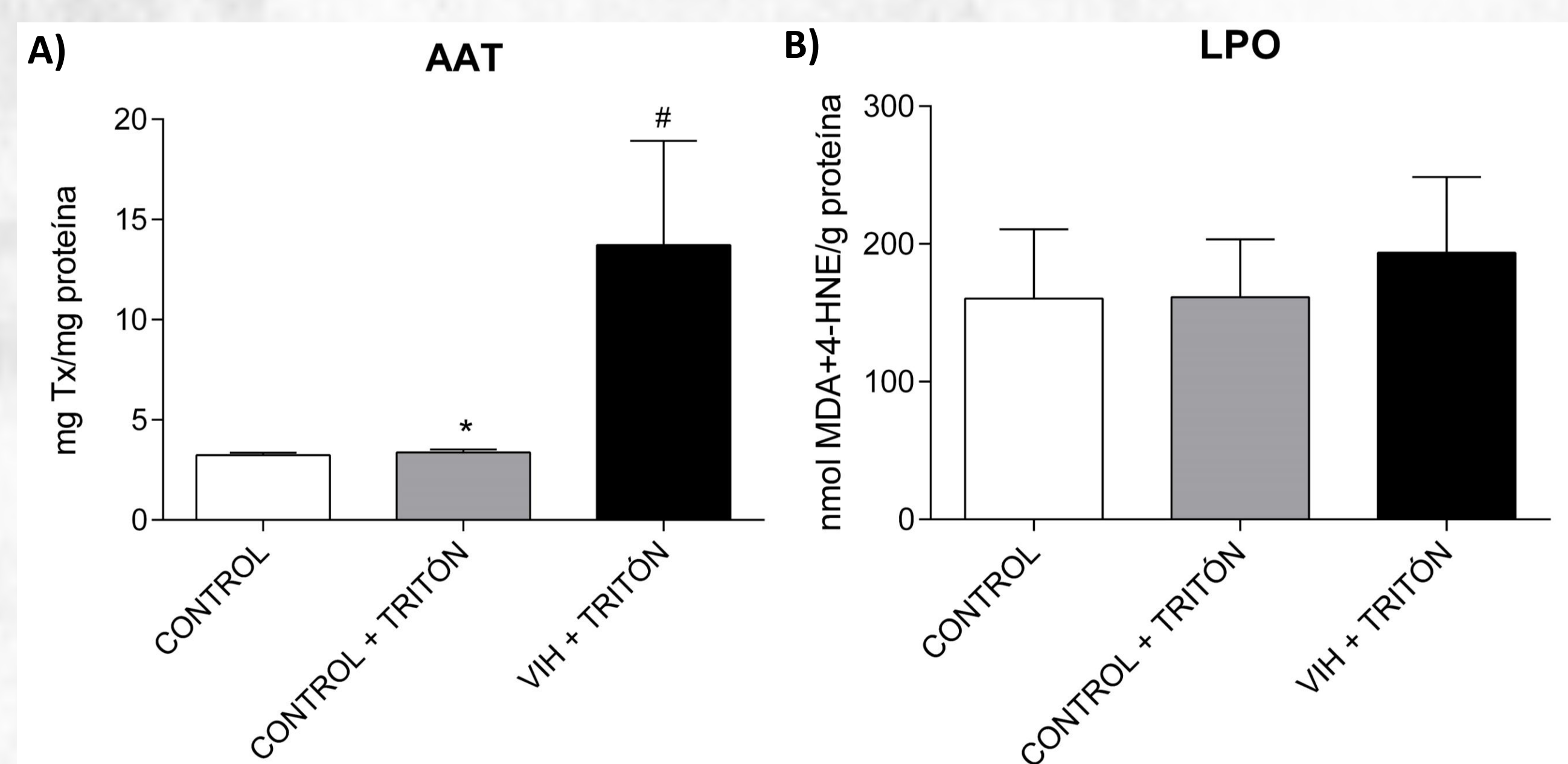


Figura 1. A muestra la Actividad Antioxidante Total (AAT). B muestra la Lipoperoxidación (LPO). Las diferencias significativas existentes entre el grupo Control y Control más Tritón se representan como *, mientras que las diferencias significativas entre control más tritón y VIH más Tritón vienen representadas como #. En ambos casos estas diferencias se aceptaron para una $p \leq 0,05$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- D. Gerard-Monnier *et al.*, Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol* (1998).
- Arnao MB *et al.*, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* (2001).
- de Gonzalo-Calvo D *et al.*, 2010. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radical Biology & Medicine* (2010).