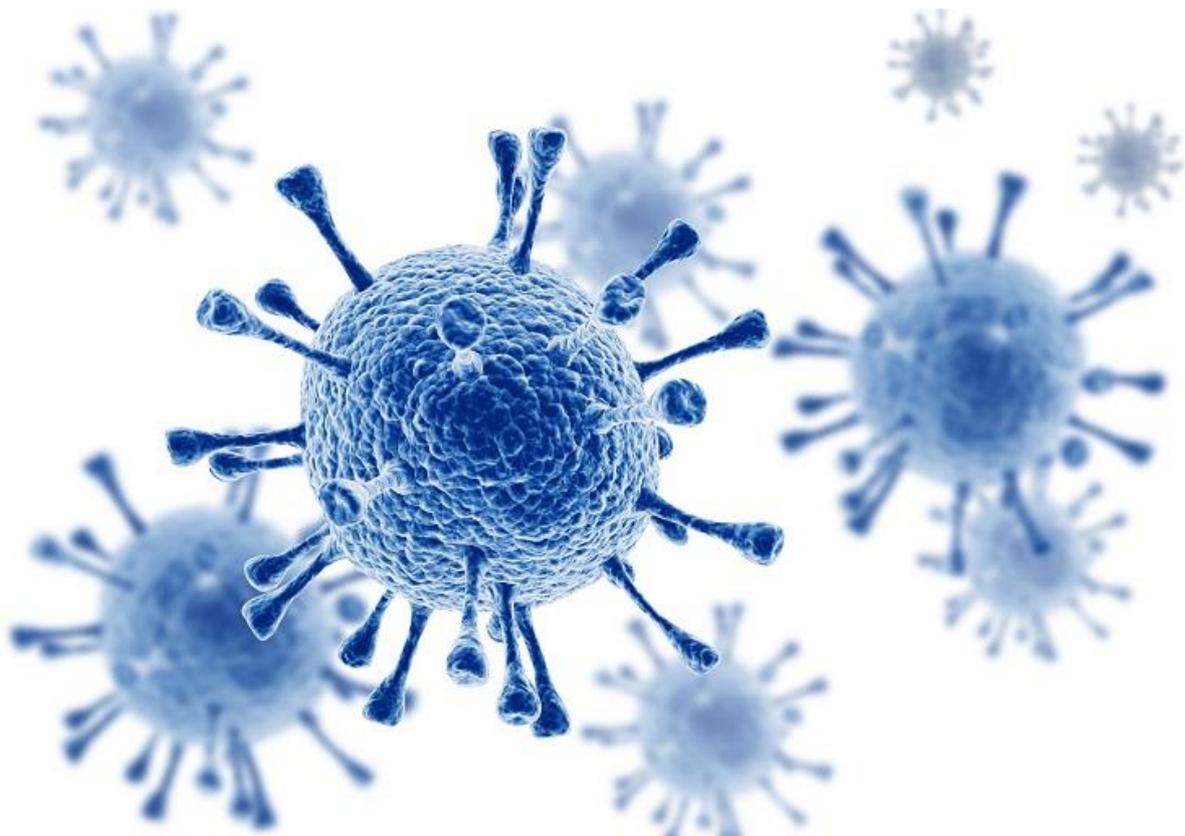


Tema 4: virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

Patricia López Benedicto, Sarah de la Mota de Gruijl, Natalia García Mayo, Beatriz Izquierdo Alarcón, Jorge Segura Núñez, Pablo López Benítez



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
JMRR-UAM © 2020

Índice

1. Introducción	3
1.1. Historia	3
1.2. Epidemiología	5
2. Clasificación	8
2.1. Grupos genéticos.....	8
2.2. Grupo M: “clades”	9
3. Composición del virus.....	10
3.1. Morfología, estructura, tamaño y organización genómica del virión	10
3.2. Proteínas estructurales	13
4. Biología	15
4.1. Estrategia de replicación.	15
5. Patogénesis.....	17
5.1 Infección primaria o fase aguda.	18
5.2. Infección asintomática o crónica.....	19
5.3. Progresión a la enfermedad sistémica.	20
5.4. Resistentes de larga duración.	21
6. Los receptores de quimioquinas y la infección por HIV-1.....	21
6.1. Identificación de los correceptores.	22
6.2. Modelo para explicar el tropismo de HIV-1.	24
6.3. Mecanismo de la fusión y entrada de HIV-1 mediada por los correceptores.....	24
6.4. Los correceptores y la enfermedad causada por el HIV-1.....	26
6.5. Señalización a través de los correceptores inducida por el virus.....	28
7. Efectos del virus sobre el sistema inmunitario.....	29
7.2 Efectos sobre las células dendríticas	34
7.3 Efectos sobre las células NK	34
7.4 Efectos sobre los linfocitos B.....	35
8. Diagnóstico.....	36
8.1. Algoritmo diagnóstico de infección de HIV	38
8.2. Tests serológicos	38
8.3. Ensayos para secuencias de nucleótidos de HIV.	41
8.4. Diagnóstico rápido de HIV	42
8.5. Diagnóstico de HIV resistentes a drogas antirretrovirales y determinación del tropismo viral	42
8.6. Diagnóstico de HIV-1 en neonatos y niños.....	45

9. Tratamiento.....	46
9.1. Aparición de mutantes. Resistencia a la quimioterapia antirretroviral.....	46
9.2. Drogas antirretrovirales.....	50
9.3. Terapia HAART.....	55
10. Latencia	56
10.1 Implicaciones de la latencia viral en el tratamiento antirretroviral	58
10.2 Abordajes que podrían posibilitar la eliminación total del virus.....	59
11. Vacunas y otros métodos de prevención de la infección.....	61
11.1. Vacunas inductoras de respuesta inmunitaria humoral	63
11.2. Vacunas inductoras de respuesta inmunitaria celular	64
11.3. Otros métodos de prevención de la infección de HIV.....	66
12. Referencias	66

TEMA 4: VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)

1. Introducción

El **virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)** es el agente etiológico del **síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)**.

De las dos formas mayoritarias de HIV, la infección con el tipo 1 (**HIV-1**) es la más prevalente en todo el mundo y se caracteriza por un deterioro lento y progresivo del sistema inmunitario que termina siendo fatal. Por lo contrario, la infección con el tipo 2 (**HIV-2**), que se encuentra principalmente en el oeste de África, generalmente tiene un curso clínico mucho más benigno.

1.1. Historia

Primeros casos y aislamiento del HIV

El primer caso de SIDA reconocido se describió en 1981, basado en la inusual aparición simultánea de dos enfermedades, el **sarcoma de Kaposi**[†] y la **pneumonía** causada por el hongo *Pneumocystis jirovecii* en un joven homosexual.

En un principio el SIDA se expandió más deprisa a través de las comunidades homosexuales debido a que por aquella época los preservativos eran únicamente utilizados como métodos anticonceptivos. De hecho, muchos grupos religiosos culparon a la comunidad homosexual de la aparición y expansión de esta enfermedad.

Casos de SIDA fueron subsiguientemente descritos en otras poblaciones (drogadictos, hemofílicos y niños nacidos de madres con SIDA), lo que sugirió una **etiología infecciosa**.

En **1983 se aisló el HIV** y se estableció como la causa de este nuevo síndrome.

Test diagnóstico y secuenciación del genoma del HIV

En 1985 se desarrolló un test de anticuerpos para detectar la infección. El desarrollo de un **test de ELISA** para detectar anticuerpos frente al HIV no fue importante sólo como método de detectar personas infectadas, sino que fue, y es, una herramienta fundamental para analizar los **bancos de sangre**, impidiendo por tanto millones de infecciones como consecuencia de las transfusiones sanguíneas.

La **secuencia completa del HIV-1** se conoció en 1985, dos años después de que se produjese su aislamiento. Pese a que el tamaño del genoma de este virus es relativamente pequeño (10 kb) se tardó tanto en secuenciar su genoma debido a que por aquella época las técnicas de secuenciación masiva que se utilizan hoy en día todavía no habían sido desarrolladas.

[†]Sarcoma de Kaposi

[†]El sarcoma de Kaposi (KS) es un tumor complejo de histogénesis incierta caracterizada microscópicamente por una proliferación de células en forma de huso. El tumor a menudo aparece en la piel particularmente sobre las extremidades, la cara y los genitales, pero se puede diseminar a los tejidos linfáticos y vísceras, especialmente en los pacientes con SIDA. Aunque aún es motivo de cierta discrepancia, se piensa que el origen del KS es un proceso infeccioso causado por un Herpesvirus.

Origen de HIV-1 y HIV-2

En 1985, estudios realizados en prostitutas en África revelaron la presencia de anticuerpos que eran más reactivos con proteínas del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), presente en macacos africanos, que con las del HIV-1, lo que condujo al descubrimiento y aislamiento del **HIV-2**. Subsiguientemente, se demostró que el HIV-2 estaba más relacionado genéticamente con el SIV que con el HIV-1, lo que llevó a sugerir que el HIV puede haber sido introducido recientemente en las poblaciones humanas a partir de los primates en África.

En 1999, se mostró que el **HIV-1 tiene su origen en la especie de chimpancés *Pan troglodytes troglodytes***, en el que el virus ha co-evolucionado durante siglos. De hecho, los SIVs no parecen causar SIDA en sus hospedadores naturales.

Por otro lado, cabe destacar la singularidad de que los chimpancés son, entre las especies actuales, los animales más relacionados con el hombre.

Primeras drogas y terapia antirretroviral

En 1985 se describió la primera droga, el **zidovudine** (o AZT), con actividad *in vitro* y en pacientes con SIDA. Su uso en humanos fue aprobado en 1987.

En 1995 se aprueba el uso en pacientes del primer inhibidor de proteasa, el **saquinavir**, lo que posibilitó la formulación de la **terapia antirretroviral altamente activa (HAART, "highly active antiretroviral therapy")**.

En la **figura 1** se representa la tasa de mortalidad en España por HIV/SIDA total y por sexos entre 1981-2013. Pese a la introducción de AZT como droga antiviral en 1987, la tasa de mortalidad aumenta hasta alcanzar su pico en 1995, momento en que se aprueba el uso de saquinavir y la introducción de la HAART. Esta gráfica refleja la importancia de la extensión de la terapia antirretroviral para disminuir las muertes por SIDA. No obstante, y como comentaremos en breves, esta tendencia no se empieza a observar a nivel global hasta 2006.

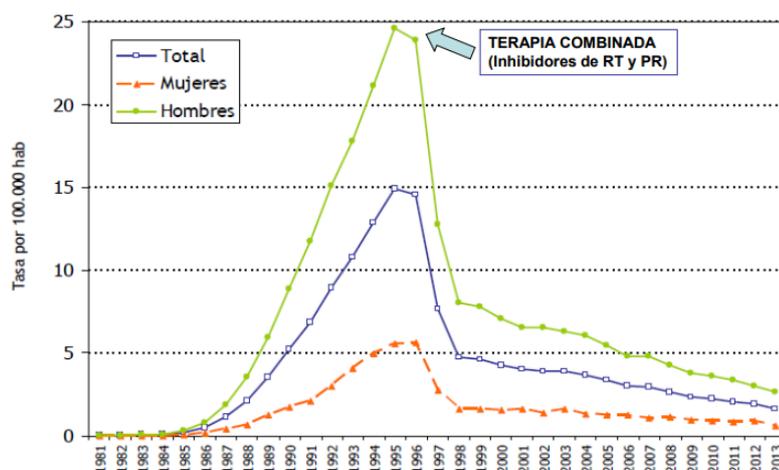


Figura 1. Tasas de mortalidad en España por HIV/SIDA total y por sexos, 1981-2013. Fuente: Centro Nacional de Epidemiología (ISCIII).

De infección incurable a infección crónica

El HIV es el agente infeccioso más intensamente estudiado de todos los tiempos. Los estudios sobre la patogénesis del HIV han dado como resultado que la infección por HIV haya pasado de ser una enfermedad incurable y de consecuencias fatales a ser considerada una infección crónica. Si bien esto es así en los países desarrollados, pues aún hay muchas personas en los países pobres que no tienen acceso a estos medicamentos.

Por otro lado, el hecho de que la enfermedad sea controlable por tratamiento no nos debe hacer bajar la guardia en las medidas de protección frente a la transmisión, pues sigue siendo una enfermedad incurable.

1.2. Epidemiología

La infección pandémica por HIV se expandió rápidamente a todos los lugares del mundo (Fig. 2). Desde principios de los años 80, alrededor de 60 millones de personas han contraído el HIV, y más de 35 millones han muerto.

Prevalencia e incidencia del HIV

Los términos prevalencia e incidencia, muy utilizados en epidemiología, no son equivalentes.

- La **prevalencia** indica el número total de individuos infectados en un momento dado.
- La **incidencia** hace referencia al número de casos de infección producidos en un determinado periodo de tiempo, siendo con frecuencia referida a periodos anuales.

El número de casos nuevos alcanzó su máximo en 1999, con 3,16 millones de infecciones, y desde entonces ha ido disminuyendo hasta los 1,94 millones en 2017 (Fig. 2a).

Aunque el número de nuevos casos, incidencia anual, alcanzó su máximo en 1999, cuando se analiza la prevalencia de la infección (Fig. 2b) esta sigue aumentando desde el inicio de la pandemia, estimándose que, en 2017, el número de personas que estaban infectadas era de unos 36,8 millones.

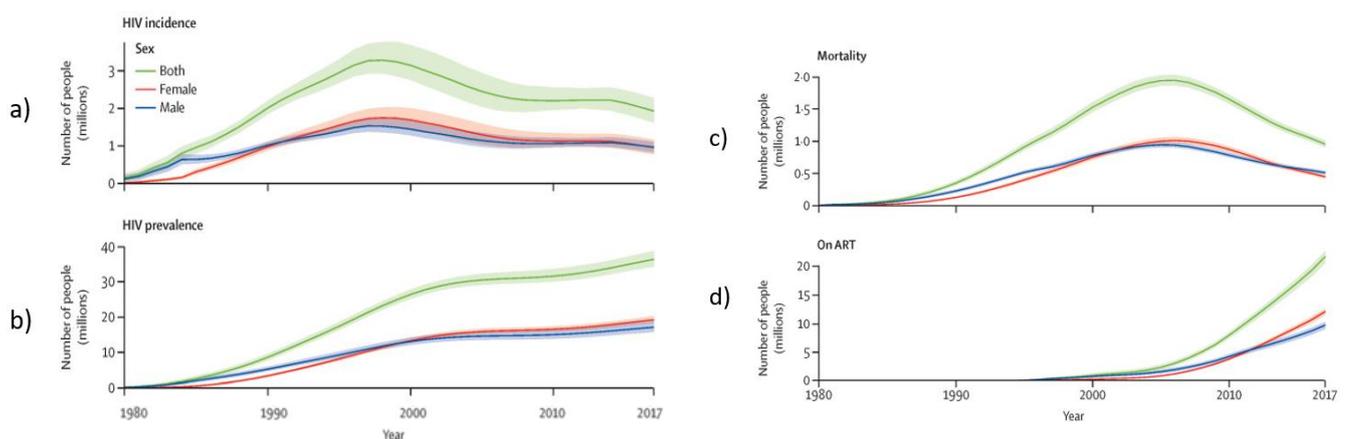


Figura 2. Incidencia, prevalencia, mortalidad y personas en tratamiento con TAR a nivel mundial, por sexo, para todas las edades, 1980-2017 (Frank *et al.*, 2019).

Mortalidad y extensión del tratamiento antirretroviral

En 1996, después de más de una década de aumentos constantes, las muertes por SIDA empezaron a decrecer en USA y algunas naciones de Europa Occidental. La bajada es debida principalmente a la introducción de **terapias** poderosas capaces de retardar la actividad HIV. Pero esta tendencia de los países industrializados no se observó a nivel global hasta 2006 (Fig. 2c), donde se alcanzó el pico máximo de mortalidad, con alrededor de 2 millones de muertes. Desde entonces se ha producido una continua disminución en la mortalidad global, que en 2017 fue de unas 950.000 personas.

Esta disminución en la tasa de mortalidad es un efecto directo del esfuerzo que se está realizando en hacer llegar los tratamientos al mayor número posible de personas. Así, mientras que en 2006, poco menos de tres millones de personas recibieron tratamiento, en 2017, el tratamiento llegó a casi 22 millones de personas (Fig. 2d). No obstante, aún entonces un 40% de las personas infectadas seguían sin recibir tratamiento.

La extensión del tratamiento a las personas infectadas es fruto de una iniciativa público-privada conocida como **UNAIDS** (www.unaids.org) o ONUSIDA (en español) cuyo objetivo es poner fin a la epidemia del SIDA en 2030. Pero para alcanzar este objetivo, resulta fundamental el **diagnóstico de todas las personas que estén infectadas**. 90-90-90 es un ambicioso objetivo de tratamiento para contribuir al fin de la epidemia de sida:

- Que en 2020 el 90% de las personas que viven con el HIV conozcan su estado serológico respecto al HIV.
- Que en 2020 el 90% de las personas diagnosticadas con el HIV reciban terapia antirretrovírica continuada.
- Que en 2020 el 90% de las personas que reciben terapia antirretrovírica tengan supresión viral.

Con respecto a este objetivo, a día de hoy hay 38 millones de personas que viven con el HIV, el 81% sabe que es seropositivo, dos de cada tres personas infectadas reciben terapia antirretroviral y solo el 59% que viven con el HIV tienen niveles indetectables de virus.

Distribución de la población infectada

La distribución de la población infectada no es homogénea, siendo **África subsahariana** la que muestra una prevalencia mayor (Fig. 3). Se estima que aquí se encuentran alrededor del **70% de los casos HIV-positivos** y donde se han producido el **80% de las muertes** causadas hasta el momento por esta epidemia (Fig. 4). La prevalencia media es del 8,8% en la población adulta (15-49 años), en algunos países de esta región la prevalencia en adultos es superior al 20%. Asimismo, la incidencia también es mayor en estas regiones de África subsahariana (Fig. 5).

Entre las causas de la elevada incidencia está la transmisión de madre a hijo, que ocurre entre el 15 y el 25% de los partos de madres HIV-positivas. La **transmisión vertical del HIV** puede ocurrir de diferentes formas:

- En el **útero**, como un resultado de la exposición al virus a través de la placenta o en el líquido amniótico.
- Durante el **parto**, por el contacto con la sangre o secreciones vaginales.
- Posnatalmente, a través de la **leche materna**.

En más del 80% de los casos, esta transmisión se produce por contaminación en el canal del parto. La cesárea programada y el tratamiento farmacológico de la madre en los días previos al parto y durante el mismo reducen la **tasa de transmisión a menos del 2%**.

En las regiones más afectadas, HIV ha revertido las mejoras en la esperanza de vida que se habían logrado. En África del sur, la esperanza de vida subió de 44 años en 1950 a 59 años en 1980, pero después de estas décadas la esperanza de vida vuelve a estar por debajo de 45.

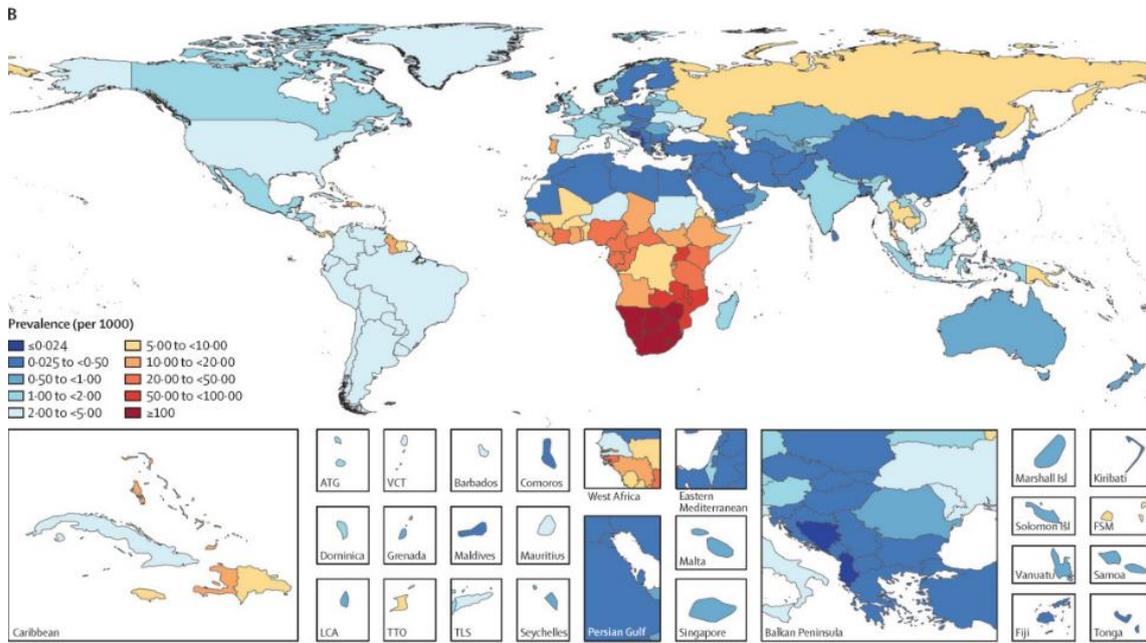


Figura 3. Prevalencia de la infección por HIV en todo el mundo. Se observa cómo la mayor parte de los casos se localizan en África subsahariana (Frank *et al.*, 2019).

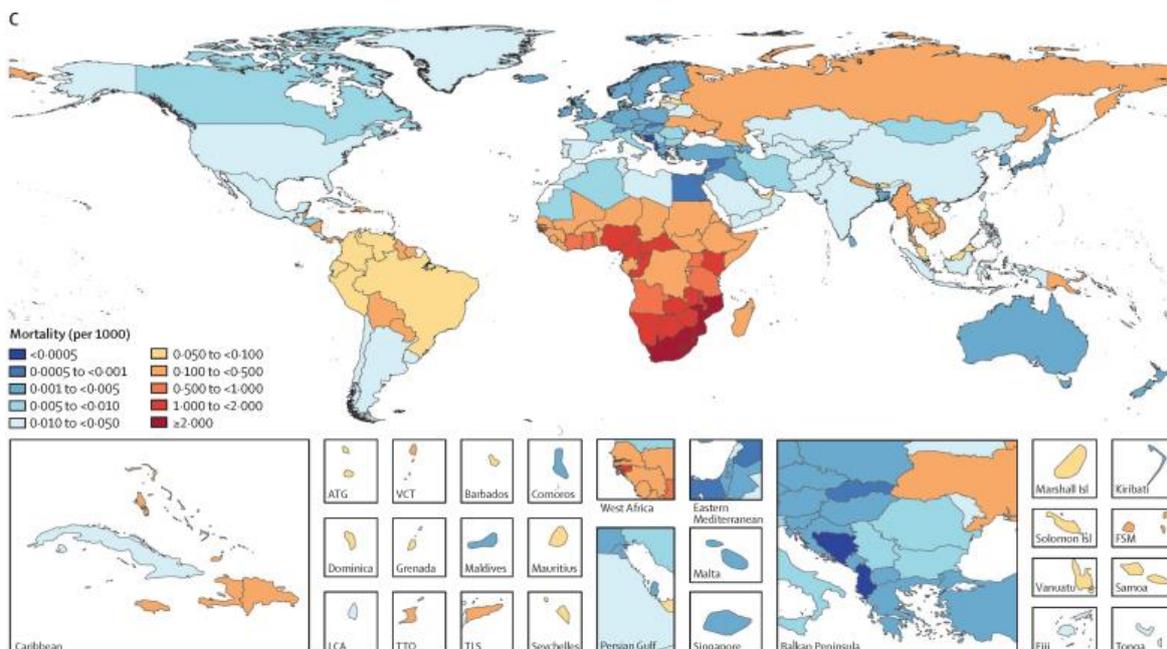


Figura 4. Mortalidad de la infección por HIV en todo el mundo. Se observa cómo la mayor parte de la mortalidad se produce en África subsahariana (Frank *et al.*, 2019).

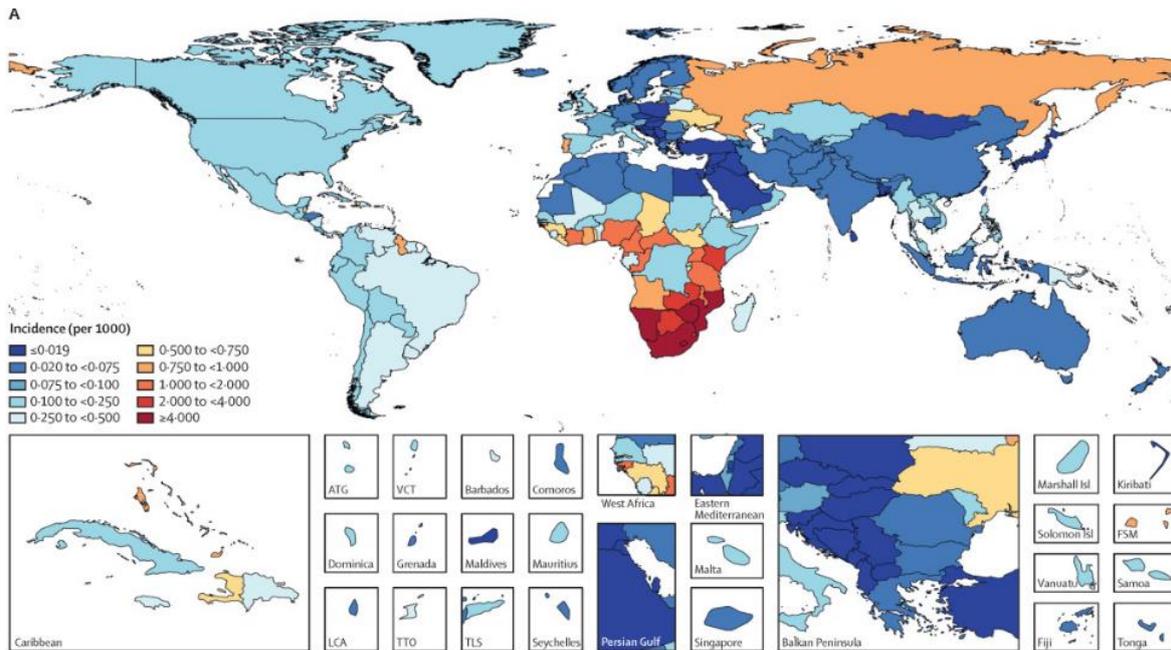


Figura 5. Incidencia de la infección por HIV en todo el mundo. Se observa cómo la mayor parte de nuevos casos se producen en África subsahariana (Frank *et al.*, 2019).

2. Clasificación

Ambos HIV-1 y HIV-2 son virus RNA que pertenecen al **género lentivirus**, citopático y no oncogénico, de la **familia Retroviridae**.

Aunque los primeros casos registrados en las publicaciones médicas fueron en 1981 y correspondían a pacientes de Estados Unidos, pronto se evidenció que la enfermedad llevaba mucho tiempo en África. Había permanecido oculta para la ciencia por estar afectando a persona que habitan las partes más olvidadas del planeta (allí se le conocía como “slim disease”).

Estudios filogenéticos recientes indican que el origen de la pandemia estuvo en **Kinshasa**, la capital de la República Popular del Congo, alrededor de 1920.

2.1. Grupos genéticos

Dentro de las cepas de HIV-1, hay tres grupos genéticos distintos, designados M (“major”), O (“outlier”) y N (“non-M, non-O”). Estos grupos tienen su origen en **transmisiones independientes** a humanos desde chimpancés (grupos M y N), gorilas (grupo O) y monos mangabeys (HIV-2).

- Los **virus de grupo M** se encuentran distribuidos en todo el mundo.
- Los **virus del grupo O**, altamente divergentes, se han aislado hasta ahora en África, Alemania, Francia y otras partes de Europa.
- El **grupo N** (que hasta ahora sólo se ha encontrado en Camerún) es un mosaico formado entre dos líneas virales divergentes relacionadas con HIV-1 y SIV (de chimpancé), posiblemente producidas por recombinación.

3. Composición del virus

3.1. Morfología, estructura, tamaño y organización genómica del virión

Morfología, estructura y tamaño

Mediante **microscopía electrónica** se ha determinado que el virión HIV-1 mide aproximadamente entre 100 a 150 nm de diámetro (Fig. 8a).

Al igual que otros lentivirus, la envuelta del HIV-1 está constituida por una bicapa lipídica que el virión adquiere al salir de las células hospedadoras por gemación. Formando parte de esta envuelta se localizan dos glicoproteínas codificadas por el virus:

- ✓ **Glicoproteína gp120 (SU):** está expuesta hacia el exterior de la superficie del virión.
- ✓ **Glicoproteína gp41 (TM):** tiene un dominio transmembrana y establece interacciones con gp120.

Por debajo de la bicapa encontramos un "core" o centro cilíndrico electrodenso formado por la **proteína de la matriz (MA, p17)** y una cápsida cónica formada por la **proteína p24 (CA)**. En el interior del "core" se encuentran dos copias de RNA de cadena sencilla, cada una contiene un genoma viral completo. Estas dos copias de RNA están estabilizadas como un complejo ribonucleoproteico junto con la **proteína de la nucleocápsida (NC, p7)**.

Finalmente, unidas al genoma viral se localizan las moléculas de **retrotranscriptasa**, y dentro del interior de la cápsida también se localizan la **proteasa e integrasa**.

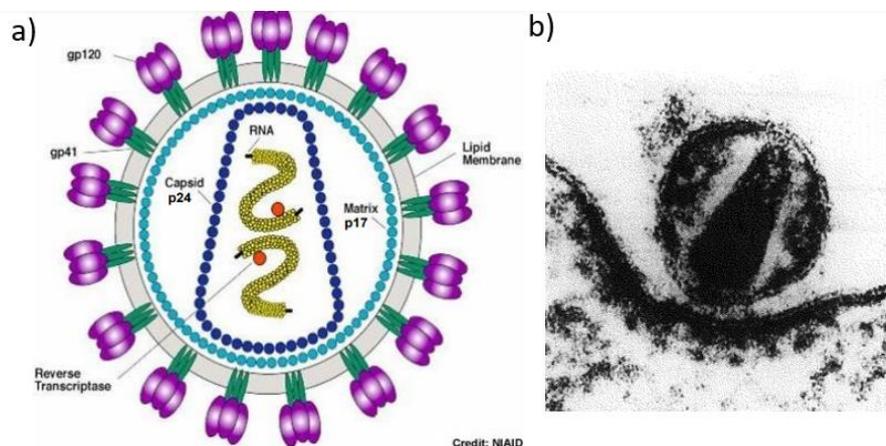


Figura 8. (a) Representación de la estructura del HIV-1. Se indica la localización de las proteínas más representativas del virión. (b) Micrografía electrónica del virión del HIV-1 en la que se observa el core cilíndrico rodeado de una capa de lípidos.

Organización genómica

El genoma HIV tiene unas 10 kb de longitud y presenta la organización típica de los retrovirus (Fig. 6). Cuando el genoma del HIV está integrado se encuentra flanqueado en sus extremos 3' y 5' por dos extremos repetitivos largos (**LTRs**), formados por las regiones U3, R y U5, que son responsables del inicio de la retrotranscripción y de la poliadenilación del RNA mensajero.

El HIV-1 presenta en su genoma tres genes estructurales:

- ✓ El gen ***gag***, que codifica los componentes estructurales del virión (proteínas CA, MA y NC).
- ✓ El gen ***pol***, que codifica varias enzimas virales (retrotranscriptasa, proteasa e integrasa).
- ✓ El gen ***env***, que codifica las glicoproteínas de cubierta (gp120 y gp41).

Además, el HIV-1 forma parte de un grupo conocido como **retrovirus complejos**, que a diferencia de los retrovirus simples presentan tres genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*) y tres genes accesorios (*vif*, *vpr* y *vpu* o *vpx* en HIV-2), que se expresan gracias a mecanismos de *splicing* alternativo. Las proteínas codificadas por estos genes funcionan en **fases tempranas y tardías del ciclo de replicación** para regular la transcripción y traducción de las proteínas virales y para aumentar el ensamblaje y liberación de partículas desde las células infectadas (ver Tabla 1).

Gen	Proteína	Tamaño	Función
Genes estructurales			
gag	Matriz (MA)	p17	Proteínas estructurales del "core"
	Cápsida (CA)	p24	
	Nucleocápsida (NC)	p7	
	p6	p6	
pol	p6	p6	Enzimas virales
	Proteasa (PR)	p12	
	Retrotranscriptasa (RT)	p66/p51	
env	Integrasa (IN)	p32	Glicoproteínas de la envuelta viral
	Glicoproteína de superficie (SU)	gp120	
	Proteína transmembrana (TM)	gp41	
Genes reguladores			
tat	Tat	p14	Activador de la transcripción viral
rev	Rev	p19	Transporte de mRNA de tamaño completo al citoplasma
nef	Nef	p28	Bloque presentación MHC-I e interacciona y degradación de CD4
Genes accesorios			
vif	Vif	p24	Bloquea la actividad de la proteína APOBEC 3G
vpu	Vpu	p16	Promueve la liberación de partículas virales
vpr	Vpr	p15	Detiene la proliferación celular
vpx	Vpx	p14	Promueve la replicación viral

Tabla 1. Genes del HIV-1, producto génico asociado, tamaño y funciones.

Transcripción de los genes estructurales en retrovirus simples

Los retrovirus simples únicamente presentan en su genoma los tres genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, cuya transcripción es dirigida desde la repetición LTR localizada en el extremo 5'. La transcripción del DNA provírico por la RNA polimerasa II de la célula hospedadora produce transcritos de RNA de tamaño completo, que pueden (Fig. 9):

- ✓ Traducirse para generar **precursores Gag** (90% de las veces) y **precursores Gag-Pol** (10% de las veces), que dependerá de que se produzca o no un cambio de fase de lectura durante la traducción en el ribosoma. El procesamiento de las poliproteínas está mediado por la proteasa, que permitirá la formación de las proteínas maduras.
- ✓ Sufrir un proceso de *splicing* para generar **precursores env**, que se traduce en un polipéptido cuya glicosilación origina la proteína gp160, como veremos en el siguiente apartado.

Alternativamente, el RNA transcrito sirve de RNA genómico para su incorporación en los viriones, como veremos en el apartado de ciclo biológico.

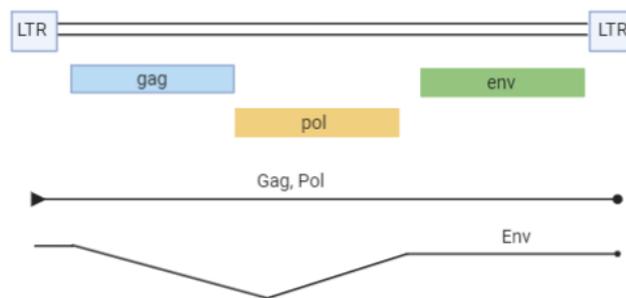


Figura 9. Proceso de transcripción en retrovirus simples. Created in BioRender.

Regulación del transporte de los mRNA en retrovirus complejos: proteínas Rev

La proteína viral Rev se expresa únicamente en los retrovirus complejos como lo es el HIV-1, y su función es la de transportar desde el núcleo al citoplasma aquellos mRNA que presentan el **elemento RRE**, que se encuentra localizado en la región codificante del gen *env*. Por tanto, los mRNA que presentarán el elemento RRE son los mRNA de tamaño completo (que se traducen en los precursores Gag y Gag-Pol), el mRNA de *env* y los mRNA de los genes accesorios. A su vez, los mRNA de los genes reguladores no presentan el elemento RRE.

Gracias a este transporte mediado por Rev la expresión de los genes de los retrovirus complejos está regulada temporalmente (Fig. 10).

- ✓ **Inicio de la infección:** los niveles de Rev son bajos, por lo que se favorece el transporte de los mRNA que no contienen el elemento Rev, que permitirá en las etapas iniciales la expresión de las proteínas reguladoras.
- ✓ **Etapas finales de la infección:** los niveles de Rev habrán aumentado, favoreciéndose el transporte de los mRNAs estructurales y accesorios. En esta etapa de la infección se producirá la expresión de las proteínas estructurales y enzimáticas que serán necesarias para el ensamblaje de los nuevos viriones.

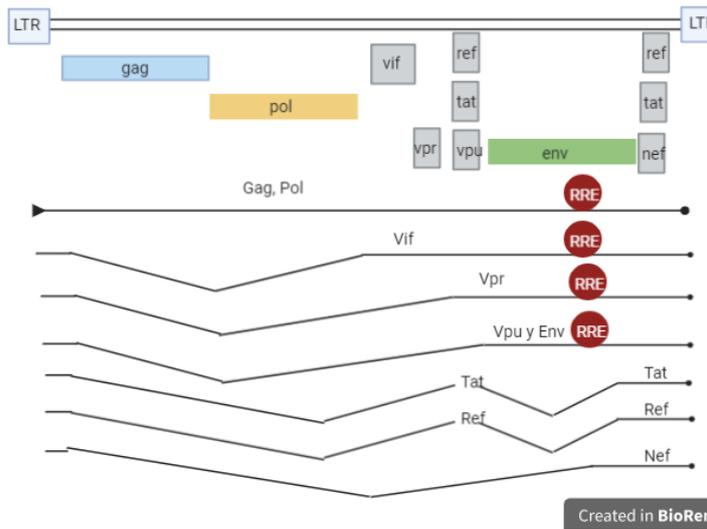


Figura 10. Proceso de transcripción en retrovirus complejos. Se muestra el elemento RRE. *Created in BioRender.*

Activación de la transcripción: proteína Tat

Como venimos diciendo, el genoma del HIV integrado está flanqueado por las secuencias LTR:

- ✓ **LTR 5'**: contiene el promotor transcripcional y sitios de unión a los factores de transcripción AP-1 y NFκB.
- ✓ **LTR 3'**: contiene el sitio de poliadenilación (y con ello el sitio de parada transcripcional).

La transcripción del provirus está mediada por la RNA pol II celular y es incrementada por la proteína Tat.

En la región LTR 5' del mRNA existe una estructura conocida como TAR, que es el sitio de unión de la proteína Tat. Cuando Tat interacciona con TAR, se produce el reclutamiento de ciclina T y Cdk9 cuya función es aumentar la procesividad de la RNA pol II.

Existe un bucle de retroalimentación positiva, pues a medida que se produce una acumulación de la proteína Tat se produce un aumento de la transcripción del provirus.

3.2. Proteínas estructurales

Formación de trímeros de gp41 y gp120

El **producto mayor del gen env** se sintetiza como un **polipéptido de 88-kDa**. Esta proteína experimenta una serie de etapas de **glicosilación** en el retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi, dando un producto de aproximadamente 160 kDa. Así, la molécula resultante, **gp160**, está glicosilada principalmente con azúcares unidos por N que suponen aproximadamente la mitad del peso molecular final.

Es también en el RE donde la proteína se ensambla formando **trímeros**, siendo así transportada a la membrana plasmática. Durante su transporte a la membrana, la gp160 es partida por una **serin-proteasa** celular para generar las subunidades **transmembrana (gp41)** y de **superficie (gp120)**.

Como para otros virus con cubierta, la rotura de las proteínas integrales de membrana es una etapa crítica en el ciclo de vida del virus. Mutaciones dentro del sitio de rotura endoproteolítico de la gp160 de HIV-1 resultan en la liberación de partículas que son morfológicamente indistinguibles del virus natural, pero no infectivas.

Tras la rotura proteolítica, la **gp120 permanece covalentemente asociada con gp41** sobre la superficie celular y son incorporadas en la cubierta de los viriones que brotan.

Subunidad gp120

La subunidad gp120 está implicada en el anclaje, la unión a CD4 y la unión al correceptor. Contiene (Fig. 11):

- 5 **dominios conservados** (C1-C5): estas regiones conservadas contienen los dominios críticos para la unión a las células.
- 5 **dominios variables** (V1-V5): se localizan cerca de la superficie de gp120.

Las **regiones V1-V4** forman una especie de lazos ("loops") que se anclan mediante puentes disulfuro. Estos lazos variables, junto a los sitios de glicosilación, generan **epítomos altamente variables** frente a la respuesta inmunitaria humoral, pero su función no es sólo la evasión de la respuesta inmunitaria: los lazos V1/V2 y particularmente el V3 desempeñan papeles importantes en la unión de Env al correceptor.

Subunidad gp41

La subunidad gp41 de Env constituye la maquinaria molecular responsable de la fusión de membranas. La proteína consta de (Fig. 11):

- Un largo dominio extracelular (**ectodominio**): consta de un péptido de fusión hidrofóbico N-terminal y dos dominios (**HR1 y HR2**) que son críticos para el proceso de fusión.
- Un **anclaje transmembrana**.
- Un dominio que se extiende en el interior de la membrana del virus.

→ Las glicoproteínas de la cubierta se ordenan sobre la superficie como trímeros en una configuración de pincho-botón típica ("spike-and-knob"). Se estima que existen 72 de estas ordenaciones por virión.

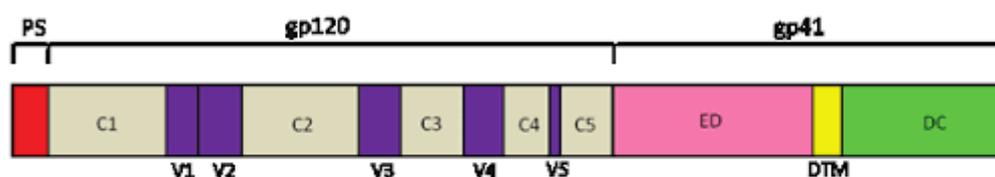


Figura 11. Dominios de las proteínas gp120 y gp41, productos proteicos del gen *env* (Spinelli, 2014).

4. Biología

4.1. Estrategia de replicación

Anclaje y entrada del VIH

El virus se ancla a la célula diana a través de la interacción de la glicoproteína de la cubierta gp120 y el receptor celular CD4, esto permite el anclaje, no la entrada (Fig. 12).

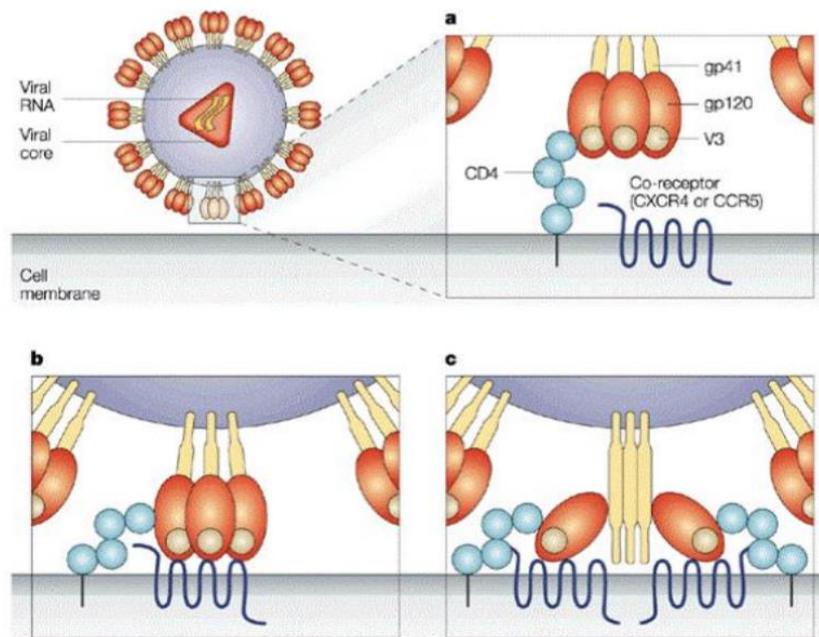


Figura 12. Anclaje y entrada del VIH. Esta figura ilustra cómo se produce el proceso de adhesión y entrada del HIV-1 en la célula hospedadora. Este proceso está mediado por la interacción entre la proteína gp120 con el CD4 y el coreceptor correspondiente, y la proteína gp41. Fuente: Adaptado de De Clercq (2003).

Síntesis de DNA y integración cromosoma del hospedador

Cuando se ha producido la interacción de la gp120 con los receptores se da el proceso de fusión de la envuelta del virus con la membrana celular de la célula hospedadora. Después de la penetración, el complejo ribonucleoproteico queda libre en el citoplasma. La conversión del RNA vírico a DNA es realizada por las **actividades coordinadas polimerasa y ribonucleasa H de la RT vírica**. La RT (DNA polimerasa dependiente de RNA), primero sintetiza una cadena complementaria de DNA a partir del RNA genómico, utilizando como **cebador el tRNA-Lys celular**, mientras que la ribonucleasa H degrada selectivamente el molde de RNA original. La enzima entonces sintetiza una segunda cadena de DNA dando lugar a una copia de DNA de doble cadena a partir del genoma RNA original.

Una vez sintetizado, el DNA viral pasa al núcleo formando un complejo en el que se encuentran varias proteínas virales (integrasa, RT y Vpr) y la proteína celular HMG-1(Y). Es la proteína Vpr la que conecta el complejo a la maquinaria de importación nuclear.

Después de la translocación al núcleo, el DNA lineal de doble cadena se integra directamente en el cromosoma del hospedador por acción de la enzima integrasa codificada en el genoma viral. Aunque inicialmente se pensó que la integración del genoma viral ocurría al azar, estudios de secuenciación del genoma humano han mostrado que el virus tiende a integrarse en genes que están activos transcripcionalmente, lo que va a favorecer su replicación y expansión.

Regulación de la transcripción viral

Una vez integrado, la activación de la transcripción es dependiente de la actividad coordinada de factores virales y celulares. Existen varias proteínas virales, y celulares, que van a regular el proceso, pero cuya descripción excede los límites de este tema. No obstante, cabe mencionar que entre los factores celulares implicados en la iniciación de la transcripción del genoma viral está el **factor de transcripción Rel/NF- κ B**. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos T-CD4+ en estado de reposo celular, y su síntesis es inducida únicamente en el curso de los procesos de activación inmunológica por la acción de mitógenos, citoquinas y otras proteínas activadoras. De esta manera, el linfocito T-CD4+ representa un doble nicho ecológico en el ciclo biológico del HIV: en estado de reposo celular permite la latencia viral al carecer de los factores necesarios para permitir la replicación del HIV; por el contrario, la activación celular induce en el linfocito T-CD4+ las proteínas necesarias para iniciar la transcripción del genoma viral, transformándose así en una célula especialmente permisiva para la replicación del HIV.

La transcripción del DNA proviral por la RNA polimerasa II de la célula hospedadora produce transcritos de RNA de tamaño completo. Algunas de estas moléculas se exportan al citoplasma y se utilizan como mRNA, donde serán traducidos para producir las poliproteínas precursoras Gag y Gag-Pol.

Montaje de los componentes virales

El gen *env* es traducido por ribosomas asociados al retículo endoplasmático. Las proteínas sintetizadas se transportan a través del aparato de Golgi donde se glicosilan y se procesan para formar la glicoproteína de superficie gp120 y la proteína transmembrana gp41. Estas proteínas maduras se transportan a la superficie de la célula infectada.

El ensamblaje del núcleo del virión compuesto de RNA HIV, proteínas modificadas del virus y enzimas tiene lugar en la membrana plasmática. Los viriones maduros se forman por gemación a través de la membrana plasmática, al tiempo que adquieren las glicoproteínas de la cubierta externa (gp120) y transmembrana (gp41). Para completar la gemación, el virus secuestra la maquinaria de transporte vesicular de la célula (Fig. 13). De hecho, el estudio de la biología del HIV ha propiciado grandes avances en el conocimiento de muchos procesos celulares desde el tráfico vesicular a mecanismos de control transcripcional, exportación de RNA y control de los retroelementos endógenos, entre otros.

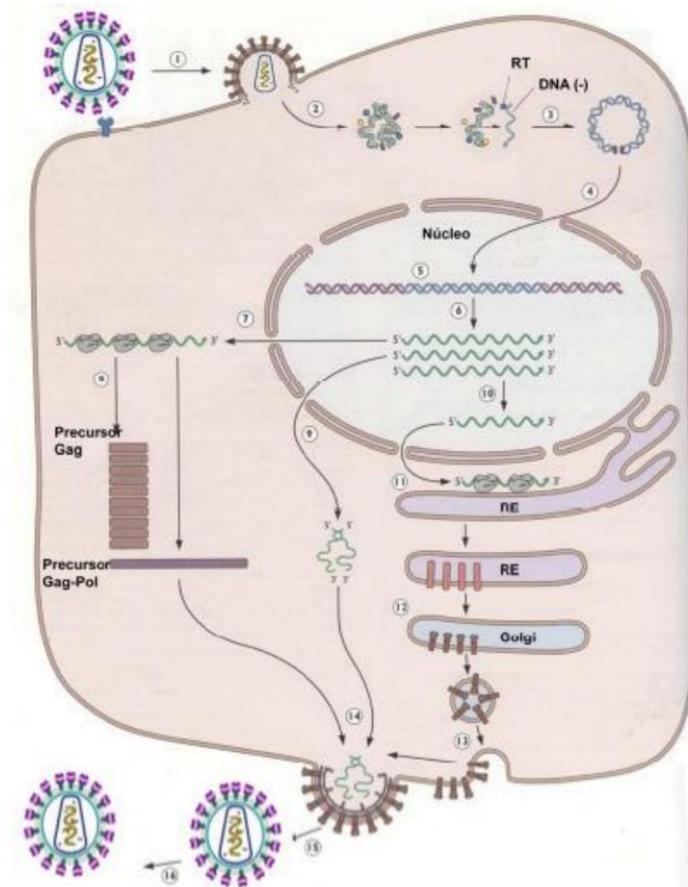


Figura 13. Resumen del ciclo de replicación viral del VIH-1, desde la adsorción y fusión con una célula hasta la producción y salida de nuevas partículas virales. (1) Las proteínas gp120 y gp41 van a mediar la adhesión y entrada del virus. (2) La cápsida del virus es liberada en el citoplasma de la célula diana. (3) Una vez en el citoplasma, el contenido de la cápsida (integrasa, proteasa, RT, RNA) es liberado. La retrotranscriptasa viral sintetiza ADN a partir de RNA viral. (4) El complejo ADN-integrasa migra al núcleo, se produce una escisión en el ADN celular y el ADN proviral se integra de manera no específica de sitio. (5) El nuevo RNA sintetizado pasa a usarse como RNA genómico y también para producir algunas proteínas virales. (6) El RNA, las proteínas virales y otros componentes, migran a la superficie celular para formar un nuevo, pero todavía inmaduro, virión (7) El virus se desprende de la célula hospedadora por gemación, incorporando las proteínas gp120 y gp41 en la bicapa lipídica. La maduración del virus tiene lugar después de su desprendimiento, por cortes proteolíticos en la partícula viral. Figura adaptada de Flint et al., 2001.

5. Patogénesis

En la gran mayoría de los individuos, la infección con HIV-1 resulta en una gradual pero sostenida pérdida de células T CD4+ y el consiguiente desarrollo de una disfunción inmunológica, y la aparición de infecciones oportunistas que son el sello del SIDA. En la mayoría de los casos, la progresión al SIDA ocurre después de un periodo prolongado de estabilidad clínica que dura alrededor de 8 a 10 años. Sin embargo, en un número pequeño de personas, la progresión de la enfermedad ocurre rápidamente entre 1 y 3 años después de la infección.

Aunque la infección con HIV-2 puede también causar SIDA, el periodo de progresión clínica es considerablemente más largo, lo que sugiere que HIV-2 puede ser menos virulento.

Progresión clínica

A pesar de la variación en la velocidad de progresión clínica, la infección con HIV procede comúnmente en tres etapas:

1. Infección primaria o fase aguda,
2. Infección clínicamente asintomática o fase crónica, y
3. Progresión sintomática de la enfermedad (Fig. 14).

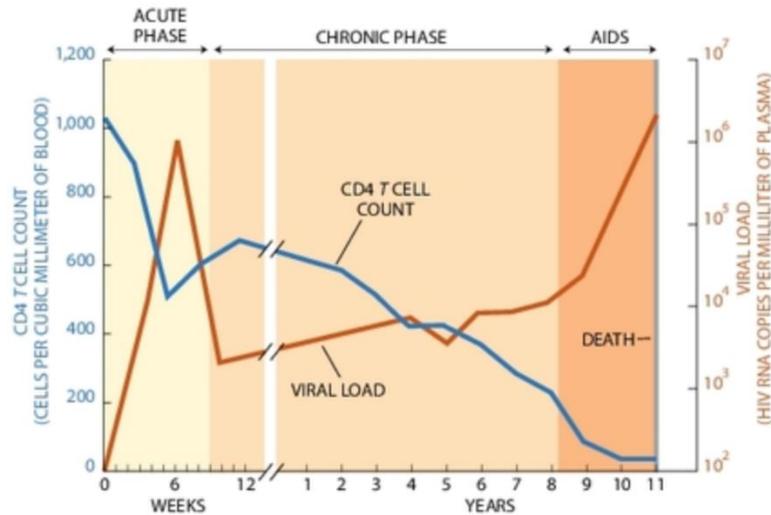


Figura 14. Resumen del curso de la patogénesis del SIDA. Se distinguen las tres fases de la patología: fase aguda, fase crónica y fase enfermedad. También se muestran la destrucción progresiva de células T CD4+ a lo largo del desarrollo de la enfermedad y el progreso de carga viral con el tiempo. Fuente: Fauci et al (1996)

Un principio importante e incontrovertible es que durante la infección HIV-1, la replicación del virus es continua durante todas las etapas, incluso durante la prolongada fase asintomática que se encuentra entre la infección primaria y el desarrollo del SIDA.

5.1 Infección primaria o fase aguda

La infección primaria con HIV-1 se caracteriza por un periodo de replicación explosiva del virus. Estimaciones cuantitativas de la carga viral durante este tiempo indican que los niveles de HIV-1 circulantes pueden alcanzar **10⁷ partículas por ml de plasma**, comparable o mayor a la que se alcanza en individuos con SIDA avanzado. A pesar de esta elevada viremia, muchos individuos permanecen clínicamente asintomáticos, mientras que otros exhiben síntomas similares a gripes, incluida fiebre.

La resolución de la fase aguda ocurre en unas pocas semanas después de la exposición al virus y está asociada con el desarrollo de **anticuerpos específicos de HIV-1 y seroconversión**. Si bien, antes de la seroconversión, ya se observa una clara disminución de los niveles circulantes del virus, resultado de la respuesta inmunitaria (celular y humoral) frente al virus que se ha generado. Los anticuerpos frente a HIV-1 contribuyen a reducir los niveles de virus circulantes bien directamente a través de la neutralización de virus, o indirectamente a través de la formación de inmunocomplejos que son subsiguientemente retirados por el sistema reticuloendotelial. Por otro lado, los **linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de HIV-1** van a eliminar células infectadas por HIV y suprimir la replicación a través de la secreción de citoquinas antivirales.

Estudios longitudinales de muestras sanguíneas tomadas durante la infección primaria indican que la actividad CTL específica coincide temporalmente con una bajada rápida en la viremia, lo que sugiere que

la inmunidad celular desempeña un papel crítico en la restricción inicial de la replicación vírica. Por lo contrario, los anticuerpos capaces de neutralizar la infectividad HIV-1 aparecen más tarde, cuando los niveles del virus han bajado significativamente de la circulación.

A pesar del hecho de que el HIV-1 induce respuestas inmunitarias antivirales bastante fuertes, la replicación viral nunca resulta totalmente controlada en los individuos infectados. Esto es debido a la gran capacidad que tiene este virus para generar variabilidad. Analizaremos este hecho más adelante, cuando hagamos referencia a la generación de resistencia a fármacos.

En la mayoría de los individuos, la carga vírica en el plasma se estabiliza después de la infección aguda. Este "plateau" varía considerablemente de persona a persona, pero generalmente se encuentra entre **10³ a 10⁵ copias de RNA vírico por ml de plasma**. Los niveles estacionarios de HIV-1 en el plasma después de la infección primaria es predictiva de la velocidad de progresión de la enfermedad. Los niveles en plasma de RNA HIV que exceden 10⁵ copias/ml después de la seroconversión es una fuerte indicación de una progresión rápida hacia el SIDA, mientras que los niveles de RNA HIV-1 por debajo de 10³ copias/ml se asocian a un curso clínico más estable.

5.2. Infección asintomática o crónica

Con la resolución de la enfermedad aguda, muchos individuos entran en un periodo asintomático de **duración variable** (con un promedio de 9 años) que se caracteriza por niveles bajos de antígenos HIV-1 en la sangre periférica y relativamente pocas manifestaciones clínicas; sin embargo, se sabe ahora que la latencia clínica no significa una latencia viral. Los niveles plasmáticos de RNA HIV-1 se encuentran en el rango 10³-10⁶ copias/ml (Fig. 15). Sin embargo, los títulos de virus infecciosos son varios órdenes de magnitud menores, indicando que muchos de los virus plasmáticos son defectivos, deteriorados o neutralizados.

La frecuencia de células T CD4+ circulantes que contienen DNA de HIV-1 se estima que se encuentra entre 1 en 1000 a 1 en 100.000 células en individuos asintomáticos, mientras que en pacientes con SIDA, la frecuencia puede alcanzar con facilidad 1 en 100 células. Además, en la fase crónica se estima que en la mayoría de los linfocitos T infectados el virus se encuentra en forma latente, y sólo se produce una replicación activa del virus en el 1% de los linfocitos T-CD4+ infectados.

El tratamiento de individuos infectados con fármacos anti-HIV durante esta etapa produce una reducción drástica en la cantidad de virus libre en la circulación y un aumento en el número de células T CD4+. Mediante extrapolación a partir de estos cambios de viremia, se ha estimado que más de 10⁹ viriones son producidos y retirados de la circulación por día en una persona infectada.

Se estima que alrededor de 10⁸ linfocitos T-CD4+ son destruidos diariamente por el HIV. Para mantener el número de células T CD4+ circulantes, el sistema inmunitario debe responder reponiendo la población de células CD4+, lo que conduce a un recambio rápido y constante de células y virus. El hecho de que la mayoría de los pacientes asintomáticos mantengan contajes bastante estables de células T CD4+ durante periodos prolongados ante una replicación tan extensiva del virus refleja la elasticidad del sistema inmunitario para proveer nuevas células CD4+. Aunque este balance puede ser mantenido durante muchos años, se produce al final una pérdida progresiva de células T CD4+ con el consiguiente deterioro de la función inmunitaria.

5.3. Progresión a la enfermedad sistémica

Cuando el nivel de células T CD4 cae por debajo de 200 células por milímetro cúbico de sangre, se dice entonces que la persona tiene el SIDA, la enfermedad. Téngase en cuenta que en personas normales existen alrededor de 1000 células T CD4+ por microlitro de sangre (Fig. 15).

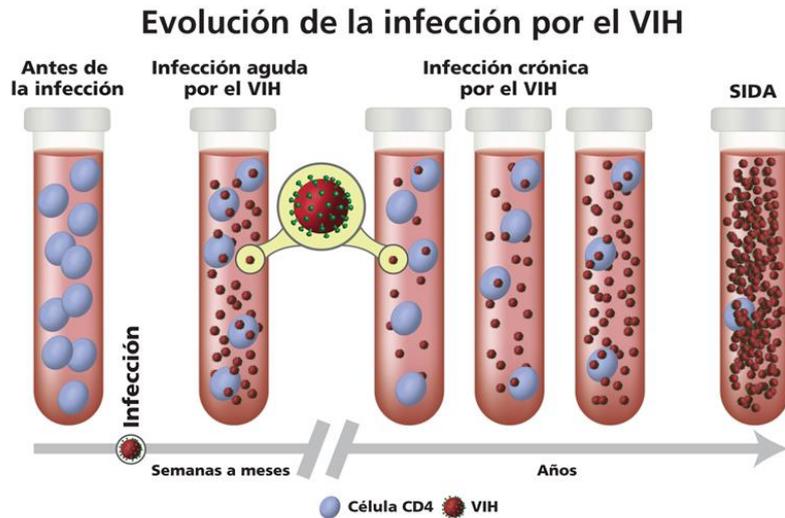


Figura 15. Cantidad de Linfocitos T CD4+ y partículas virales de VIH presentes en cada una de las fases de la infección: Antes de la infección, infección aguda, infección crónica y la fase final, SIDA.

La bajada en los contajes de células T CD4+, acompañada por frecuentes infecciones oportunistas y desarrollo de tumores, es generalmente signo del desarrollo del SIDA. En algunos pacientes, los contajes de células T CD4+ declinan gradualmente a lo largo de la infección, mientras que otros experimentan una caída brusca después de un periodo de relativa estabilidad.

Análisis longitudinales demuestran que los niveles de virus presentes en la sangre periférica aumentan antes del comienzo del SIDA, indicando que la carga viral está directamente relacionada con el deterioro inmunológico y clínico del paciente.

La diversidad dentro del genoma viral aumenta a través de la infección, alcanzando un "plateau" en el momento de una depleción significativa de las células T CD4+. Incluso durante la infección clínica asintomática, los pacientes pueden albergar hasta un millón de variantes genéticamente distintas. Estudios filogenéticos muestran que a través del curso de la infección, aparecen oleadas de nuevas cuasiespecies virales, sólo para ser eliminadas y reemplazadas por poblaciones nuevas. Es probable que la progresión de la enfermedad esté unida a la emergencia de variantes con incrementada virulencia o, alternativamente, variantes que pueden escapar a la detección del sistema inmunitario.

Además de la depleción de células T CD4+, los individuos infectados por HIV-1 exhiben defectos en otros apartados del sistema inmunitario. Las células B aisladas de pacientes con SIDA están a menudo en un estado de activación crónica que conduce a una hipergammaglobulinemia y producción de elevadas cantidades de autoanticuerpos; la actividad citotóxica de las células NK ("natural killer") está disminuida; la actividad de las APC ("antigen-presenting cells") está deteriorada o es aberrante.

Los perfiles de citoquinas también se encuentran alterados, se observan niveles aumentados de IL-6 y TNF- α en el plasma de pacientes con SIDA. Estas citoquinas se ha visto que estimulan la expresión de HIV-1 *in vitro* y pueden actuar aumentando la expresión del virus en células infectadas al tiempo que modulan la activación de otras células inmunitarias.

A pesar de la bajada en los números de células T CD4+, los contajes de linfocitos T CD8+ aumentan con el progreso de la enfermedad. Sin embargo, la ausencia de ayuda de las células T CD4+ hace que la actividad citotóxica específica de HIV-1 mediada por células T CD8+ esté a menudo reducida o ausente en pacientes de SIDA.

5.4. Resistentes de larga duración.

Cuando la epidemia ya ha cumplido su tercera década, un pequeño número de individuos infectados con HIV-1 han sido identificados que se mantienen clínica e inmunológicamente sanos a pesar de infecciones de 20 años y más. Estos individuos, denominados **sobrevivientes de larga duración** o **“supresores de elite”** (“elite suppressors”), y que son capaces de controlar la replicación del HIV-1 sin tratamiento, son el foco de considerables esfuerzos de investigación encaminados a elucidar los factores del hospedador y virales que pueden contribuir a la atenuación de la progresión de la enfermedad.

La carga viral en estos individuos es considerablemente más baja que la encontrada en pacientes que progresan hacia el SIDA. Esto puede ser debido en parte a la presencia de una respuesta inmunitaria anti-HIV particularmente vigorosa, incluyendo anticuerpos neutralizantes y una potente actividad antiviral por parte de las células T CD8+.

Las cepas HIV-1 aisladas de estos pacientes a menudo se replican pobremente en cultivo, lo que sugiere que estos individuos pueden haber sido infectados por una cepa debilitada o atenuada del virus.

Así, es probable que la **combinación de un virus debilitado acoplado con una respuesta inmunitaria fuerte** altere el balance entre el virus y el hospedador en una forma que al final favorezca al hospedador.

6. Los receptores de quimioquinas y la infección por HIV-1

La noción de que un correceptor era necesario para la entrada de HIV-1 se dedujo del hecho de que la expresión de CD4 no era suficiente para explicar el tropismo de HIV-1 *in vitro*. Dos datos experimentales condujeron a esta conclusión.

Por un lado, una serie de experimentos utilizando la proteína CD4 humana, indicaron que este receptor permitía la infección (fusión y entrada) mediada por Env, pero sólo cuando era expresada en algunos tipos de células humanas. En estos experimentos la principal evidencia de que CD4 es el receptor del VIH era que anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor CD4, prevenían la infección por el VIH-1 *in vitro*. Posteriormente se comprobó que la transfección del gen humano del receptor CD4 a células también humanas que no expresaban este receptor, les confería susceptibilidad a la infección por el VIH-1. Sin embargo, se reconoció que la transfección de CD4 en otros tipos de cultivos de células humanas no generaba susceptibilidad a la infección, lo que hacía pensar a los investigadores en la posibilidad de la existencia de otras moléculas involucradas en la infección como correceptores del VIH. Aunque no se podía descartar la existencia en las células no humanas de un factor inhibidor de la fusión. Finalmente iniciaron la búsqueda de estos cofactores de infección para el VIH, que termina con el descubrimiento en 1996 de los receptores para quimioquinas, como correceptores del VIH.

El segundo fenómeno experimental fue el descubrimiento de distintos tropismos mostrados por diferentes aislados de HIV-1 en relación con el tipo celular de células CD4 humanas. Todas las cepas HIV-1 infectan y se replican en linfocitos T CD4+ primarios, estos se denominan también linfocitos T

colaboradores y son un subgrupo de linfocitos que tienen un papel muy importante en establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmunitario. Sin embargo, algunos aislados infectan eficientemente a líneas celulares T CD4+ pero pobremente a macrófagos primarios. Estos virus se denominaron trópicos de línea celular T (TCL-trópicos). Otras cepas HIV-1 mostraron una preferencia opuesta, infectaban macrófagos primarios más eficientemente que líneas celulares T; éstos se denominaron M-trópicos.

Después se vio que este tropismo *in vitro* tiene implicaciones importantes en la transmisión y patogénesis del HIV-1. Así, los aislados obtenidos de sangre periférica de individuos recientemente infectados o durante la fase asintomática son predominantemente M-trópicos; mientras que cuando la infección progresa a SIDA, son los virus TCL-trópicos los que se aíslan con más frecuencia.

Así, a mitad de los años 90, quedó claro que la clave del tropismo y entrada del HIV-1 estaría en la identificación de moléculas correceptoras, y que el tropismo es importante en el desarrollo de la enfermedad.

6.1. Identificación de los correceptores

El primer correceptor HIV-1 fue identificado empleando una genoteca de cDNA humana, para transfectar una línea de ratón que expresaba CD4 de humanos, aislando el clon de cDNA que confería a estas células la capacidad de ser infectadas (realmente lo que se analizó fue la capacidad de formar sincitios con células que expresaban la proteína producto del gen *Env*). El análisis de secuencia de este clon indicó que codificaba para un miembro de la superfamilia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G (Fig. 16) Esta proteína, denominada “fusina” funcionaba (daba la capacidad de infección) con cepas HIV-1 TCL-trópicas, pero no con las M-trópicas. Así, “fusina” cumplía los criterios para ser considerado el **correceptor de las cepas HIV-1 TCL-trópicas**.

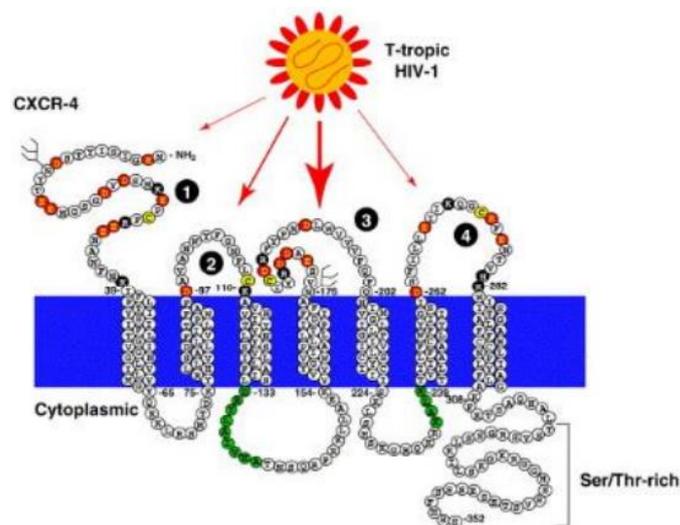


Figura 16. Secuencia primaria y topología de membrana de CXCR4. Se destacan ciertos residuos de los dominios extracelulares, incluyendo cisteínas (amarillo), residuos ácidos (rojo), residuos básicos (negro) y sitios modificables por N-glicosilación (estructuras ramificadas). Dominios implicados en la unión de proteínas G se muestran en verde. Fuente: Horuk (1999).

Entre los miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G se encuentran los receptores de quimioquinas. Las quimioquinas son pequeñas proteínas (70-90 aminoácidos) con actividad quimiotáctica para leucocitos; son secretadas por diversas células del sistema inmunitario y

desempeñan papeles fundamentales en la activación de leucocitos y su movilización hacia los sitios de inflamación.

Existen dos clases mayoritarias de quimioquinas en humanos y que se denominan de acuerdo con la estructura de los motivos de cisteínas del extremo N-terminal. Así, están las **quimioquinas CXC** (en las que las dos primeras cisteínas están separadas por un aminoácido) y las **quimioquinas CC** (en las que las dos primeras cisteínas están adyacentes).

Pronto se encontró que la “fusina” es receptor para quimioquinas CXC tales como SDF-1 α y SDF-1 β y fue renombrada como **receptor de quimioquinas CXCR4** (cuarto receptor para quimioquinas CXC).

Por otro lado, Cocchi et al. en 1995 encontraron que ciertas quimioquinas CC (tales como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β) producidas por LT CD8+ eran potentes inhibidores de la infección de cepas HIV-1 M-trópicas pero no de las TCL-trópicas. Esto llevó a la caracterización del receptor de quimioquinas responsable de este efecto que se designó como CCR5 (el quinto receptor para quimioquinas tipo CC). Por tanto, **CCR5** se consideró como el **correceptor de las cepas HIV-1 M-trópicas**. Este receptor de quimioquinas también pertenece a la superfamilia de 7 dominios transmembrana acopladas a proteínas G. Su estructura molecular de alta resolución se ha obtenido mediante el uso de un inhibidor de la entrada del HIV-1 llamado Maraviroc (Fig. 17), que tiene un sitio de unión en CCR5 distinto de los sitios de reconocimiento principales propuestos para las quimiocinas y la glicoproteína viral gp120, lo que proporciona información sobre el mecanismo de inhibición alostérica de la señalización de quimiocinas y la entrada viral.

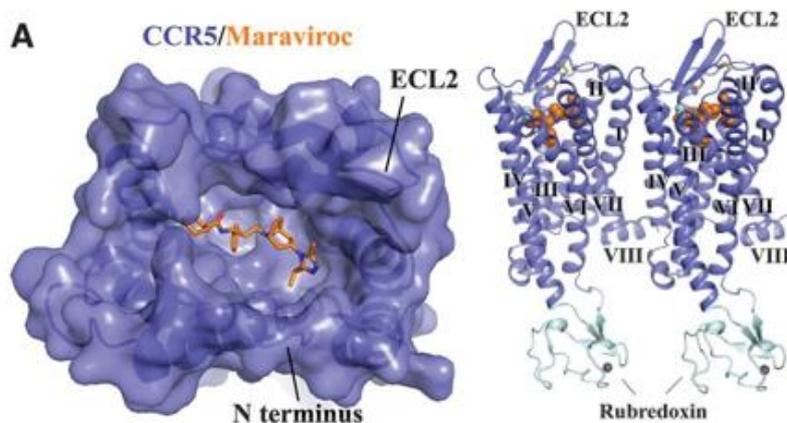


Figura 17. La estructura del CCR5 unido a un inhibidor de entrada del HIV-1 llamado Maraviroc (naranja) sugiere que este compuesto actúa como un inhibidor no competitivo al unirse a una región del CCR5 que es distinta del sitio de unión al HIV-1 y quimioquinas. A la derecha se muestra la estructura de dos receptores CCR5 cristalizada con rubredoxina. Imagen obtenida de Tan et al (2013), modificada.

Los principales correceptores del HIV-1 son CCR5 y CXCR4, pero también existen otros como CCR2 en monocitos, células T y B, y basófilos, CCR3 en eosinófilos, microglías, basófilos, timocitos y células endoteliales, y CCR8 en macrófagos, que son usados tanto por el SIV como por el VIH-1. Aunque el significado in vivo de estos correceptores alternativos no está en claro, es posible que el uso de receptores distintos a CCR5 y CXCR4 puedan tener cierta importancia en la patogénesis viral. Por ejemplo, el CCR3 es expresado en la microglía, y el uso de este receptor puede correlacionar con el neurotropismo de una cepa dada. Un desafío importante en este campo será el uso de estos receptores adicionales para comprender mejor la patogénesis viral.

6.2. Modelo para explicar el tropismo de HIV-1

En la figura 18 se muestra el modelo más sencillo para explicar el tropismo del virus HIV-1.

- Las **cepas TCL-trópicas** o **cepas X4** utilizan el correceptor CXCR4.
- Las **cepas M-trópicas** o **cepas R5** prefieren el correceptor CCR5.
- Existen otras cepas, denominadas de **tropismo dual** o **cepas R5X4**, que pueden utilizar ambos correceptores. Los virus con tropismo dual se consideran un paso intermedio en la evolución de las cepas M-trópicas hacia las TCL-trópicas.

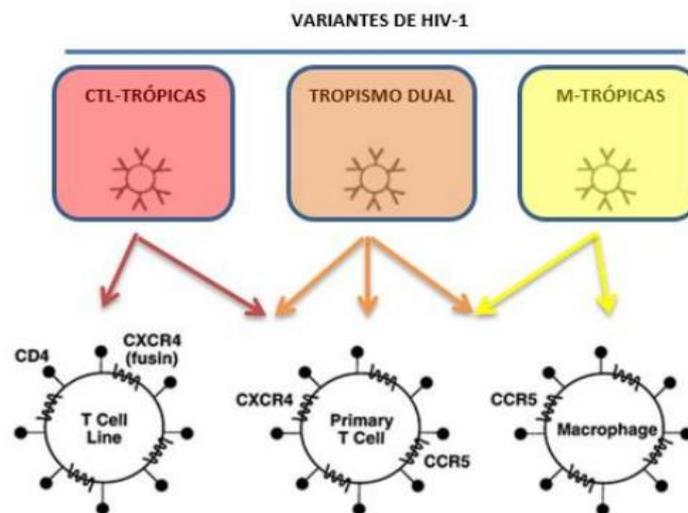


Figura 18. Modelo de funcionamiento del co-receptor del HIV-1 y su tropismo. Fuente: Adaptación de Berger et al. (1999).

Por otro lado, las líneas celulares T expresan CXCR4, de manera que pueden ser infectadas por cepas TCL-trópicas, los macrófagos primarios expresan CCR5, por lo que pueden ser infectados por cepas M-trópicas, y las células T primarias expresan ambos correceptores (CXCR4 y CCR5), de forma que pueden ser infectadas tanto por cepas TCL-trópicas como por M-trópicas.

6.3. Mecanismo de la fusión y entrada de HIV-1 mediada por los correceptores

La entrada de HIV es un proceso complejo (Fig. 19). La primera etapa es la unión de la molécula CD4 a la gp120, que es la subunidad proteica que se encuentra en la superficie del virus. CD4 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en la membrana de monocitos, macrófagos, algunas subseries de linfocitos T y en células dendríticas. El sitio de unión a CD4 implica a regiones conservadas y carentes de carbohidratos de gp120. Esta unión induce cambios conformacionales grandes en gp120 que conducen a la exposición en superficie de sitios de unión al correceptor de alta afinidad. Como consecuencia de este cambio quedan expuestos en la **superficie los lazos V1/V2 y V3**, responsables de la interacción con el correceptor.

La unión entonces del correceptor a la gp120 produce nuevos cambios conformacionales que conducen a la activación de gp41 a su estado activo en fusión. Estos cambios conformacionales conllevan la inserción del péptido de fusión de gp41 en la membrana de la célula blanco y la formación de un estado intermedio en el que gp41 está unida simultáneamente a la membrana celular y a la del virus. Una vez que se produce la inserción del péptido de fusión, las **regiones HR1 y HR2** de gp41 experimentan un reordenamiento por el que terminan plegadas una sobre la otra. Este reordenamiento estructural aproxima la región transmembrana de la gp41, que está embebida en la membrana viral, al péptido de

fusión, que está insertado en la membrana celular. Esta yuxtaposición conduce a la formación de un **poro de fusión**, lo que permite a la cápsida viral entrar en la célula.

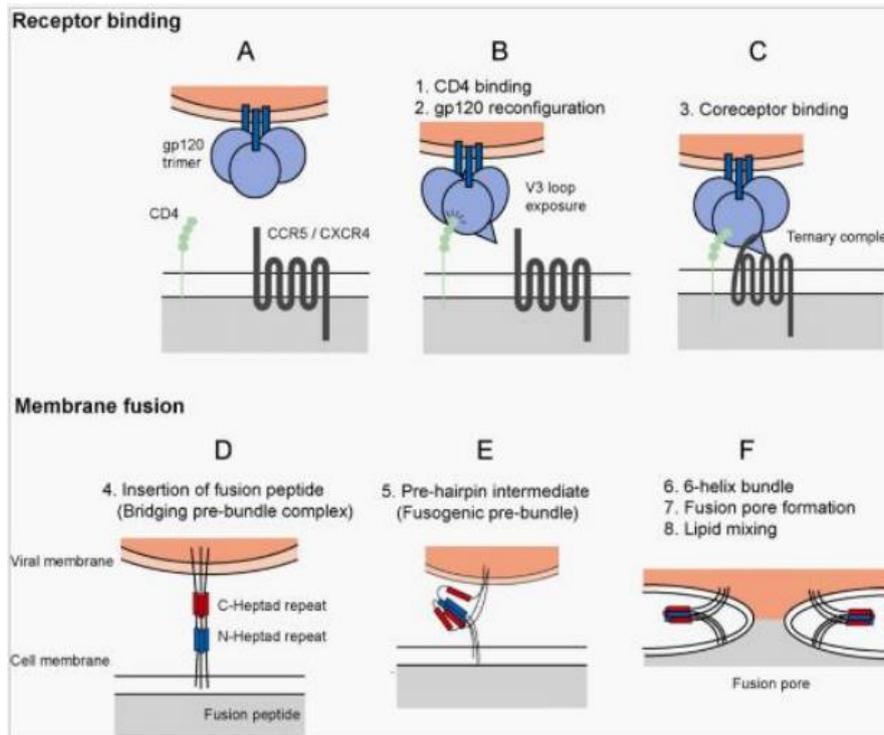


Figura 19. Modelo de unión a receptor y fusión de membranas del HIV-1. Fuente: Lobritz et al. (2010)

Esta estrategia de interacción con el receptor en dos etapas permite al HIV-1 el mantener la superficie de unión al correceptor, que está muy conservada, en una conformación críptica, quedando sólo expuesta tras la interacción de gp120 con CD4.

En el mecanismo de entrada del virus mediada por correceptores, el loop V3 de gp120 determina el tropismo viral, ya que la presencia de residuos básicos y sitios de N-glicosilación en V3 guarda relación con el tropismo X4 o R5. Esto se vio en un experimento de Xiang et al. 2014, en el que el cambio de los residuos 302, 325 y 326 en la base del loop V3, impedía la interacción de gp120 con el externo N-terminal de CCR5, y tenía un papel menos importante en el uso de CXCR4. Además, residuos en la superficie de V3 y la longitud y geometría espacial del bucle V3 son importantes para la unión eficaz de CCR5, siendo por tanto el conjunto de estos cambios importantes para el tropismo (Fig. 20).

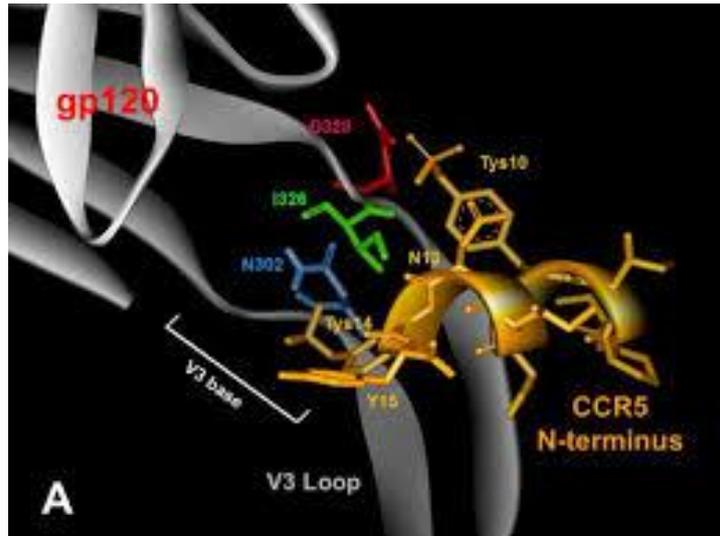


Figura 20. Interacción entre gp12 y CCR5, que muestra que para el tropismo R5, son necesarios los residuos 302, 325 y 326 en la base V3, además los residuos en la superficie V3 y la longitud y orientación del bucle V3 son importantes. Figura obtenida de Xiang et al. (2014).

6.4. Los correceptores y la enfermedad causada por el HIV-1

Las variantes M-trópicas se encuentran tras la infección y durante todas las etapas de la enfermedad, mientras que las cepas TCL-trópicas y duales se detectan en las etapas próximas al inicio de la enfermedad (Fig. 21). Estos resultados sugieren que el correceptor CCR5 va a ser importante para la transmisión viral mientras que el CXCR4 va a ser importante en las etapas de progresión a enfermedad.

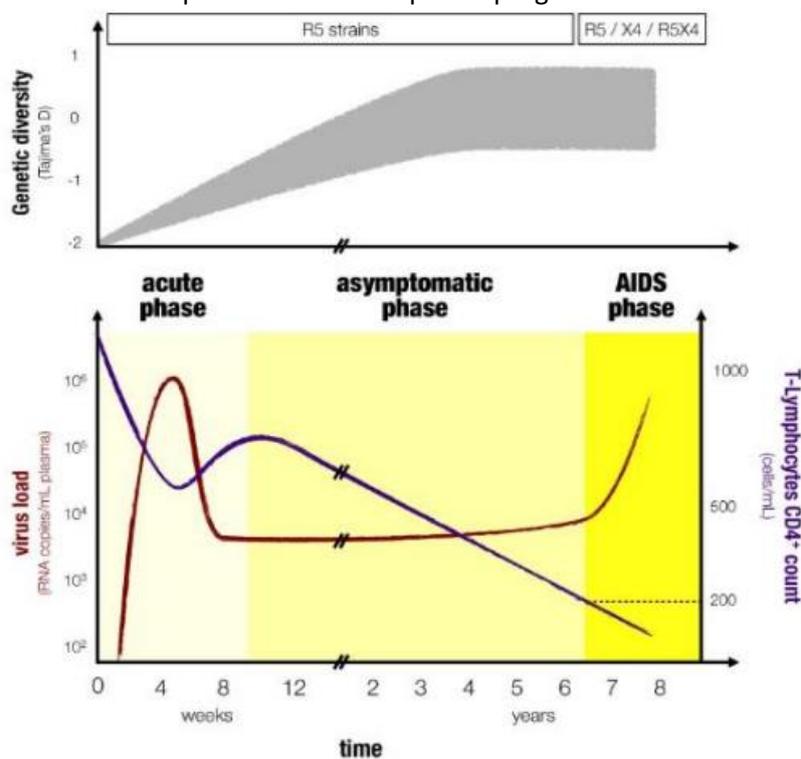


Figura 21. Curso típico de una infección por HIV-1. El panel superior muestra la diversidad genética de las cepas R5 o X4 a lo largo de las distintas etapas de la infección. El panel inferior muestra la dinámica de la infección del HIV-1. Fuente: Alizon y Magnus (2012).

Un problema importante es la relación entre el uso de correceptores y la depleción de células T CD4+ que ocurre durante la enfermedad (Fig. 21). Se ha visto que las cepas R5X4 y X4 son generalmente más citopáticas *in vitro* que las cepas R5, sugiriendo la posibilidad de que el uso de CXCR4 puede contribuir, de forma directa o indirecta, a la muerte de la célula blanco. Esto concuerda con que el correceptor CCR5 podría ser importante para la transmisión viral, ya que para que el virus se transmita de una célula a otra las células deben estar vivas.

En la transmisión por vía sexual, la primera diana del virus es el sistema linfoide difuso asociado a mucosas. Además del CD4, los linfocitos situados en los nichos linfoides de la submucosa presentan el correceptor CCR5 en la superficie. Por el contrario, CXCR4, el otro correceptor viral, no se expresa en la membrana ya que las células dendríticas y de Langerhans producen su ligando, la quimioquina SDF-1, que induce la endocitosis del receptor CXCR4. Esta expresión diferencial de los correceptores del HIV explicaría la baja transmisibilidad de las variantes X4 y la selección de cepas con tropismo R5 en los estadios iniciales de la infección.

La evidencia fundamental de que el correceptor CCR5 es importante para la transmisión viene del descubrimiento en la población humana de un alelo CCR5 mutante, denominado **CCR5 Δ 32**, y su asociación a la resistencia a la infección por HIV-1. El gen CCR5 Δ 32 tiene una delección de 32 pares de bases en la región codificante del segundo lazo extracelular que produce un cambio de fase y una parada prematura. La proteína truncada no se expresa en la superficie celular.

Esta mutación fue descubierta por aparecer en homocigosis en dos homosexuales de alto riesgo (llamados fenotipo EU ("exposed-uninfected")) que permanecían no infectados. Estudios posteriores, indicaron la existencia de una elevada frecuencia de esta mutación entre individuos EU, mientras que homocigotos CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32 no se encontraron entre miles de individuos infectados que fueron analizados.

Finalmente, experimentos *in vitro* demostraron una absoluta correlación con los datos de población: los linfocitos de sangre periférica de homocigotos CCR5 Δ 32/ CCR5 Δ 32 son susceptibles a la infección por virus X4, pero completamente resistentes a la infección por virus R5.

Aunque los heterocigotos CCR5 Δ 32 no son resistentes a la infección por HIV, la progresión a enfermedad es mucho más lenta, posiblemente como una consecuencia de unos niveles reducidos de expresión de CCR5.

Una cuestión interesante está en relación con el origen de la mutación CCR5 Δ 32. Esta mutación es muy común entre las poblaciones Caucásicas, se encuentra con menores frecuencias en el Oriente Medio e India, y sólo aparece esporádicamente entre Africanos, Amerindios y Asiáticos. Así entre los caucásicos, esta mutación se encuentra en homocigosis en aproximadamente el 1% de la población y en torno al 20% en heterocigosis.

Análisis de haplotipos indicaron que el alelo CCR5 Δ 32 se ha originado bastante recientemente, hace unos 700 años en el norte de Europa. El que esta mutación se extendiera rápidamente sólo se explica porque confiriera una clara ventaja frente a un factor de selección, posiblemente una epidemia catastrófica. Basado en el tiempo y en el lugar de la fijación de esta mutación, se ha sugerido a la peste bubónica como el factor más plausible de esta selección.

No obstante, cabe mencionar en este punto, que también se han descrito otros individuos EU que no tienen el genotipo CCR5 Δ 32. En algunos individuos se ha encontrado una asociación entre el fenotipo EU

(tanto en homosexuales como hemofílicos) y unos niveles elevados de quimioquinas CC endógenas (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES).

6.5. Señalización a través de los correceptores inducida por el virus

La señalización a través de los receptores de quimioquinas está acoplada a distintas vías que median la migración celular, la activación transcripcional y el crecimiento y diferenciación celular (Fig. 22).

Diversos datos experimentales han puesto de manifiesto que al igual que las quimioquinas (SDF-1 y RANTES), las cubiertas de virus T- y M-trópicos inducen fosforilación de tirosinas en la proteína tirosín-quinasa Pyk2. Estos datos indican que la unión de la cubierta del virus a los correceptores CXCR4 y CCR5 no solo media la entrada sino que también activa múltiples cascadas de señalización intracelular, un proceso que mimetiza la señalización por las quimioquinas. Así, se ha visto que la unión de gp120 de HIV-1 a CCR5 o CXCR4 dispara la activación de Pyk2, PI3K, Akt, Erk-1/2, y la activación del factor de despolimerización de actina, cofilina (Fig. 23).

Además, se ha demostrado que la señalización a través de los correceptores de quimioquinas es una función independiente, no necesariamente ligada a los procesos de entrada y replicación del virus.

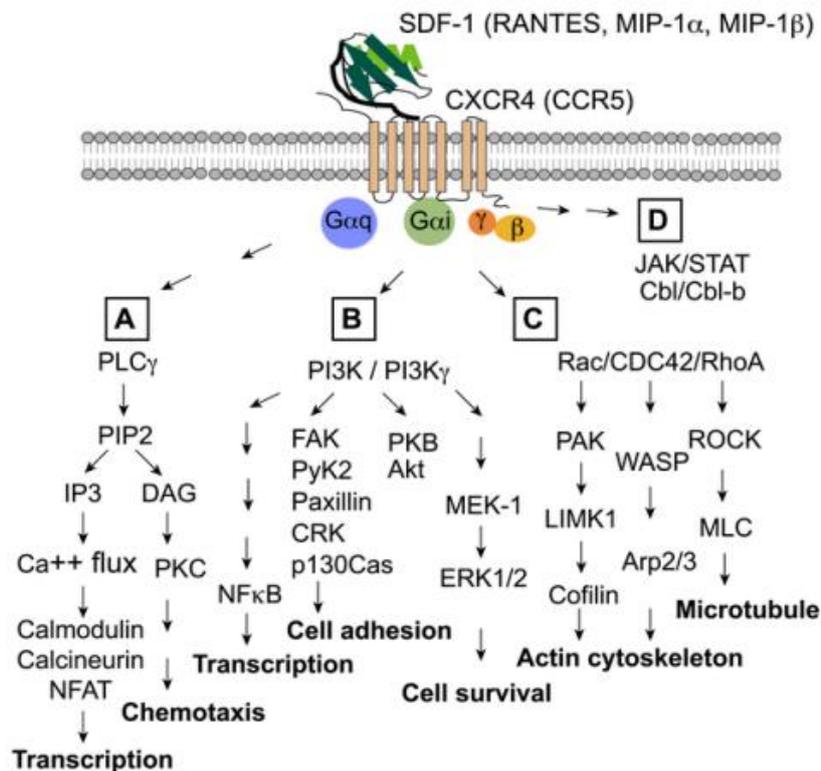


Figura 22. Vía de señalización del receptor de quimioquinas CXCR4. A) Vía de señalización de PLCY que desemboca en la activación de la transcripción y la quimiotaxis. B) Vía de señalización de PI3K/PI3KY que desemboca en una activación de la transcripción, aumento de la adhesión celular y de la supervivencia celular. C) Vía de Rac/CDC42/RhoA, que desemboca en una modificación del citoesqueleto de actina y en una remodelación de los microtúbulos. D) Vía de señalización de JAK/STAT. Fuente: Wu y Yoder (2009).

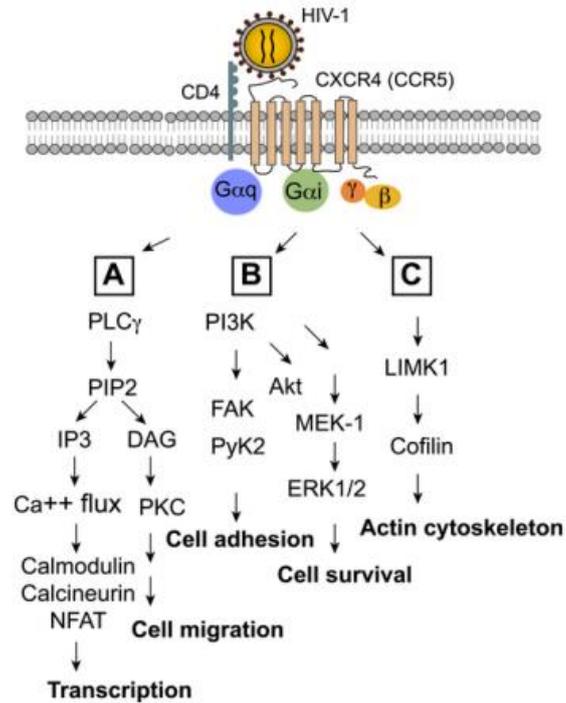


Figura 23. Componentes de la vía de señalización del co-receptor de quimioquinas (CXCR4 o CCR5) al interactuar con gp120 de la superficie del HIV-1. A) Vía de señalización de PLC γ que activa la transcripción y la migración celular. B) Vía de señalización de PI3K, que activa la adhesión y supervivencia celular. C) Vía de señalización de LIMK1, que desemboca en una remodelación del citoesqueleto de actina. Fuente: Wu y Yoder (2009).

7. Efectos del virus sobre el sistema inmunitario

La principal ruta de transmisión del virus es durante las relaciones sexuales. Mucha información sobre los primeros eventos en el proceso de infección se ha obtenido de estudios en macacos con el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV). Así, las primeras células infectadas que se detectan son las células T CD4 de memoria que expresan CCR5, el correceptor para el virus. Una semana post-infección, el virus se detecta en los nódulos linfáticos, a donde parece ser transportado a través del sistema linfoide difuso por células dendríticas (DC) y células de Langerhans, células muy abundantes en los epitelios, punto de entrada del virus. Una masiva producción de los virus se va a producir en los nódulos linfáticos drenantes cuando las células T entran en contacto con las DC, resultando simultáneamente activadas e infectadas. En este momento, el virus alcanza el torrente sanguíneo desde donde alcanzará otros sitios, particularmente los tejidos linfáticos asociados al intestino (GALT, "gut-associated lymphoid tissues") donde residen grandes números de células T de memoria. Actualmente se sabe que los primeros y más importantes daños causados por la infección por HIV afectan a los órganos linfoides GALT, Aquí se produce otra gran expansión del virus, aproximadamente el 20% de las células T situadas en los tejidos GALT resultan infectadas y el 80% destruidas de forma colateral como consecuencia de la inducción de procesos apoptóticos (probablemente mediados por el Fas ligando). De hecho, la depleción de células T CD4⁺ en los GALT es mucho más acusada que la imagen derivada del análisis de la sangre periférica (Fig. 24).

Además, los linfocitos T CD4⁺ de la mucosa intestinal expresan el correceptor CCR5, luego esto concuerda con que la infección primaria se dé por cepas R5-tropicas, y que este sea uno de los sitios preferidos del virus para establecerse. Cabe destacar la función de los CD8⁺ que producen una alta destrucción de

células T de memoria CD4+ en estas GALT como consecuencia de la detección del virus, citoquinas muy activas que se ven en estos momentos en la zona entérica y en el plasma serían TNF α , IFN α , IL15 o IL18, que correlacionan con una situación de gran inflamación (Fig. 24).

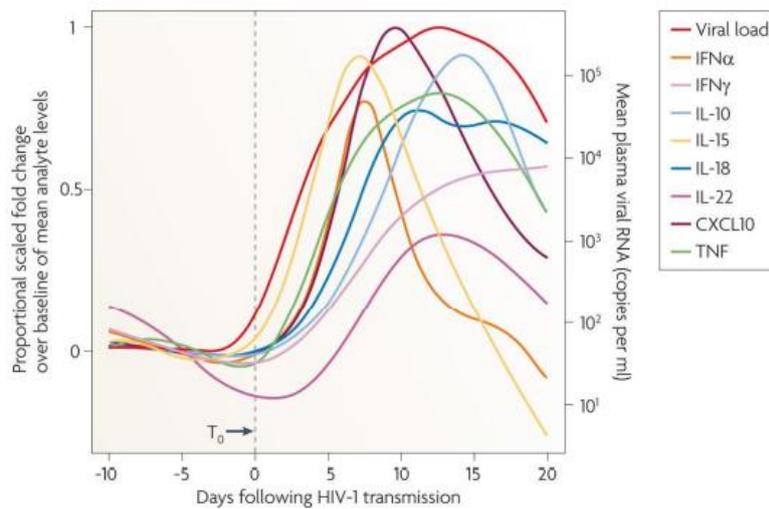


Figura 24. Cinética de ciertas citoquinas durante la infección aguda de VIH. Se observa una primera oleada con IFN α e IL-15, y una posterior aparición de TNF, IL-10 e IL-18. Fuente: McMichael et al. (2009)

El hecho de que el virus use CD4+ para replicarse es una ventaja en este punto, ya que aparte de infectar aquellas CD4+ a nivel intestinal, todas aquellas T CD4+ circulantes que se desplacen hasta la zona de infección para colaborar con las CD8+ también podrán verse infectadas y aumentar aún más de manera involuntaria la replicación del virus. Sin embargo, el efecto general del sistema inmune acaba siendo más fuerte y la infección consigue controlarse en este punto a pesar de la gran depleción de T CD4+ de la mucosa gastrointestinal.

La Figura 25 muestra la evolución de la pérdida de LT CD4+ en el intestino, mientras que las CD8+ prácticamente no varían:

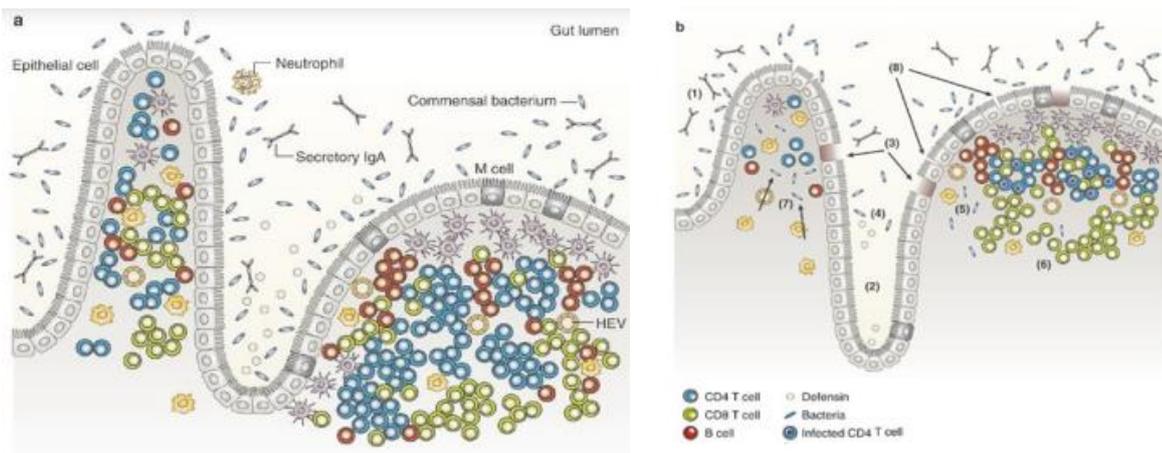


Figura 25. Destrucción del epitelio intestinal y descenso de CD4+ por la acción de VIH. Fuente: Brenchley et al. (2008).

Con la replicación explosiva del HIV-1 en los GALT, la carga viral detectada en la sangre periférica alcanza un pico. Éste pico de viremia se alcanza alrededor del día 21, llegando a niveles de $>10^7$ partículas víricas por ml de plasma. Poco antes de la seroconversión se produce un descenso pronunciado de la viremia (Fig. 26), que se piensa es consecuencia de la aparición de células T CD8+ citotóxicas específicas de HIV. Coincidiendo con el pico de viremia, los linfocitos T CD8 específicos para HIV se expanden hasta suponer el 10% de todas las células T CD8+ circulantes.

Además, otros dos factores contribuyen al descenso de la viremia. Primero, aunque los anticuerpos neutralizantes sólo aparecen varias semanas o meses después, los anticuerpos producidos en este momento, en combinación con factores del sistema inmunitario innato, tales como el complemento, van a ayudar a la opsonización y eliminación del virus. Segundo, la depleción de células T CD4+ CCR5+ en el intestino es tan severa que no hay suficientes nuevas células blanco para que el virus mantenga una viremia tan alta.

Todavía es un enigma cómo el virus HIV-1 va minando continuamente al sistema inmunitario hasta que éste deja de ser suficientemente operativo en su función protectora frente a la infección por patógenos. La mayoría de los virus que infectan a humanos, bien son retirados pronto en las fases agudas o establecen un equilibrio con el sistema inmunitario del hospedador que les permite persistir largo tiempo, pero sin causar daños significativos en el hospedador. Ejemplos de estos últimos son el citomegalovirus (CMV), el virus Epstein-Barr (EBV) o los herpesvirus. En cambio, HIV-1 es extremadamente nocivo y de una forma paulatina termina deteriorando al sistema inmunitario del hospedador. La cuestión por resolver es, por tanto, ¿qué tiene HIV que le hace diferente a la mayoría de los patógenos que infectan a humanos?

Posiblemente la respuesta se encuentra relacionada con sus células blanco, los linfocitos ayudadores Th CD4+. Existen varios tipos de células T CD4+ que, junto a los productos solubles que secretan, regulan las actividades de las células T citotóxicas CD8+, la diferenciación de los linfocitos B y el cambio de isotipo de inmunoglobulina, y la inducción de inmunidad frente a tolerancia. Lógicamente, la depleción de este tipo de células va a tener consecuencias graves en la función inmunitaria. La disminución progresiva de células CD4 es una característica de la infección por HIV-1 y, de hecho, la determinación del número de estas células en sangre se utiliza como indicador del progreso de la infección hacia la enfermedad (SIDA).

Sin embargo, el número de células T CD4+ infectadas por HIV-1 en la sangre durante la fase crónica de la infección es sólo 0,01-0,10%, demasiado bajo como para explicar su eliminación bien por lisis directa o retirada por el sistema inmunitario. Además, las células T CD4+ en la circulación sanguínea representan sólo el 1-2% del total de estas células en el hospedador. Para explicar el declinar de linfocitos T CD4+ se han invocado varios mecanismos patológicos, entre los que cabe destacar la activación de la muerte celular y la pérdida gradual de la capacidad de regenerar linfocitos T (Fig. 26).

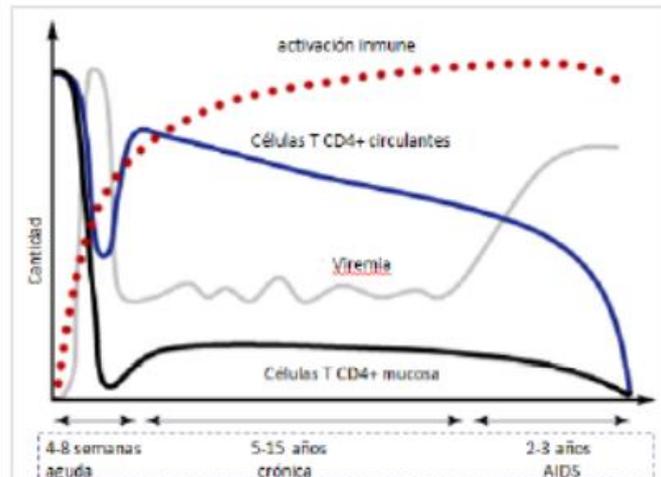


Figura 26. Variación de las poblaciones de linfocitos T CD4+ en el curso de la patogénesis asociada a la infección por HIV1. En el esquema se muestra la evolución y la fuerte depleción de los linfocitos T CD4+ asociados a la mucosa intestinal (línea negra) en relación a la evolución de los linfocitos T CD4+ circulantes (línea azul) y la evolución de la viremia (línea gris). La línea de puntos rojos muestra el nivel de activación del sistema inmunitario en el curso de la infección. Fuente: Forsman and Weiss (2008).

A continuación, se detallan los mecanismos (Fig. 27) que provocan la destrucción de CD4+ que antes se comentaban.

- Los mecanismos que gobiernan la fusión de las membranas celulares, viral y del hospedador, también gobiernan la fusión entre células infectadas que expresan la gp120 sobre su superficie y las células T CD4+ no infectadas. La fusión de células infectadas y no infectadas conduce a la formación de células gigantes multinucleadas de vida corta llamadas **sincitios**. Aunque los sincitios se forman reproduciblemente *in vitro* y las células infectadas normalmente mueren en pocos días, no es claro si éste representa el mecanismo primario para la depleción de linfocitos CD4+ observada *in vivo*.
- Otros mecanismos han sido también implicados en la depleción de linfocitos T CD4+, entre los que se incluye la **citotoxicidad** sobre las células infectadas ejercida por los linfocitos T CD8+ específicos de HIV-1. Otro mecanismo es la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos de las células infectadas o de células no infectadas que tienen unida la proteína gp120 al receptor CD4.
- La gp120 está implicada también en inducir apoptosis de células T CD4+ a través de la **vía Fas-FasL**.
- Por otro lado, estudios recientes implican al **IFN- α** en la depleción de células T CD4+ a través del siguiente mecanismo. La presencia de IFN- α induce la expresión de las formas solubles, y asociada a membrana, de TRAIL (“TNF-related apoptosis-inducing ligand”) por las células T CD4+. Paralelamente, el virus HIV-1 induce la expresión del receptor de la muerte DR5 sobre las células T CD4+. La interacción de TRAIL con DR5 induce la apoptosis selectiva de células T CD4+ pero no de linfocitos T CD8+.

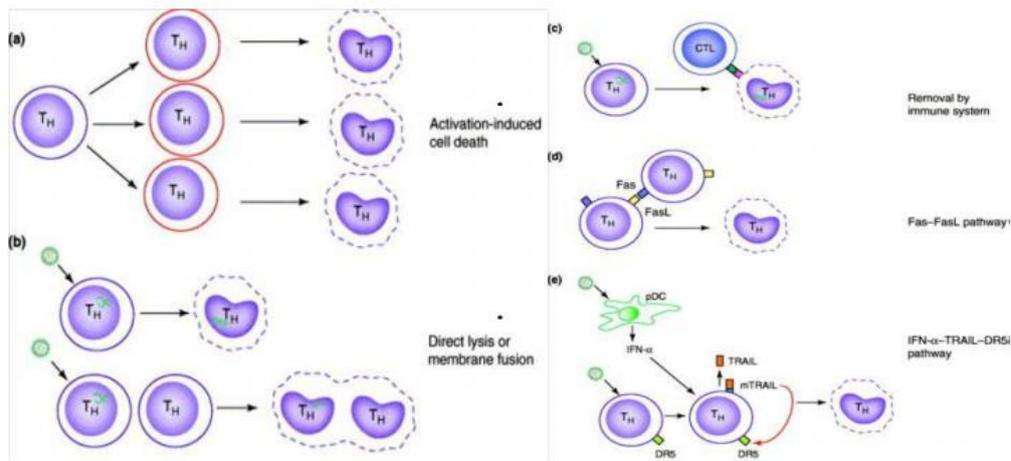


Figura 27.

- a) Efecto natural de la respuesta inmunitaria, cuando se activan los linfocitos y empiezan a proliferar. El SI a continuación desencadena un proceso homeostático, el exceso de linfocitos es destruido. No es propio del HIV, pero hay que tenerlo en cuenta.
 - b) El virus infecta los linfocitos Th, expresa en su membrana gp120; la cual es reconocida por otro linfocito que interacciona con su receptor CD4+, interpretando que se trata de un virus. Se fusionan ambas membranas y tenemos células multinucleadas, sincitios. Las células infectadas son células gigantes que han resultado de la fusión de linfocitos infectados con linfocitos sanos.
 - c) La propia defensa: un linfocito infectado es blanco de los linfocitos CTL; pero además desencadena, debido a la presencia de gp120 en su membrana, la respuesta mediada por anticuerpos ADCC.
 - d) La gp120 y las partículas subvirales pueden desencadenar procesos apoptóticos por medio de la vía Fas-FasL, produciendo la muerte de linfocitos Th.
 - e) Otra vía apoptótica es la mediada por TRAIL. Cuando una célula dendrítica interacciona con el HIV por medio de los TLR produce IFN- α . Este factor conduce a la expresión de los linfocitos Th de la proteína TRAIL tanto solubles como unidos a la membrana. Los componentes del virus también producen la expresión del receptor de TRAIL (DR5), que interacciona con el ligando TRAIL. Como consecuencia de esta interacción se desencadena también la apoptosis.
- Fuente: Hel et al. (2006).

Para confirmar que TRAIL y FasL, entre otras, participan, la Figura 28 muestra sus valores relativos en los días posteriores a la infección, se observa que tanto TRAIL como FasL son altos en el intervalo entre 10-30 días lo cual cuadra con que en apenas 3-4 semanas las T CD4+ de la mucosa intestinal desaparezcan.

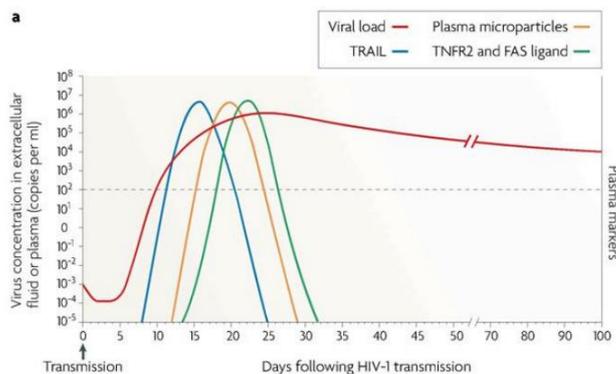


Figura 28. Se observan los picos de expresión de distintas moléculas como TRAIL y FasL durante la infección aguda por VIH. También se muestra la cantidad de virus y la aparición de micropartículas apoptóticas en plasma. Fuente: McMichael et al. (2009)

7.1. Efectos sobre las células dendríticas

Por otro lado, las **células dendríticas (DC)** se ven reducidas durante la infección aguda con VIH. Las DC infectadas por VIH tienen una expresión menor de IL-12, lo cual concuerda con que durante la fase aguda se vean bajos niveles de dicha citoquina. De manera más concreta, el virus fuerza a las DC plasmacitoides (pDC) a generar IFN α , lo cual parece contraproducente pues es una molécula supuestamente antiviral, pero en realidad este IFN α es fundamental para desencadenar la muerte de LT CD4⁺ y generar ciertas moléculas que modulan el SI y que ayudarán de forma indirecta a la supervivencia del virus. Además, estas pDC y las DC convencionales también, generan como efecto del virus y de este IFN α una molécula denominada indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que induce el cambio de T CD4⁺ de las denominadas Th17 a T reguladoras que suprimirán el efecto del SI sobre el VIH (Fig. 29).

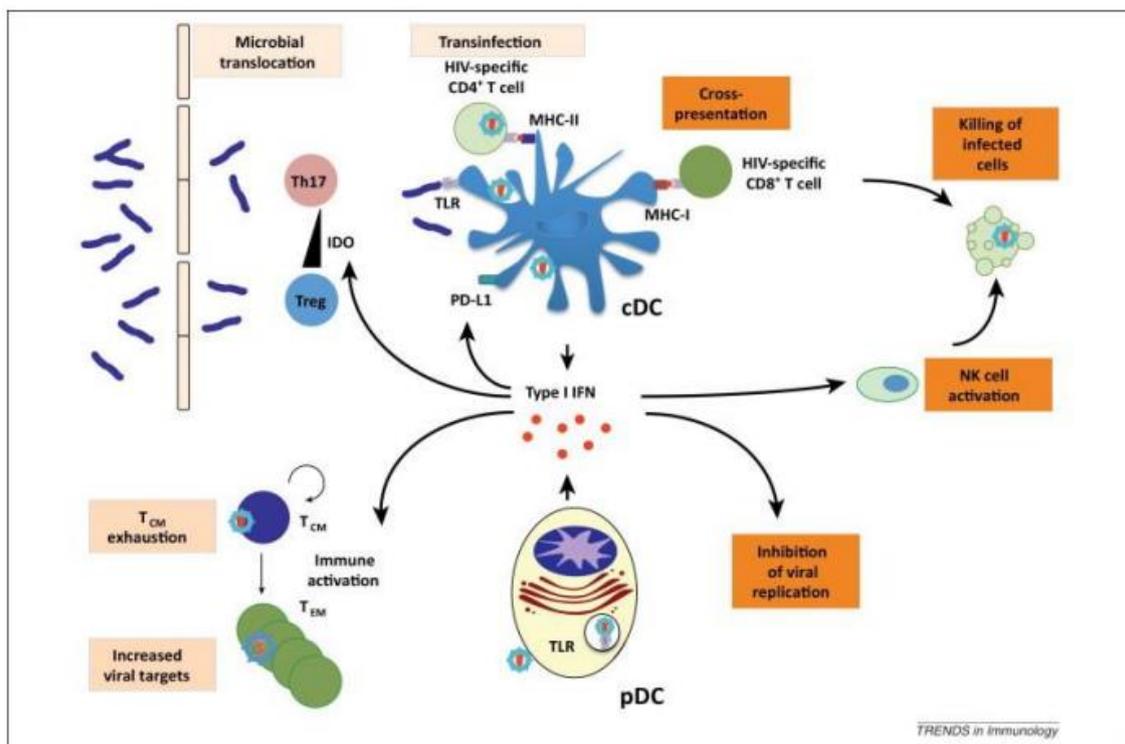


Figura 29. Acciones desencadenadas desde las DC por efectos del VIH, destacando la producción de IFN α , y posteriormente de IDO como consecuencia de la aparición del primero. Fuente: Manches et al. (2014).

7.2. Efectos sobre las células NK

El papel de las células NK es fundamental en la respuesta del SI innato ante la infección por el VIH-1 (Fig. 30). Sin embargo, en los individuos susceptibles al VIH-1 y en aquellos que progresan rápidamente a SIDA, el virus altera la frecuencia y la función de las células NK, llevando a una baja respuesta antiviral, evidenciada por la baja producción de moléculas citotóxicas y citoquinas, como IFN γ e IL-12, afectando a su interacción con las DC, y facilitando la replicación viral. En los casos en los que las células NK responden de una manera efectiva, se observa una baja susceptibilidad a la infección (individuos HESN) o un control de la replicación viral a largo plazo (individuos LTNP y controladores). Dicha respuesta antiviral incluye la producción de citoquinas/quimioquinas y moléculas efectoras, como las perforinas y granzimas, así como una interacción efectiva con las células dendríticas, favoreciendo el establecimiento de una respuesta inmunitaria adaptativa que potencie los mecanismos de las células NK, como en el caso de la ADCC (citotoxicidad celular mediada por anticuerpos)

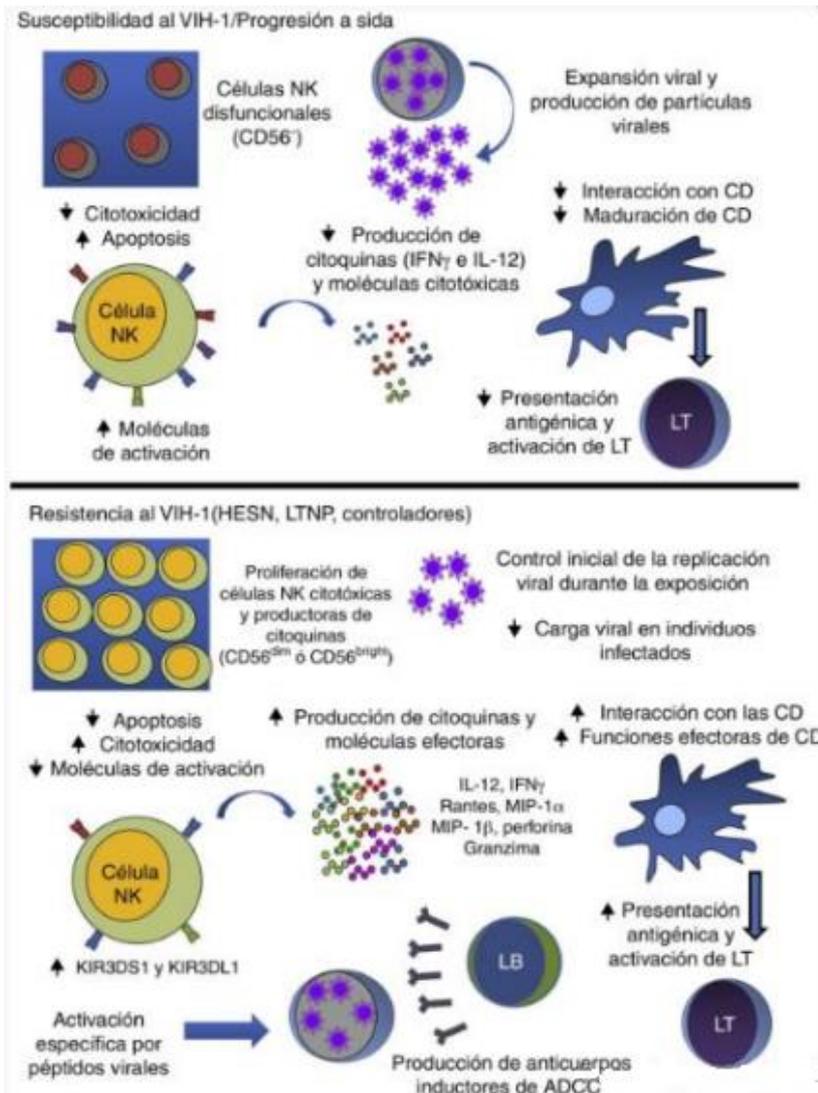


Figura 30. Papel de las células NK durante la infección por el VIH-1 y estrategias diseñadas por el virus para evitar la aparición de los ligandos de las NK en la superficie de las células infectadas, disminuyendo la acción del SI innato Fuente: Taborda et al. (2014).

Según ciertos estudios recientes se postula que las células NK podrían contribuir al mantenimiento de la estructura y la función del GALT, y de esta manera reducir los efectos producidos por las alteraciones en este tejido durante la infección por el VIH-1.

7.3. Efectos sobre los linfocitos B

Otro dato interesante es un efecto final que tiene el VIH sobre los linfocitos B naives. Se ha observado que a su paso por los ganglios linfáticos el VIH es capaz de eliminar linfocitos B foliculares y producir una apoptosis masiva de linfocitos B que conduce a la muerte del 50% de las células de los centros germinales en los primeros 80 días tras la infección. Dependiendo de la severidad de este efecto del virus sobre los linfocitos B, el tiempo de seroconversión y aparición de anticuerpos adecuados contra el VIH varía de unas personas a otras. Otra acción asociada al VIH sobre los linfocitos B sería la aparición de nuevas subpoblaciones de linfocitos B (LB), como LB exhaustos, LB inmaduros o plasmablastos (Fig. 31). Asu vez, disminuyen otras poblaciones destacadas como los LB de memoria.

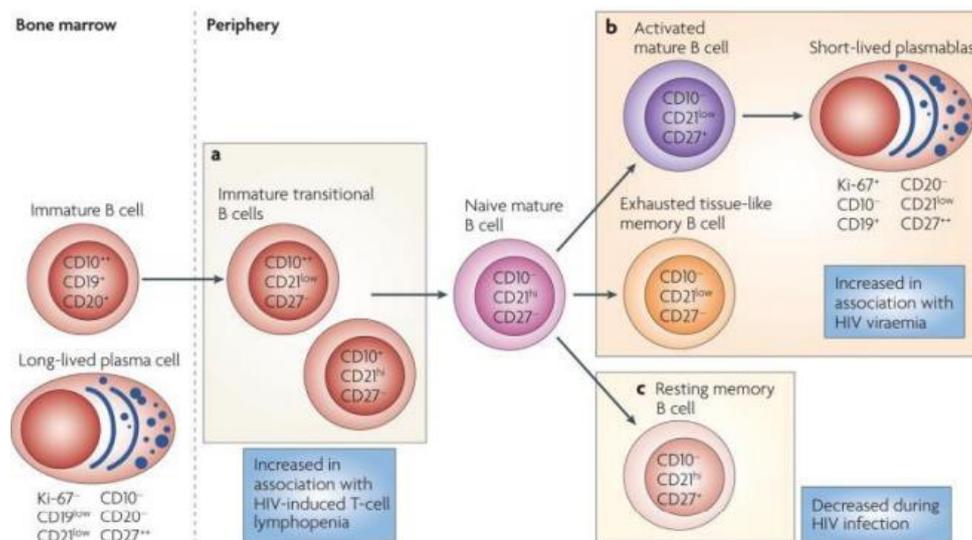


Figura 31. Diferentes subpoblaciones de LB que se ven incrementadas/disminuidas durante las infecciones por VIH. Fuente: Moir et al. (2009).

En resumen, la casi completa eliminación de células T CD4⁺ de memoria (que expresan CCR5) en los tejidos linfoides de las mucosas durante la etapa inicial de la infección por HIV-1 va a interferir con las importantes funciones, reguladoras y efectoras, que estas células tienen para el control de las respuestas inmunitarias frente a antígenos y patógenos. La retirada de células T CD4⁺ de memoria de los tejidos de las mucosas es compensada en parte por la producción aumentada y migración de linfocitos T CD4⁺ de vida corta; sin embargo, este mecanismo compensatorio del timo puede dejar de funcionar de forma eficaz. Por otro lado, en ausencia de la ayuda de linfocitos T CD4⁺, las respuestas de células T CD8⁺ y anticuerpos frente a las nuevas variantes del HIV-1 son débiles y retrasadas, lo que resulta en una multiplicación aumentada del virus.

8. Diagnóstico

Los costes económicos, sociales y psicológicos de diagnósticos falso-positivos y falso-negativos para la infección HIV han empujado a los investigadores y fabricantes a desarrollar tests de diagnóstico de excepcionalmente alta sensibilidad y especificidad.

Además, el progresivo aumento del número de pacientes infectados con el HIV desde el comienzo de la epidemia en los años 80 hasta el día de hoy ha llevado consigo un cambio con respecto a los métodos diagnósticos utilizados en los primeros casos de SIDA y los de hoy en día. No solo este hecho, sino que además el hecho de que esta enfermedad se haya convertido en una patología crónica gracias a nuevos tratamientos antirretrovirales condiciona una gran demanda asistencial en los laboratorios de microbiología de los hospitales por ser el punto de entrada de pacientes infectados a la cascada de tratamiento. Se puede decir por tanto que las pruebas de HIV no son un método estático y los avances tecnológicos han permitido nuevas estrategias de mayor sensibilidad y especificidad. Un ejemplo claro de esto es la evolución del aislamiento del virus como método de referencia a la utilización del Western Blot (WB), más específico y sensible.

Desde los primeros momentos se utilizó la carga viral y el conteo de linfocitos T CD4 como marcador de inmunodeficiencia. La **determinación de la carga viral del HIV-1** se hace en muestras de sangre seca en

papel de filtro, pudiendo cuantificarse el ARN en pares de muestras plasma-sangre. El **contaje de linfocitos T CD4+** adquirió mayor importancia a partir de 1993 debido a la nueva clasificación para los pacientes infectados de HIV donde se incluía la clínica del paciente y las cifras de CD4+. Tiene un mayor valor pronóstico y además predictivo debido a que fue demostrado que cifras por debajo de 200/mm³ hacían al paciente vulnerable a numerosas enfermedades oportunistas. Este test se usa para guiar la iniciación de la terapia ART en pacientes y monitorizar la respuesta al tratamiento.

El diagnóstico de la infección con HIV se hace principalmente mediante la detección de antígeno o anticuerpo con tests serológicos, mediante el aislamiento del virus o por detección de secuencias de nucleótidos virales (Fig. 32).

En la figura 32 se muestra el momento posinfección en el que los métodos de diagnóstico utilizados pueden resultar positivos. Un concepto frecuentemente utilizado en el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas es lo se conoce como '**período ventana**', que hace referencia al intervalo de tiempo que existe entre la infección y la aparición de anticuerpos o seroconversión (fase aguda de la infección). En el caso de la infección por HIV, este período de aproximadamente 20 días puede ser evidenciado, en ausencia de anticuerpos específicos, por la detección de ARN viral a los 10 días por PCR, ADN pro-viral integrado en el genoma celular o el antígeno p24 como buen marcador de infección aguda de HIV. A medida que aumentan los anticuerpos disminuye la viremia y desaparece el antígeno p24.

El diagnóstico de la infección aguda por el HIV es muy importante por varias razones:

- **Epidemiológicas:** la infección aguda es el periodo con mayores tasas de transmisión, por lo que diagnosticar la infección en esta etapa permite conocer el patrón de crecimiento de la epidemia y la tasa de transmisión de cepas resistentes a los antirretrovirales
- **Inmunopatológico:** oportunidad para estudiar los mecanismos virológicos, inmunológicos y genéticos implicados en la transmisión y patogenia de esta enfermedad
- **Terapéutico:** el inicio del tratamiento antirretroviral en esta fase podría modificar la historia natural de esta infección

Por eso, individuos con alto riesgo de presentar síntomas en la fase aguda de la infección deberían hacerse tests adicionales como la amplificación de ácidos nucleicos o la captura de la proteína viral p24, además del test serológico.

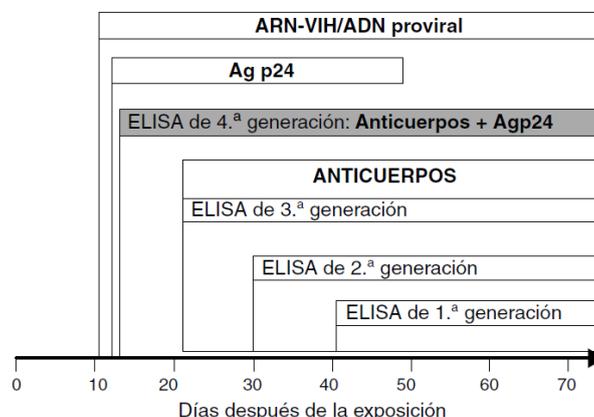


Figura 32. Tiempo de aparición de marcadores específicos de infección HIV. Imagen obtenida de *García et al (2011)*.

8.1. Algoritmo diagnóstico de infección de HIV

El algoritmo de diagnóstico de HIV recomienda usar tres técnicas de distinto principio antigénico de forma secuencial para considerar un resultado positivo (Fig. 33):

1. Test serológico 1: **ELISA**.
 - Resultado negativo: no requiere test confirmatorio ni seguimiento, excepto en personas con riesgo de infección
 - Resultado positivo: se usa un segundo ensayo.
2. Test serológico 2: **Western Blot** como procedimiento confirmatorio obligado
3. Detección del **genoma**

Se suele recomendar un inmunoensayo combinatorio de antígeno/anticuerpo (Ag/Ab) seguido de un ensayo de diferenciación HIV-1 y HIV-2 confirmatorio si es positivo.

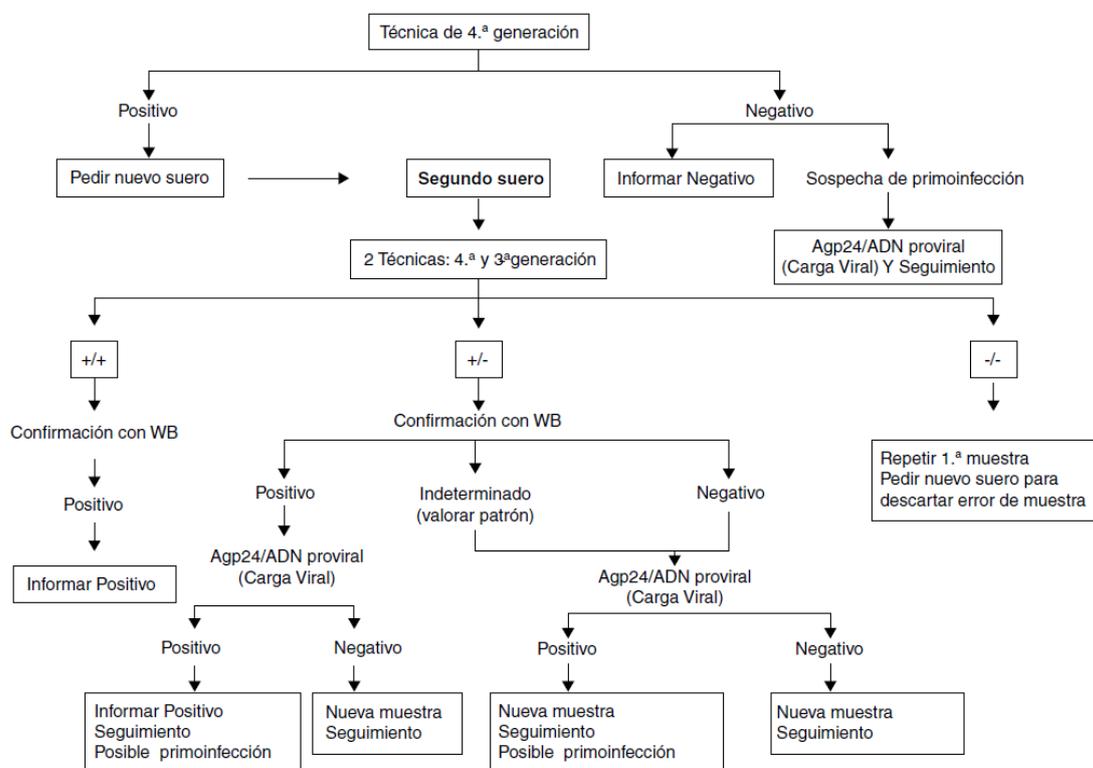


Figura 33. Algoritmo de diagnóstico de HIV. Obtenido de *García et al (2011)*.

8.2. Tests serológicos

El diagnóstico serológico es un proceso de dos etapas: los sueros que dan una reacción positiva en un ensayo inicial son vueltos a analizar para excluir la posibilidad de un error de laboratorio; los sueros que son repetidamente reactivos son entonces analizados mediante un ensayo confirmatorio para verificar que los anticuerpos reactivos están directamente dirigidos frente a antígenos HIV. A continuación se describen los tests serológicos empleados.

Determinación de anticuerpos mediante ensayos ELISA

De forma habitual, el diagnóstico de infección se realiza detectando la presencia de anticuerpos específicos, ya que estos se encuentran en el suero de prácticamente el 100% de las personas infectadas. De acuerdo al modo de producir los antígenos para los ELISAs de HIV-1 o HIV-2 se pueden preparar a partir de lisados de líneas de células T humanas infectadas con HIV, proteínas recombinantes producidas en sistemas de expresión bacterianos o levaduras, o péptidos sintéticos, pudiendo dar lugar a resultados falso-positivos o falso-negativos.

- I. Las primeras metodologías se desarrollaron en 1985, **ELISA de primera generación** que usaba como base antigénica un lisado celular de la célula infectada por el virus, lo que permitía que los anticuerpos frente al HIV se unieran a los antígenos inmovilizados y los anticuerpos ligados se podían identificar mediante IgG humana conjugada con enzimas. De este modo se lograba detectar la presencia de anticuerpos a los 40 días de la infección (Fig. 17). Este examen sin embargo tenía baja especificidad por las impurezas de la preparación y el inconveniente de que se obtenía una elevada tasa de falsos positivos.

En este tipo de ensayos donde se utilizan lisados virales pueden aparecer reacciones falso-positivas debido a la reactividad de anticuerpos dirigidos frente a antígeno de leucocitos humanos (HLA) que son expresados por las líneas celulares linfoides utilizadas para preparar los lisados virales. Tales anticuerpos se encuentran con frecuencia en mujeres con varios partos, quienes son expuestas a proteína HLA extrañas de las células fetales y en individuos que han sufrido múltiples transfusiones sanguíneas.

- II. En 1987 se introdujeron las metodologías **ELISA de segunda generación**, que incorporan como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos en vez de utilizar lisados de las células, obteniendo una mayor sensibilidad. Estas metodologías permiten, además, detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a los grupos M (y subtipos), N y O, y frente a VIH-2. También permiten acortar el tiempo de detección a unos 33-35 días posinfección.

Los ensayos de segunda generación que emplean antígenos HIV recombinantes o sintéticos pueden solventar el problema de los anticuerpos anti-HLA, pero la reacción cruzada con proteínas contaminantes de bacterias o levaduras pueden ser una causa alternativa de reacciones falso-positivas.

Ensayos basados en antígenos de la cubierta recombinantes o sintéticos pueden fallar en la detección de anticuerpos del grupo O de HIV que es altamente divergente, o entre los distintos subtipos del grupo M, que también presentan muchas diferencias de secuencia.

- III. A partir de 1994, los ensayos **ELISA de tercera generación** permiten determinar la clase de anticuerpos, IgG e IgM, frente a HIV-1 y HIV-2 presentes en el suero y utilizan la técnica "sándwich" (intercalado) usando antígenos del HIV emparejados con enzimas, aprovechando la naturaleza bivalente o multivalente de los anticuerpos, mejorando la especificidad. Permiten acortar el período ventana a unos 22 días.
- IV. Se han introducido técnicas **ELISA de cuarta generación** en las que se detectan simultáneamente anticuerpos y el antígeno p24 de HIV-1 y HIV-2, con un periodo ventana de 13-15 días. Estos ensayos permitieron obtener resultados en solo 30 minutos y facilitaron el screening de sangre

de los bancos. Sin embargo, el antígeno p24 y los anticuerpos de HIV-1/2 detectados no se pueden distinguir individualmente.

- V. En último lugar se habla ya de **ELISA de quinta generación** donde usan conjuntos múltiples de perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos monoclonales anti-p24 y epítopos específicos para HIV-1 (grupos M, N, O) y HIV-2. De este modo, personas infectadas con p24 en el periodo ventana pueden ser identificadas en un único test y pueden ser tratadas de forma temprana para prevenir la transmisión viral.

Con estas técnicas la sensibilidad se sitúa alrededor del 99,8%, lo que hace muy improbable el obtener un resultado falso negativo. Por esta razón, un resultado negativo no requiere confirmación ni seguimiento serológico, excepto en personas con alto riesgo de adquirir la infección, ya que se pueden producir falsos negativos en fases iniciales.

Ensayo de detección de antígeno.

Dado que existen altos niveles de antígeno p24 en el suero de pacientes infectados en la fase aguda durante el intervalo previo a la seroconversión, el ensayo de antígeno p24 puede ser útil en el diagnóstico de la **infección primaria de HIV-1**. Este ensayo también puede ser útil en el diagnóstico temprano de neonatos infectados con HIV-1.

El antígeno p24 es detectado mediante un ensayo de captura. La sensibilidad de las técnicas actuales es muy alta, pueden llegar a detectar cantidades tan pequeñas como 8 pg/ml, que equivalen a unas 5000-10000 partículas virales. Así, resultados positivos pueden ser detectados en unos 13-15 días tras la infección (Fig. 32).

Después de la seroconversión, el antígeno p24 se acompleja con los anticuerpos anti-p24 y se hace indetectable en la mayoría de los individuos infectados. Por esta razón, el ensayo de antígeno p24 no es un test de diagnóstico útil en individuos asintomáticos con riesgo de infección con HIV-1.

Además, este sistema inmunoenzimático fue perfeccionado empleando la desnaturalización por calor como tratamiento previo a las muestras y la incorporación de un paso de amplificación biotina-tiramina/estreptavidina-peroxidasa para aumentar su sensibilidad. Este aumento de sensibilidad en los sistemas de captura de p24 es de vital importancia como **ensayo complementario**, para **estudios de progresión de la enfermedad** en pacientes infectados por el HIV-1 y para el **monitoreo de la terapia antirretroviral**.

Ensayos confirmatorios: *Western blot*

Incluso con una especificidad del 99.8% para los ensayos ELISA, asumiendo una prevalencia del 0.5% de infección por HIV-1, como ocurre en la población de Estados Unidos, dos resultados falso-positivos se obtendrán por cada cinco individuos infectados identificados. Por esta razón, un **test confirmatorio** que aumente la especificidad como el Western Blot es esencial para excluir los resultados falso-positivos. La inmunotransferencia por Western blot es un método específico para detectar la presencia de reactividad serológica de antígenos virales específicos. Consiste en la separación de las proteínas virales en función de su peso molecular mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida y su transferencia a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se añade el suero del paciente.

Tiene más de un 99% de especificidad y su principal ventaja radica en que define el patrón de bandas de las proteínas virales mayoritarias para las cuales tienen reactividad los anticuerpos de un individuo, de forma que aporta información adicional sobre el **estadio de la infección**. El resultado se considera positivo, si el suero reacciona contra el **antígeno p24** y uno o más anticuerpos de las **glicoproteínas de la envuelta** (gp160/gp120, gp41). El patrón podrá variar dependiendo de la extensión de la glicosilación del antígeno y la maduración del anticuerpo.

En general, el patrón de bandas es complejo y su interpretación requiere personal con experiencia. Para evitar la malinterpretación, actualmente se han desarrollado tiras de nitrocelulosa donde se colocan proteínas recombinantes de HIV-1/2 y péptidos sintéticos purificados correspondientes a los antígenos más inmunorreactivos. Existen además otros métodos confirmatorios como el **inmunoensayo en línea (LIA) o el Geenius cartridge** (Fig. 34).

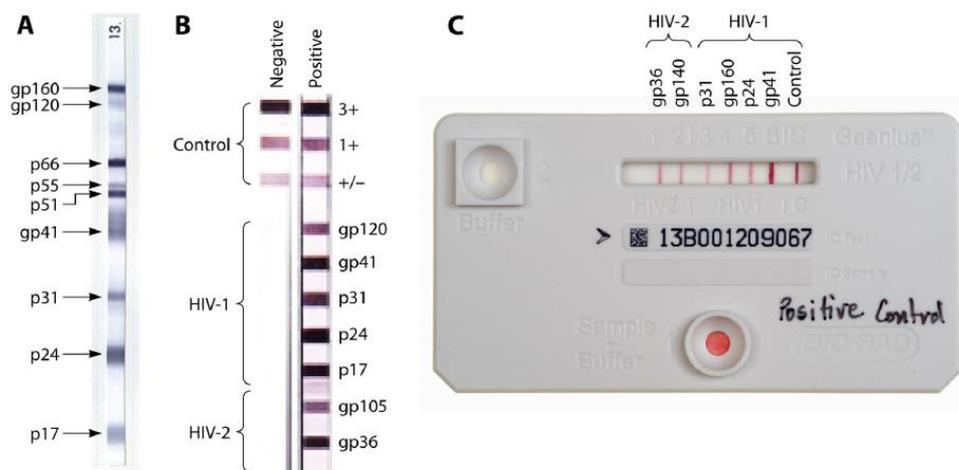


Figura 34. Ilustración de tres ensayos confirmatorios suplementarios. **A)** El *Western Blot* (WB) usa gradientes purificados de lisados virales que dan lugar a antígenos separados en las bandas de nitrocelulosa. **B)** Inmunoensayo en línea (*LIA blot*) usa combinaciones de cinco y dos antígenos sintéticos o recombinantes para HIV-1 y HIV-2, respectivamente. **C)** *Geenius cartridge* con doble plataforma (DPP) usa cuatro y dos antígenos sintéticos y recombinantes para HIV-1 y HIV-2, respectivamente. Se incluyen tres y una banda de control interna en los ensayos de Inno-LIA y Geenius. Obtenida de *Parekh et al. (2018)*.

8.3. Ensayos para secuencias de nucleótidos de HIV

Una evidencia de la infección de HIV-1 puede ser establecida mediante la demostración de la presencia de **DNA HIV-1 proviral** en PBMC o **RNA HIV-1** asociado al virión en el suero o sangre. La mayoría de los ensayos para detectar DNA HIV-1 proviral emplea la PCR para amplificar secuencias conservadas en los genes gag o pol.

Los ensayos para la detección y cuantificación del RNA HIV-1 están basados en la amplificación del "target" (transcripción reversa del RNA HIV-1 a cDNA, seguido por la amplificación por PCR u otros medios) o por amplificación de señal (p. ej., decoración seriada del RNA diana con sondas de oligonucleótidos ramificados).

Aun así, la serología sigue siendo el test primario de elección para el diagnóstico de la infección por HIV, siendo más eficiente el ELISA de tercera generación para la detección de antígenos del HIV-1 en el periodo

de ventana. Además de para el diagnóstico inicial, estas técnicas se emplean para monitorizar la eficacia del tratamiento y la detección de fallos terapéuticos. Actualmente, año 2018, se estima que hay, en todo el mundo, unos 21 millones de personas que están recibiendo tratamiento antirretroviral frente al HIV.

A pesar de la sensibilidad de las técnicas basadas en PCR, su empleo es sólo realizado por **laboratorios especializados**, debido a la posibilidad de aparición de resultados falso-positivos debidos a problemas de contaminaciones. Si bien, ya hay test comerciales que requieren mínimas manipulaciones, con lo que se ha disminuido mucho el riesgo de contaminaciones.

8.4. Diagnóstico rápido de HIV

Existen tests que no necesitan aparatos y pueden ser realizados por individuos entrenados para ello, permitiendo el diagnóstico rápido (20-30 minutos) y a simple vista a partir de una muestra de sangre, plasma o suero. Son la medida ideal para la **asistencia médica primaria**, así como para **aumentar los ratios de tests** y reducir la morbilidad y mortalidad del HIV.

Sin embargo, la sensibilidad oscila entre el 85-99% y la especificidad entre el 93-99%, por lo que suelen darse casos de **falsos negativos** si no hay un nivel alto de anticuerpos o en estadios recientes de infección. Requieren por tanto una confirmación posterior por un ELISA de cuarta generación.

En estos test encontramos ensayos de aglutinación de partículas o eritrocitos, inmunocromatografía capilar o Dot-inmunoensayo.

8.5. Diagnóstico de HIV resistentes a drogas antirretrovirales y determinación del tropismo viral

En los últimos años ha habido una rápida extensión de la terapia ART que ha dado lugar a la emergencia de **HIV resistentes a la terapia antirretroviral**, comprometiendo los programas de tratamiento. Los test serológicos rápidos no son capaces de detectar la fase aguda y algunos individuos que empiezan la ART en fase aguda puede que nunca tengan anticuerpos detectables con estos tests. Por ello, es importante monitorizar y prevenir la emergencia de estas mutaciones para que los pacientes puedan seguir beneficiándose de los medicamentos.

Cultivo de HIV-1

HIV-1 puede ser aislado tras el cultivo del **plasma** o de células mononucleares de la sangre periférica (**PBMC**, "Peripheral Blood Mononuclear Cell"). Un cultivo positivo da una evidencia directa de la infección HIV-1, pero el cultivo del virus es rara vez necesario para establecer el diagnóstico.

La sensibilidad global del cultivo de PBMC es del 95% o mayor en pacientes con cuentas de células T CD4+ menores de 500/mm³, pero la sensibilidad es menor en pacientes con mayores cuentas de células T CD4+. La depleción de células CD8+, que puede inhibir la replicación del virus *in vitro*, antes de cultivar las PBMC puede aumentar la probabilidad de obtener un cultivo positivo en pacientes con fuertes respuestas inmunitarias celulares específicas de HIV.

El valor del aislamiento de virus está principalmente en que permite la subsiguiente investigación de las características genotípicas y fenotípicas del virus tales como la resistencia a drogas. En consonancia con

el diagnóstico por cultivo del virus, existen ensayos fenotípicos y genotípicos para identificar HIV resistentes a drogas.

Ensayos fenotípicos

Se realizan in vitro y miden la **susceptibilidad al fármaco** mediante la concentración de fármaco necesaria para inhibir la replicación viral en cultivos celulares en un 50% (**IC50**).

Los métodos de sensibilidad del virus en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se basan en **aislar el virus** del paciente y cultivarlo con CMSP añadiendo diluciones seriadas de un fármaco. La susceptibilidad se establece en base a la menor concentración del fármaco capaz de suprimir la replicación viral.

Debido a la complejidad de los protocolos de ensayos fenotípicos y la duración requerida para completarlos, se recomienda a personas con patrones complejos de mutaciones de resistencia conocidas o con sospecha de estas. Además han sido desplazados en la actualidad por otros ensayos basados en **modelos de virus recombinantes** que consiguen una mayor rapidez y reproducibilidad en los resultados, aunque siguen sin estar disponibles en los laboratorios de diagnóstico. En ellos se obtiene la secuencia de los genes de la RT y proteasa del plasma de un paciente por RT-PCR y se introducen en un sistema para la producción de un HIV recombinante capaz de infectar una línea celular. Las características de estos ensayos se muestran en la figura 35.

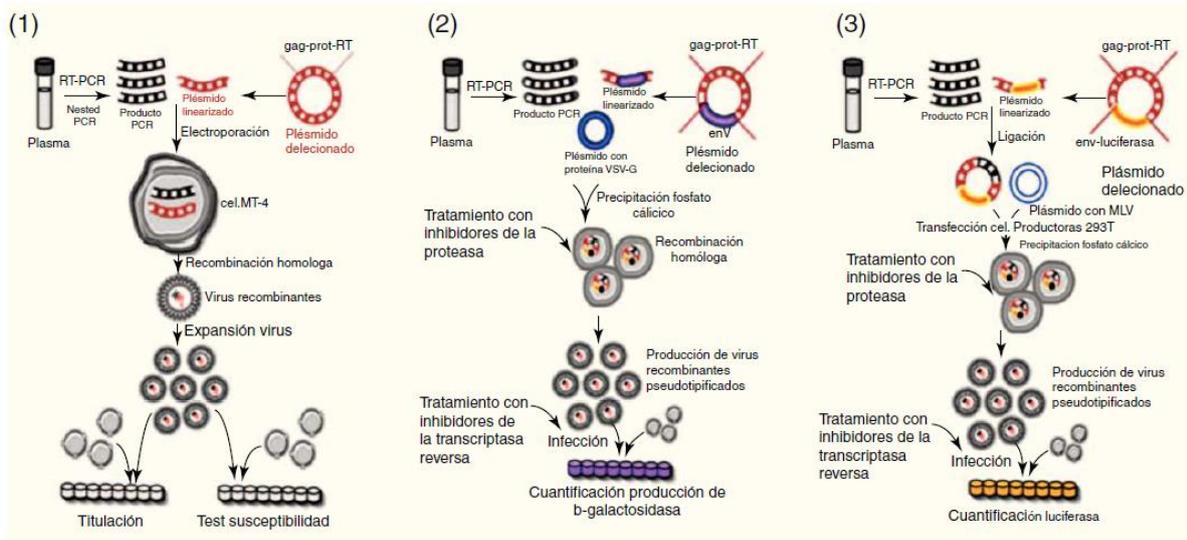


Figura 35. Ensayos de virus recombinantes para la determinación fenotípica de la resistencia a antiretrovirales. Obtenida de *García et al (2011)*.

También pueden ser usados para **detectar el tropismo viral** mediante la generación de virus recombinantes. El gen de la envuelta se amplifica por RT-PCR a partir del plasma y mediante clonaje o recombinación genética se generan virus quiméricos o pseudotipos que portan la envuelta del paciente. Se utilizan para infectar líneas celulares que expresan el receptor CD4 y uno de los dos correceptores, CCR5 o CXCR4. De esta forma se define el tropismo viral conferido a la envuelta del paciente.

Ensayos genotípicos

En primer lugar es necesario extraer el ácido nucleico del plasma del paciente, retrotranscribirlo en ADN y hacer al menos una reacción de amplificación por PCR. Posteriormente requiere la secuenciación poblacional del genoma que codifica para las enzimas proteasa, transcriptasa reversa o integrasa del genoma viral y la identificación de **mutaciones de resistencia** a los distintos tratamientos en estos genes. El procedimiento de lectura se encuentra automatizado mediante electroforesis acoplada a la detección de dideoxi-nucleótidos (terminadores de cadena) fluorescentes. Es el método de elección para guiar la terapia en pacientes con respuestas virológicas subóptimas.

También sirven para **discernir el tropismo del virus** mediante la secuenciación masiva y generación simultánea de centenares de secuencias clonales de virus. No está disponible para el diagnóstico clínico rutinario al ser caro, poco automatizado y la necesidad de un análisis bioinformático intensivo.

Estos dos métodos presentan diferentes ventajas e inconvenientes en la determinación de la resistencia (Tabla 2) y del tropismo viral (Tabla 3).

	Ventajas	Inconvenientes
Genotipo	<ul style="list-style-type: none"> • Rapidez • Dificultad técnica media, realizable en laboratorios hospitalarios • Menor coste económico • La mutación precede a la resistencia fenotípica 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección indirecta de la resistencia • Desconocimiento del efecto de las resistencias cruzadas • Puede no existir correlación con el análisis fenotípico • Carencia de sensibilidad para las variantes menores (<20%) • Requieren la interpretación por un experto • No son válidos para nuevas drogas hasta que se diseñan los algoritmos de interpretación y se validan clínicamente
Fenotipo	<ul style="list-style-type: none"> • Medida directa de la sensibilidad a los distintos antirretrovirales • Proporciona información acerca de las resistencias cruzadas • Reflejan el efecto de todas las mutaciones presentes, incluso aquellas que no han sido descritas • Los resultados son fáciles de interpretar 	<ul style="list-style-type: none"> • No puede realizarse con cargas virales bajas • No detecta subpoblaciones virales que constituyan menos del 10-20% de la población total • No aporta sensibilidad a combinaciones de fármacos • Falta de estandarización en los valores de IC₅₀ de cada fármaco • Disponible únicamente en laboratorios comerciales por su elevada complejidad • Elevado coste y técnica compleja • Posible selección de variantes víricas mejor adaptadas al cultivo celular

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de los ensayos genotípicos y fenotípicos para la determinación de resistencias a los antiretrovirales. Fuente: *García et al (2011)*.

Limitaciones	Fenotipo	Genotipo
Técnicas	<ul style="list-style-type: none"> • La transcripción inversa <i>in vitro</i> tiene una eficiencia no superior al 10% • La eficiencia del proceso de generación del plásmido en el que se inserta la envuelta del paciente es variable. Las técnicas de clonaje son más eficaces que las de recombinación homóloga y más sensible • La generación de virus de ciclo múltiple aumenta la sensibilidad frente a los sistemas de ciclo único, ya que las secuencias minoritarias se amplifican biológicamente en los ciclos de infección-reinfección y pueden ser detectadas con mayor eficacia 	<ul style="list-style-type: none"> • La transcripción inversa <i>in vitro</i> tiene una eficiencia no superior al 10% • Limitada sensibilidad de la secuenciación poblacional para detectar variantes por debajo del 10-20% • Amplificación limitada a la región V3, sin tener en cuenta los determinantes contenidos en V1, V2 y C4
De interpretación	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación del umbral clínico que predice el éxito o el fracaso al tratamiento con antagonistas de CCR5 	<ul style="list-style-type: none"> • Los sistemas de interpretación del tropismo viral están basados en datos pareados genotípico/fenotípico con un número relativamente bajo de secuencias y con escaso número de secuencias de subtipos no-B

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de los ensayos genotípicos y fenotípicos para la determinación del tropismo viral. Fuente: *García et al (2011)*.

8.6. Diagnóstico de HIV-1 en neonatos y niños

La transferencia placentaria de anticuerpos IgG anti-HIV desde las madres infectadas a sus fetos, es un reto especial que resolver en el diagnóstico temprano de HIV-1 en neonatos. Todos los niños nacidos de madres infectadas con HIV-1 son inicialmente **seropositivos para HIV-1**, pero sólo del 15 al 25% de estos niños están infectados con HIV-1, o menos si el parto se hace por cesárea controlada.

Los títulos de la IgG materna decaen en un plazo de 12 a 18 meses. La persistencia de anticuerpos HIV-1 más allá de 18 meses es tomada, por tanto, de valor diagnóstico de la infección del niño. Sin embargo, una identificación más temprana de la infección es esencial para indicar el inicio del tratamiento y así el paciente poderse beneficiar de los tratamientos antirretrovirales y profilácticos. La progresión a SIDA es muy rápida en los niños que han adquirido el virus en el útero o durante el parto. Se estima que si no reciben un tratamiento pronto, el 35% y el 52% de los niños morirán antes de 1 o 2 años, respectivamente.

Por otro lado, el diagnóstico certero y temprano de los niños infectados minimizará la exposición de los niños no infectados a las toxicidades potenciales de estas terapias.

Al contrario que con los anticuerpos IgG, los anticuerpos maternos IgM e IgA no son capaces de atravesar la placenta, y, por tanto, la presencia de **anticuerpos IgM o IgA específicos** de HIV-1 en un niño indicarían que éste está infectado. Desgraciadamente, la detección de estos anticuerpos presenta problemas de sensibilidad y especificidad y actualmente no existen tests disponibles.

Los métodos directos para detectar HIV-1 tales como el **ensayo de antígeno p24 en suero, el cultivo del virus, o el ensayo de PCR del DNA HIV-1** son más sensibles y específicos que los ensayos de anticuerpos

en el diagnóstico de la infección HIV-1 en neonatos. Con estos métodos el diagnóstico del niño puede realizarse en el primer mes de vida, lo que facilitará las decisiones terapéuticas apropiadas.

9. Tratamiento

La infección por HIV provoca una sintomatología asociada a las infecciones causadas por agentes oportunistas que aprovechan el estado de debilidad inmunológica del organismo como consecuencia del ciclo replicativo del HIV. Así, los tratamientos varían según traten las enfermedades oportunistas o la propia infección por HIV.

Debido a su ciclo replicativo, el HIV provoca en humanos una activación permanente de parte del sistema inmune, así como su destrucción progresiva y prolongada, lo que genera un estado de inmunodeficiencia. En este documento nos referiremos a los tratamientos específicos para HIV.

El **tratamiento antirretroviral** tiene como meta inhibir la replicación viral. Procurando retrasar, prevenir y revertir la destrucción inmunológica, evitando así la aparición de enfermedades oportunistas.

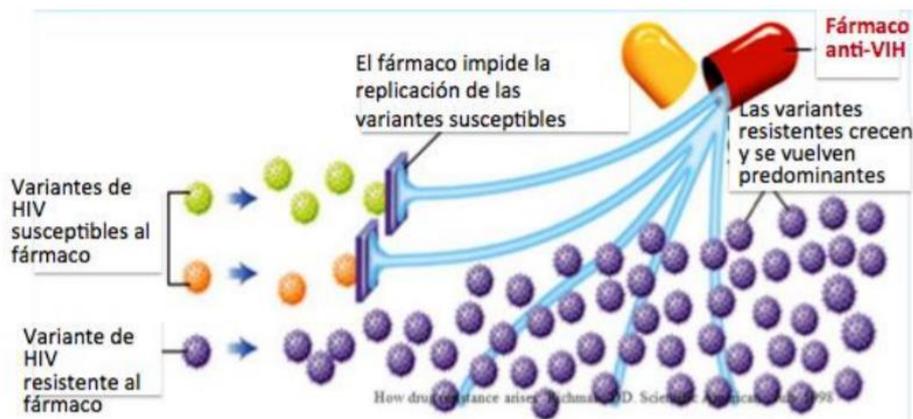


Figura 36. Representación del mecanismo de selección de las variantes resistentes por el fármaco antirretroviral.

Adaptado de: *Scientific American Journal*, (1988).

9.1. Aparición de mutantes. Resistencia a la quimioterapia antirretroviral

La aparición de variantes de HIV viene, en parte, causada por la acción, presión selectiva, que ejercen las drogas antirretrovirales (figura 36). Esta presión, selecciona aquellos mutantes virales resistentes a drogas debido a que son los únicos que se escapan a la acción del fármaco (figura 37). Por lo que pueden replicarse y volver a alcanzar altos niveles de carga viral en los pacientes.

La función que determina la **probabilidad de emergencia de mutantes resistentes** depende de cuatro factores:

1. La frecuencia de mutación viral.
2. La velocidad de replicación del virus.
3. La mutabilidad intrínseca del sitio diana de la droga antiviral.
4. La presión selectiva de la droga antiviral.

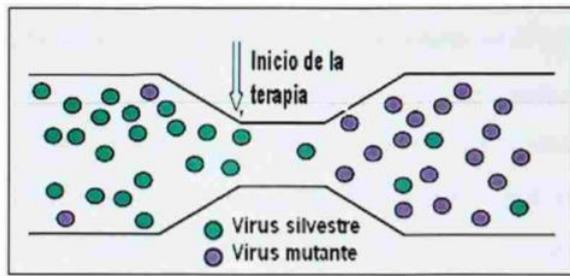


Figura 37. Emergencia de variantes virales.
Fuente: Valle Bahena (2005).

Frecuencia de mutación

El HIV es un virus de RNA de cadena sencilla, que necesita de una retrotranscriptasa (RT) para que tenga lugar la replicación y multiplicación. La acción correctora de errores no está presente en la RT del HIV, lo que conlleva a una elevada **frecuencia de mutación de 3×10^{-5} nucleótido por ciclo de replicación**. Como el genoma del HIV es de 10 kb supone la generación de **una mutación por cada tres genomas virales progenie**.

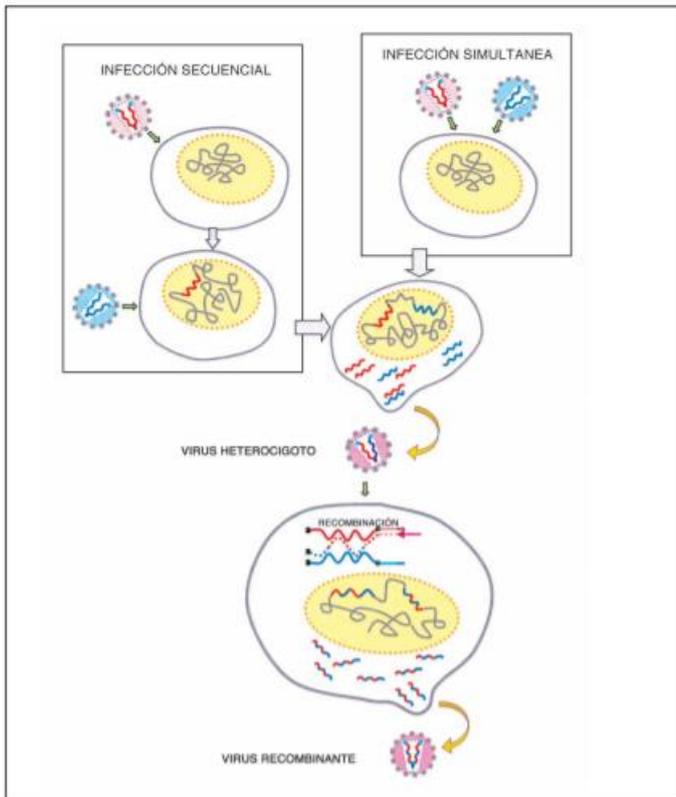


Figura 38. Generación de retrovirus recombinantes. Dos viriones con genomas genéticamente disimilares infectan a una única célula, bien secuencialmente o simultáneamente. Ambos genomas virales son retrotranscritos y los provirus se integran en el cromosoma celular. Heterodímeros de los transcritos genómicos derivados de ambos provirus integrados son empaquetados en partículas virales. En un segundo ciclo de replicación, los virus heterocigotos producen genomas provirales recombinantes mediante saltos alternativos entre los RNA durante la transcripción inversa. Fuente: Nájera Morrondo et al. (2005).

Por otro lado, los **mecanismos de recombinación** son otro factor productor de diversidad. Por lo que, dentro del hospedador, este mecanismo puede suponer una fuerza a considerar en cuanto a la propagación de resistencias a drogas.

La recombinación tiene lugar cuando una célula se infecta doblemente por dos variantes genómicas del virus, produciendo viriones progenie con RNA de ambos virus (Fig. 38). Tiene lugar durante el siguiente ciclo de retrotranscripción reversa en el cual la retrotranscriptasa va cambiando de hebra molde produciendo virus recombinantes. Algunos genomas recombinantes se han estabilizado en la población humana y se han clasificado como **formas recombinantes circulantes (CRFs ``circulating recombinant``)**.

Para que tenga lugar la recombinación hace falta dos características fundamentales de los retrovirus:

- La encapsidación por parejas de dos RNA genómicos (gRNA) distintos. Lo que provoca su proximidad facilitando el cambio de molde durante la retrotranscripción (en HIV-1 no implica ni rotura de cadena ni su posterior unión).
- La propensión a la recombinación del propio mecanismo replicativo del virus, pues se necesitan de dos cambios de molde. La generación de DNA retroviral no es tan sencilla como la copia de RNA sentido en un DNA antisentido seguido de la síntesis de la cadena complementaria.

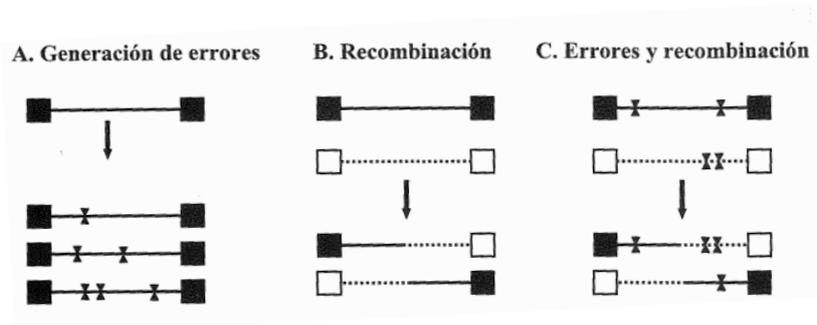


Figura 39. Generación de variabilidad mediante mutaciones puntuales y recombinación.

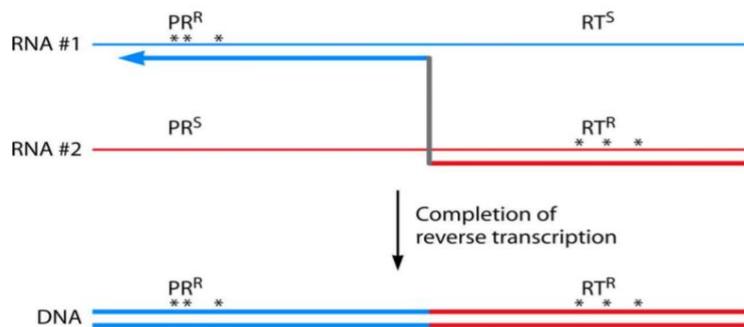


Figura 40. Mecanismo de recombinación del genoma en HIV-1. Fuente: Onafuwa-Nuga et al. (2009).

En resumen, la síntesis de DNA recombinante conlleva la copia parcial de un gRNA seguido del cambio de la RT a una región homóloga sobre un gRNA co-empaquetado, es decir, la copia de una gRNA en otro gRNA empaquetado en la misma cápsida, provocado por el cambio de molde de la RT a una región homóloga sobre el gRNA co-empaquetado.

Este mecanismo genera combinaciones alélicas difíciles de obtener por mutación. En el ejemplo de la figura 40, un gRNA parental que contiene un alelo PR (proteasa) que le dota de resistencia a inhibidores de proteasas, recombina con un segundo genoma que expresa una RT resistente a zidovudine (AZT), obteniendo una alta resistencia a dos tratamientos. La dificultad de la aparición de esta alta resistencia radica en la baja probabilidad de que aparezcan estos alelos por simple mutación, ya que requieren de varias mutaciones puntuales.

Para que se detecte recombinación, es necesaria la infección de una célula por un virión con dos gRNA distintos. Para ello se debe cumplir el establecimiento de 2 provirus genéticamente diferentes en una misma célula y la asociación en una misma cápsida de dos gRNA diferentes. Esto explica que no siempre se generen recombinantes en un paciente infectado por dos variantes génicas de HIV. Por otro lado, en la mayoría de las infecciones retrovirales ocurre un efecto de protección frente a la reinfección de una célula. Para que HIV-1 infecte un linfocito T, necesita de su receptor CD4 y correceptores. Estos ven disminuida su expresión tras una primera infección por HIV-1 causado por la proteína Nef y Vpu. Esto disminuye la probabilidad de co-infección.

Aun así, a pesar de que la recombinación tiene sus complicaciones y necesita de una serie de eventos para que ocurra, es una fuente importante de diversidad viral en pacientes infectados con HIV-1.

Velocidad de replicación del virus

La velocidad a la que se replica HIV es un importante factor en cuanto a la generación de variantes resistentes. La causa reside en que cuanto mayor sea la velocidad de replicación más replications se producen y más aumenta la probabilidad de implantarse mutaciones en el genoma viral. De entre **10⁸ a 10¹⁰ nuevos viriones son generados diariamente** durante la infección por HIV, con una tasa de mutación de 3×10^{-5} por nucleótido, la inserción de mutaciones en cualquier punto es bastante elevada.

Respecto a pacientes infectados con HIV, la emergencia de resistencia a AZT aumenta de acuerdo a la disminución en los contajes de células T CD4+, asociado a una mayor tasa de replicación de HIV (destruyen a los LT CD4+). Mutantes resistentes a drogas han sido identificados en aislados de pacientes sin haber recibido tratamiento previo. Son las drogas, las que permiten el crecimiento de estos mutantes preexistentes.

Mutabilidad intrínseca del sitio diana de la droga antiviral

La frecuencia de aparición de variantes víricas resistentes a drogas va a estar condicionada en cierta medida, por el sitio de interacción de la droga y su importancia en el funcionamiento de la proteína diana a la que se une.

Por ejemplo, si en un virus se produce una mutación en el sitio de diana de acción del fármaco sobre la proteína tras el cual la droga no puede ejercer su función y la proteína no ve comprometida su funcionalidad, éste será resistente a la droga.

Presión selectiva de la droga antiviral

Recapitulando, una droga es un compuesto que ejerce una presión selectiva suficiente sobre la replicación del virus como para seleccionar aquellas variantes (preexistentes) resistentes a dicha droga.

Lo que se observa es que altas dosis de droga, por ejemplo AZT, tienden a seleccionar variantes víricas resistentes a la droga de manera más eficaz que bajas dosis. Esto es consecuencia de la actividad de la droga, ya que cuando es baja, permite más frecuentemente la supervivencia de variantes resistentes y no resistentes (se multiplican muchas más variantes víricas sin llegar a seleccionarse ninguna resistente). Cuando la actividad de la droga antiviral aumenta, la replicación del virus disminuye hasta tal punto que la emergencia de mutantes comienza a disminuir, haciéndose nula cuando la replicación viral se inhibe completamente (representado en la figura 41 como un pico en la probabilidad de emergencia de resistentes el cual comienza a disminuir según aumenta la actividad antirretroviral del fármaco). La progresión observada sobre la acción de una droga produce inicialmente un descenso en los niveles de

replicación, seguido o bien de un nuevo aumento en dichos niveles como consecuencia de la aparición de mutantes resistentes o bien, dependiendo de la actividad del antirretroviral, éstos se mantienen bajos en el tiempo.

El fin último de la quimioterapia es la identificación de regímenes de drogas que sean capaces de inhibir completamente la replicación del virus. El desarrollo de fármacos que cumplan con este propósito supone un reto ya que esto implica tanto la distribución del fármaco por el organismo como la administración de una dosis suficiente como para que se encuentre en su concentración máxima en el sitio de acción, de tal manera que resulte efectivo inhibiendo la replicación del virus.

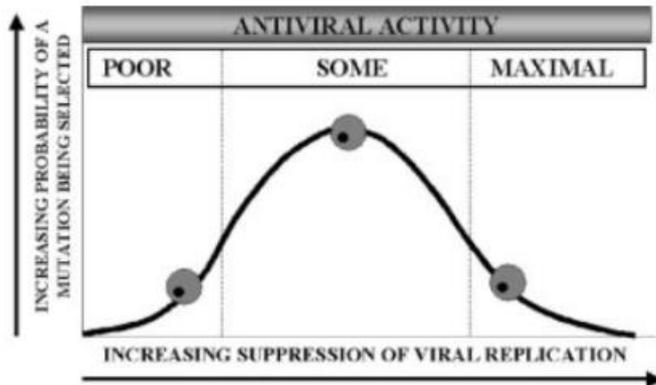


Figura 41. Impacto hipotético de la eficacia de los medicamentos antivirales sobre la probabilidad de seleccionar mutantes virales resistentes a los medicamentos. Fuente: *Chin y Locarnini (2003)*.

9.2. Drogas antirretrovirales

Actualmente los antirretrovirales no solo se enfocan en la inhibición de la retrotranscriptasa de HIV-1, sino que también se enfocan en otras etapas del ciclo de vida de HIV-1 (figura 42).

La infección por HIV es la infección viral que cuenta con un mayor número de fármacos de uso clínico.

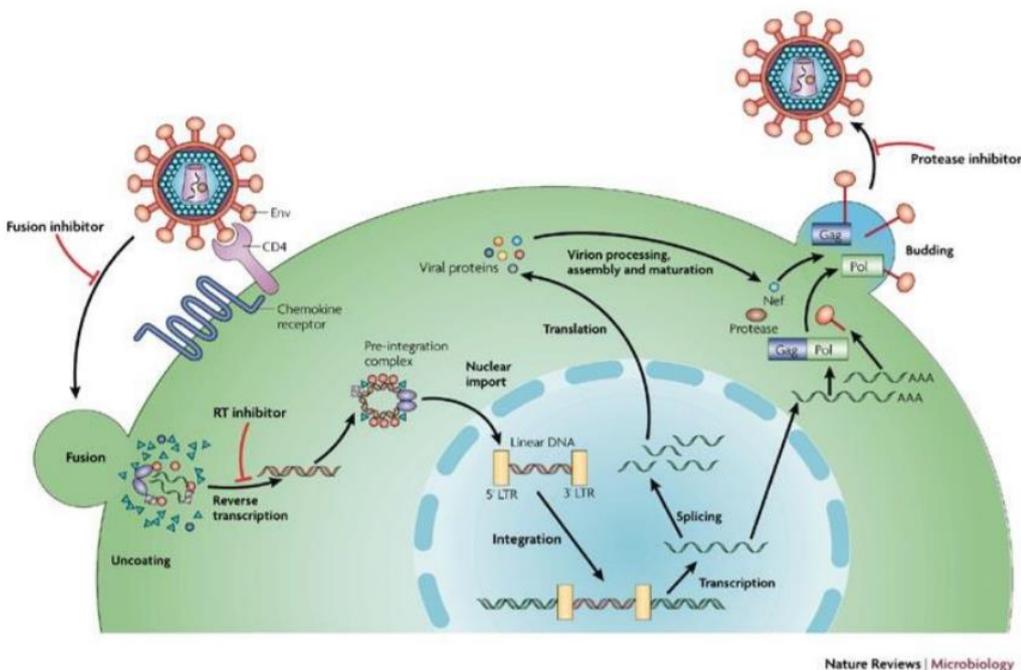


Figura 42. Principales vías de acción de los tratamientos farmacológicos frente a HIV. Fuente: *Han et al. (2007)*.

Inhibidores nucleosídicos de la RT

Zidovudine (ZDV, AZT o retrovir) es un fármaco **análogo de la pirimidina** con un grupo azida sustituyendo al grupo 3'-hidroxilo de la ribosa. Dada su estructura, su acción se centra en la **terminación prematura de la elongación** debido a la imposibilidad de formar enlaces fosfodiéster tras su incorporación en la cadena por la RT.

El zidovudine fue el primer fármaco en mostrar un efecto beneficioso para tratar la infección por HIV-1. Inicialmente se desarrolló como un agente quimioterapéutico antitumoral. Su actividad anti-retroviral se demostró frente al virus de la leucemia de Friend en 1970 y en 1985 muestra ser un tratamiento efectivo contra HIV-1.

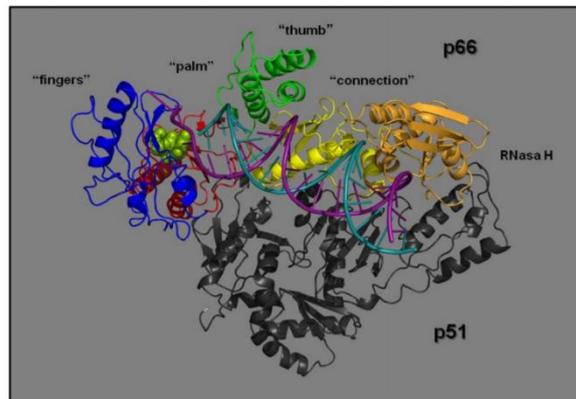


Figura 43. Estructura de la RT del VIH-1 formando un complejo con un molde-iniciador DNA/DNA heteropolimérico y con el dNTP entrante (PDB 1RTD). Fuente: *Huang et al. (1998)*.

En la figura 44 se observan otros compuestos como la didanosina, de acción similar.

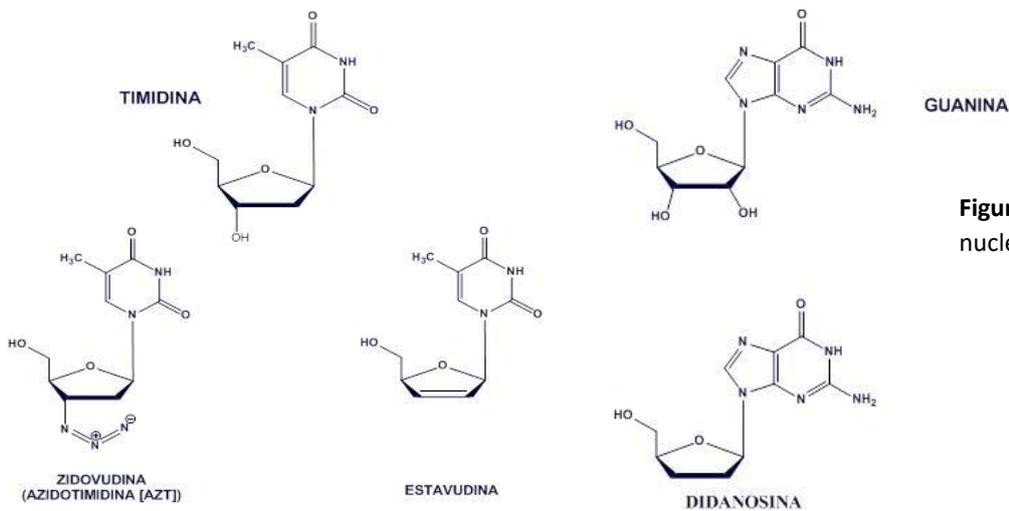


Figura 44. Inhibidores nucleosídicos de la RT.

Inhibidores de la RT no nucleosidos

Algunas de estas drogas son: nevirapine, delavirdine y loviride (su estructura química se muestra en la figura 45 junto con la de otros inhibidores).

Son un grupo de compuestos de diversa clase química capaces de bloquear la replicación viral. Para ello primero se unen al bolsillo estructural de la RT de HIV-1 cerca del sitio catalítico de la polimerasa, induciendo cambios conformacionales. Por otro lado, estos compuestos son específicos frente a HIV-1 y no frente a HIV-2 debido a las diferencias estructuras de la RT.

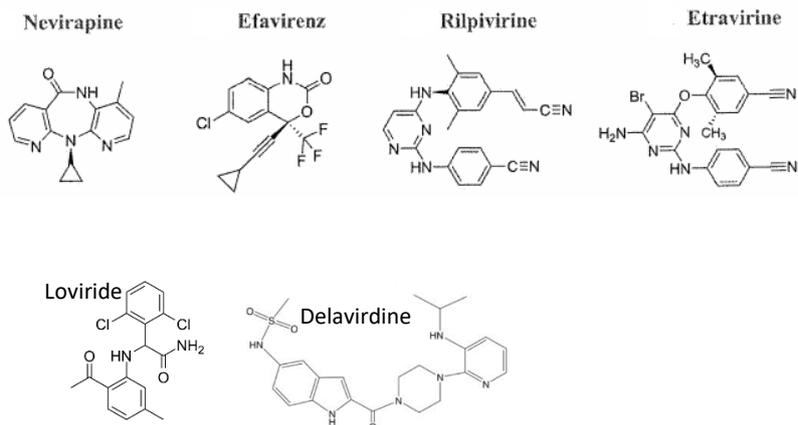


Figura 45. Inhibidores no nucleósidos de la RT.

Inhibidores de proteasas

Clase estructuralmente diversa encargada de mimetizar el sustrato peptídico de la enzima viral.

El mecanismo replicativo de HIV-1 requiere de rotura proteolítica, mediada por los precursores gag y gag-pol y por proteasas altamente específicas como la enzima aspartil-proteasa. Las proteasas virales tienen actividades altamente específicas, y, aunque tienen características relacionadas con las enzimas del hospedador como la renina, la collagenasa y la elastasa, su función no puede ser rescatada por las enzimas celulares. Por estas razones, la proteasa HIV es una diana antiviral atractiva.

Saquinavir (primero en usarse en 1995), indinavir, ritonavir VX-478 y nelfinavir, son compuestos que encajan en el sitio activo de la proteasa bloqueando su actividad (figura 46).

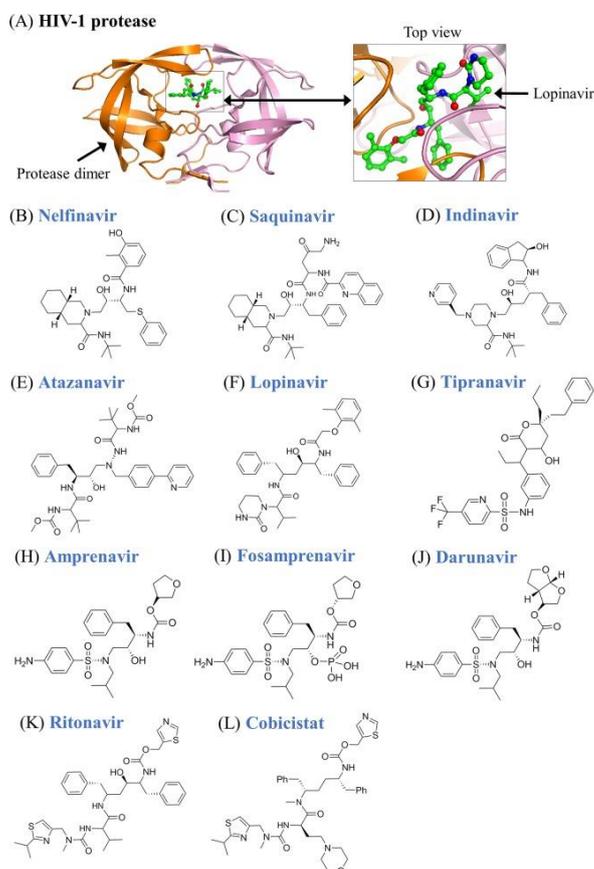


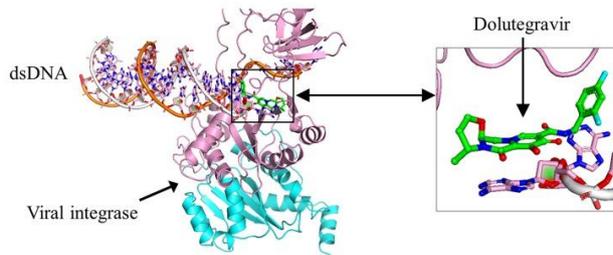
Figura 46. Estructuras terciarias de la proteasa del VIH-1 y fórmulas químicas de los inhibidores de la proteasa del VIH. (A) Dímero de proteasa de VIH-1 complejo con lopinavir (número de acceso de PDB 2Q5K). Se presentan la vista lateral (izquierda) y la vista superior (derecha) de las estructuras. (B a K) Fórmulas químicas de nelfinavir, saquinavir, indinavir, atazanavir, lopinavir, ritonavir, fosamprenavir, amprenavir, darunavir y tipranavir en el grupo de inhibidores de proteasa. (L) Fórmula química del cobicistat. Cobicistat es un fármaco potenciador utilizado con inhibidores de la proteasa del VIH, solo no muestra actividad antiviral. Fuente: *De Clercq and Li. (2016).*

Inhibidores de la integrasa viral

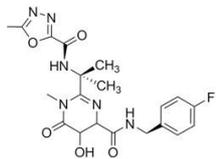
Para lograr la integración del DNA viral en el genoma hospedador, se necesita la función de integrasas virales.

Además de raltegravir, el primer compuesto efectivo frente a la integrasa del HIV, existen otros fármacos como elvitegravir y dolutegravir (figura 47).

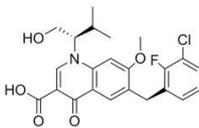
(A) Viral integrase



(B) Raltegravir



(C) Elvitegravir



(D) Dolutegravir

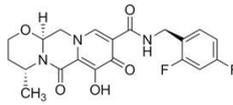


Figura 47. Estructuras terciarias de la integrasa viral y fórmulas químicas de los inhibidores de la integrasa del VIH. (A) Integrasa viral del prototipo de virus espumoso en complejo con dsDNA y dolutegravir (número de acceso PDB 3S3N). Se muestra una estructura dimérica de la integrasa viral en rosa y cian. Aunque todavía falta la estructura de la integrasa del VIH en un complejo con sus inhibidores. Se cree que los inhibidores antivirales aprobados que se dirigen al VIH y la integrasa del virus, comparten unos mecanismos similares. (B a D) Fórmulas químicas de raltegravir, elvitegravir y dolutegravir en el grupo de inhibidores de la integrasa del VIH. Fuente: *De Clercq and Li. (2016)*.

Inhibidores de la entrada

- En un primer momento se pensó en la utilización (como ligando) de quimioquinas para el bloqueo de ciertos receptores como RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3) y MIP-1 β (CCL4). Esta primera idea inicial se descartó por los efectos secundarios no deseados que producían. Maraviroc (UK-427857 figura 48) es un medicamento aprobado en 2007 para el tratamiento de pacientes infectados por cepas de HIV con una resistencia múltiple. Efectivo frente a HIV R5-trópicas, coligando de CCR5. Maraviroc es una droga activa en el rango nanomolar cuya efectividad se centra en la inhibición de la interacción de gp120 con su correceptor. El mecanismo de acción se basa en la unión competitiva al bolsillo hidrofóbico de las hélices transmembrana de CCR5. Esto conlleva un cambio estructural en la parte extracelular del receptor encargada de la interaccionar con HIV.
- Los tratamientos que tenían como blanco la interacción entre gp120 y el correceptor CXCR4 son una vía de la que no se espera buenos resultados. Esto se debe a que CXCR4 es esencial para múltiples procesos fisiológicos. En ratones, la delección del gen CXCR4, o su ligando 5DF-1 (CXCL12) es letal durante el desarrollo embrionario. En humanos, ciertas mutaciones en heterocigosis de este receptor están asociadas a algunos síndromes de inmunodeficiencia, por lo que no parece probable que este camino dé los frutos deseados.
- Se estudiaron péptidos sintéticos correspondientes a los dominios HR1 y HR2 de gp41, como fármacos capaces de bloquear la fusión de membranas por gp41. Los péptidos sintéticos competirían por los dominios HR1 y HR2 bloqueando la fusión de membranas.

Enfuvirtide (T-20) es un inhibidor de fusión de membranas aprobado por la FDA estadounidense para el tratamiento en pacientes del 2003. Se trata de un péptido sintético lineal de 36 aminoácidos que presenta una secuencia idéntica a la región HR2 de gp41.

El problema que surge con los tratamientos peptídicos es que su administración ha de ser inyectada (no pueden ser administradas por vía oral dada su labilidad) por lo que se sigue investigando en la búsqueda de otras moléculas que también bloqueen la fusión.

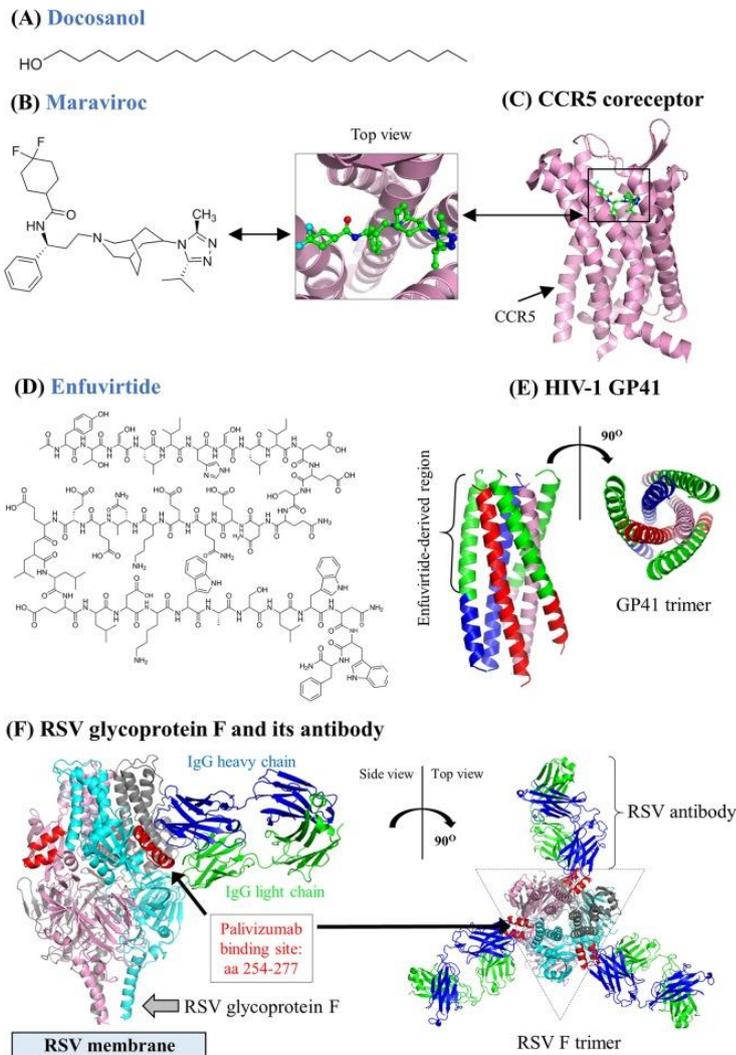


Figura 48. Fórmulas químicas de inhibidores de la entrada del VIH y estructuras terciarias de CCR5, VIH-1 GP41 y glicoproteína F del RSV. (A) Fórmula química del docosanol. (B y C) Fórmula química de maraviroc y el coreceptor CCR5 en complejo con maraviroc (número de acceso PDB 4MBS). Se presentan las vistas superior y lateral de la estructura CCR5. (D y E) Fórmula química de enfuvirtida y estructura terciaria del trímero GP41 del VIH-1 (número de acceso PDB 2X7R). La enfuvirtida se deriva de la región verde de HIV-1 GP41. Se presentan las vistas superior y lateral del trímero VIH-1 GP41. Se muestran tres unidades del trímero de VIH-1 GP41 en azul, rojo y rosa, respectivamente. (F) Estructura terciaria del trímero de glicoproteína F de RSV de prefusión en complejo con el anticuerpo motavizumab (número de acceso de PDB 4ZYP). Motavizumab es un anticuerpo monoclonal experimental derivado del fármaco palivizumab aprobado por la FDA. Se presentan las vistas laterales (izquierda) y superior (derecha) de las estructuras de proteínas. Las cadenas pesada y ligera de motavizumab se muestran en azul y verde, respectivamente. El sitio de unión de palivizumab (posiciones de aminoácidos [aa] 254 a 277) está resaltado en rojo. Se muestran tres unidades del trímero RSV F de prefusión en rosa, gris y cian, respectivamente. Fuente: *De Clercq, and Li. (2016).*

9.3. Terapia HAART

La terapia HAART o TARSA (terapia de alta actividad antirretroviral), introducida en 1996, supuso un gran avance contra la infección del HIV, pasando a ser una **infección crónica controlable**. Se trata de un tratamiento que combina la administración de tres fármacos diferentes (terapia combinada triple), dos inhibidores de la RT (uno nucleosídico y otro no nucleosídico) y un inhibidor de proteasas. Gracias a esta combinación de tratamientos la probabilidad de emergencia de mutantes resistentes al comienzo del tratamiento es muy reducida, lo que la ha llevado a ser un tratamiento altamente exitoso.

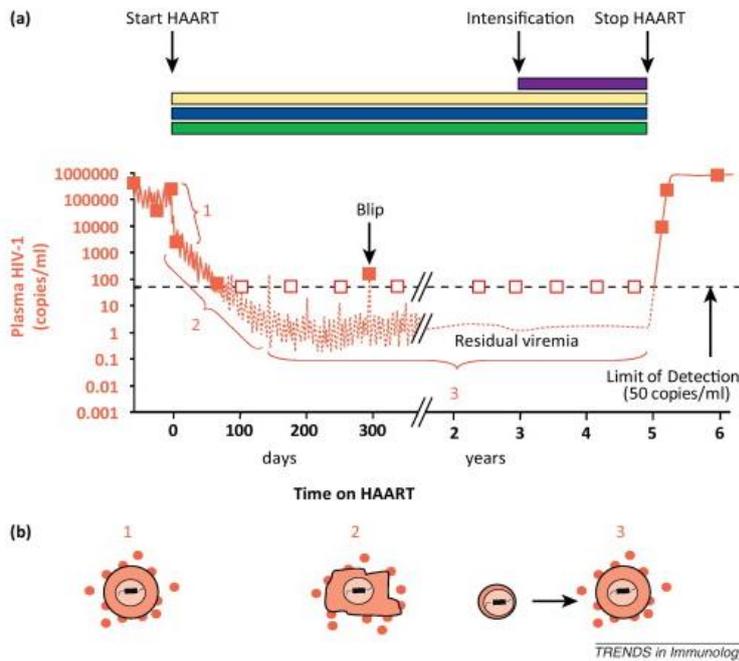


Figura 49. Evolución de la carga viral a lo largo del tratamiento

Este tratamiento conduce a la reducción de los niveles de HIV-1 hasta debajo del límite de detección de los métodos diagnósticos (50 copias de RNA de HIV-1 RNA por mililitro de plasma, figura 49). Esta bajada en los niveles de carga viral (suponen una replicación viral muy baja y por tanto baja infección de LT CD4+) va seguido de un aumento en los números de LT CD4+, reestableciéndose así la función inmunológica, disminuyendo por tanto las infecciones oportunistas y las muertes por SIDA.

A pesar de que esta terapia ha supuesto un gran avance en la lucha contra la infección por HIV y una gran mejora en el pronóstico y calidad de vida de los pacientes, sigue siendo una enfermedad crónica sin cura. Diversos estudios han demostrado que a pesar de ser indetectables o de mantener unos niveles bajos, se siguen detectando células infectadas tras años de tratamiento debido a que el virus persiste en reservorios no muy bien caracterizados. Además, si se cesa el tratamiento en un periodo de tiempo de entre tres y cuatro semanas, la carga viral en los pacientes aumenta.

Otro de los problemas que abarca la infección por HIV es la disponibilidad del tratamiento. Ya que, aunque actualmente se estima que el 60% de pacientes infectados reciben tratamiento, hasta hace poco solo era menos del 5% quienes lo recibían. Debemos sus esfuerzos por la generalización en el acceso del tratamiento antirretroviral a la OMS y entidades privadas que colaboran en la lucha tanto por la investigación contra la infección por HIV, como por el acceso a los antirretrovirales y por la aceptación de los pacientes infectados por HIV.

10. Latencia

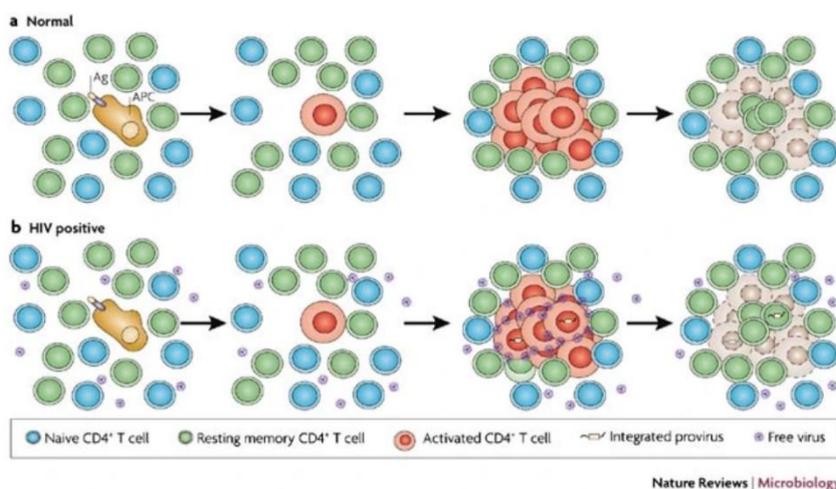
Aunque el virus HIV-1 se multiplica continuamente durante el curso de la infección, el virus puede establecer un estado de latencia a nivel celular. HIV-1 latentes han sido detectados *in vivo* en células T CD4+ no activadas. Como una consecuencia de su tropismo por células T CD4+ activadas, HIV-1 puede establecer **infecciones latentes en células T CD4+ de memoria**, que son generadas cuando las células T CD4+ activadas vuelven a su estado quiescente.

El HIV-1 latente persiste como un **provirus establemente integrado**, pero transcripcionalmente silencioso. En este estado, el virus no es afectado por las respuestas inmunitarias o por los fármacos antirretrovirales, y este reservorio en células T CD4+ “durmientes” (“*resting*”) es un gran impedimento para conseguir la curación de la infección. Se estima que en un individuo infectado con HIV, con una viremia indetectable como consecuencia de un tratamiento eficaz, puede tener hasta 10^7 células infectadas de forma latente, principalmente linfocitos T CD4+ de memoria.

En resumen, el virus no se verá afectado en estas células ni por la respuesta inmunitaria del organismo ni por fármacos antirretrovirales.

Cuando una célula T CD4+ encuentra su antígeno, experimenta una transformación y entra en ciclo celular, produciéndose una serie de rápidas divisiones que dan lugar a varias células efectoras activadas. Algunas de estas células reversion a un estado G0 quiescente, persistiendo como células de memoria, preparadas para responder rápidamente en futuros encuentros con el mismo antígeno (Fig. 50a). Esto se considera la vía normal de una respuesta mediada por linfocitos T CD4+.

En el caso de pacientes infectados por HIV, la respuesta sigue la misma línea que en una situación normal pero con una excepción: el virus tiene tropismo por linfocitos T CD4+ activados, por lo que durante esta activación el HIV-1 infectará preferentemente estas células y se replicará (Fig. 50b). No obstante, estas células infectadas no sobreviven más allá de unos pocos días (Fig. 42). Sin embargo, aun siendo un evento poco frecuente, algunos linfoblastos CD4+ son capaces de revertir a un estado de memoria (“durmiente”).



Resulta significativo que, como consecuencia de esta transición, la expresión génica del HIV-1 es bloqueada. Una razón de este hecho es que la transcripción a partir de las LTR (“long terminal repeat”) es inducida de forma fuerte por factores transcripcionales del hospedador como son el factor nuclear κB

(**NF- κ B**) y el **NFAT** (“nuclear factor of activated T cells”), que son excluidos del núcleo de células “durmientes”.

El resultado es un provirus integrado de forma estable pero transcripcionalmente silencioso en una célula T de memoria, una célula cuya función es sobrevivir durante largos periodos de tiempo (meses o incluso años). Si la célula encuentra de nuevo su antígeno, o resulta activada por citoquinas u otros estímulos, comienza a producir virus. Mientras tanto, el virus persiste como un DNA integrado, no afectado por fármacos antirretrovirales. Así, la latencia del HIV-1 se establece sobre un pilar fundamental del sistema inmunitario, la memoria inmunológica que reside en linfocitos “durmientes” de larga vida. Se estima que estos reservorios donde el virus está latente pueden llegar a persistir hasta 44 meses.

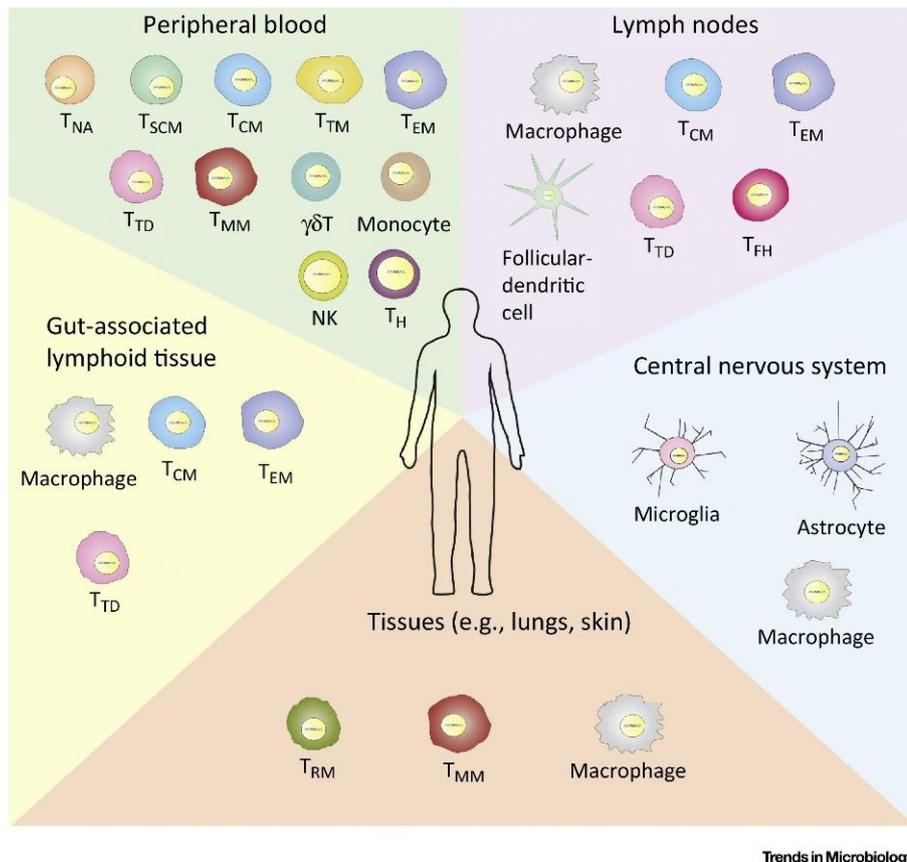
El estudio de los **linfocitos T CD4+ de memoria** o no activados, como reservorios del HIV-1 es complicado también por el hecho de que estas células de memoria se clasifican en diversas categorías: células de memoria (Tscm, “T stem cell memory”), Tcm (“central memory”), Ttm (“transitional memory”), Tem (“effector memory”), Tmm (“migratory memory”), Trm (“tissue resident memory”) y Ttd (“terminally differentiated”). Dentro de las células T CD4+ de memoria, posiblemente las células TSCMs se consideran especialmente relevantes en el establecimiento de latencia, dadas sus características de autorrenovación, resistencia a la apoptosis y su supervivencia durante periodos muy largos de tiempo.

En algunos estudios se ha demostrado la presencia de virus competentes para la replicación y DNA de HIV-1 en **linfocitos T $\gamma\delta$** , una subserie de linfocitos T CD3+ con TCR formado por las cadenas γ y δ . Estos linfocitos T difieren de los convencionales T $\alpha\beta$ en que no reconocen antígenos peptídicos, sino que reconocen antígenos lipídicos de forma no restringida por MHC.

Otros tipos celulares en los que el virus puede persistir (Fig. 51) son los macrófagos, donde el virus puede persistir en forma de DNA no integrado durante periodos largos. La idea de que los macrófagos eran células terminales en la vía de diferenciación mieloide está siendo reconsiderada, ya que se ha visto que son capaces de auto-renovarse y repoblar tejidos.

Otras células importantes para la persistencia del virus (Fig. 51) serían las células dendríticas foliculares presentes en los tejidos linfoides, ya que están especializadas en atrapar y retener antígenos, incluidos viriones HIV-1, sobre su superficie en forma de inmunocomplejos, donde pueden persistir viables hasta al menos nueve meses. Estudios recientes indican que el HIV-1 podría también establecer latencia en células progenitoras hematopoiéticas.

El HIV-1 también se ha encontrado en el SNC (Fig. 51), lo que indica que puede atravesar la barrera hematoencefálica. El SNC tiene muy pocos linfocitos T CD4+, pero sí tiene diversos tipos de macrófagos, incluyendo la microglía, que se ha visto pueden contener HIV latentes.



Trends in Microbiology

Figura 51. Tipos celulares que pueden ser afectados por HIV-1 y donde se ha visto que establecen latencia.
Fuente: *Barton et al. (2016)*

10.1 Implicaciones de la latencia viral en el tratamiento antirretroviral

Los tratamientos actuales, aunque efectivos, deben mantenerse de por vida, dado que la interrupción conduce a un rápido rebrote del virus. A pesar del tratamiento prolongado, los pacientes mantienen viremias entre 1 a 50 copias por mililitro de sangre. Y, de hecho, si se cesa el tratamiento, rápidamente se observa una expansión del virus (Fig. 49).

Además, hay que tener en cuenta que se trata de tratamientos caros y por tener efectos secundarios derivados de su uso prolongado. Algunos pacientes están ya en su segunda década de tratamiento y en el mundo desarrollado unos 3 millones de personas están siendo tratadas.

Aunque la toxicidad del tratamiento HAART es muy baja, sí que existe una preocupación por una mayor incidencia de enfermedades cardíacas, diabetes, enfermedades hepáticas y varias formas de cáncer entre los pacientes sometidos al tratamiento.

Además, en 2009 se reportó el caso de una posible cura de un paciente infectado por HIV-1; este paciente fue tratado por una leucemia consistente en la destrucción de su tejido mieloide y la reconstitución con células madre hematopoyéticas (“hematopoietic stem cell transplantation”) procedentes de una persona homocigota para la mutación CCR5Δ32 y, por tanto, resistente al HIV-1. Este paciente, conocido como el “paciente de Berlín” dejó de tomar el tratamiento TARSA (HAART) el día anterior de someterse al trasplante, que fue en 2007, y hasta ahora no se le ha detectado el virus ni ninguna evidencia de replicación viral.

10.2 Abordajes que podrían posibilitar la eliminación total del virus

Una terapia tan drástica como la sufrida por el “paciente de Berlin” no se contempla como una estrategia de tratamiento habitual contra la infección por HIV-1. Es por esto que se están buscando otras vías de alcanzar una cura total de la infección.

Uso de nucleasas específicas de sitio

Actualmente se está ensayando el uso de nucleasas específicas de sitio para producir células resistentes a la infección por HIV-1. Para ello se desarrollaron las **proteína ZFN** (“Zinc Finger Nuclease”) mediante ingeniería molecular, que presentan un dominio de dedo de zinc (especificidad de reconocimiento de secuencia) y un dominio endonucleasa. Así, cuando la proteína reconoce su sitio en el DNA producirá una rotura en ambas cadenas, que será reparada por la célula por NHEJ (“Non-Homologous End Joining”). Se han desarrollado ZFNs para evitar la expresión de CCR5 y CXCR4, que serían introducidas a través de vectores adenovirales o retrovirales, o en su defecto por transfección con nucleofectina.

La alteración de los genes de CCR5 en células T CD4+ o hematopoyéticas en ratones humanizados genera una menor carga del virus. En este mismo estudio, las células T CD4+ se colectan por aféresis (técnica de separación de componentes sanguíneos por medio de sus densidades; los componentes no necesarios se reintroducen en el paciente). A continuación, la proteína ZFN de CCR5 se introduce en las células (en este caso con un adenovirus) y, por último, las células modificadas genéticamente se reintroducen en el paciente.

La mayor limitación de esta técnica es que la **ZFN no es capaz de eliminar las células infectadas en estado latente**, solamente las células en un estado activo.

Activación y destrucción de virus latentes

El uso de las nucleasas específicas de sitio presenta la limitación de no ser capaz de eliminar el virus latente, y por eso existe una intensa investigación en la búsqueda de mecanismos de activación de los virus latentes para llevar a cabo una curación total de las personas infectadas (Fig. 52).

Actualmente se tiene un conocimiento en gran detalle de los factores implicados en el silenciamiento y activación de la expresión génica del provirus HIV-1 (Fig. 53):

I. Linfocitos en reposo

En los linfocitos T en reposo (Fig. 53a), los nucleosomas adyacentes al promotor HIV, llevan **marcadores de heterocromatina silenciosa**, tal como trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), la proteína HP1 (“heterochromatin protein 1”) y bajos niveles de acetilación de histonas.

Estas marcas de silenciamiento están determinadas y reguladas por las HDACs (Deacetil-transferasas de histonas) – derivando en una cromatina más compactada – y por HMTs (Metil-transferasas de histonas) – con efecto activador o represor en función del número de metilaciones

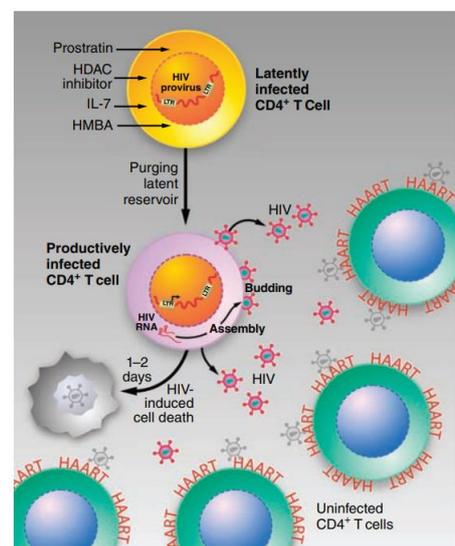


Figura 52. Representación esquemática de la combinación de activadores del virus y la terapia HAART para prevenir la expansión del HIV a células T CD4+ no infectadas.

Fuente: Richman et al. (2009)

realizadas –. Ambas clases enzimáticas son reclutadas hacia la región donde el virus se ha integrado, induciendo el estado de heterocromatina.

Además, se metilan islas CpG por las DNMTs (Metiltransferasas de DNA), reprimiendo la transcripción. A esto se le suma que factores de activación de transcripción como NF-κB y NFAT están secuestrados en el citoplasma. Por ejemplo, NF-κB se encuentra como un heterodímero p50/Rel A (p65) unido a IκB (inhibidor de NF-κB).

II. Linfocitos activados

Cuando se produce la activación de linfocitos T (Fig. 53b), una serie de sucesos invierten el proceso represivo. La región 5'LTR del virus contiene secuencias de unión para varios factores transcripcionales: NF-κB, NFAT, Sp1 y AP1. Estos factores celulares pueden ser activados por estímulos externos y promover la transcripción del HIV-1.

Tras la activación del linfocito, la degradación de IκB (el inhibidor del factor NFκB) permite la migración al núcleo y la unión al promotor de HIV del heterodímero p50-p65, que es la forma activa de NFκB, quien va a estimular la expresión de HIV, a través del reclutamiento de HATs (“histone acetyltransferases”) como p300/CBP y la remodelación de la cromatina mediante la acetilación de histonas.

La vía de señalización por protein quinasa C (PKC) interviene en la activación de factores transcripcionales implicados en la activación de linfocitos T, tales como el factor NFAT o el factor NF-κB. De ahí, que la utilización de agonistas de la vía, como son los **ésteres de forbol**, se han mostrado eficaces en la activación linfocitaria. Sin embargo, la implicación de la vía PKC en múltiples procesos celulares ha desaconsejado el realizar ensayos clínicos para probar su utilizar para erradicar linfocitos con virus HIV en estado latente.

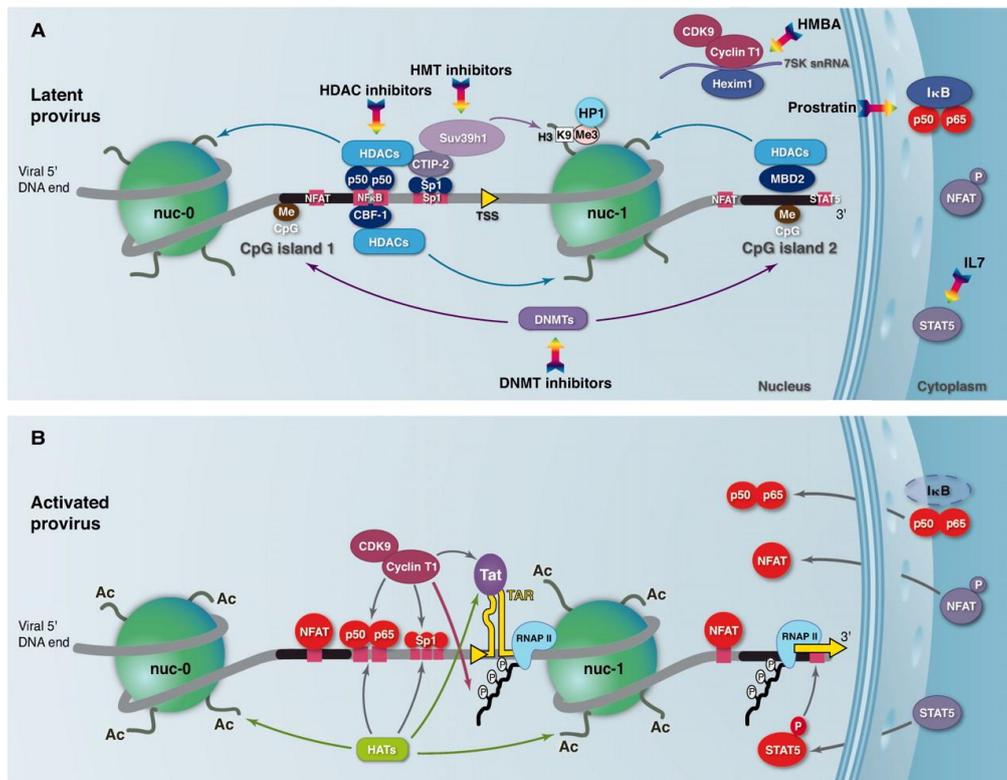


Figura 53. (A) Regulación de la latencia de HIV mediante factores celulares (células en reposo). **(B)** Regulación de la activación de HIV mediante factores celulares (linfocitos activados). Fuente: *Trono et al. (2010)*

Por otro lado, también se ha visto que algunos activadores transcripcionales son regulados a través de **acetilaciones reversibles en residuos de lisina**. Así, por ejemplo la lisina acetiltransferasa p300/CBP acetila a la subunidad Rel A del factor NF- κ B y aumenta su actividad transcripcional. En cambio, HDAC3 desacetila RelA y regula negativamente su actividad. En consecuencia, la inhibición de HDACs (“histone deacetylases”) conduce a una hiperacetilación de este factor transcripcional y puede explicar en parte la reactivación del HIV que se observa en presencia de estos inhibidores (Fig. 53b).

Actualmente, teniendo en cuenta los mecanismos responsables del establecimiento y mantenimiento de la latencia, tres categorías de agentes se están ensayando: activadores de linfocitos T, inhibidores de enzimas que modifican las histonas e inhibidores de metilación de DNA (Fig. 53).

En experimentos iniciales en los que se utilizaron activadores de linfocitos, tales como IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-7, o anticuerpos específicos de la subunidad CD3 del receptor de linfocitos T, se observó una disminución en pacientes de células con el virus integrado, pero cuando se dejó de administrar la terapia HAART se observó un incremento de la carga viral en el plasma. Además, los ensayos clínicos realizados se tuvieron que suspender al observarse fuertes respuestas inflamatorias, consecuencia de una desregulación del sistema inmunitario.

Estudios *in vitro* y *ex vivo* han demostrado que la actividad transcripcional de provirus HIV latentes puede ser aumentada por la combinación de una serie de sustancias que incluyen el **éster de forbol prostratina**, un compuesto aislado de la corteza del árbol mamala que es inductor de NF κ B (se está estudiando también su papel durante décadas por posibles aplicaciones terapéuticas contra enfermedades como el SIDA, la hepatitis o el Alzheimer), el ácido valproico, un inhibidor de HDACs (“histone deacetylases”), o inhibidores de la metilación del DNA como es el 5-aza-2'-deoxicitidina.

Todas estas aproximaciones, sin embargo, deben ser planteadas con cierta preocupación, pues la administración de sustancias con capacidad de inducir la activación del HIV podría también conducir a la activación de los retroelementos contenidos en nuestro genoma.

De hecho, más del 40% del genoma humano deriva de tales retroelementos. La expresión de estos elementos está muy controlada, y su expansión incontrolada se ha demostrado ser causa de enfermedades hereditarias y en el desarrollo de algunos tipos de cáncer.

A pesar de los inconvenientes, todas estas aproximaciones tienen un objetivo común: eliminar la infección viral, por lo que es interesante continuar investigando e invirtiendo en ellas.

11. Vacunas y otros métodos de prevención de la infección

La búsqueda por una vacuna frente al SIDA comenzó hace ya más de 30 años con un gran optimismo y elevadas expectativas. Con la identificación del virus HIV como la causa del SIDA, se pensó que una vacuna seguiría rápidamente a este descubrimiento. A ese optimismo contribuyó el hecho de que en esos momentos se había demostrado exitosa una vacuna frente al virus de la hepatitis B basada en la producción en levaduras de una proteína de la cubierta del virus. Actualmente existen unas 20 vacunas que se han o están ensayando en distintas fases (Tabla 4; anexionada al final del tema).

Vacuna	Inmunógeno	Clade	País	Fase
AIDSVAX B/E	gp120	B, E	Tailandia	3
AIDSVAX B/B	gp120	B	USA	3
AIDSVAX B/B	gp120	B	USA	2b
ALVAC vCP1452	Env-gag-pol-CTL	B	USA	2b
ALVAC vCP1452	Env-gag-pol-CTL	B	Brasil, Haití, Perú	2b
AIDSVAX B/B	gp120	B	Trinidad y Tobago	2b
DNA, HIVA	Gag-CTL	A	UK	2a
MVA, HIVA	Gag-CTL	A	Uganda	2a
ALVAC vCP205 o vCP1452	Env-gag-pol-CTL	B	USA	2a
AIDSVAX B/B	gp120	B	USA	2a
ALVAC vCP205	Env-gag-pol	B	USA	1
ALVAC Vcp1452	Wnv-gag-pol-CTL	B	USA	1
DNA HIVA	Gag-CTL	A	Kenia	1
MVA HIVA	Gag-CTL	A	Kenia	1
MRKAd5	Gag	B	USA	1
Poly-env1	Env	A,B,C,D,E	USA	1
VCR-HIVDNA009-99-VP	Env-gag-pol-CTL	A,B,C	USA	1
GTUNef DNA	Nef	B	Finlandia	1
VCR4302 DNA	Gag-pol	B	USA	1
Gag DNA	Gag	B	USA	1
PGA2/JS2 DNA	Gag, RT, Env, Tt, Rev, Vpu	B	USA	1
NefTat fusión/gp120	Nef, tat, gp120	B	USA	1
LIPO-4T lipopeptide	Gag-pol-nef-TT-CD4	B	Francia	1
ALVAC vCP1452	Env-gag-pol-CTL	B	Francia	1
LIPO-5T o LIPO-6T	Gag-pol-Nef-TT-CD4	B	Francia	1

Tabla 4. Vacunas profilácticas de HIV en ensayos clínicos. Tabla adaptada de la página web de la Iniciativa Internacional de Vacunación contra el SIDA (<https://www.iavi.org>)

Uno de los obstáculos ha sido la identificación de inmunógenos capaces de inducir una inmunidad amplia y duradera. Además, la tremenda variabilidad genética del virus es otra dificultad, pues resulta complicado crear una vacuna universalmente efectiva frente a los diversos “clades” y cepas de virus. Finalmente, la investigación en vacunas HIV también está dificultada por la falta de modelos animales.

Respuestas proliferativas de células CD4 frente a antígeno HIV, respuestas de células T CD8 citotóxicas y niveles de anticuerpos neutralizantes son mayores en resistentes de larga duración que en pacientes con enfermedad progresiva.

En la Tabla 5 se muestran todas las estrategias vacunales frente al HIV probadas, que se pueden dividir en dos grandes grupos, aquellas basadas en la producción de una fuerte respuesta humoral y aquellas que van a producir una fuerte respuesta celular.

Constituyentes	Estado	Ventajas	Desventajas
Vacunas que producen anticuerpos anti-HIV			
Proteínas virales de superficie (ej: gp120).	Fase I y Fase II (evaluando la seguridad).	Seguro y simple de preparar.	Los anticuerpos inducidos no reconocen HIV de pacientes.
HIV completos inactivados.	Sin estudiar en humanos.	Deberían presentar proteínas de la superficie del HIV en una conformación relativamente natural. Simple de preparar.	Riesgo de que algunas preparaciones contengan algunos virus activos. Los virus inactivos pueden perder proteínas y ser inefectivos.
Pseudoviriones (virus artificiales).	Cerca de Fase I.	Presentan proteínas de la superficie del HIV en una conformación relativamente natural.	Difíciles de producir y asegurar una estabilidad a largo plazo.
Vacunas que producen una respuesta celular			
Vectores virales vivos.	Fase II.	Se puede controlar la cantidad y el tipo de proteínas virales producidas	Complicado de preparar. Se induce una respuesta moderada.
DNA desnudo.	Fase I.	Simple de preparar. No es caro.	Preocupaciones en cuanto a la integración de los genes en las células humanas (puede dañar a los pacientes).
Péptidos HIV.	Fase I.	Simple de preparar.	No muestran una fuerte respuesta inmunitaria.
Vacunas que producen una respuesta celular y humoral			
Combinaciones.	Fase II.	Debería estimular ambas partes de la respuesta inmune a la vez.	Complicado de preparar.
HIV vivo atenuado.	Sin estudiar en humanos, solo se ha probado en primates.	Vacuna que mejor imita al HIV, puede interferir con la capacidad de replicarse	Los virus podrían causar enfermedad.

Tabla 5. Tabla representativa de los distintos tipos de vacunas que se están desarrollando contra el HIV. Fuente: *Adaptado de Scientific American; David Baltimore and Carole Heilman (1998)*

11.1. Vacunas inductoras de respuesta inmunitaria humoral

Vacunas basadas en la proteína gp120

Actualmente, los candidatos a vacunas HIV más extensamente testados son aquellos que contienen alguna parte de la proteína de la cubierta (Env), principalmente la proteína gp120. Dado que el virus emplea esta proteína para entrar en las células, la generación de anticuerpos que se unieran a esta proteína impedirían al HIV unirse e infectar las células.

La gp120 ha sido administrada a voluntarios humanos. En estos ensayos, la proteína fue capaz de promover la producción de anticuerpos. Además, los anticuerpos resultantes son capaces de neutralizar eficientemente al HIV en el tubo de ensayo, bloqueando su habilidad para infectar linfocitos humanos cultivados. Desgraciadamente, los anticuerpos sólo reconocen cepas de HIV que son muy similares a las empleadas para generar las vacunas (cepas cultivadas en el laboratorio). Los anticuerpos inducidos frente a las proteínas procedentes de estas cepas adaptadas al laboratorio fueron ineficaces en la neutralización de las cepas HIV aisladas directamente de pacientes infectados.

Vacunas basadas en virus inactivados

Como intentos de mejorar la eficacia de la neutralización se ha planteado la posibilidad de inmunizar con partículas víricas completas muertas que pudieran presentar al sistema inmunitario formas más naturales de la proteína Env. Sin embargo, el hacer una vacuna con virus muertos requiere de un proceso de inactivación muy riguroso, dado que virus residuales e incluso el material genético viral residual podría ser potencialmente peligroso.

Vacunas basadas en pseudoviriones

Como estrategia alternativa, las proteínas Env podrían ser presentadas al sistema inmunitario embebidas en "pseudoviriones", estructuras artificiales que recuerdan partículas víricas. Estas partículas son seguras (se produce la partícula viral pero sin el material genético), pero son difíciles de producir en una forma estable.

La mayor dificultad a la que se enfrentan las investigaciones dirigidas a generar respuestas de anticuerpos neutralizantes es la gran variabilidad del virus, donde además de variaciones puntuales en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de superficie, con frecuencia, se observan inserciones y deleciones de longitudes variables de aminoácidos. Además, las proteínas de superficie están altamente glicosiladas, lo que impide la interacción de los anticuerpos con las proteínas.

11.2. Vacunas inductoras de respuesta inmunitaria celular

Otro tipo de vacunas son aquellas dirigidas a generar una activación específica de linfocitos T citotóxicos (CTL). Las células CTL reconocen pequeños fragmentos de proteínas extrañas que son presentadas en la superficie de una célula infectada en el contexto de moléculas MHC clase I. Para que una vacuna HIV estimule la inmunidad celular a través de MHC-I, debe inducir a que células seleccionadas sintetizen y muestren péptidos de proteínas víricas.

Estas células favorecerán que se monte una respuesta inmunitaria frente a todas las células que muestren péptidos virales, incluyendo aquellas verdaderamente invadidas por HIV. Al matar las células infectadas, van a reducir la producción de nuevos viriones. Además, los linfocitos CD8+ activados producen grandes cantidades de quimioquinas tales como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β , que compiten por la unión al receptor CCR5.

Los investigadores han desarrollado diversos métodos para conseguir que las células produzcan y muestren fragmentos de proteínas de HIV.

Vacunas con vectores vivos

Esta aproximación se basa en la habilidad de diversos virus para invadir células. Así, los investigadores insertan los genes HIV seleccionados en un virus que no es dañino y que se va a encargar de conducir el DNA al interior de las células del cuerpo. El vector más extensamente utilizado para este tipo de vacunas deriva del virus "canarypox". Este virus no patógeno, relacionado con el virus de la viruela, penetra en las células humanas pero es incapaz de ensamblar nuevas partículas virales. Hasta la fecha, las vacunas "canarypox" se han mostrado seguras, pero inducen sólo respuestas CTL modestas.

Vacunas con péptidos antigénicos

Otros investigadores han analizado la inducción de estas respuestas CTL a través de la administración de péptidos sintéticos derivados de las proteínas virales. Sin embargo, estos péptidos tampoco inducen fuertes respuestas inmunitarias en humanos.

Vacunas de ADN

Una aproximación para inducir respuestas inmunitarias celulares consiste en la inyección de DNA desnudo de genes HIV. Aunque cabría pensar que este DNA desnudo podría degradarse demasiado rápido, se ha visto que este DNA es capaz de entrar dentro de las células y dirigir la producción de proteínas virales.

En estudios en ratones y en primates, las vacunas de DNA generan respuestas CTL que reconocen las proteínas HIV. Precisamente, la primera vacuna de DNA que se ha ensayado en humanos ha sido la vacuna frente a HIV-1. Estos estudios, que en conjunto han implicado a centenares de personas, han puesto de manifiesto que este tipo de vacunas son bien toleradas en humanos, y no se ha reportado ningún efecto adverso.

Los resultados han mostrado que las respuestas de anticuerpos son bajas o inexistentes. Se observan respuestas de células T CD4+ razonables, pero las respuestas de células T CD8+ no parecen ser lo suficientemente altas como para asegurar un control efectivo de la infección.

Las esperanzas en el desarrollo de una vacuna frente al HIV se han renovado con los resultados del ensayo RV144, que se dieron a conocer a finales de 2009. Este ensayo consistió en la inoculación de un "canarypox" que expresa las proteínas Gap y Pol del HIV subtipo B y la gp120 del subtipo E, seguidas de una inoculación posterior de una mezcla de proteínas gp120 de los subtipos B y E en hidróxido de aluminio, utilizado como adyuvante. El ensayo se realizó con 16000 personas heterosexuales en Tailandia y los resultados indicaron que la vacuna había inducido una protección frente a la infección del 31%.

Estos resultados han puesto de manifiesto, por otro lado, que quizás la mejor estrategia para obtener una vacuna eficaz es la de combinar formulaciones que induzcan tanto respuestas celulares y de anticuerpos.

Por otro lado, ahora que la patogénesis de la infección HIV es mejor entendida, los investigadores se han dado cuenta que, si el virus se mantiene a concentraciones bajas en la sangre, una persona infectada podría no progresar nunca a SIDA. Este dato es importante porque sugiere que incluso una vacuna parcialmente efectiva podría ser valiosa al limitar la cantidad de virus en los pacientes.

En este momento, hay tres vacunas que se están analizando en ensayos clínicos, una de ellas basada en el empleo del virus *canarypox*, y otras dos, en las que se emplean como vectores adenovirus que expresan las proteínas mayoritarias de HIV-1 (Env/Gag/Pro).

11.3. Otros métodos de prevención de la infección de HIV

Además de las vacunas, otros métodos de prevención son la concienciación de las personas en el uso de medidas para evitar la transmisión del virus durante las **prácticas sexuales**, la utilización de terapia retroviral durante el **parto** para disminuir la transmisión de la madre al hijo y la utilización de una **profilaxis pos-exposición**. Dentro de esta última aproximación, se encuentra el tratamiento con anti-retrovirales en personas con sospecha de haberse podido infectar. Sin embargo, hay que evitar un uso indiscriminado de esta práctica porque, por un lado, los antirretrovirales pueden tener contraindicaciones y, por otro lado, pueden ayudar a la aparición de virus resistentes a fármacos, si se utiliza esta práctica en personas que ya están infectadas por el virus.

Otro método pos-exposición en el que se está trabajando activamente es la generación de **anticuerpos neutralizantes**, que se administrarían a las personas con sospecha de infección. Este tipo de práctica se denomina inmunización pasiva.

12. Referencias

Araújo JF, Oliveira AEF, Carvalho HLCC, Roma FRVO, Lopes FF. (2018). Most common oral manifestations in pediatric patients HIV positive and the effect of highly active antiretroviral therapy. *Cien Saude Colet.*;23(1):115-122.

Archin, N.M., Sung, J.M., Garrido, C., Soriano-Sarabia, N. and Margolis, D.M. (2014). Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat Rev Microbiol* 12: 750-764.

Asensi, V. (2002). Los antirretrovirales. *Ventana a otras especialidades*. Julio - agosto. Vol. 1 (5).

Avila-Cabrejo, J.A., García Mendez, F.M. y Fonseca-Marrero, C.A. (2020). Evolución histórica del diagnóstico de la infección por el VIH en Cuba. *16 De Abril*, 59(278).

Bailey, J., Blankson, J.N., Wind-Rotolo, M., and Siliciano, R.F. (2004). Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 470-476.

Baltimore, D. and Heilman, C. (1998) HIV vaccines: Prospects and challenges. *Scientific American* July:98-103.

Barton, K., Winckelmann, A. and Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends Microbiol* 24: 345-355.

Belyakov, I.M., and Berzofsky, J.A. (2004). Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. *Immunity* 20: 247-253.

Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.A. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657-700.

Buchanan, A.M. and Cunningham, C.K. (2009). Advances and failures in preventing perinatal human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 493-507.

Buckheit, R.W., Siliciano, R.F., Blankson, J.N. (2013) Primary CD8+ T cells from elite suppressors effectively eliminate non-productively HIV-1 infected resting and activated CD4+ T cells. *Retrovirology* 10:68.

Chin, R. y Locarnini, S. (2003), Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev. Med. Virol.*, 13: 255-272.

Coiras, M., Lopez-Huertas, M.R., Perez-Olmeda, M. and Alcami, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 798-812.

- De Clercq, E. and Li, G.** (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev* 29: 695-747.
- De Clercq, E.** (2003). The bicyclam AMD3100 story. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 581-587.
- Derdeyn, C.A., and Silvestri, G.** (2005). Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 366-373.
- Didigu, C. A., Wilen, C. B., Wang, J., Duong, J., Secreto, A. J., Danet-Desnoyers, G. A., ... & Doms, R. W.** (2014). Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(1), 61-69.
- Durand, C.M., Blankson, J.N. and Siliciano, R.F.** (2012). Developing strategies for HIV-1 eradication. *Trends Immunol.* 33: 554-562.
- Estcourt, M.J., McMichael, A.J., and Hanke, T.** (2004). DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol. Rev.* 199: 144-155.
- Fauci, A.S.** (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* 9: 839-843.
- Fauci, A.S.** (1996) et al. in *Annals of Internal Medicine*, Vol 124.
- Finzi, D. and Siliciano, R.F.** (1998) Viral Dynamics in HIV-1 infection. *Cell* 93: 665-671.
- Forsman, A. and Weiss, R.A.** (2008) Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol.* 16:555-560.
- Frank, T.D., Carter, A., Jahagirdar, D., Biehl, M.H., Douwes-Schultz, D., Larson, S.L., Arora, M., Dwyer-Lindgren, L., Steuben, K.M., Abbastabar, H., et al.** (2019). Global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2017, and forecasts to 2030, for 195 countries and territories: A systematic analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2017. *Lancet HIV* 6: e831–e859.
- Garber, M. E., Mayall, T. P., Suess, E. M., Meisenhelder, J., Thompson, N. E., & Jones, K. A.** (2000). CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Molecular and cellular biology*, 20(18), 6958–6969.
- García, F., Alvarez, M., Bernal, C., Chueca, N., and Guillot, V.** (2011). Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29: 297-307.
- Gayle, H.D. and Hill, G.L.** (2001) Global impact of human immunodeficiency virus and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 327-335.
- Giri, M., Ugen, K.E., and Weiner, D.B.** (2004). DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 370-389.
- González, M.E. y Alcamí, J.** (2006) Retroviridae. En: *Virus patógenos* (Eds.: L. Carrasco y J.M. Almendral). Ed. Hélice, pp. 281-305.
- Greene, W.C.** (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol* 37 (S1): S94-102.
- Haase, A.T.** (1999) Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 625-656.
- Han, Y., Wind-Rotolo, M., Yang, H.C., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F.** (2007). Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(2): 95-106.
- Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P.** (2010). Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464:232–236.
- Heeney, J.L., Dalgleish, A.G., and Weiss, R.A.** (2006). Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 313: 462-466.

- Hel, Z., McGhee, J.R., and Mestecky, J.** (2006). HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol.* 27: 274-281.
- Ho, D. D. and Huang, Y.** (2002) The HIV-1 vaccine race. *Cell* 110: 135-138.
- Horuk, R.** (1999) Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol. Today* 20: 89-94.
- Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC.** (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science.* 27;282(5394):1669-75.
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Erkizia, I., Puertas, M.C., Borrás, F.E., Blanco, J., and Martínez-Picado, J.** (2010). HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog* 6, e1000740.
- Juan R.** (1998) Factores asociados a la resistencia natural a la infección por HIV. *Dermatol.Perú*;8(sup 1):39-45.
- Kisic Aguirre, M.** (2010) Mecanismos moleculares de resistencia e hipersensibilidad a fármacos antirretrovirales mediados por deleciones en la horquilla [beta]3-[beta]4 de la retrotranscriptasa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, Universidad Autónoma de Madrid.
- Lawn, S.D., Butera, S.T. and Folks, T.M.** (2001) Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 753-777.
- Letvin, N.L. and Walker, B.D.** (2003) Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat. Med.* 9: 861-866.
- López Galera, R.M., Gómez Domingo, M.R., Pou Clavé, L., Ruiz Camp, I., Ribera Pascuet, I., Monterde Junyent, J.** (2001). Inhibidores de la proteasa del VIH: actualización y monitorización terapéutica de las concentraciones plasmáticas en el tratamiento antirretroviral. *Farmacia Hospitalaria.* Vol. 25. Núm. 2. páginas 55-66
- Malim, M.H. and Emerman, M.** (2001) HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* 104: 469-472.
- Martínez-Cajas JL, Mueses-Marín HF, Galindo-Orrego P, Agudelo JF, Galindo-Quintero J.** (2010). Resistencia a fármacos en pacientes en tratamiento antirretroviral, Cali, Colombia, *Biomedica [Internet].* 1 de diciembre de 2013 [citado 12 de noviembre de 2020];33(4):631-42.
- Mascort, J., Carrillo, R., Alastrue, I., Zarco, J., Aguado, C., Rodríguez, B., Fransi, L. y Ramon, J.L.** (2020). Profilaxis pre-exposición de la infección por el VIH y Atención Primaria (AP). *Atencion Primaria*, 52(3): 137-139.
- McCune, J.M.** (2001) The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410: 974-979.
- McMichael, A.J.** (2006). HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 227-255.
- McMichael, A.J. and Hanke, T.** (2003) HIV vaccines 1983-2003. *Nat. Med.* 9: 874-880.
- Nabel, G.J.** (2001) Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* 410: 1002-1007.
- Nájera Morrrondo R, Delgado Blanco E, Pérez Álvarez L, Thomson Okatsu M.** (2005). El papel de la recombinación genética en el desarrollo de la pandemia del SIDA. *Investigación de excelencia.* Vol. 2 (1): 09-22
- Onafuwa-Nuga, A. and Telesnitsky, A.** (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73: 451-480.
- Paintsil, E., & Cheng, Y. C.** (2009). Antiviral Agents. *Encyclopedia of Microbiology*, 223–257.
- Parekh, B.S., Ou, C.Y., Fonjungo, P.N., Kalou, M.B., Rottinghaus, E., Puren, A., Alexander, H., Hurlston Cox, M., and Nkengasong, J.N.** (2019). Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 32: e00064.
- Permanyer, M., Ballana, E., and Este, J.A.** (2010). Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends Microbiol.* 18: 543-551.

- Piot, P., Bartos, M., Ghys, P.D., Walker, N. and Schwartländer, B.** (2001) The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 410: 968-973.
- Piguet V, Steinman RM.** (2007) The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol.* 28: 503-510.
- Poignard, P., Saphire, E.O., Parren, P.W.H.I. and Burton, D.R.** (2001) GP120: Biologic aspects of structural features. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 253-274.
- Pomerantz, R.J. and Horn, D.L.** (2003) Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat. Med.* 9: 867-873.
- Pope, M. and Haase, A.T.** (2003) Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat. Med.* 9: 847-852.
- Ray, N., and Doms, R.W.** (2006). HIV-1 coreceptors and their inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 303: 97-120.
- Richman, D.D.** (2001) HIV chemotherapy. *Nature* 410: 995-1001.
- Richman, D.D., Margolis, D.M., Delaney, M., Greene, W.C., Hazuda, D. and Pomerantz, R.J.** (2009). The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323: 1304-1307.
- Rowland-Jones, S., Pinheiro, S. and Kaul, R.** (2001) New insights into host factors in HIV-1 pathogenesis. *Cell* 104: 473-476.
- Ruelas, D.S. and Greene, W.C.** (2013). An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell* 155: 519-529.
- Schickli JH, Whitacre DC, Tang RS, Kaur J, Lawlor H, Peters CJ, Jones JE, Peterson DL, McCarthy MP, Van Nest G, Milich DR.** (2015). Palivizumab epitope-displaying virus-like particles protect rodents from RSV challenge. *J Clin Invest* 125:1637–1647.
- Shattock, R.J., and Moore, J.P.** (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 25-34.
- Shearer, G.M.** (1998) HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity* 9: 587-593.
- Spinelli, F.M.** (2014) Caracterización funcional de glicoproteínas de envoltura provenientes de aislamientos de HIV-1 de un paciente infectado por transmisión vertical. Universidad de Belgrano.
- Stevenson, M.** (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 9: 853-860.
- Taborda NA, Hernández JC, Montoya CJ, Rugeles MT.** (2014) Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología* 1,;33(1):11-20.
- Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, et al.** (2013) Structure of the CCR5 chemokine receptor–HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*; 341(6152):1387-1390
- Tilton, J.C. and Doms, R.W.** (2010). Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* 85: 91-100.
- Trono, D., Van Lint, C., Rouzioux, C., Verdin, E., Barre-Sinoussi, F., Chun, T.W., and Chomont, N.** (2010). HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* 329: 174-180.
- Valle Bahena, O.M.** (2005). Frecuencia de mutaciones del VIH que confieren resistencia a los antirretrovirales en pacientes del Hospital Universitario UANL que no han recibido tratamiento previo [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León].
- Vanegas-Otálvaro D, Acevedo-Sáenz L, Díaz-Castrillón FJ, Paula Velilla-Hernández A.** (2014). Resistencia a antirretrovirales: bases moleculares e implicaciones farmacológicas. *Rev CES Med.* 28(1): 91-106.
- Willey, S. and Aasa-Chapman, M.M.I.** (2008). Humoral immunity to HIV-1: neutralisation and antibody effector functions. *Trends Microbiol.* 16: 596-604.

Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. (2007). Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J Mol Biol* 368:652–665.

Wu, Y. and Yoder, A. (2009). Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis. *PLoS Pathog* 5: e1000520.

Xiang S, Pacheco B, Bowder D, Yuan W, Sodroski J. (2013) Characterization of a dual-tropic human immunodeficiency virus (HIV-1) strain derived from the prototypical X4 isolate HXBc2. *Virology*; 438(1):5-13.

Direcciones de interés en la “Internet”.

<http://hivinsite.ucsf.edu> Información en varios idiomas sobre diagnóstico, infecciones oportunistas, tratamiento y epidemiología del SIDA.

<http://www.avert.org> [Avert-AIDS Education and Research Trust]. Datos históricos, epidemiológicos e imágenes de HIV y SIDA.

<http://www.unaids.org> [Programa de las Naciones Unidas para la lucha contra el SIDA]

<http://content.nejm.org/cgi/content/full/359/4/339/DC2?query=TOC> [Presentación interactiva de la estructura del HIV y su ciclo biológico]

<https://hivinfo.nih.gov/es/understanding-hiv/fact-sheets/las-fases-de-la-infeccion-por-el-vih> [Las fases de la infección por el VIH]

<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/prevencion/pruebaVIH/home.htm> Información del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social sobre la prevención y la Prueba del VIH.

<http://www.infosida.es> Información adicional sobre el VIH: Pruebas clásicas, prevención y tratamientos.

https://www.who.int/topics/hiv_aids/es/ Información de la Organización Mundial de la Salud sobre el VIH: definición, transmisión, prevención y diagnóstico.