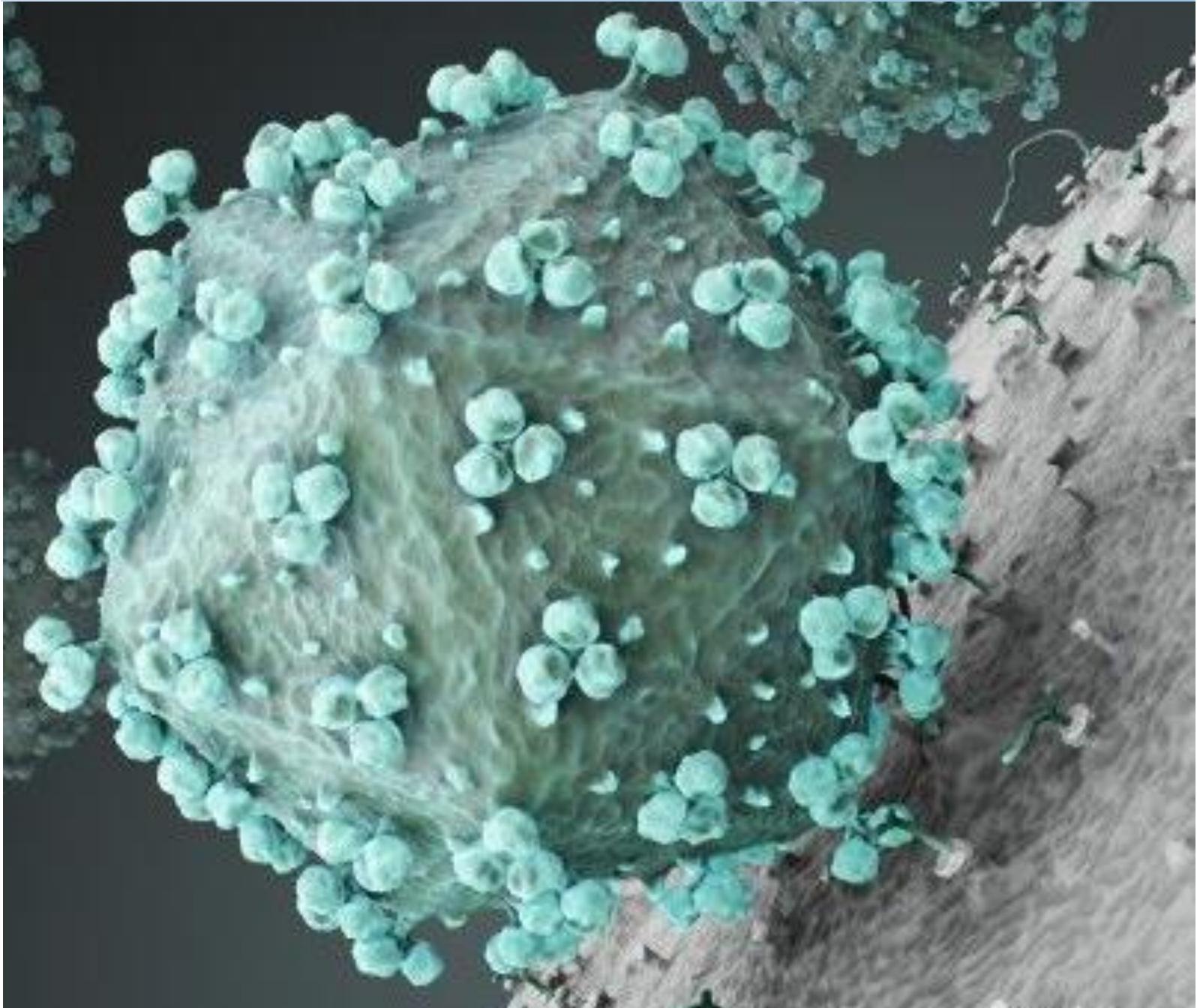


TEMA 4

VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)



Autores

Andrea de la Fuente Alonso

Alfonso Herreros Cabello

Ana Belén Gallego de Miguel

María Page Pérez



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
U. A. M. © 2016



Índice:

1.	Introducción	3
1.1	Epidemiología	5
2.	Clasificación	8
3.	Composición del virus	9
4.	Biología	12
4.1	Estrategia de replicación	12
5.	Patogénesis	15
5.1	Infección primaria o fase aguda	16
5.2	Infección asintomática o crónica	17
5.3	Progresión a la enfermedad sistémica	18
5.4	Resistentes de larga duración	19
6.	Los receptores de quimioquinas y la infección por HIV-1	20
6.1	Identificación de los correceptores	20
6.2	Modelo para explicar el tropismo de HIV-1	22
6.3	Mecanismo de la fusión y entrada del HIV-1 mediada por los correceptores	22
6.4	Los correceptores y la enfermedad causada por el HIV-1	23
6.5	Señalización a través de los correceptores inducida por el virus	25
7.	Efectos del virus sobre el sistema inmunitario	27
7.1	Efectos sobre linfocitos T	27
7.2	Efectos sobre las células dendríticas	32
7.3	Efectos sobre las células NK	33
7.4	Efectos sobre los linfocitos B	34
8.	Diagnóstico	35
8.1	Marcadores de la infección por VIH a tener en cuenta para un primer posible diagnóstico	35
8.2	Test serodiagnóstico o diagnóstico serológico	36
8.2.1	Determinación de anticuerpos mediante ELISA	36
8.2.1.1	Historia de los ELISA de VIH	36
8.2.1.2	Problema de falsos positivos y negativos	37
8.2.2	Técnicas de ejecución rápida	38
8.2.3	Test confirmatorio más común: "Western Blot"	39
8.2.4	Ensayo de detección de antígeno	39
8.2.5	Ensayos para la detección de infección reciente de VIH	40
8.2.6	Resumen del algoritmo diagnóstico usado mediante métodos serológicos	41
8.3	Detección de resistencia a antirretrovirales	41
8.3.1	Cultivo del virus	41

8.3.2	Ensayos fenotípicos-----	42
8.3.3	Ensayos genotípicos-----	43
8.4	Detección de secuencias nucleotídicas del virus VIH -----	43
8.5	Detección del tropismo viral-----	44
8.5.1	Ensayos fenotípicos-----	44
8.5.2	Ensayos genotípicos-----	44
8.6	Detección en niños y neonatos-----	45
9.	Tratamiento-----	48
9.1	Resistencia a la quimioterapia antirretroviral-----	48
9.1.1	La frecuencia de mutación viral-----	49
9.1.2	La velocidad de replicación del virus-----	52
9.1.3	La mutabilidad intrínseca del sitio diana de la droga antiviral-----	52
9.1.4	La presión selectiva de la droga antiviral-----	52
9.2	Fármacos antirretrovirales -----	53
9.2.1	Inhibidores nucleosídicos de la RT-----	54
9.2.2	Inhibidores no nucleosídicos de la RT-----	54
9.2.3	Inhibidores de proteasas-----	55
9.2.4	Inhibidores de la entrada del virus-----	56
9.2.4.1	Inhibidores de la adhesión del virus al receptor CD4-----	56
9.2.4.2	Inhibidores de la unión de gp120 y CCR5-----	57
9.2.4.3	Inhibidores de la unión de gp120 y CXCR4-----	58
9.2.4.4	Inhibidores de la fusión de las membrana celular y viral-----	58
9.3	Terapia HAART-----	59
10.	Latencia-----	60
10.1	Implicaciones de la latencia viral en el tratamiento antirretroviral-----	62
10.2	Abordajes para posibilitar una completa eliminación del virus-----	63
10.2.1	Utilización de nucleasas específicas de sitio-----	63
10.2.2	Activación de los virus latentes y destrucción de los mismos-----	63
11.	Vacunas-----	66
11.1	Vacunas basadas en la inducción de una respuesta inmunitaria humoral-----	67
11.2	Vacunas basadas en la inducción de una respuesta inmunitaria celular-----	67
12.	Bibliografía-----	71

1. Introducción

El HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) es el virus causante del SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida). Hay dos tipos mayoritarios de HIV; la infección por el HIV-1 es la más prevalente en el mundo y se caracteriza por un deterioro lento y progresivo del sistema inmunitario que termina siendo fatal. Por lo contrario, el HIV-2 se encuentra principalmente en la zona del oeste de África y produce un curso clínico mucho más benigno.

Historia:

- En 1981 aparecen los primeros casos de la enfermedad. El primero se basó en la inusual aparición simultánea de dos enfermedades, el sarcoma de Kaposi y la neumonía causada por el hongo *Pneumocystis carinii* en un joven homosexual. Fueron subsiguientemente descritos otros casos en otras poblaciones (drogadictos, hemofílicos y niños nacidos de madres con SIDA), lo que sugirió una etiología infecciosa.

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.

***Pneumocystis carinii** es un hongo patógeno, oportunista, extracelular, que parasita el árbol respiratorio del ser humano, produciendo una infestación que se manifiesta en muchos pacientes que han sufrido de inmunosupresión. Es un agente infeccioso común entre los afectados por SIDA.*

- En 1983 se aisló el HIV-1 y se reconoció como la causa de ese síndrome.
- En 1985 se desarrolló un test de ELISA (test para detectar la presencia de anticuerpos frente a HIV), una herramienta fundamental tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para analizar los bancos de sangre, impidiendo por tanto millones de infecciones como consecuencia de las transfusiones sanguíneas.
- La secuencia completa de HIV-1 se conoció en 1985. Es un virus con un genoma pequeño, formado por 10kb.
- En 1985, se describió la primera droga, el AZT (zidovudine), con actividad *in vitro* y en pacientes con SIDA. Su uso en humanos como terapia antirretroviral contra el HIV fue aprobado en 1987.
- 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 troglodyte*, 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. Esto ha puesto de manifiesto que la co-evolución de un virus con su hospedador durante muchos años ha llevado a que el virus haya atenuado su virulencia y, al acceder a un nuevo hospedador, que era el hombre, lo ha hecho con una virulencia extrema.
- En 1995 se aprueba el uso en pacientes del primer inhibidor de la proteasa viral, el saquinavir, lo que posibilitó la formulación de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART, “*highly active antiretroviral therapy*”) (Figura 1).

El HIV es el agente infeccioso más intensamente estudiado en 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.

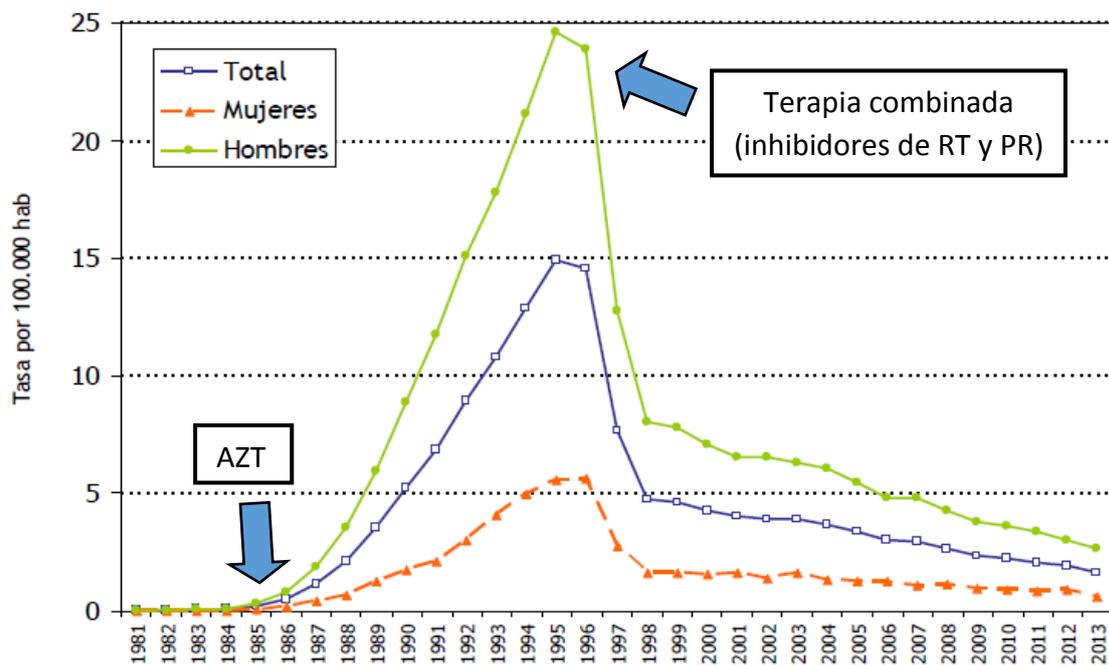


Figura 1. Gráfica que representa los años en el eje “X” y en el eje “Y” la tasa de mortalidad por 100.000 habitantes. Se muestra el uso en humanos en 1987 del AZT y en 1995 el uso de Saquinavir el cual permitió una terapia combinada con inhibidores de la retrotranscriptasa y la proteasa. Ello sirvió para disminuir el número total de pacientes con SIDA, con lo que se afirma que es una buena terapia. Además se ve como el SIDA está más presente en hombres.

Fuente: Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad. “Mortalidad por HIV/SIDA en España. Año 2013. Evolución 1981-2013”

<http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/home.htm>

1.1. Epidemiología

En 1996, después de más de una década de aumentos constantes, las muertes por SIDA empezaron a decrecer en EEUU y algunas naciones de Europa Occidental. La bajada fue debida principalmente a la introducción de terapias poderosas capaces de retardar la actividad del HIV. Pero esta tendencia de los países industrializados no es representativa del conjunto del Mundo.

La infección por HIV se expandió rápidamente a todos los lugares. Desde principio de los años 80, alrededor de 60 millones de personas han contraído el HIV, y más de 35 millones han muerto. Se estima que, cada año el HIV-1 infecta a unos 2,1 millones de personas en todo el mundo, y produce la muerte de unos 1,1 millones de personas (según el informe de la OMS, 2015) **(Tablas 1, 2 y 3; Figura 2)**.

En el año 2000 hubo 490.000 infecciones nuevas entre niños, datos que han sido reducidos hasta 150.000 en el año 2015 (según el informe de UNAIDS, 2016).

Número de personas infectadas por HIV	Total	36,7 millones
	Adultos	34,9 millones
	Mujeres	17,8 millones
	Niños (<15 años)	1,8 millones
Número de personas infectadas por HIV en 2015	Total	2,1 millones
	Adultos	1,9 millones
	Niños (<15 años)	150.000

Tabla 1. Tabla resumen del número de personas (total, adulto, mujeres y niños) infectadas por el HIV y las personas (total, adultos y niños) infectadas en el 2015.

Fuente: UNAIDS, 2016.

Región	Personas viviendo con HIV (total)	Nuevas infecciones por HIV			Muertes causadas por HIV (total)
		Total	Edad >15	Edad <15	
África este y sur	19 millones	960.000	910.000	56.000	470.000
Latinoamérica y el Caribe	2 millones	100.000	100.000	2.100	50.000
África oeste y central	6,5 millones	410.000	350.000	66.000	330.000
Asia y el Pacífico	5,1 millones	300.000	280.000	19.000	180.000
Europa este y Asia central	1,5 millones	190.000	190.000	-----	47.000
África medioeste y norte	230.000	21.000	19.000	2.100	12.000
Europa oeste y central y Norteamérica	2,4 millones	91.000	91.000	-----	22.000

Tabla 2. Tabla de distribución mundial de casos de SIDA. Se muestra como la patología se extendió por todo el mundo, siendo África Sub-Sahariana (África este y sur) la región con más casos (19 millones de personas)

Fuente: UNAIDS, 2016.

Adults and children estimated to be living with HIV | 2015

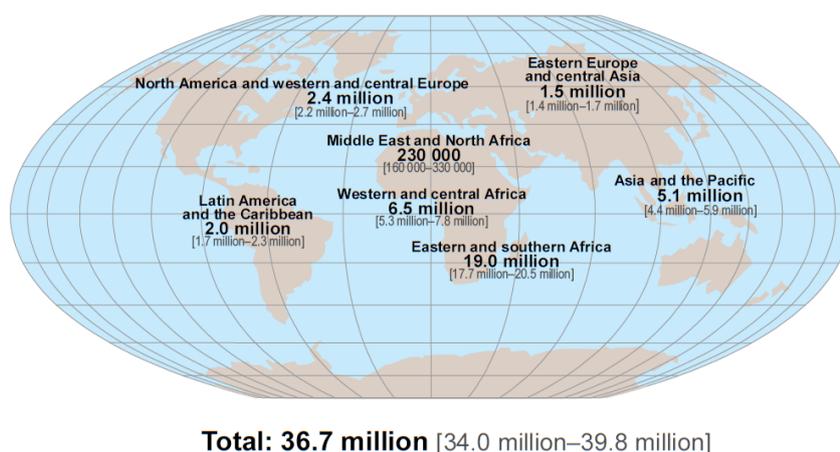


Figura 2. Se muestra la distribución mundial de adultos y niños que se estiman que se encuentran infectados por HIV.

Fuente: UNAIDS, 2016.

África sub-Sahariana es la región del mundo donde la epidemia es más devastadora y su impacto sigue creciendo (**Tabla 3; Figuras 3, 4**). De los 36,7 millones de personas HIV positivas, aquí se encuentran el 70 % de los casos (25,6 millones de personas) y se han dado el 80 % de las muertes causadas hasta el momento por esta epidemia. Su prevalencia media es de 8,8% en la población adulta (15-49 años), siendo en algunos países de esta región la prevalencia en adultos superior al 20%.

	Prevalencia adulta (15-49 años) [%]
África sub-sahariana	5,0 %
África norte y este	0,2 %
Asia sur y sur-este	0,3 %
Asia este	0,1 %
Suramérica central	0,5 %
Caribe	1,0 %
Europa este y Asia central	0,8 %
Europa central y oeste	0,2 %
Norteamérica	0,5 %
Oceanía	0,3 %
Total	0,8 %

Tabla 3. Tabla de distribución mundial de la prevalencia adulta de SIDA. Se muestra como la prevalencia más elevada es en África Sub-Sahariana (5%).

Fuente: UNAIDS, 2009.

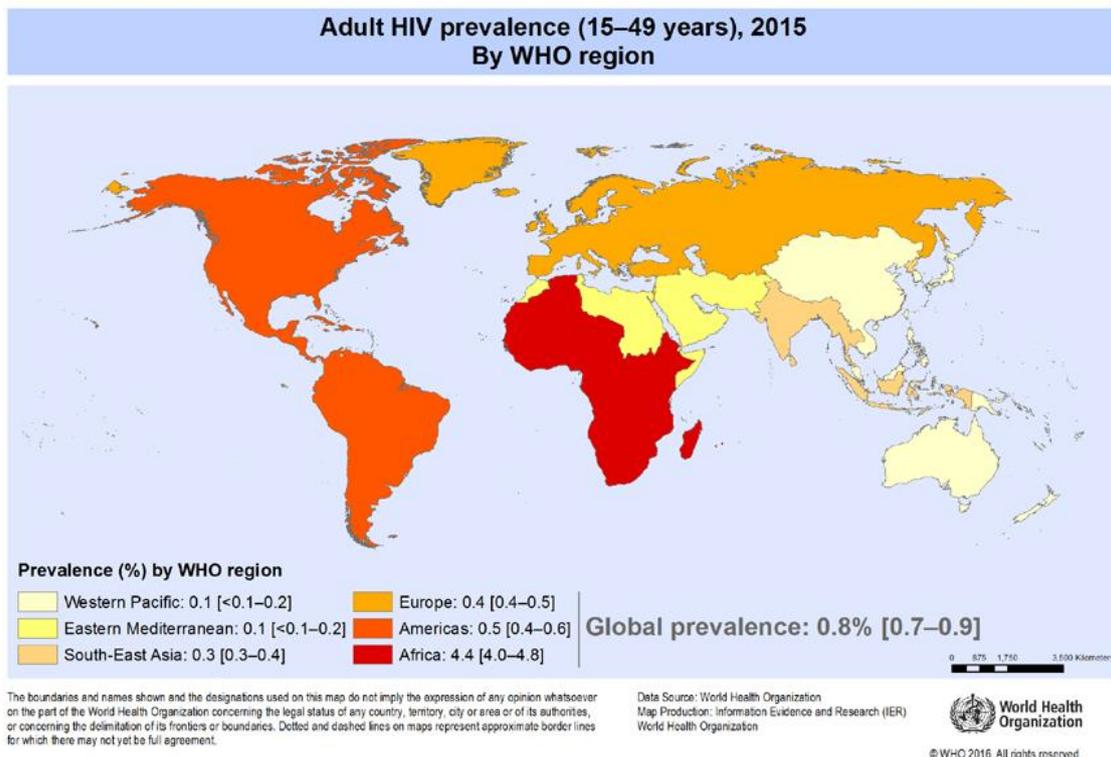


Figura 3. Se muestra la prevalencia mundial en adultos del SIDA. Se ve la distribución (en porcentajes) en todo el mundo y como África es la más afectada.

Fuente: Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016.

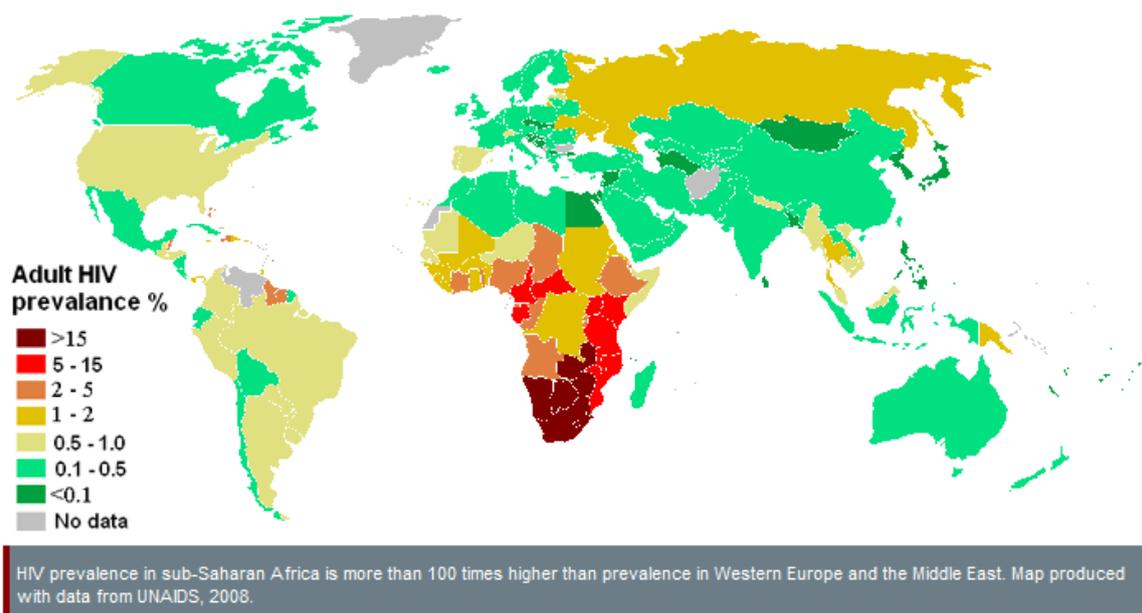


Figura 4. Se muestra la prevalencia mundial en adultos del SIDA. Se ve la distribución (en porcentajes) en todo el mundo y como la zona de Sudáfrica es la más afectada.

Fuente: <https://genderedinnovations.stanford.edu/case-studies/hiv.html#tabs-2>

La transmisión vertical de madre a hijo se estima que ocurre entre el 15 y el 25% de los partos de madres HIV-positivas. La transmisión puede ocurrir en el útero (como 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) o posnatalmente a través de la leche materna. En más del 80% de los casos, se produce por contaminación en el parto. En países desarrollados 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 zonas más afectadas como África sub-Sahariana, el HIV ha reducido la esperanza de vida que había aumentado. 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.

Datos de 2006 indican que de los 49 millones de habitantes de Sudáfrica, 5,7 millones están infectados con HIV, lo que lo convierte en el país con mayor número de casos. Todo esto conlleva graves implicaciones sociales y económicas.

2. Clasificación

Tanto el HIV-1 como el HIV-2 son virus RNA que pertenecen a la familia *Retroviridae*; género lentivirus. Son virus citopáticos pero no oncogénicos.

Dentro de las cepas del HIV-1 existen a su vez tres grupos genéticos distintos: el M (“mayor”, mayoritario), el O (“outlier”, altamente divergente o atípico) y el N (“non-M, non-O”). Es muy probable que estos grupos sean el resultado de tres transmisiones independientes de virus SIV de chimpancés a poblaciones humanas. Es decir, no son el resultado de una evolución del virus.

Los virus de **grupo M** se encuentran distribuidos por todo el mundo, mientras que los virus del **grupo O** (altamente divergentes) se han aislado en África, Alemania, Francia y otras partes de Europa. Por último, el **grupo N** (que hasta ahora solo 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. La recombinación entre genomas de virus es bastante frecuente (**Figura 5**).

El grupo M se divide a su vez en nueve subtipos genéticos o “clades” (A, B, C, D, F, G, H, J y K). Estos subtipos se establecen en base al grado de divergencia entre los genes gag y env.

La divergencia en la secuencia de aminoácidos de los virus de los diferentes “clades” puede llegar a ser del 35%, en el caso de la proteína env, y hasta un 20% dentro de un mismo “clade” o subtipo.

Todos los subtipos genéticos provienen de un mismo aislado, es decir, de un evento de transmisión a humanos y, a partir de esta transmisión se han diversificado. Estudios filogenéticos han establecido que el origen de todos los “clades” provienen de un ancestro común que se originó alrededor de 1920. 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.

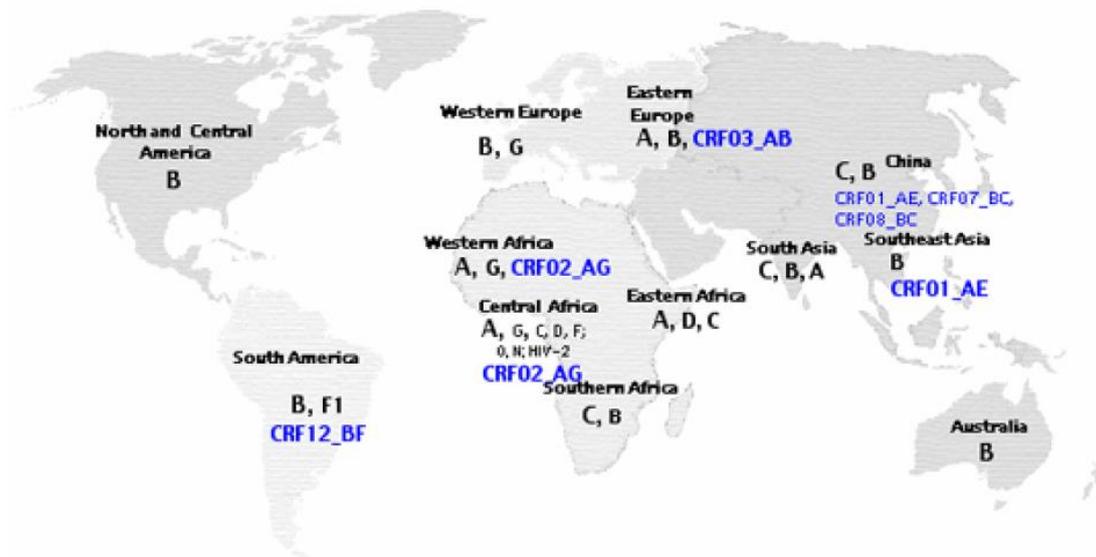


Figura 5. Distribución geográfica de los distintos subtipos (“clades”) del grupo M de HIV-1. El clade B es el más común en Europa y América del Norte, mientras que el C es el más predominante en África. En azul se muestra la distribución de formas recombinantes que circulan en la población y que son el resultado de la recombinación de subtipos definidos.

3. Composición del virus

La partícula viral (virión) del HIV tiene un tamaño de entre 100 y 150 nm de diámetro, con un “core” o centro cilíndrico electrodensito en donde se encuentra la información genética. Este “core” está rodeado por una membrana lipídica adquirida cuando el virión brota desde la célula infectada (**Figura 6**).

El núcleo (“core”) contiene dos copias de RNA de cadena sencilla, cada una con un genoma viral completo.

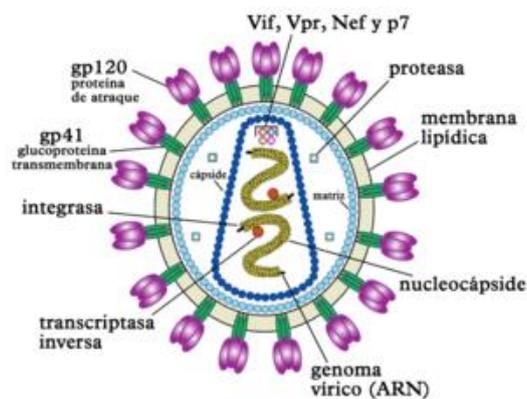


Figura 6. Estructura del virión de HIV, con las dos moléculas de RNA correspondientes, la matriz y sus proteínas y la membrana lipídica (incluyendo gp 120 y gp41).

Fuente: Obtenido de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:800px-HIV_Viron_es.png

Ese genoma viral tiene una longitud de unas 10 kb y presenta la organización típica de los retrovirus. El genoma viral está flanqueado por dos repeticiones terminales largas (LTR) en los extremos 5' y 3'. La secuencia del genoma viral esta formada por los genes clásicos de retrovirus: gag, pol y env.

Gag codifica componentes estructurales de la partícula viral (como MA, proteína de la matriz o NC ,de la nucleocápside), mientras que pol contiene enzimas virales como retrotranscriptasa, proteasa o integrasa, y env a su vez tiene los genes codificantes de la envuelta (glicoproteína de superficie gp120, proteína transmembrana gp41) (**Figura 7**).

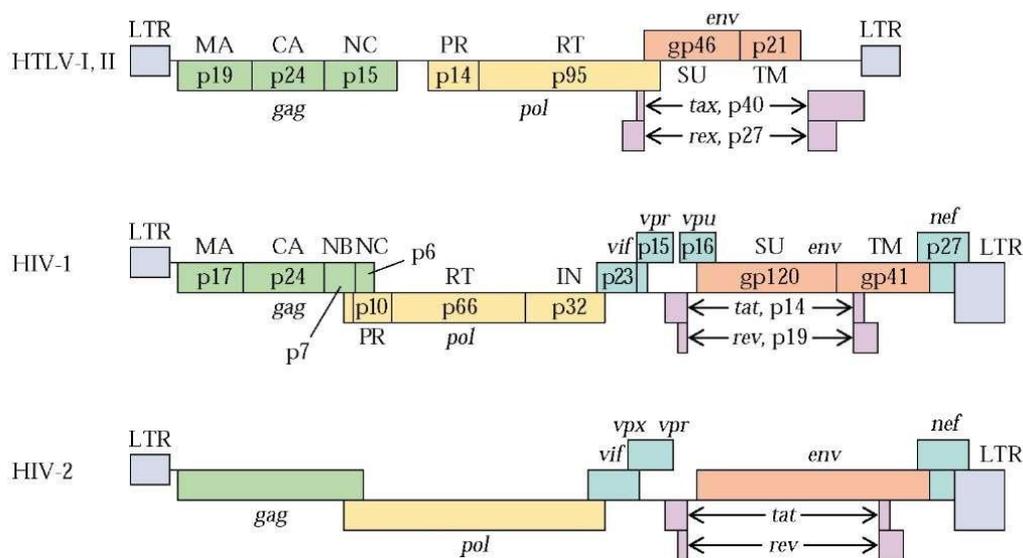


Figura 7. Estructura del genoma vírico con los genes gag, pol y env, tanto en HIV-1 como en HIV-2.

Fuente: <http://what-when-how.com/acp-medicine/human-retroviral-infections-part-1/>

Pero además de los genes habituales en retrovirus, el HIV presenta otros genes adicionales:

- **tat.** Activador de la transcripción, se une a un bucle del RNA que normalmente bloquea la transcripción aumentándose así la síntesis de mRNA.
- **rev.** Regulador transcripcional a nivel de la salida del mRNA al citoplasma. Rev ayuda en la exportación al núcleo de la mRNA con intrones y aumenta su traducción en el citosol.
- **nef.** Bloquea la presentación de péptidos por MHC-I e interacciona con CD4, marcándolo para su degradación.
- **vif.** Bloquea la actividad de la proteína APOBEC 3G, que se inserta en la partícula en proceso de maduración provocando errores de replicación.
- **vpr.** Proteína reguladora que detiene la proliferación celular.
- **vpu.** Se ancla en la célula infectada y tiene función reguladora. Sin ella se pierde eficacia en la maduración del virus. Solo está presente en HIV-1, en HIV-2 encontramos una proteína similar, **vpx**.

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 (**Figura 8**).

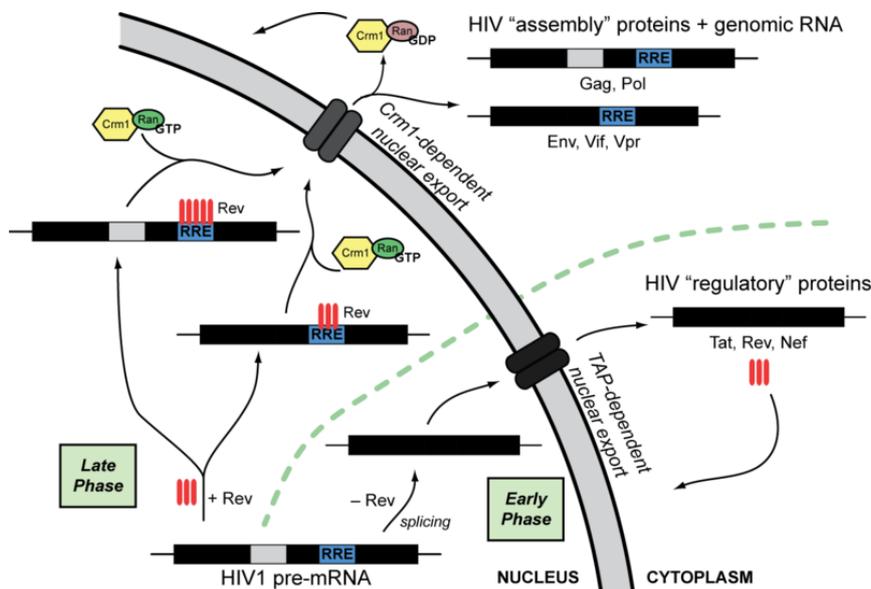


Figura 8. Proteínas exclusivas del HIV, y modo de actuación de algunas de ellas.

Fuente: Obtenido de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rev-mediated_HIV_mRNA_transport.png

El principal producto del gen env es un polipéptido de unos 88 kDa (**Figura 9**). Este polipéptido sufre una serie de glicosilaciones (principalmente del tipo N) en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi que aumentan su peso molecular hasta unos 160 kDa (el doble de peso molecular). Esta molécula, ya glicosilada, se conoce como gp160. En el propio retículo, la proteína se ensambla formando trímeros que serán exportados a la membrana plasmática.

Durante ese transporte, actúa una serin-proteasa celular que partirá a la proteína gp160 para generar las subunidades de membrana (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.

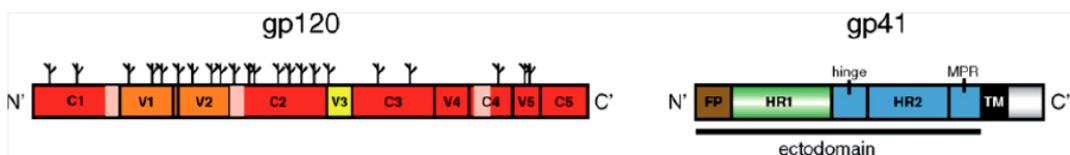


Figura 9. gp120 y gp41, productos del gen env. Podemos distinguir los distintos dominios de cada proteína.

Fuente: Adaptado de Tilton (2010).

La subunidad **gp120** está implicada en el anclaje, la unión al receptor CD4 y al correceptor. Presenta cinco dominios variables (V1-V5) y otras cinco más conservadas (C1-C5). Los dominios conservados contienen los dominios críticos para la interacción con las células, mientras que los dominios variables se localizan en zonas más externas de la proteína. De hecho, las regiones V1-V4 forman una especie de lazos (“loops”) que se anclan entre ellas mediante puentes disulfuro. Estos lazos variables, junto a los sitios de glicosilación, dan lugar a 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.

La subunidad **gp41** de Env constituye la maquinaria molecular responsable de la fusión de membranas. La proteína tiene un dominio extracelular o ectodominio (que contiene un péptido fusogénico muy hidrofóbico que facilita la fusión, y los dominios HR1 y HR2 importantes para el proceso de fusión), un anclaje transmembrana y 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 “spike-and-knob” (pincho-botón). Se estima que existen 72 trímeros por virión.

4. Biología

4.1 Estrategia de replicación

La adhesión a las células diana y la entrada del HIV-1 requiere la presencia de dos proteínas en la superficie celular: el receptor CD4 (permite el anclaje, no la entrada) y los receptores de quimioquinas (Figura 10).

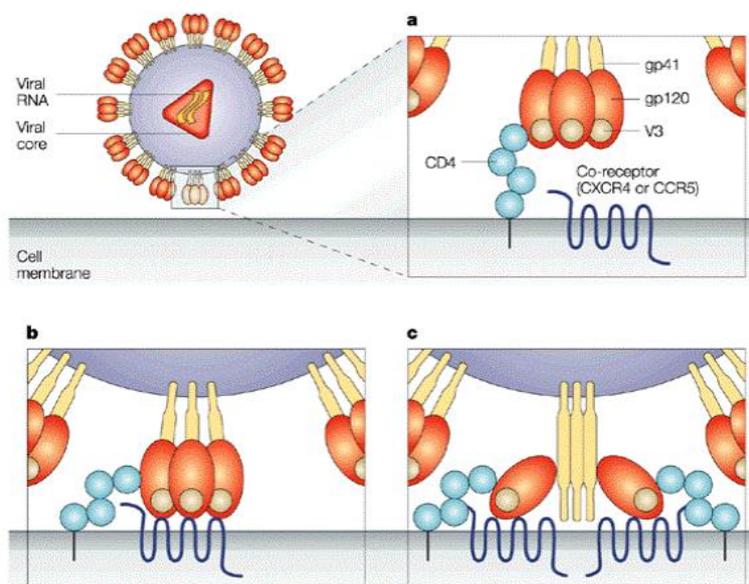


Figura 10. Anclaje y entrada del HIV. Esta figura ilustra cómo se produce el proceso de adhesión y entrada del HIV-1 en la célula hospedadora. Este proceso está mediado por la interacción entre la proteína gp120 con el CD4 y el correceptor correspondiente, y la proteína gp41.

Fuente: Adaptado de Erik de Clercq (2003).

En primer lugar, la interacción entre la glicoproteína gp120, de la cubierta del virus, y CD4 va a mediar el anclaje del virus a la célula diana. A partir de dicha interacción se producen una serie de cambios conformacionales en la superficie del virus que permiten la fusión de la envuelta con la membrana celular y la penetración del virus en la célula hospedadora. Posteriormente, el complejo ribonucleoproteico es liberado en el citoplasma.

Existen dos copias idénticas del genoma retroviral. La conversión del RNA vírico a DNA es llevada a cabo por las actividades coordinadas de la 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. El tRNA-Lys celular se une a un sitio específico del genoma retroviral denominado "Primer Binding Site" (PBS) para iniciar la síntesis del DNA por la RT. La ribonucleasa H degrada selectivamente el molde de RNA original. El resultado final de la síntesis por RT es una molécula de DNA de doble cadena (denominada "DNA proviral") a partir de las dos moléculas de RNA genómico.

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). En la mayoría de los retrovirus, el complejo provirus-integrasa es demasiado grande y no puede atravesar los poros de la membrana nuclear, por lo que sólo llega al núcleo cuando las células se están dividiendo. Sin embargo, en el caso del HIV, la proteína Vpr permite el paso del complejo a través de la membrana nuclear. Este paso a través de la membrana nuclear es llevado a cabo por la maquinaria de importación nuclear.

Después de la translocación al núcleo, el DNA linear de doble cadena se integra directamente en el cromosoma del hospedador por acción de la enzima integrasa. 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. El proceso de integración no requiere el aporte de energía adicional.

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, que codificarán para elementos estructurales de la cápsida o enzimas virales.

El gen *env* es traducido por ribosomas asociados al retículo endoplasmático. La proteína sintetizadas se transporta a través del aparato de Golgi donde se glicosila y, aproximadamente, dobla su tamaño. Esta glicoproteína se denomina gp160 y será procesada por una proteasa para formar la glicoproteína de superficie gp120 y la proteína transmembrana gp41, pero ambas permanecen unidas estructuralmente (esencial para la infectividad del virus). Estas proteínas maduras se transportan a la superficie de la célula infectada.

El ensamblaje del núcleo del virión compuesto del RNA genómico, proteínas modificadas del virus y enzimas, tiene lugar en la membrana plasmática (**Figura 11**). 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). En adición a los componentes codificados por el virus, los viriones también incorporan otras proteínas no virales, como antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y ciclofilina. No se conoce el papel, si es que tienen alguno, que estos factores pueden desempeñar en el ciclo de replicación. Para completar la gemación, el virus secuestra la maquinaria de transporte vesicular de la célula. De hecho, el estudio de la biología del HIV ha supuesto 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.

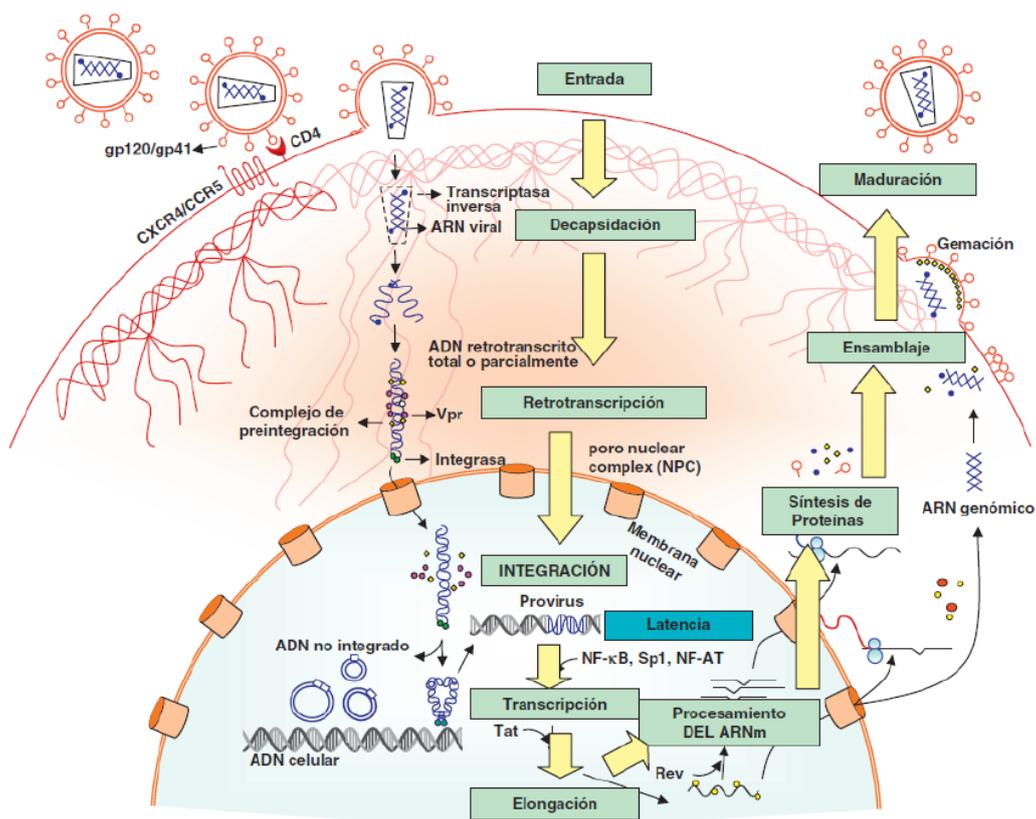


Figura 11. Ciclo biológico del HIV. La figura muestra el ciclo replicativo del HIV-1. (1) Las proteínas gp120 y gp41 van a mediar la adhesión y entrada del virus. (2) La cápsida del virus es liberada en el citoplasma de la célula diana. (3) Una vez en el citoplasma, el contenido de la cápsida (integrinas, proteasas, 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.

Fuente: Alcamí & Coiras (2011).

5. Patogénesis

En la gran mayoría de los individuos, la infección por HIV-1 resulta en una pérdida gradual aunque sostenida de linfocitos T CD4+. A consecuencia de esto, se desarrolla una disfunción inmunológica que facilitará la aparición de infecciones oportunistas, lo cual se considera el sello característico 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.

A pesar de la variación en la velocidad de progresión clínica, la infección con HIV progresa comúnmente en tres etapas (**Figura 12**):

- Infección primaria o fase aguda
- Infección clínicamente asintomática o fase crónica
- Progresión sintomática de la enfermedad

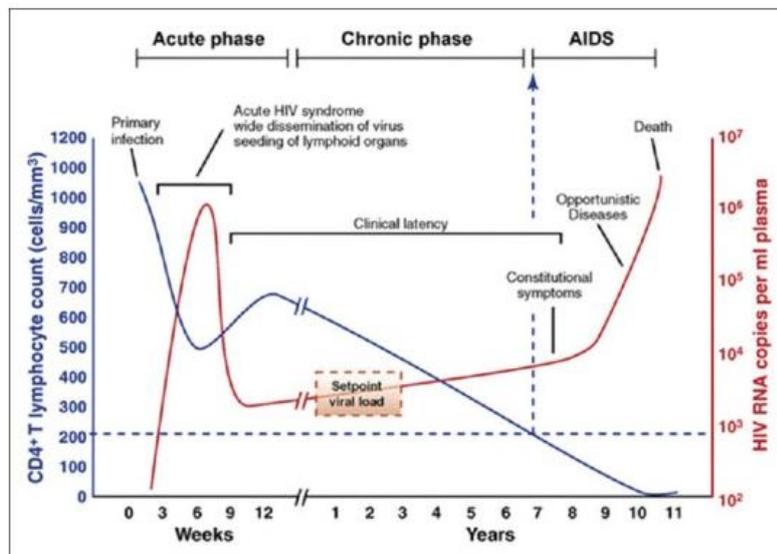


Figura 12. Resumen del curso de la patogénesis del SIDA. Se distinguen las tres fases de la patología: fase aguda, fase crónica y fase enfermedad. También se muestran la destrucción progresiva de células T CD4+ a lo largo del desarrollo de la enfermedad y el progreso de carga viral con el tiempo.

Fuente: Munawwar y Singh (2016).

Un principio importante que no se debe olvidar es que, durante la infección por HIV-1, la replicación del virus es continua a lo largo de 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 10^7 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 los de la gripe, incluida su característica fiebre.

La resolución de la fase aguda ocurre en pocas semanas tras la exposición al virus y está asociada con el desarrollo de anticuerpos específicos de HIV-1 y seroconversión. Los niveles de HIV-1 en la circulación también decrecen drásticamente durante este periodo, lo que sugiere que los mecanismos inmunitarios del hospedador controlan eficientemente la replicación del virus y disminuyen la carga viral.

El control de la viremia HIV-1 durante la infección primaria requiere de las respuestas humoral y celular del sistema inmunitario. Los anticuerpos frente a HIV-1 pueden contribuir a reducir los niveles de virus circulantes, bien directamente a través de la neutralización del virus, o indirectamente a través de la formación de inmunocomplejos que serán posteriormente limpiados por el sistema retículo-endotelial.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de HIV-1 pueden actuar eliminando células infectadas por HIV y suprimiendo 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 el contrario, los anticuerpos capaces de neutralizar la infectividad de HIV-1 aparecen más tarde, cuando los niveles del virus han bajado significativamente en 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 10^3 a 10^5 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 10^5 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 10^3 copias/ml se asocian a un curso clínico más estable (**Figura 13**).

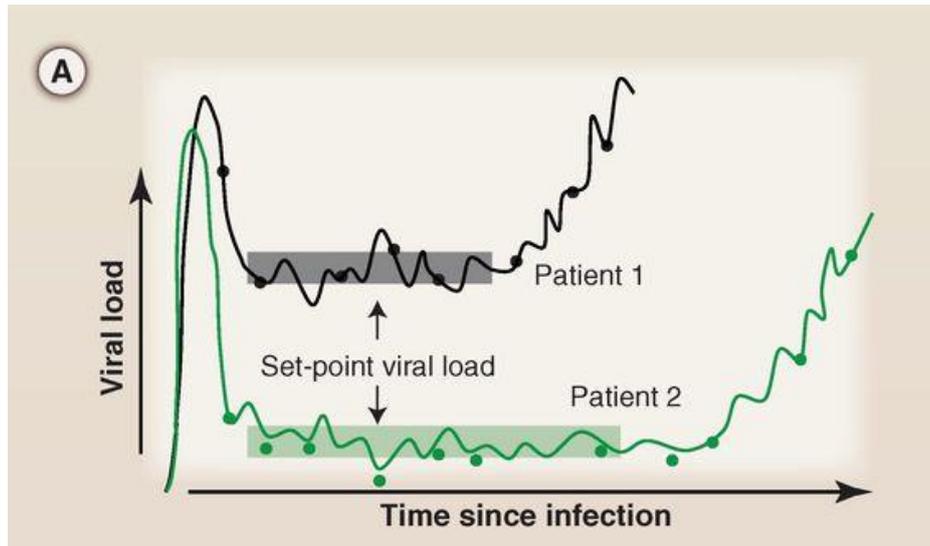


Figura 13. Duración de la estabilidad tras la fase aguda en función de los niveles estacionarios de HIV-1 en el plasma después de la infección primaria).

Fuente: <http://science.sciencemag.org/content/sci/343/6177/1243727/F1.large.jpg>

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 10^3 - 10^6 copias/ml. 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 10^9 viriones son producidos y retirados de la circulación por día en una persona infectada.

Se estima que alrededor de 10^8 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 (estado de enfermedad). Téngase en cuenta que en personas normales existen alrededor de 1000 células T CD4+ por microlitro de sangre (**Figura 14**).

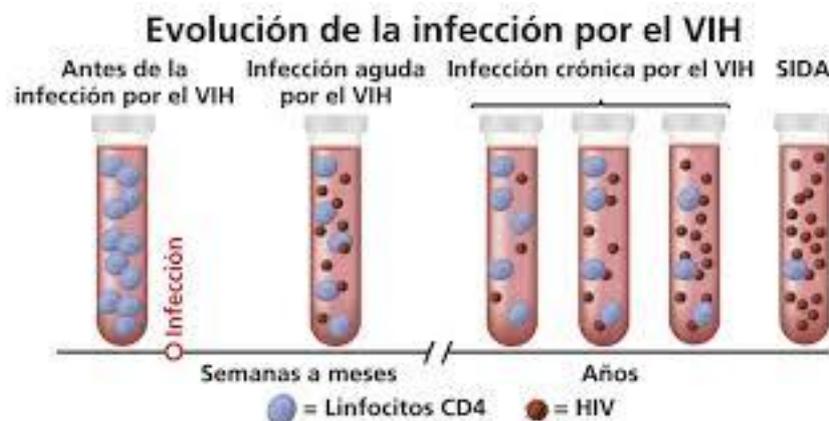


Figura 14. Cantidad de Linfocitos T CD4 y partículas virales de HIV presentes en cada una de las fases de la infección.

Fuente: <https://infosida.nih.gov/education-materials/fact-sheets/19/46/las-fases-de-la-infeccion-por-el-vih>

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+ disminuyen 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 hiper-gammaglobulinemia y producción de elevadas cantidades de auto-anticuerpos.
- La actividad citotóxica de las células NK ("natural killer") está disminuida.
- La actividad de las APC ("antigen-presenting cells") está deteriorada o es aberrante.

De forma adicional, 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 la combinación de un virus debilitado acoplado con una respuesta inmunitaria fuerte, lo que 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. Aunque no se podía descartar la existencia en las células no humanas de un factor inhibidor de la fusión.
- 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. 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 (1996), quedó claro que la clave del tropismo y entrada del HIV-1 estaría en la identificación de moléculas correceptoras.

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, 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 (**Figura 16**). Esta proteína, denominada “fusina” funcionaba 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.

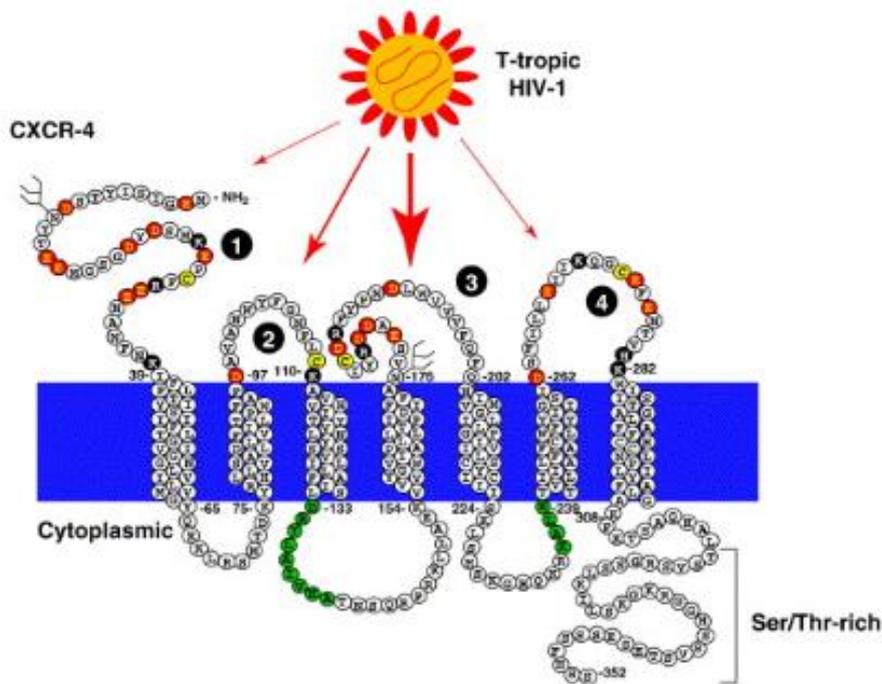


Figura 16. Secuencia primaria y topología de membrana de CXCR4. Se destacan ciertos residuos de los dominios extracelulares, incluyendo cisteínas (amarillo), residuos ácidos (rojo), residuos básicos (negro) y sitios modificables por N-glicosilación (estructuras ramificadas). Dominios implicados en la 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)
- Las quimioquinas CC (en las que las dos primeras cisteínas están adyacentes).

Por otro lado, Cocchi et al. en 1995 encontraron que ciertas quimioquinas CC (tales como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β) eran potentes inhibidores de la infección de cepas HIV-1 M-trópicas pero no de las CTL-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).

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).

6.2. Modelo para explicar el tropismo de HIV-1.

En la figura se muestra el modelo más sencillo para explicar el tropismo del virus HIV-1 (**Figura 17**).

- Las cepas de HIV-1 CTL-trópicas utilizan el correceptor CXCR4, por lo que se les denomina como cepas X4. Las líneas celulares T sólo expresan CXCR4.
- Las cepas de HIV-1 M-trópicas prefieren el correceptor CCR5, y se les asigna el nombre de cepas R5. Los macrófagos sólo expresan CCR5.
- Las cepas de tropismo dual, pueden infectar a macrófagos y las líneas celulares T, pues usan CXCR4 y CCR5 como correceptores. Son claves en la evolución de la patología, se cree que son intermedias en el proceso de evolución de las cepas M-trópicas a las T-trópicas. Estas cepas de tropismo dual se denominan cepas R5X4.

Las células T primarias tienen ambos tipos de receptores, CXCR4 y CCR5, de forma que pueden ser infectadas tanto por cepas T-trópicas como por M-trópicas.

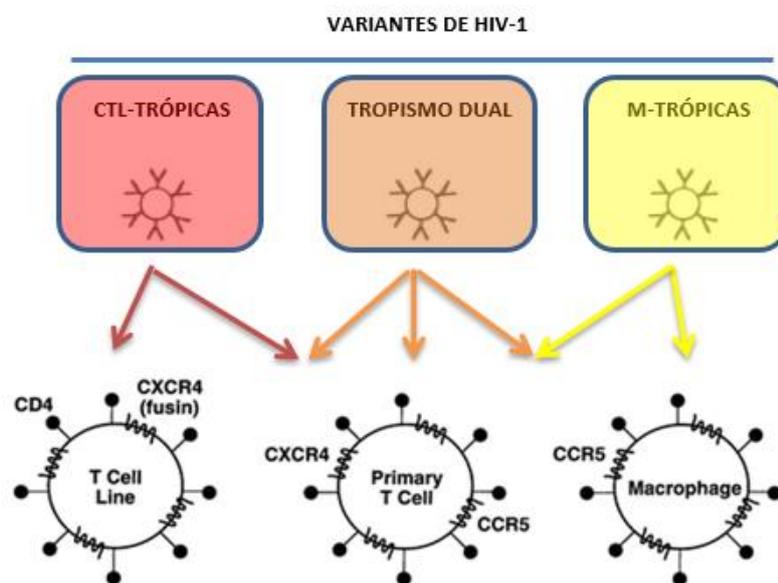


Figura 17. Modelo de funcionamiento del co-receptor del HIV-1 y su tropismo.

Fuente: Adaptación de Berger et al. (1999).

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

La entrada de HIV es un proceso complejo (**Figura 18**). La primera etapa es la unión de la molécula CD4 a gp120. 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 de alta afinidad al correceptor. 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 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 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 18**).

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.

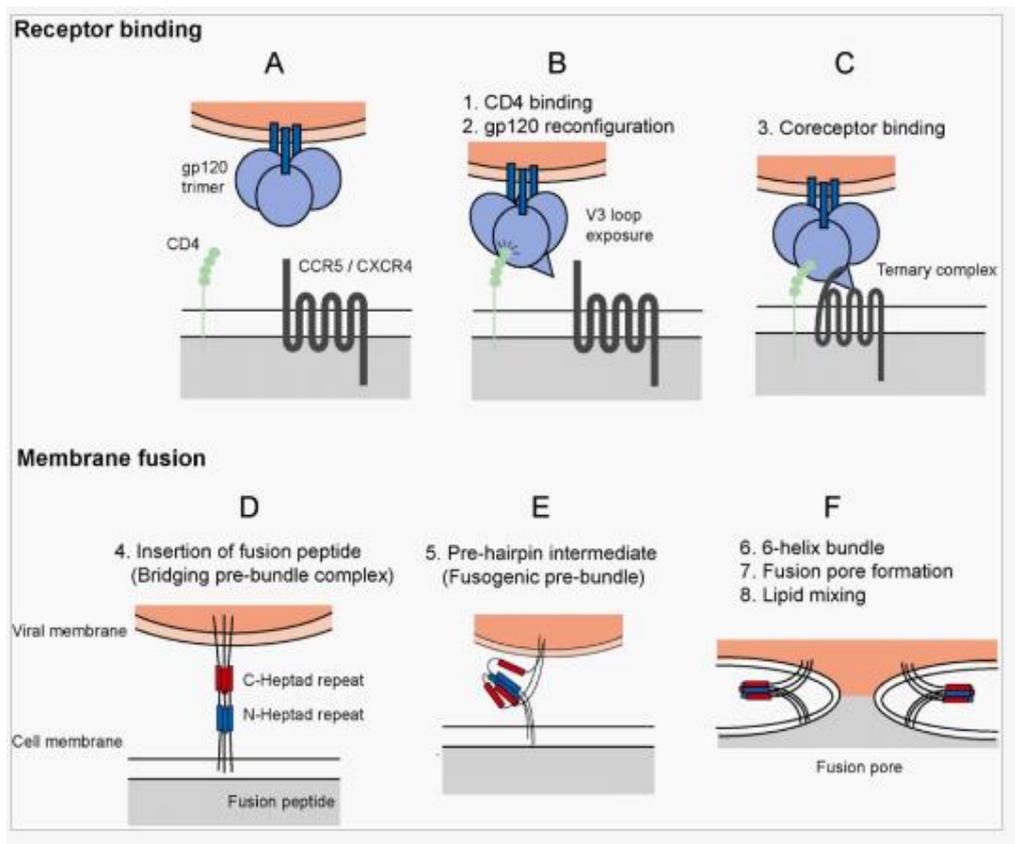


Figura 18. Modelo de unión a receptor y fusión de membranas del HIV-1.

Fuente: Lobritz et al. (2010).

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 finales de la enfermedad (**Figura 19**). 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.

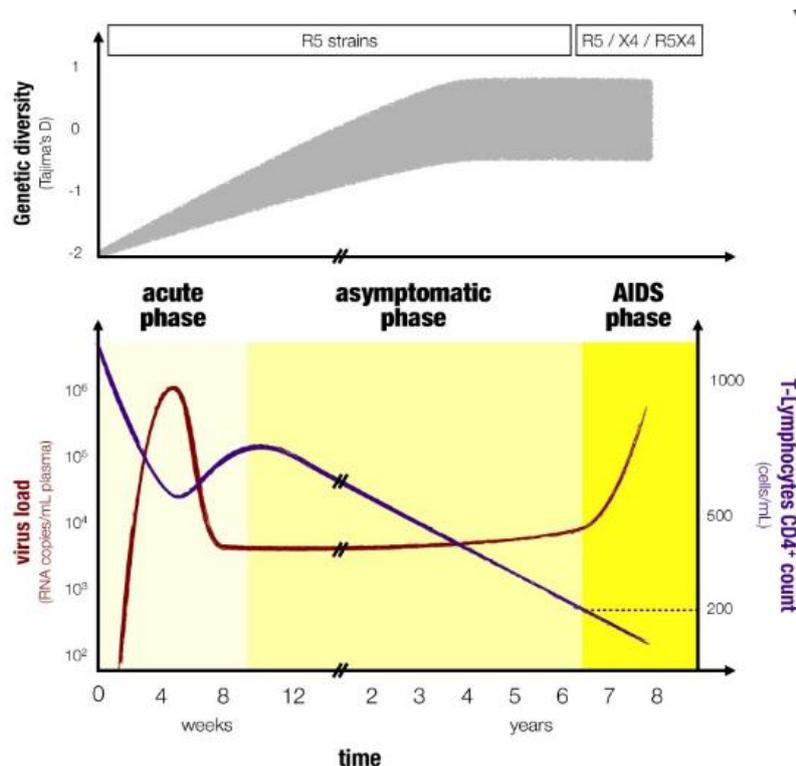


Figura 19. Curso típico de una infección por HIV-I. El panel superior muestra la diversidad genética de las cepas R5 o X4 a lo largo de las distintas etapas de la infección. El panel inferior muestra la dinámica de la infección del HIV-I, como ya se explicó en la Figura 12.

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. 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.

En la transmisión por vía sexual, la primera diana del virus es el sistema linfóide 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 grandes cantidades de su ligando, la quimioquina SDF-1, induciéndose así 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 deleción 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 los 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 indican 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 (**Figura 20**).

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 tirosinquinasa 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 (**Figura 21**).

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.

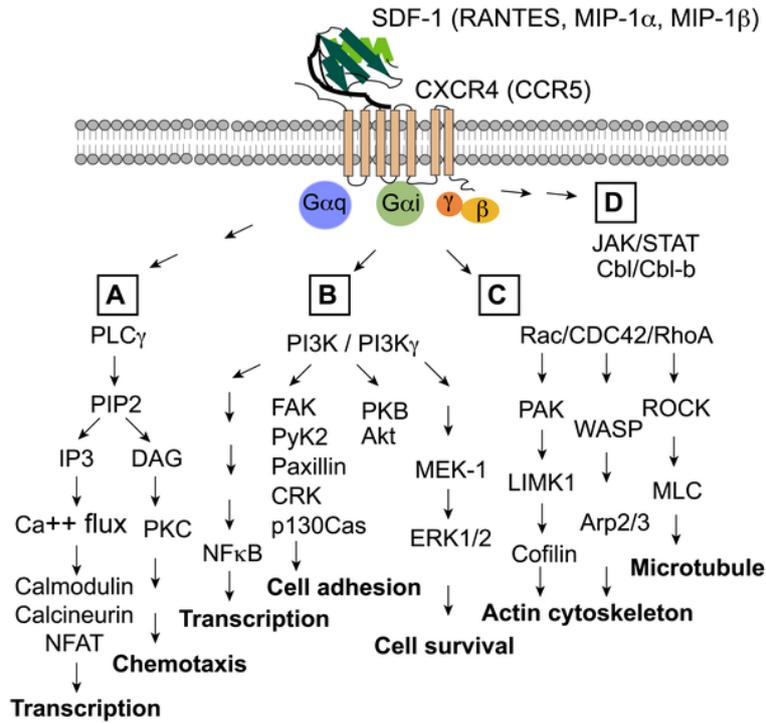


Figura 20. Vía de señalización del receptor de quimioquinas CXCR4. A) Vía de señalización de PLC γ que desemboca en la activación de la transcripción y la quimiotaxis. B) Vía de señalización de PI3K/PI3K γ que desemboca en una activación de la transcripción, aumento de la adhesión celular y de la supervivencia 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).

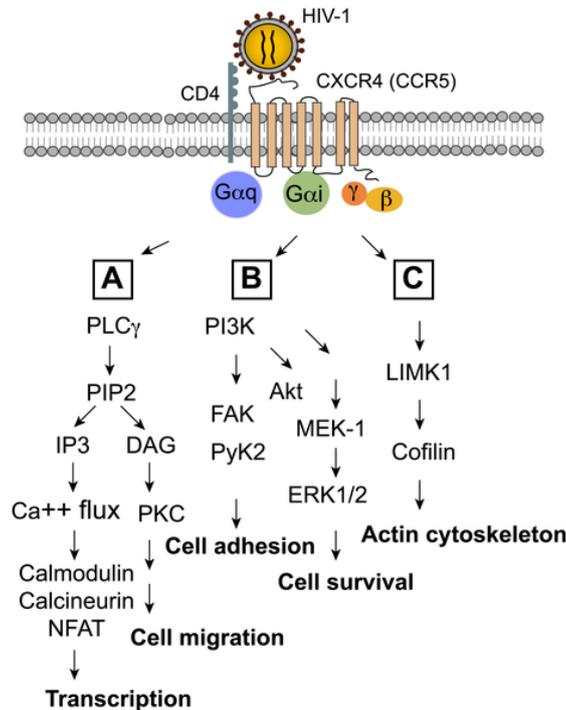


Figura 21. Componentes de la vía de señalización del co-receptor de quimioquinas (CXCR4 o CCR5) al interactuar con gp120 de la superficie del HIV-1. A) Vía de señalización de PLC γ que activa la transcripción y la migración celular. B) Vía de señalización de PI3K, que activa la adhesión y supervivencia 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:

7.1 Efectos sobre linfocitos T:

La principal ruta de transmisión del virus es a través de las relaciones sexuales. A partir de estudios en macacos con el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) se ha conseguido mucha información acerca de los primeros eventos que se producen en el proceso de infección. El proceso sería tal que así:

- Las primeras células blanco del virus que se detectan son los linfocitos T CD4+ de memoria que expresan el receptor CCR5 (correceptor para el virus).
- Una semana post-infección, el virus se detecta en los nódulos linfáticos, adonde parece ser transportado por células dendríticas (DC) y células de Langerhans, células muy abundantes en los epitelios, punto de entrada del virus.
- Se produce una masiva producción de los virus 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 del virus se detectan en los órganos linfoides GALT.

Se ha visto que el VIH tiene un efecto importante a nivel de los enterocitos, por ejemplo, la proteína Tat tiene un efecto inhibitor de la entrada de glucosa en las células, y por otro lado la gp120 puede producir aumento de calcio que se asocia a despolimerización de tubulina y descenso de la habilidad de los enterocitos de mantener el balance iónico.

Es en estos órganos dónde 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 (mediados probablemente por 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.

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 (**Figura 22**).

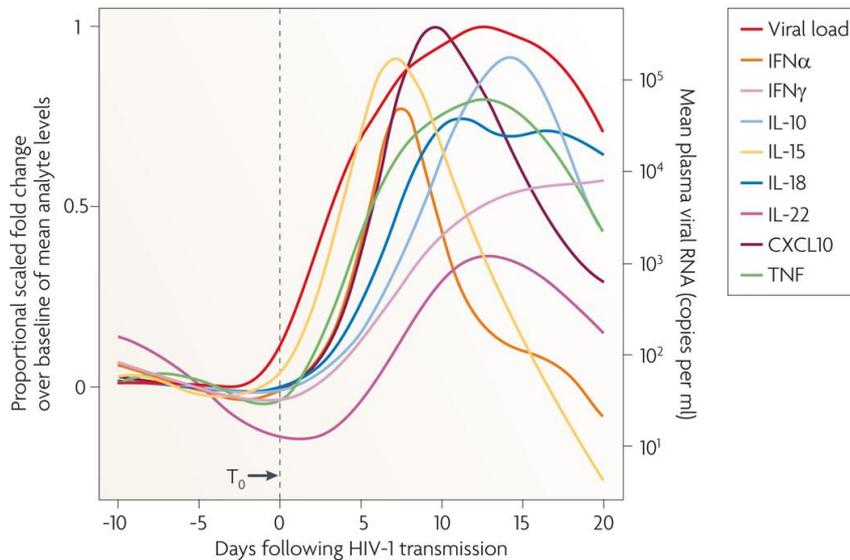


Figura 22. Cinética de ciertas citoquinas durante la infección aguda de VIH. Se observa una primera oleada con IFN α e IL-15, y una posterior aparición de TNF, IL-10 e IL-18.

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 SI acaba siendo más fuerte y la infección consigue controlarse en este punto, aunque la depleción de T CD4+ de la mucosa gastrointestinal es más que evidente.

La **Figura 23** muestra una evolución de la pérdida de LT CD4+ en el intestino, mientras que las CD8+ prácticamente no varían:

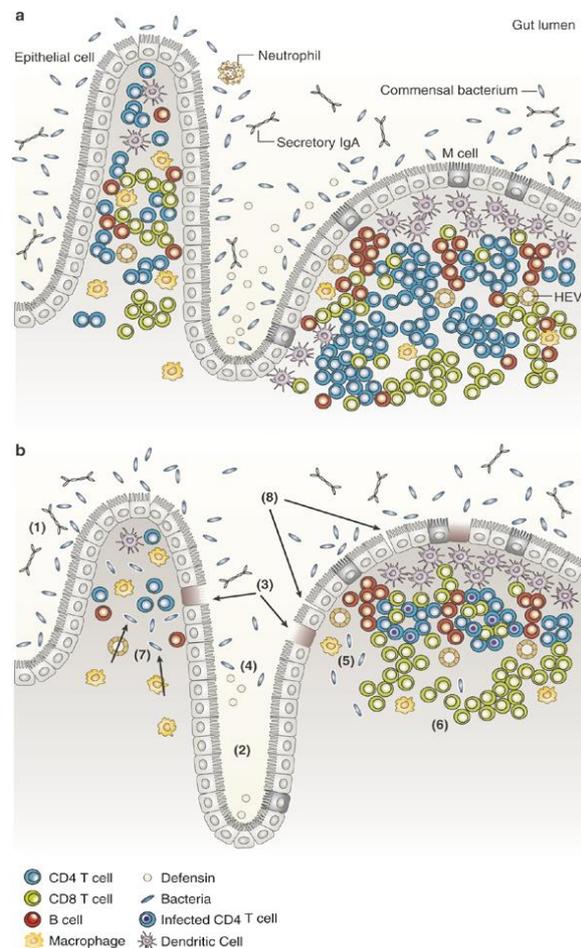


Figura 23. Destrucción del epitelio intestinal y descenso de CD4+ por la acción de VIH.

Fuente: Brenchley et al. (2008).

La carga viral detectada en la sangre periférica alcanza un pico como consecuencia de la replicación explosiva del HIV-1. Este pico de viremia se alcanza alrededor del día 21, llegando a niveles por encima de 100 partículas víricas por mililitro de plasma.

Poco antes de la seroconversión se produce un descenso pronunciado de la viremia, consecuencia, según se piensa, de la aparición de células T CD8+ citotóxicas específicas del 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.

Tenemos otros dos factores que contribuyen al descenso de la viremia.

1) 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.

2) 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 elevada.

Se desconoce todavía 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, 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 en el hospedador.

Algunos ejemplos de estos últimos son el citomegalovirus (CMV), el virus Epstein-Barr (EBV) o los herpes virus. Por el contrario, el HIV-1 es extremadamente nocivo y de una manera paulatina termina deteriorando al sistema inmunitario del hospedador.

Por tanto, la cuestión por resolver es ¿qué tiene el 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 T 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).

No obstante, 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. (**Figura 24**).

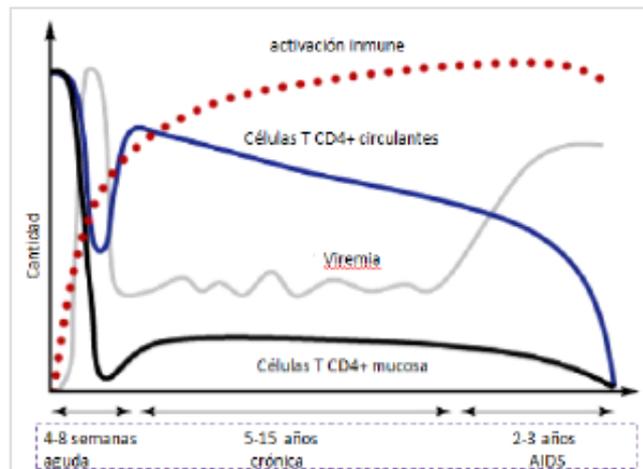


Figura 24. Variación de las poblaciones de linfocitos T CD4+ en el curso de la patogénesis asociada a la infección por HIV1. En el esquema se muestra la evolución y la fuerte depleción de los linfocitos T CD4+ asociados a la mucosa intestinal (línea negra) en relación a la evolución de los linfocitos 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 (**Figura 25**) que provocan la destrucción de CD4+ que antes se comentaban.

- Tenemos los mecanismos que gobiernan la fusión de las membranas celulares, viral y del hospedador, que 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. A pesar de que los sincitios se forman reproduciblemente in vitro y las células infectadas normalmente mueren en pocos días, no está 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. Pero también tenemos otros como la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos de las células infectadas o de células no infectadas que tienen absorbida 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+.

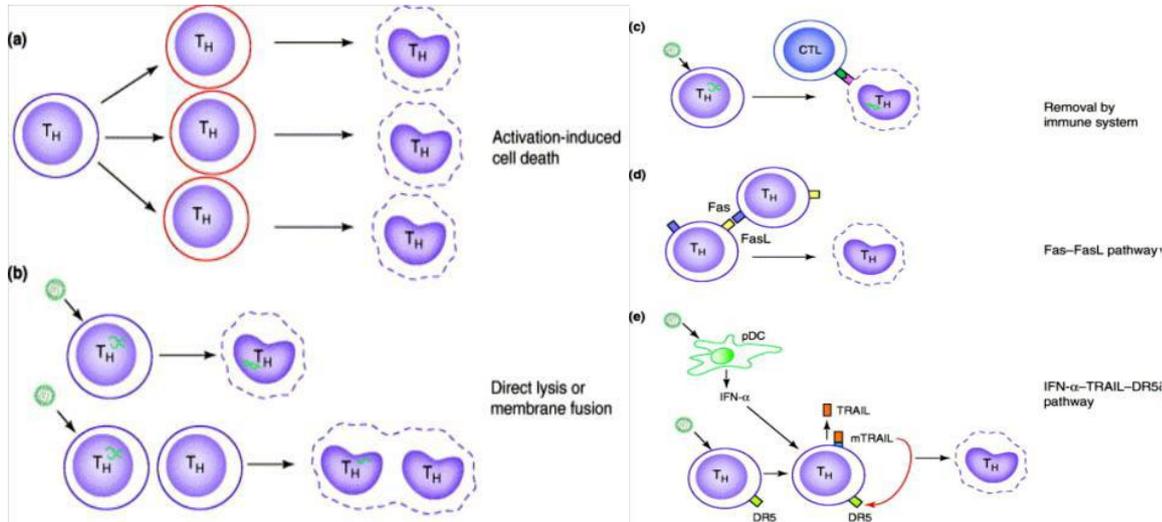


Figura 25.

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 26** 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 lo que vemos en la **Figura 24**: que en apenas 3-4 semanas las T CD4+ de la mucosa intestinal desaparecan.

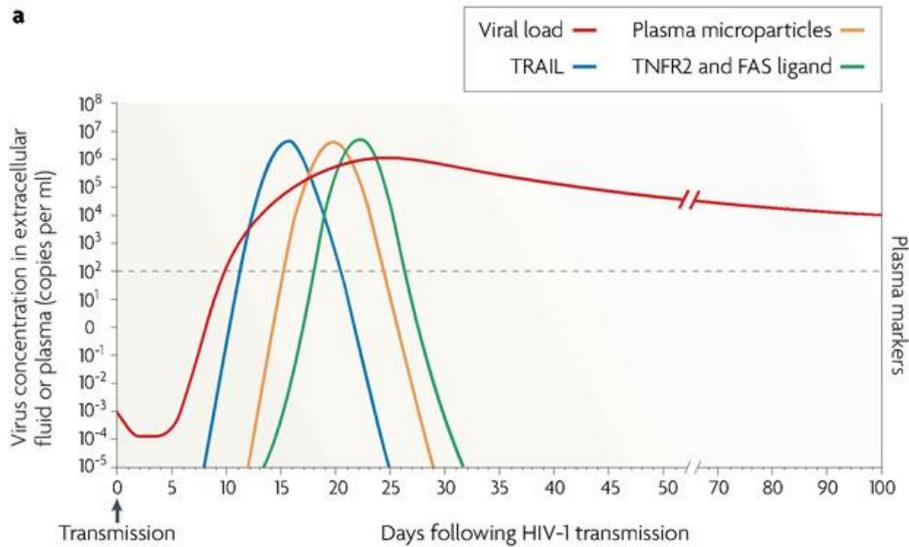


Figura 26. Se observan los picos de expresión de distintas moléculas como TRAIL y FasL durante la infección aguda por VIH. También se muestra la cantidad de virus y la aparición de micropartículas apoptóticas en plasma, mostrando que hay una apoptosis activa.

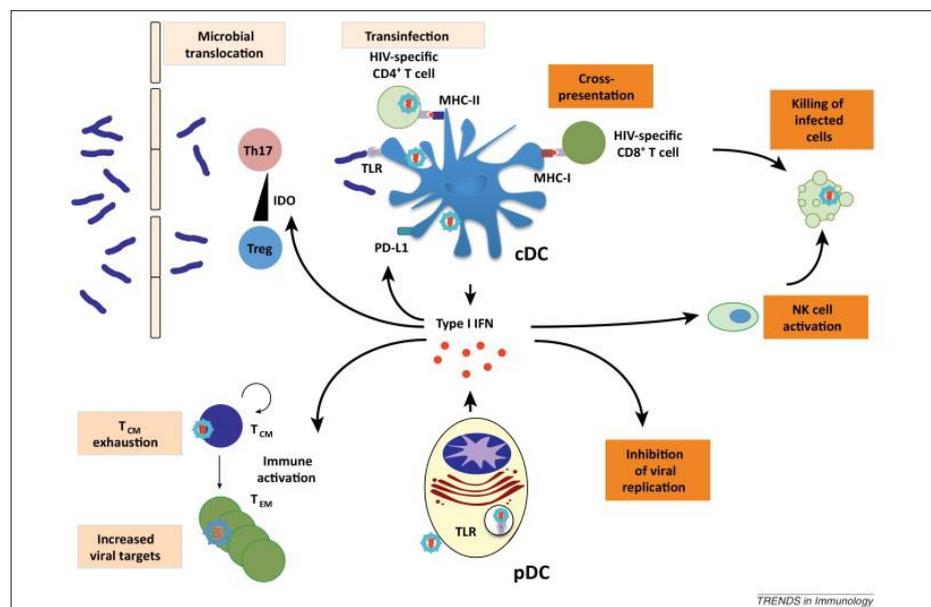
Fuente: McMichael et al. (2009)

7.2 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 $\text{IFN}\alpha$, lo cual parece contraproducente pues es una molécula supuestamente antiviral, pero luego se verá que este $\text{IFN}\alpha$ 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 $\text{IFN}\alpha$ 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 (**Figura 27**).

Figura 27. Acciones desencadenadas desde las DC por efectos del VIH, destacando la producción de $\text{IFN}\alpha$, y posteriormente de IDO como consecuencia de la aparición del primero.

Fuente: Manches et al. (2014).



7.3 Efectos sobre las células NK:

Igualmente, las NK y NKT también se ven afectadas por el virus. VIH ha diseñado estrategias para evitar la aparición de los ligandos de las NK en la superficie de las células infectadas, disminuyendo esta acción del SI innato (**Figura 28**).

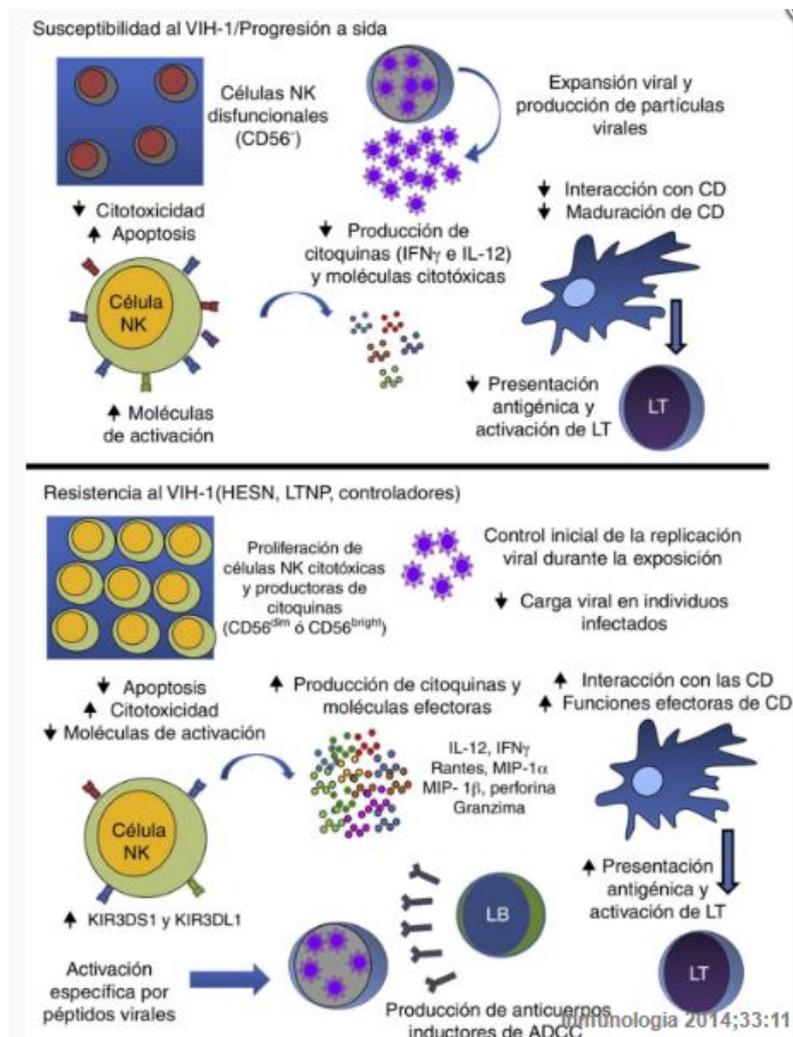


Figura 28. Papel de las células NK durante la infección por el VIH-1. Su papel es fundamental en la respuesta del SI innato ante la infección por el VIH-1. Sin embargo, en los individuos susceptibles al VIH-1 y en aquellos que progresan rápidamente a SIDA, el virus altera la frecuencia y la función de 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).

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.

7.4 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. Según el efecto del virus en este punto se explica que ciertas personas y otras no tardan más tiempo del debido en tener la seroconversión y aparición de anticuerpos adecuados contra el VIH.

Una acción más asociada al VIH sobre los linfocitos B sería la aparición de subpoblaciones de linfocitos B (LB), debido a diversas alteraciones durante su generación producidas por el virus. Se generan nuevos tipos celulares como LB exhaustos, LB inmaduros o plasmablastos (**Figura 29**). Y se disminuyen otras poblaciones destacadas como los LB de memoria.

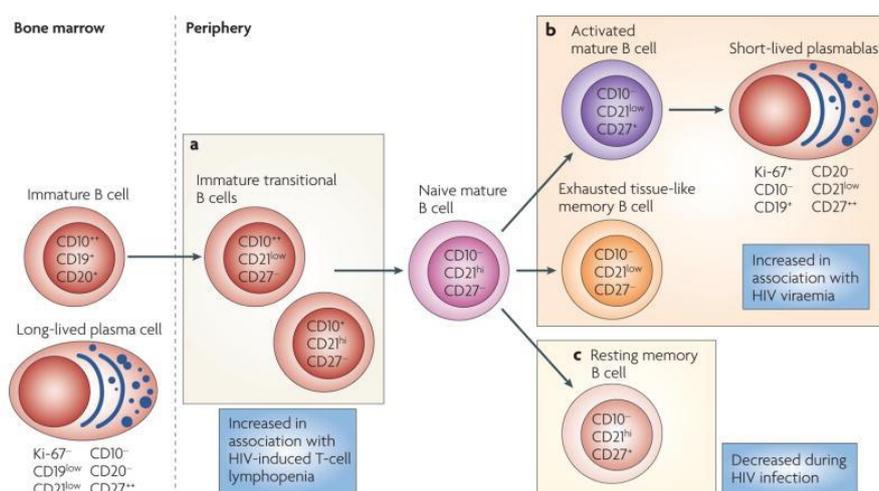


Figura 29. Diferentes subpoblaciones de LB que se ven incrementadas/disminuidas durante las infecciones por VIH.

Fuente: Moir et al. (2009).

Resumiendo, y centrándose en el principal efecto contra los LT $CD4^{+}$, 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

En la infección por HIV es muy importante tener un diagnóstico bueno y fiable. Los sistemas de diagnóstico son los mejores que existen comparados con otras enfermedades. Los costes económicos, sociales y psicológicos causados por falso positivos y falsos negativos para la infección por HIV han empujado a los investigadores y fabricantes a desarrollar tests de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad. No obstante, por definición no existe un sistema de diagnóstico totalmente fiable, y, por tanto, todo método lleva asociada la posibilidad de dar un resultado erróneo.

Para considerar un resultado positivo, se recomienda el uso de tres técnicas con distinto principio antigénico, y siempre para la confirmación una de ellas ha de ser el Western Blot. Las 3 técnicas serían:

- Los test serodiagnósticos ELISA, actualmente se usan de manera masiva para la detección de anticuerpos ante el VIH, sin embargo, poseen el problema de que generan falsos positivos.
- El Western Blot como confirmación y así descartar los falsos positivos.
- La detección del genoma de VIH (DNA proviral, RNA) que complementa al diagnóstico serológico en situaciones complejas. La viremia en sangre se utiliza para el seguimiento de los pacientes infectados por VIH, para decidir el inicio del tratamiento y para comprobar la ineficacia de los antirretrovirales propuestos.

Existen otras pruebas de importancia para distintos objetivos:

- Las de resistencia que se utilizan para guiar el cambio de tratamiento, y para detectar la transmisión de cepas resistentes en los nuevos diagnósticos. Se aíslan los virus y se ponen en cultivos ante distintos fármacos.
- Para determinar el tropismo viral; se pueden utilizar métodos genotípicos, accesibles para los laboratorios de diagnóstico, o fenotípicos, de más difícil acceso. Esto puede ser útil antes de usar tratamientos como los antagonistas de CCR5.
- Las últimas técnicas serológicas denominadas de cuarta generación han conseguido acortar la ventana de diagnóstico a 13-15 días, gracias a la detección del antígeno p24. Antes de la seroconversión podemos detectar la infección positiva por VIH.

8.1 Marcadores de la infección por VIH a tener en cuenta para un primer posible diagnóstico

Antes de la seroconversión se tiene el llamado período ventana: el primer marcador que aparece tras la infección es el RNA del virus que se puede detectar por PCR aproximadamente a las dos semanas de la infección, sobre los 10-12 días. Prácticamente al mismo tiempo se puede detectar el DNA del VIH integrado en el genoma celular (DNA proviral). Por otro lado, el antígeno p24 aparece en suero a los 11-13 días, siendo un buen marcador de infección aguda de VIH.

Los anticuerpos se detectan en el suero a las tres o cuatro semanas de la infección, con una media de 22 días, y su concentración máxima se da a las 10-12 semanas. A la par que surgen los anticuerpos, disminuyen los niveles de viremia y desaparece el antígeno p24.

8.2 Test serodiagnóstico o diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico es un proceso de dos etapas: los sueros que dan como resultado una reacción positiva se tienen que volver a analizar, para excluir así la posibilidad de un error en el laboratorio. Si se vuelve a obtener el mismo resultado, hay que realizar un ensayo confirmatorio para verificar que los anticuerpos reactivos están dirigidos frente a antígenos HIV. Los principales tests serológicos son:

8.2.1 Determinación de anticuerpos mediante ELISA

En muchos casos la infección se diagnostica mediante la presencia de anticuerpos específicos para HIV-1 o HIV-2. Los anticuerpos frente a HIV se detectan de 6 a 12 semanas de infección en la mayoría de los casos y en virtualmente todos los pacientes dentro de los 6 meses de la infección.

Los antígenos para los ELISA de HIV-1 o HIV-2 se preparan bien a partir de lisados de células T humanas infectadas con el virus, proteínas recombinantes de HIV producidas en sistemas de expresión bacterianos o levaduras, u oligopéptidos sintetizados químicamente.

8.2.1.1 Historia de los ELISA de VIH

- Las primeras técnicas se desarrollaron en 1985, usaban como base antigénica un lisado vírico, y se detectaban los anticuerpos a los 40 días de la infección.
- En 1987 se introdujeron las técnicas de segunda generación que incorporaban como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos; y además nuevos antígenos para detectar anticuerpos frente a todos los subtipos M, y los grupos N y O, y también frente al VIH-2. Se incrementó la sensibilidad, detectándose los anticuerpos a los 33-35 días tras la infección.
- En 1994 las técnicas de ELISA adquirieron el formato “en sándwich” y se denominaron ELISA de tercera generación. Detectan anticuerpos de clase IgG e IgM, y por ello se acorta el período ventana a 22 días.
- Recientemente se han introducido las técnicas de cuarta generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos y antígeno p24, reduciéndose el período ventana a 13-15 días, aproximándose casi a la detección del RNA de VIH (**Figura 30**). Con estas técnicas la sensibilidad aumenta hasta el 99,9% lo que reduce la posibilidad de obtener falsos negativos.

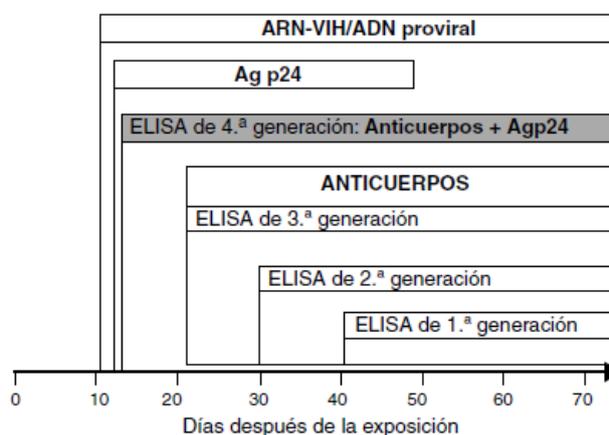


Figura 30. Tiempo de aparición de marcadores específicos de la infección por VIH.

Fuente: García et al. (2011).

La **Figura 31** refleja la ventana de detección de cada ensayo de los comentados anteriormente:

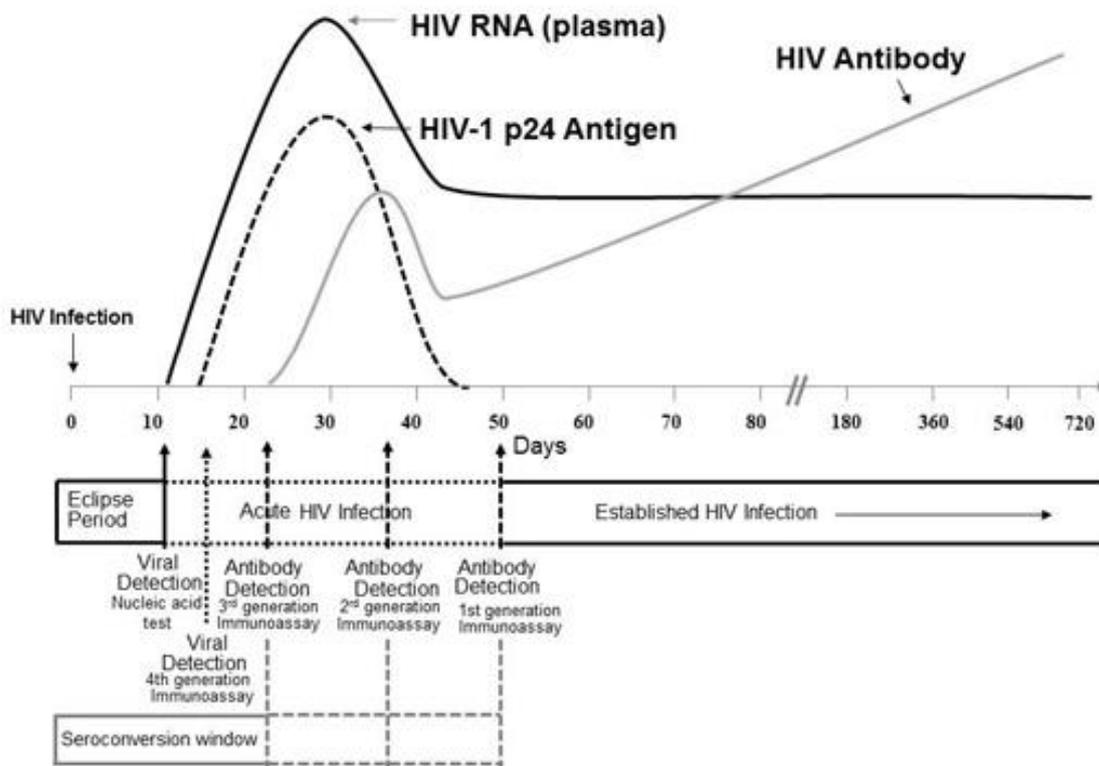


Figura 31. Se muestran los momentos a partir de los cuales se pueden detectar las biomoléculas que cada método detecta, y los niveles relativos de cada una desde el inicio de la infección.

Fuente: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447> (2014).

8.2.1.2 Problema de falsos positivos y negativos

Estos tipos de tests tienen problemas de falsos positivos y falsos negativos.

Los falsos positivos pueden aparecer en los siguientes casos:

- Aparecen falsos positivos en mujeres que han tenido varios partos o transfusiones sanguíneas; ya que en los preparados de estos virus existen trazas del antígeno de superficie de linfocito (el HLA). Durante el parto se pone en contacto la sangre del niño y la de la madre, produciéndose anticuerpos frente a los antígenos de superficie de linfocitos del niño.
- Ensayos basados en el crecimiento del propio virus sobre linfocitos de sangre periférica (ELISAs HIV-1 de primera generación), debido a la reactividad de anticuerpos dirigidos frente al antígeno de leucocitos humanos (HLA), que son expresados por las líneas celulares linfoides utilizadas para preparar los lisados virales y permanecen tras la purificación.

Posteriormente se han empezado a utilizar proteínas recombinantes que se producen en bacterias o en levaduras (los denominados ensayos de segunda generación). Estos ensayos que van a solventar el problema de los anticuerpos anti-HLA, tienen el potencial problema de que la reacción cruzada del suero

con proteínas contaminantes de bacterias o levaduras pueden ser causa también de reacciones falso-positivas.

Falsos negativos. Pueden darse en ensayos basados en antígenos recombinantes o sintéticos derivados de la proteína de la cubierta. Pueden fallar en la detección de anticuerpos del grupo O de HIV que es altamente divergente. Los anticuerpos no reconocen a los péptidos sintéticos y da un falso negativo.

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 USA, dos resultados falso-positivos se obtendrán por cada cinco individuos infectados identificados. Por esta razón, un test confirmatorio es esencial para excluir los resultados falso-positivos. En la **figura 32** se esquematiza un resumen del procedimiento a seguir por los clínicos a la hora de aplicar el test serológico por ELISA.

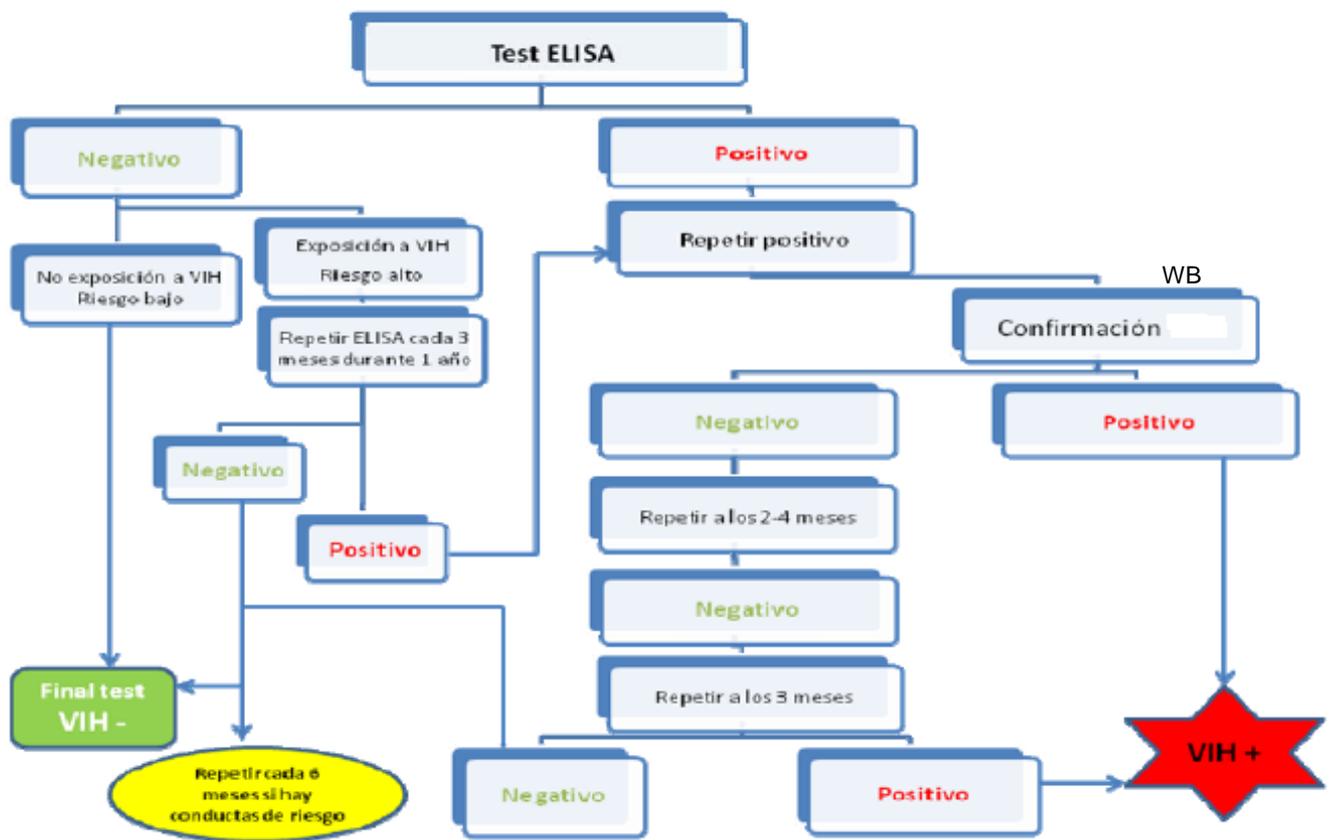


Figura 32. Procedimiento a seguir a nivel médico cuando hacemos el test de ELISA para determinar si un paciente es positivo o negativo para el VIH.

Fuente: <http://www.infosida.es/las-pruebas-del-vih/las-pruebas-clasicas-para-vih-sida#>.

8.2.2 Técnicas de ejecución rápida

Para situaciones de emergencia a veces se requiere rapidez fundamentalmente, estas técnicas no necesitan mucho aparataje y se pueden interpretar los resultados a simple vista. Se basan en la aglutinación de partículas sensibilizadas de látex, o eritrocitos, técnicas de Dot-inmunoensayo y de inmunocromatografía capilar. La sensibilidad oscila entre el 85-99%, y la especificidad entre el 93-99%. Suele haber falsos negativos en muestras con bajo nivel de anticuerpos.

8.2.3 Test confirmatorio más común: "Western blot"

Detecta anticuerpos frente a las proteínas HIV-1 mayoritarias (gag, pol y env). Los anticuerpos frente a las proteínas gag (p17, p24 y p55) aparecen antes en el curso de la infección, pero decrecen en título con la progresión de la enfermedad. Mientras que los anticuerpos frente a las proteínas de la cubierta (gp160 o gp120/41) normalmente persisten incluso en etapas avanzadas de la enfermedad. (Figura 33).

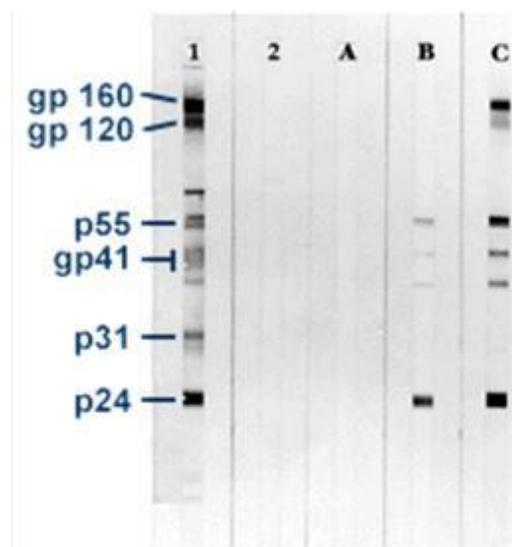


Figura 33. El WB se utiliza como ensayo confirmatorio en un resultado serológico positivo. Tiras de nitrocelulosa que contienen las proteínas del HIV-1, separadas mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, son incubadas con los sueros a ensayar. Las tiras fueron incubadas con los siguientes sueros (control negativo); A, B y C, sueros de pacientes diagnosticados inicialmente como seropositivos por ELISA.

Fuente: <http://slideplayer.es/slide/1670949/>.

Existen otros métodos confirmatorios: como el inmunoblot recombinante o inmunoensayo en línea (LIA) que tienen como mínimo la misma sensibilidad que el ELISA y una especificidad en este caso mayor. Ambas técnicas pueden incorporar antígenos de envoltura de VIH-2 lo que permite diagnosticar de paso este tipo vírico.

8.2.4 Ensayo de detección de antígeno

Este ensayo está basado en la detección mediante un ELISA de captura de antígeno, de la presencia del antígeno gag del HIV-1 (p24). Este sistema de detección puede ser útil en el diagnóstico de la infección primaria de HIV-1, ya que en la fase aguda existen altos niveles de antígeno viral (p24) en el suero de pacientes infectados durante el intervalo previo a la seroconversión. También puede ser útil en el diagnóstico temprano de neonatos infectados con HIV-1.

Cuando se produce la seroconversión, hay anticuerpos anti p24 que se unen a p24 acompañándolo, e impiden la interacción con el anticuerpo de captura, pudiendo enmascarar el antígeno y haciéndolo indetectable en la mayoría de los individuos infectados. Algunos estudios indican que la infección HIV es detectada por tests de antígeno p24 aproximadamente 6 días antes que con tests de anticuerpos.

En la **figura 34** vemos el procedimiento por el cual se detecta dicho antígeno, se usa un anticuerpo con una actividad enzimática y cuando se le da su sustrato el producto es sustrato de una nueva enzima que usa thio-NAD pasándolo a thio-NADH cuya absorbancia podemos medir a 400nm.

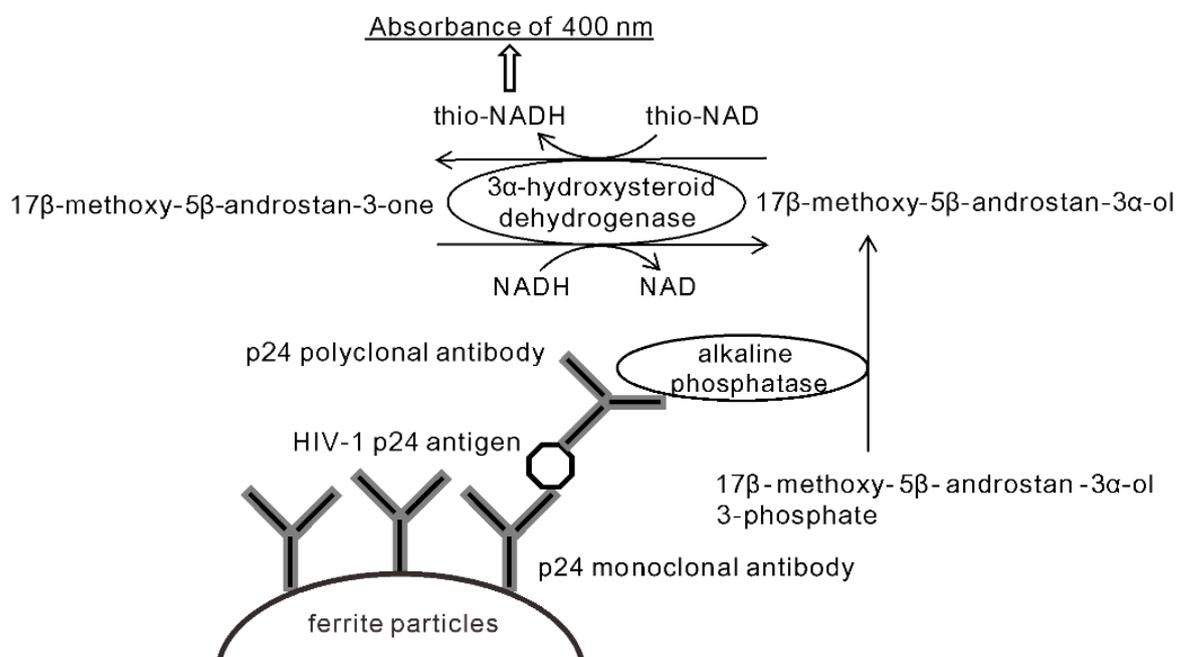


Figura 34. Ensayo comercial de detección del antígeno p24 mediante anticuerpos con actividad fosfatasa alcalina y posterior acción de una deshidrogenasa para generar thio-NADH cuya absorbancia se puede medir a 400nm.

Fuente: Nakatsuma et al. (2015).

8.2.5 Ensayos para la detección de infección reciente de VIH

Estos ensayos destacan a la hora de conocer el patrón de transmisión de VIH en una comunidad o población. En la fase aguda de la infección existen títulos bajos de anticuerpos y con muy baja avidéz. Cuando la infección progresa la concentración de anticuerpos y la avidéz de los mismos se incrementa.

Los métodos que permiten distinguir una infección reciente de una crónica mediante la detección de anticuerpos se agrupan bajo el término STARHS (algoritmo serológico para la detección de infección reciente por el VIH), que se basa en la aplicación de dos técnicas de ELISA para detectar anticuerpos contra el VIH, donde una de ellas está modificada para que sea menos sensible. Se considera que una infección es reciente si la muestra es positiva para el ELISA convencional y negativa en el ELISA modificado de baja sensibilidad.

Otra manera de identificar infecciones recientes es usando el índice de avidéz. Para ello se procesa el suero por duplicado (diluido con PBS y tratado con guanidina que interfiere en la unión antígeno-anticuerpo de baja avidéz). Tras ello se calcula el índice de avidéz dividiendo la señal obtenida del suero tratado con PBS entre la del suero tratado con guanidina. Si el índice es $< 0,6$ se estima con una probabilidad elevada que la infección ha ocurrido en los 6 meses anteriores.

Hay que destacar, que estas técnicas se utilizan con fines epidemiológicos, para conocer, por ejemplo, el patrón de transmisión de VIH y poder diseñar medidas preventivas adecuadas.

8.2.6 Resumen del algoritmo diagnóstico usado mediante métodos serológicos

Como ya se ha comentado, se recomienda el uso de 3 técnicas con distinta base antigénica, siendo el WB siempre obligatorio para confirmar. Para decir que la persona está infectada se debe cumplir que las 3 pruebas den positivas. La **figura 35** refleja todo el algoritmo establecido y que se debe seguir en los laboratorios de diagnóstico:

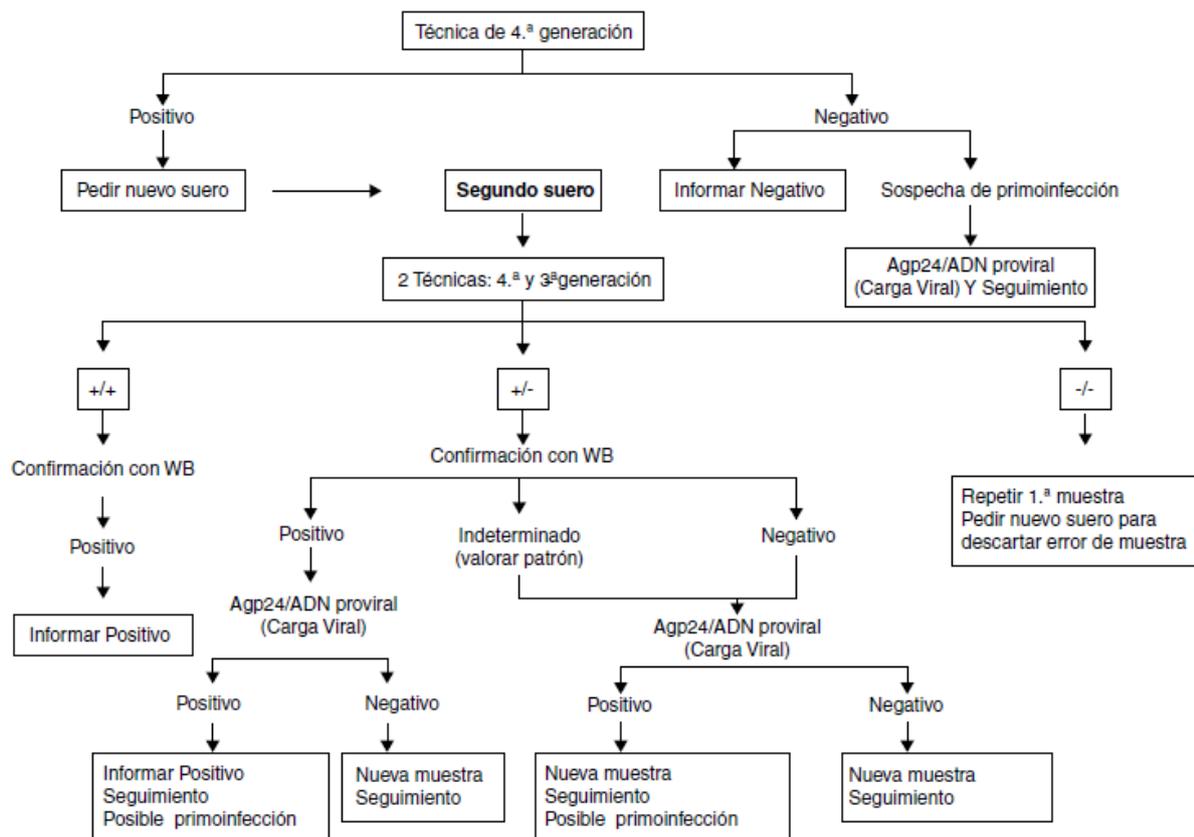


Figura 35. Algoritmo del diagnóstico de VIH. Fuente: García et al. (2011).

8.3 Detección de resistencia a antirretrovirales:

8.3.1 Cultivo del virus

El 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, pero el cultivo del virus es rara vez necesario para establecer el diagnóstico.

Por otro lado, este sistema no es demasiado sensible; solo se consiguen sensibilidades del 95% cuando los contajes de linfocitos CD4+ son menores de 500/mm³. Pero la sensibilidad baja mucho 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.

8.3.2 Ensayos fenotípicos

Estos ensayos buscan medir la concentración de fármaco necesaria para inhibir la replicación viral en cultivos celulares. Los resultados se presentan, de manera general, como cambios en la IC50 respecto a los casos controles. Sin embargo, esta técnica posee algunos problemas: es cara, laboriosa y lenta. Luego se han diseñado otros métodos más asequibles para los laboratorios:

- Empleo de virus recombinantes con los cuales se consiguen una mayor rapidez y reproducibilidad en los resultados. Consisten en la obtención de la secuencia de los genes RT y PR (proteasa) del plasma de un paciente por medio de RT-PCR, y su introducción dentro de un sistema ya estandarizado para la producción de un VIH recombinante capaz de infectar una línea celular. Las características de estos ensayos se muestran en la **Figura 36**. La interpretación de los resultados, aunque más intuitiva y sencilla, sigue dando algún problema, ya que se analiza la sensibilidad fármaco a fármaco, y en la vida real las combinaciones de los mismos pueden suponer un comportamiento diferente del meramente aditivo.

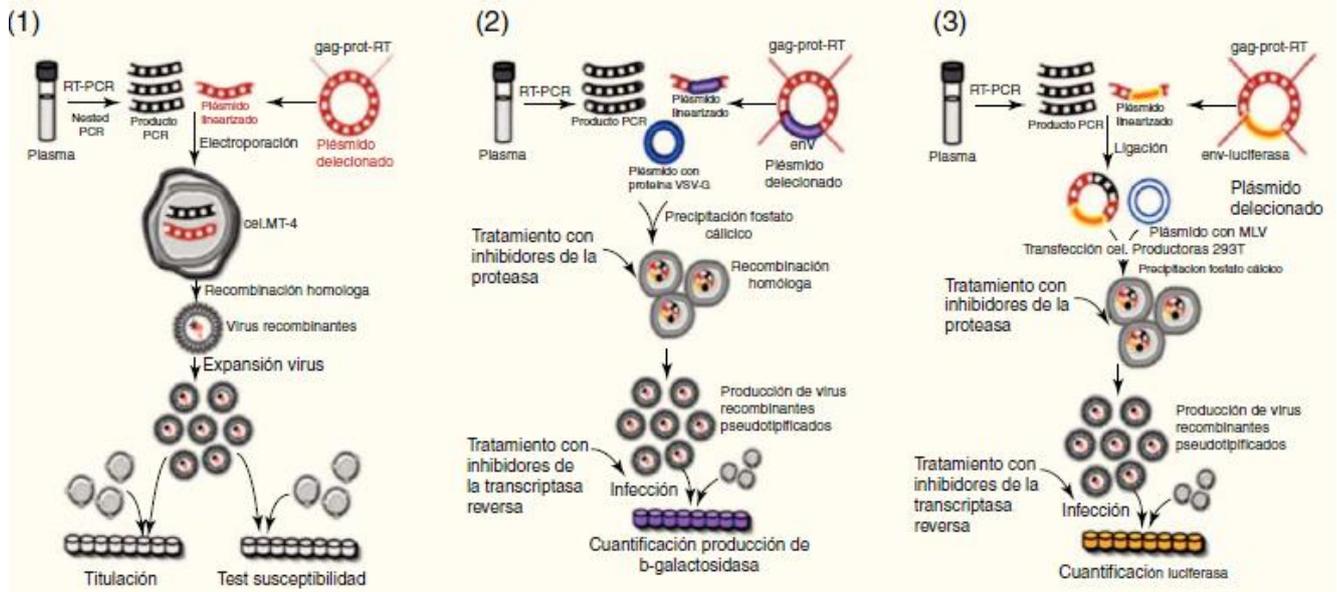


Figura 36. Ensayos de virus recombinantes para la determinación fenotípica de la resistencia a los antirretrovirales.

En el método Antivirogram® (Virco) (1) los virus recombinantes se preparan mediante transfección de células MT-4 con el producto amplificado PR-RT y con un plásmido que contiene el genoma completo del VIH salvo la región gag-pro-RT. La IC50 del virus recombinante se determina en cultivos, midiendo la viabilidad de células MT4 infectadas con el virus recombinante en presencia de diluciones de cada antirretroviral. El método Phenoscript (Viralliance) (2), combina aspectos de los otros dos métodos: un proceso de recombinação homóloga, como en el Antivirogram, con un sólo ciclo de replicación viral, como en el Phenosense. Las células diana (P4) contienen el gen de la β -galactosidasa controlado por el LTR de HIV de modo que cuando se acumulan suficientes productos del gen TAT en la célula infectada, se expresa el gen de la β -galactosidasa y su producto se puede medir mediante colorimetría o fluorimetría. El método Phenosense (ViroLogic) (3), a diferencia del Antivirogram, es un ensayo de un solo ciclo de replicación viral, lo que reduce el tiempo para los resultados. Utiliza un proceso de ligación, más que de recombinação homóloga, para introducir el fragmento amplificado mediante RT-PCR en el genoma de una partícula de VIH en la que el gen env ha sido sustituido por un gen productor de luciferasa. En un ciclo de replicación este virus es capaz de producir todas las proteínas de VIH a excepción de las de envoltura y, en su lugar, se expresa el gen de la luciferasa. La CI50 del virus recombinante se determina cuantificando la expresión del gen de la luciferasa en cultivos de célula infectadas con el virus recombinante en presencia de antirretrovirales.

Fuente: García et al. (2011)

8.3.3 Ensayos genotípicos

Estos ensayos pretenden estudiar los cambios que se dan en genes concretos del virus: integrasa, RT y proteasa que generan las resistencias a los distintos tratamientos.

La técnica más empleada para la detección de mutaciones de resistencia es la secuenciación poblacional del genoma que codifica las enzimas transcriptasa inversa, proteasa o integrasa. Antes de la secuenciación es necesario extraer el ácido nucleico del plasma del paciente, transcribirlo a DNA y hacer al menos una reacción de amplificación (PCR). Una vez realizada la reacción de secuenciación, el procedimiento de lectura se encuentra automatizado mediante electroforesis acoplada a la detección de dideoxineucleótidos (terminadores de cadena) fluorescentes, donde existe tanto el método de electroforesis

capilar como la electroforesis bidimensional para este hecho. Tras obtener la secuencia es necesario un análisis informático para comparar las secuencias obtenidas con una cepa de referencia para establecer las mutaciones encontradas relacionadas con resistencia a antirretrovirales, a día de hoy ya existen algoritmos propios para facilitar dicha interpretación.

A modo de resumen la **Tabla 4** muestra una comparativa de los métodos de ensayo fenotípicos y genotípicos mostrando ventajas e inconvenientes de ambos a la hora de evaluar la resistencia de los virus a fármacos.

Ventajas	Inconvenientes
<p><i>Genotipo</i></p> <p>Rapidez</p> <p>Dificultad técnica media, realizable en laboratorios hospitalarios</p> <p>Menor coste económico</p> <p>La mutación precede a la resistencia fenotípica</p>	<p>Detección indirecta de la resistencia</p> <p>Desconocimiento del efecto de las resistencias cruzadas</p> <p>Puede no existir correlación con el análisis fenotípico</p> <p>Carencia de sensibilidad para las variantes menores (< 20%)</p> <p>Requieren la interpretación por un experto</p> <p>No son válidos para nuevas drogas hasta que se diseñan los algoritmos de interpretación y se validan clínicamente</p>
<p><i>Fenotipo</i></p> <p>Medida directa de la sensibilidad a los distintos antirretrovirales</p> <p>Proporciona información acerca de las resistencias cruzadas</p> <p>Reflejan el efecto de todas las mutaciones presentes, incluso aquellas que aún no han sido descritas</p> <p>Los resultados son fáciles de interpretar</p>	<p>No puede realizarse con cargas virales bajas</p> <p>No detecta subpoblaciones virales que constituyan menos del 10-20% de la población total</p> <p>No aporta sensibilidad a combinaciones de fármacos</p> <p>Falta de estandarización en los valores de IC₅₀ de cada fármaco</p> <p>Disponibles únicamente en laboratorios comerciales por su elevada complejidad</p> <p>Elevado coste y técnica compleja</p> <p>Posible selección de variantes víricas mejor adaptadas al cultivo celular</p>

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los ensayos genotípicos y fenotípicos para la determinación de resistencias a los antirretrovirales.

Fuente: *García et al. (2011).*

8.4 Detección de secuencias nucleotídicas del virus VIH:

Una evidencia de la infección de HIV-1 también puede obtenerse mediante la demostración 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 están basados en PCR, para amplificar secuencias conservadas en los genes gag o pol. Se detectan así fragmentos del virus integrado en el genoma.

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).

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.

8.5 Detección del tropismo viral:

Los antagonistas de los receptores de quimioquinas son una nueva familia de fármacos usados para el tratamiento de la infección por VIH, siendo el Maraviroc el de más éxito comercial. Su actividad antiviral está limitada a variantes R5- trópicas y se han detectado variantes X4-trópicas en pacientes que no responden a estos fármacos. Por lo tanto, antes de recomendar el inicio de un tratamiento con antagonistas de CCR5, se requiere la realización de un estudio de tropismo del VIH por los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4. El tropismo viral por los receptores de quimioquinas puede ser determinado mediante métodos fenotípicos y genotípicos.

8.5.1 Ensayos fenotípicos

Estos ensayos se usan virus recombinantes iguales a los ya vistos anteriormente, pero usando esta vez las proteínas de la envuelta, y se usan para infectar células que posean el CD4 y uno de los dos posibles correceptores, CXCR4 o CCR5 para establecer entonces el tropismo del virus.

8.5.2 Ensayos genotípicos

Estos ensayos son más rápidos, económicos y factibles para los laboratorios en general, y se basan nuevamente en secuenciación poblacional. Se han descrito y desarrollado diferentes reglas y algoritmos de correlación genotipo-tropismo basados fundamentalmente en las características de la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la envuelta viral. Estos algoritmos se han difundido rápidamente y su uso está suponiendo un gran avance gracias a la secuenciación masiva.

En la **Tabla 5** se muestra un resumen de las ventajas e inconvenientes de ambos tipos de ensayos para determinar el tropismo:

Limitaciones	Fenotipo	Genotipo
Técnicas	<ul style="list-style-type: none">• La transcripción inversa <i>in vitro</i> (síntesis de una doble hebra de ADN a partir de ARN) 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 por tanto 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> (síntesis de una doble hebra de ADN a partir de ARN) 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 genotipo/fenotipo con un número relativamente bajo de secuencias y con escaso número de secuencias de subtipos no-B

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de los ensayos genotípicos y fenotípicos para la determinación del tropismo viral.

Fuente: García et al. (2011).

8.6 Detección en niños y neonatos:

Los test serológicos no son aplicables en neonatos puesto que los anticuerpos IgG atraviesan la placenta. El bebé siempre va a tener anticuerpos IgG, pero eso no implica que el niño esté enfermo.

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.

Los anticuerpos transmitidos de la madre (IgG) se mantienen en títulos altos durante 12-18 meses.

La persistencia de anticuerpos HIV-1 más allá de 18 meses es tomada como valor diagnóstico de la infección del niño. Sin embargo, es mucho tiempo para esperar a ver si decaen.

Por otro lado, tampoco se puede dar un tratamiento generalizado a todos los niños, dados los efectos secundarios que tienen los tratamientos. Por tanto, es muy importante obtener el diagnóstico lo más temprano posible y de esta forma el paciente podrá beneficiarse de los tratamientos antirretrovirales y profilácticos.

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 (**Figura 37**). Con estos métodos el diagnóstico del niño puede realizarse en el primer mes de vida, lo que facilitará las decisiones terapéuticas apropiadas.



Figura 37. Algoritmo seguido para la detección de la infección por VIH en recién nacidos.

Fuente: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/90000-94999/93733/norma.htm> (2004).

9. Tratamiento

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad suelen ser ocasionadas por **ataques de patógenos oportunistas** que se aprovechan de la destrucción progresiva del sistema inmune por el HIV. El tratamiento dependerá por tanto de cuáles sean esas infecciones oportunistas. En este apartado nos vamos a referir únicamente al tratamiento específico de la infección por HIV.

Se asume que el tratamiento anti-retroviral va a retrasar, prevenir e incluso revertir la destrucción inmunológica que conduce al desarrollo de complicaciones oportunistas. Con el tratamiento antirretroviral se busca prevenir, retrasar e incluso revertir la destrucción inmunológica que conduce al desarrollo de complicaciones oportunistas. De esta manera, la principal meta del tratamiento del paciente infectado con HIV con la terapia antiviral sería la de alcanzar la supresión prolongada de la replicación viral.

9.1 Resistencia a la quimioterapia antirretroviral

Por principio teórico, las drogas antirretrovirales seleccionan la emergencia de variantes virales resistentes a drogas. Dado que el fármaco evita que los virus susceptibles al mismo crezcan, si existe alguna variante resistente al fármaco esta será capaz de expandirse. Por tanto, la presión selectiva en este caso es creada por el propio fármaco (**Figura 38**).

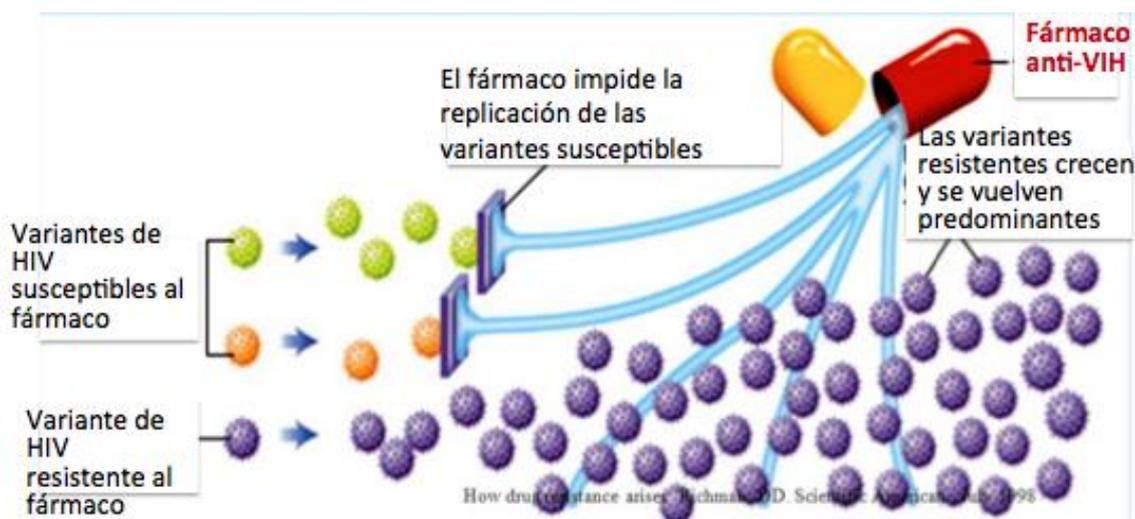


Figura 38. Representación del mecanismo de selección de las variantes resistentes por el fármaco antirretroviral. Fuente: *Scientific American Journal* (1988).

La probabilidad de la emergencia de mutantes resistentes es una función que depende de al menos cuatro factores: la frecuencia de mutación viral, la velocidad de replicación del virus, la mutabilidad intrínseca del sitio diana de la droga antiviral y la presión selectiva de la droga antiviral.

9.1.1 La frecuencia de mutación viral

El hecho de que la RT del HIV **no tenga actividad correctora de errores** provoca que este virus tenga una frecuencia de mutación elevada, de 3×10^{-5} nucleótidos por ciclo de replicación. Así un genoma de 10-kb, como es el de HIV, generaría una mutación por cada tres genomas virales progenie. Esto implica que un tercio de los virus generados tras cada ciclo de replicación podrían tener una mutación.

Un segundo mecanismo productor de diversidad de secuencia es la **recombinación**.

La recombinación del genoma de HIV-1 no implica rotura de cadenas y su posterior unión sino que es el resultado de cambios de molde de la retrotranscriptasa durante la replicación del virus. Dos características de los retrovirus resultan fundamentales para la recombinación:

- 1) Su mecanismo de replicación es propenso a la recombinación, pues para la síntesis del DNA viral se deben producir dos cambios de molde (**Figura 39**). La generación de un DNA retroviral no es tan sencillo como la copia del RNA sentido en un DNA antisentido, seguido de la síntesis de la cadena complementaria.
- 2) Los RNAs genómicos (gRNAs) son encapsidados por parejas, y la proximidad de los 2 gRNAs facilita el cambio de molde durante la retrotranscripción. (**Figura 40**).

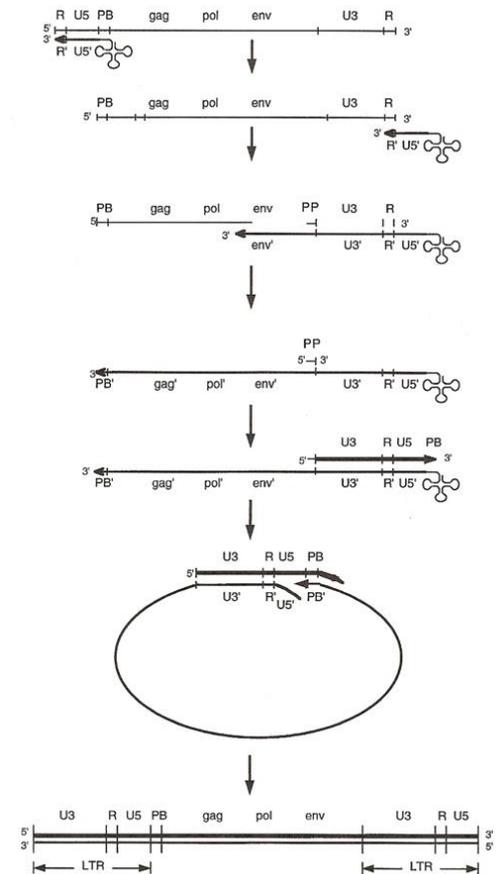


Figura 39. Mecanismo de salto de la retrotranscriptasa.

Fuente: Coffin, 1996.

Así, en su forma más sencilla, la recombinación implica la copia parcial de un gRNA seguido del cambio de la RT a una región homóloga sobre un gRNA co-empaquetado para completar la síntesis de DNA.

De esta manera, la recombinación puede ocurrir cuando una célula que es doblemente infectada con virus diferentes produce viriones progenia con RNAs genómicos de cada virus, y un cambio de hebra tiene lugar durante la siguiente ronda de transcripción reversa (**Figura 39**).

Algunos de estos genomas recombinantes se han estabilizado en la población humana y se clasifican como formas recombinantes circulantes (CRFs, "circulating recombinant forms"). Por otro lado, dentro de un hospedador, la recombinación puede ser una fuerza importante para la diseminación de resistencia a drogas, ya que este mecanismo puede servir para generar combinaciones alélicas que por mutación resultan difíciles de obtener. En el ejemplo de la **Figura 40**, un gRNA parental que contiene un alelo PR (proteasa) con mutaciones que le confiere resistencia a inhibidores de proteasas, recombina con un segundo genoma que expresa una RT con resistencia a zidovudine (AZT). Dado que la generación de estos alelos de alta resistencia requiere de la acumulación de varias mutaciones puntuales, la aparición de estas formas a través de simple mutación resulta poco probable.

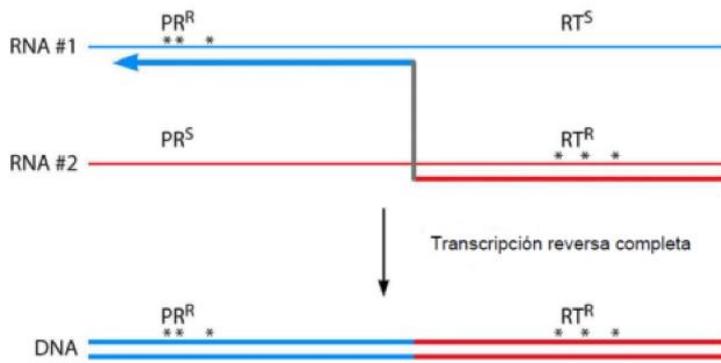


Figura 40: Cambio de molde llevado a cabo por la RT en dos RNAs genómicos empaquetados, que contienen distintas mutaciones.

Fuente: Onafuwa-Nuga and Telesnitsky (2009).

La combinación de estos dos factores (frecuencia de mutación elevada y recombinación) y su papel en la variabilidad del virus se representa en la siguiente figura (**Figura 41**):

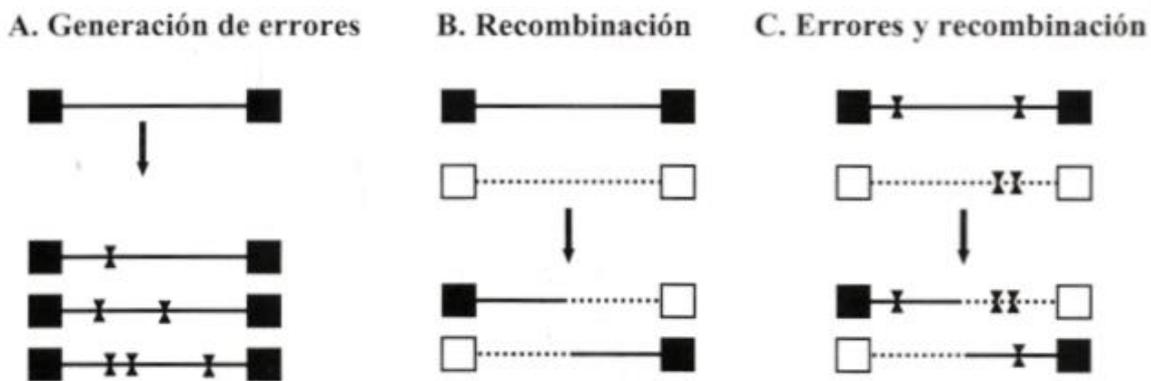


Figura 41: Mecanismos de aumento de variabilidad en HIV

En resumen, aunque la recombinación ocurre con mucha frecuencia, sólo se va a detectar cuando un virión con dos gRNAs distintos infecta a una célula, pero no se detecta cuando una célula es coinfectada con dos virus genéticamente iguales. Para que se genere un virión con 2 gRNAs diferentes se debe cumplir:

- (i) El establecimiento de 2 provirus genéticamente diferentes en una misma célula
- (ii) La asociación de dos diferentes gRNAs en una misma cápsida.

Estos sucesos se muestran en la **Figura 42**.

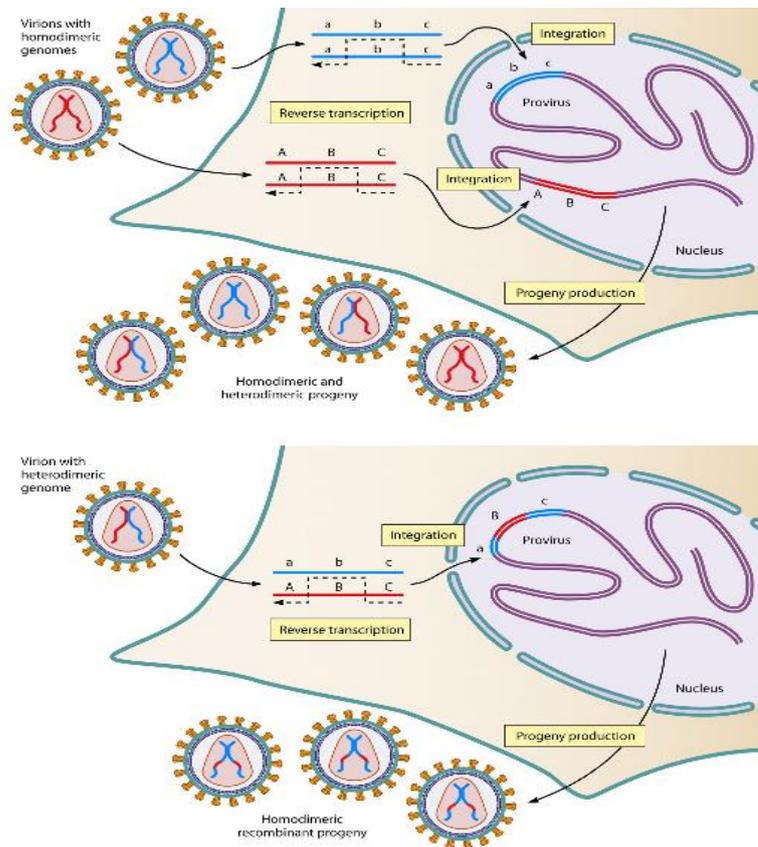


Figura 42. Requisitos para generar genomas recombinantes. Se produce en primer lugar la coinfección de dos virus genéticamente diferentes, y posteriormente la recombinación entre ambos RNAg.

Fuente: Onafuwa-Nuga and Telesnitsky (2009).

Estos requisitos explican el hecho de que la coinfección de una persona con 2 variantes genéticas de un virus no conduce necesariamente a la generación de virus recombinantes.

Además, está el hecho de que en la mayoría de las infecciones retrovirales se observa un efecto de protección de una célula infectada de la subsiguiente reinfección por un virus similar. Así, la proteína **Nef** de HIV-1 disminuye la expresión de CD4 y de los correceptores de la célula infectada, lo que va a disminuir la posibilidad de co-infección. La proteína accesoria **Vpu** también tiene un efecto modulador de la expresión de estos receptores.

No obstante, a pesar de estas características, la recombinación supone una fuente importante de diversidad viral en los pacientes infectados con HIV-1.

Por tanto, el hecho de que los genomas virales se encapsulen por parejas (causando la proximidad espacial entre ambos) además de que, como se ha mencionado anteriormente, para la síntesis del DNA viral se deben producir dos cambios de molde, facilita este salto entre cadenas.

Esto provoca que puedan combinarse los genomas de variantes resistentes a distintos fármacos. Por ejemplo, un gRNA parental que contiene un alelo PR (proteasa) con mutaciones que le confieren resistencia a inhibidores de proteasas, recombina con un segundo genoma que expresa una RT con resistencia a zidovudine (AZT).

9.1.2 La velocidad de replicación del virus

Este factor tiene grandes consecuencias sobre la probabilidad de aparición de mutantes resistentes. Muchas infecciones víricas se caracterizan por niveles altos de replicación de virus. Esto es especialmente cierto en las infecciones crónicas con HIV, HBV y HCV. La probabilidad de aparición de resistencia a AZT aumenta en pacientes infectados con HIV de acuerdo a como disminuye los contajes de células T CD4+, que se asocian con niveles aumentados de replicación de HIV. Con unos 10^8 a 10^{10} nuevos viriones generados diariamente durante la infección HIV, una tasa de mutación de aproximadamente 3×10^{-5} por nucleótido garantiza la pre-existencia de casi cualquier mutación en cualquier punto. De hecho, los mutantes resistentes a drogas han sido identificados en aislados obtenidos de

pacientes no expuestos previamente a drogas. La presión selectiva del tratamiento de drogas permite el sobrecrecimiento de estos mutantes pre-existentes. En la **Figura 43** se muestran imágenes de la gemación de nuevos virus de una célula infectada.

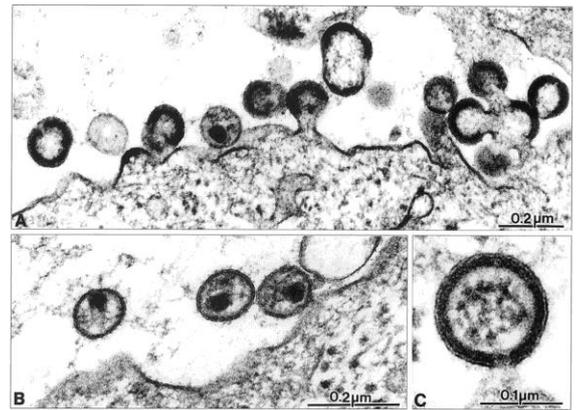


Figura 43.

- A) Virus VIH-1 gemando de células infectadas
- B) Partículas VIH-1 extracelulares
- C) Partícula de VIH inmadura unida todavía a la membrana celular

Fuente: Han et al. (2007)

9.1.3 La mutabilidad intrínseca del sitio diana de la droga antiviral

Respecto a este factor, dependiendo del sitio de interacción de la droga y de la importancia de este sitio para la función de la proteína a la que se une va a condicionar la aparición más o menos rápida de variantes víricas resistentes a la droga.

Por ejemplo, puede ocurrir que en uno de los virus se produzca una mutación en el centro activo de una proteína que haga que esta no sea funcional, por lo que este virus no progresaría. Sin embargo, si se produce una alteración en una proteína que no afecte a la viabilidad del virus pero que provoque la resistencia a un fármaco, provocará que este virus progrese y se expanda.

9.1.4 La presión selectiva de la droga antiviral

Como se ha mencionado anteriormente, una droga es un compuesto que confiere presión selectiva suficiente sobre la replicación del virus para seleccionar los mutantes resistentes a la droga, pues los no mutantes (o mutantes no resistentes) serán afectados por el fármaco y morirán.

Al analizar la relación entre la probabilidad de aparición de virus resistentes y la actividad antiviral del fármaco, se observa que altas dosis del medicamento (por ejemplo, AZT) tienden a seleccionar virus resistentes a la droga más eficientemente que bajas dosis. Esto se debe a que, si el fármaco es poco activo, deja que muchas variantes se multipliquen (tanto las resistentes como las no resistentes) por lo que no se van a seleccionar específicamente variantes resistentes frente a ese fármaco.

De esta manera, según aumenta la presión selectiva para los mutantes resistentes (esto es, según aumenta la efectividad del fármaco) aumenta la probabilidad de que tales mutantes alcancen niveles significativos de persistencia de replicación viral (es decir, se van seleccionando variantes resistentes que evaden al fármaco). Esto ocurre hasta que se llega a un punto de máxima probabilidad de resistencias (representado en la **Figura 44** como un pico), a partir del cual la probabilidad de emergencia de variantes resistentes comienza a disminuir. Esta probabilidad se hace nula cuando la replicación del virus es inhibida completamente, debido a la gran efectividad del fármaco, que impide la replicación de todas las variantes, tanto resistentes como susceptibles a la actividad del medicamento. Así, la meta última de la quimioterapia es la infección viral es la identificación de regímenes de drogas que inhiban completamente la replicación del virus para evitar de esta manera la aparición de virus resistentes al tratamiento.

Sin embargo, el desarrollo de fármacos que inhiban completamente la replicación viral es bastante complicado, ya que el medicamento tiene que distribuirse por el organismo tras su administración, y tendría que encontrarse en una concentración máxima en su sitio de acción para poder destruir todos los virus.

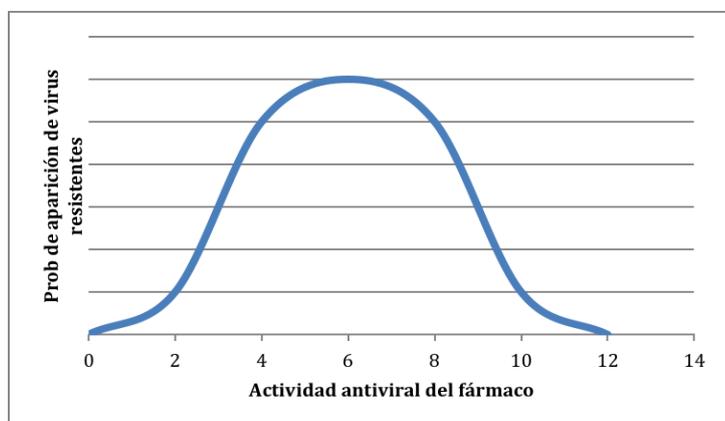


Figura 44. Representación de la relación entre la probabilidad de aparición de virus resistentes y la actividad antiviral del fármaco.

9.2 Fármacos antirretrovirales

Las estrategias anti-retrovirales iniciales se enfocaron sobre la inhibición de la RT de HIV-1 con compuestos de análogos de nucleósidos. No obstante, compuestos desarrollados últimamente tienen como diana no sólo la RT sino otras etapas en el ciclo de vida del virus. Los tratamientos pueden clasificarse en:

9.2.1 Inhibidores nucleosídicos de la RT

El zidovudine (ZDV, AZT o retrovir) fue la primera droga que mostró un efecto beneficioso para el tratamiento de la infección de HIV. El zidovudine es análogo de timidina (**Figura 45**) con un grupo azida sustituyendo el grupo 3'-hidroxilo sobre el anillo de ribosa. Este compuesto fue inicialmente desarrollado como un agente quimioterapéutico con potencialidad antitumoral, su actividad anti-retroviral fue primero demostrada frente al virus de la leucemia de Friend en los años 70 y en 1985 mostró una prometedora actividad in vitro frente a HIV-1. Dada su estructura, su mecanismo de acción se basa en la incorporación de este análogo de pirimidina por parte de la RT a la cadena en elongación con la consiguiente terminación prematura debido a la imposibilidad del análogo de formar el enlace fosfodiéster. Por tanto, no se puede completar la síntesis del genoma del virus, ya que se interrumpe su replicación. Compuestos similares son la didanosina, la estavudina y otros que se muestran en la **Figura 46**.

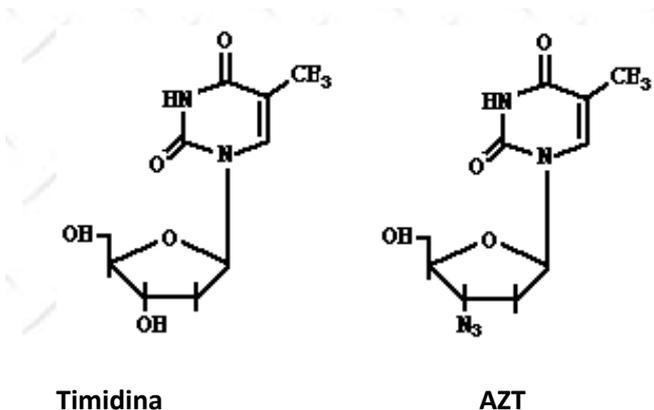


Figura 45. Similitud estructural entre la timidina y el fármaco AZT. Este análogo carece del extremo 3'OH, lo que impedirá que se añada otro nucleótido a continuación.

Fuente: Adaptada de la página web quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

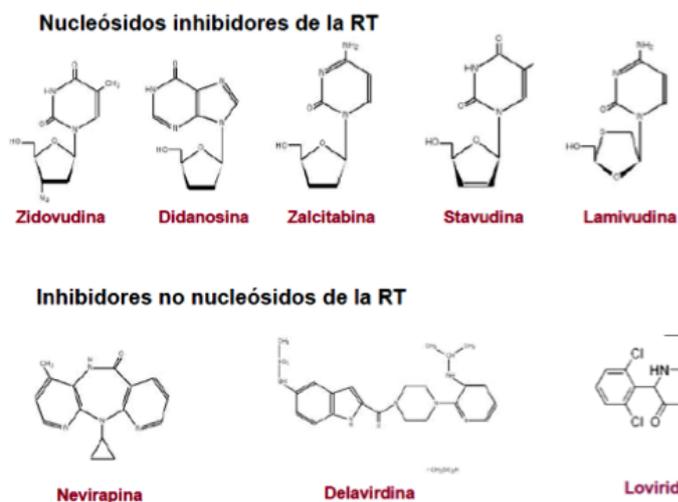


Figura 46. Ejemplos estructurales de inhibidores tanto nucleosídicos como no nucleosídicos de la retrotranscriptasa de HIV.

9.2.2 Inhibidores no nucleosídicos de la RT

Este grupo de inhibidores se descubrieron posteriormente, y se trata de una clase químicamente diversa de compuestos que se unen a un bolsillo estructural de la RT de HIV-1 cerca del sitio catalítico de la polimerasa. De esta manera, cuando esta molécula penetra en la RT, distorsiona su centro activo provocando que la enzima ya no pueda continuar realizando la retrotranscripción. Estos compuestos son eficaces, pero rápidamente producen una selección para la aparición de variantes resistentes a la droga. Esta mayor frecuencia de aparición de resistencias se debe a la mutabilidad intrínseca del sitio blanco del fármaco: un bolsillo estructural de la RT. Esto permite a los virus cambiar algunos aminoácidos de este bolsillo, lo que impediría la entrada del fármaco sin provocar la pérdida de viabilidad de los virus.

Sin embargo, para producirse resistencias contra los inhibidores nucleosídicos, los virus tendrían que alterar su centro activo (ya que la diana de estos fármacos es el propio centro activo de la RT), y es más complicado generar cambios en el centro activo que no provoquen que el virus ya no sea viable. Entre estos compuestos están el nevirapina, el delavirdina y el loviride. (**Figura 46**).

Sin embargo, y debido a la aparición de resistencias, se están desarrollando nuevas estrategias para inhibir la RT. Un ejemplo sería el desarrollo de un inhibidor dual (bifuncional inhibidor), una molécula que inhiba simultáneamente el centro activo de la RT (al que se unen los inhibidores nucleosídicos) y el bolsillo estructural con el que interaccionan los inhibidores no nucleosídicos. La posibilidad de obtener una molécula dual podría implicar la aparición de efectos sinérgicos que aumentarían la potencia de la inhibición, y se disminuiría también la probabilidad de aparición de resistencias. Un ejemplo de un inhibidor dual sintetizado sería el TIBO-6PEG (**Figura 47**). Estos inhibidores se encuentran en fase experimental.

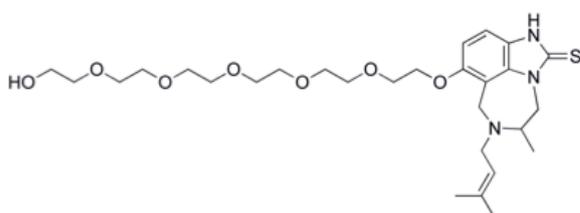


Figura 47. Estructura del inhibidor dual de la RT de HIV: TIBO-6PEG.

Fuente: Piao et al. (2013).

9.2.3 Inhibidores de proteasas

Estos fármacos son una clase variada de compuestos que comparten la característica de mimetizar el sustrato peptídico de la enzima viral, esto es, mimetizan el sitio de rotura de la aspartil proteasa viral.

La replicación del retrovirus requiere la rotura proteolítica mediada por el virus de polipéptidos precursores gag y gag-pol. La enzima viral responsable de esta función esencial de HIV-1 es una aspartil-proteasa. Las proteasas virales tienen actividades altamente específicas, y, aunque tienen características relacionadas con las enzimas del hospedador como la renina, la colagenasa y la elastasa, su función no puede ser rescatada por las enzimas celulares. Por estas razones, la proteasa HIV es una diana antiviral atractiva. Algunos ejemplos son el saquinavir, el indinavir, el ritonavir, el VX-478 y el nelfinavir (**Figura 48**).

Inhibidores de proteasas

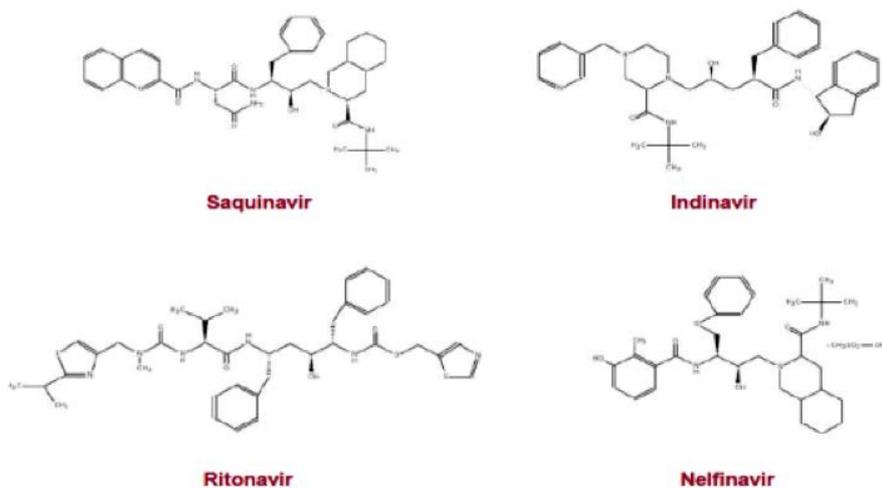


Figura 48. Estructura de distintos inhibidores de proteasas.

9.2.4 Inhibidores de la entrada del virus

Una diana actualmente en exploración podría ser impedir la entrada del virus en la célula. Desde el punto de vista fisiopatológico se pueden considerar tres fases o mecanismos de entrada del virus en la célula: unión del virus al receptor CD4, unión a los receptores de quimioquinas que actúan como correceptores (CCR5 y/o CXCR4) y fusión de las membranas celular y viral. Cada uno de ellos puede ser una diana terapéutica. Las dianas de estos fármacos serán por tanto cualesquiera de las dos glucoproteínas del virus (gp120 y gp41) o sus correspondientes receptores o correceptores celulares.

9.2.4.1 Inhibidores de la adhesión del virus al receptor CD4

Este paso está mediado por la proteína viral gp120, que se encuentra expuesta en la superficie viral. El sitio de unión de gp120 al receptor CD4 se encuentra enormemente conservado entre los diferentes subtipos circulantes, por lo que constituye una diana interesante para el diseño de fármacos. Se han descubierto inhibidores inespecíficos, como moléculas polianiónicas (**Tabla 6**). Se ha visto que ciertos polisacáridos sulfatados (dextrán-sulfato, pentosán sulfato o heparina) pueden inhibir la replicación viral in vitro. La actividad anti-VIH de compuestos con estructuras tan heterogéneas parece deberse a que poseen una elevada densidad de cargas negativas (polianiones). El dextrán-sulfato se uniría al asa V3 del gp120 de las cepas CXCR4 y evitaría la unión al receptor CD4.

Aunque su uso en la práctica clínica es improbable, en la actualidad distintos polianiones están siendo evaluados como agentes de uso tópico.

Además, también se han desarrollado inhibidores específicos como CD4 recombinante soluble (rsCD4), determinados péptidos y anticuerpos monoclonales anti-CD4. Aunque el bloqueo de los receptores CD4 podría causar cierta inmunodepresión, se ha encontrado un anticuerpo llamado TNX-355 que ha sido bien tolerado y que no ha producido linfocitopenia CD4+.

Existen otros inhibidores de este proceso como BMS-378806 y BMS-488043, entre otros (**Figura 49**).

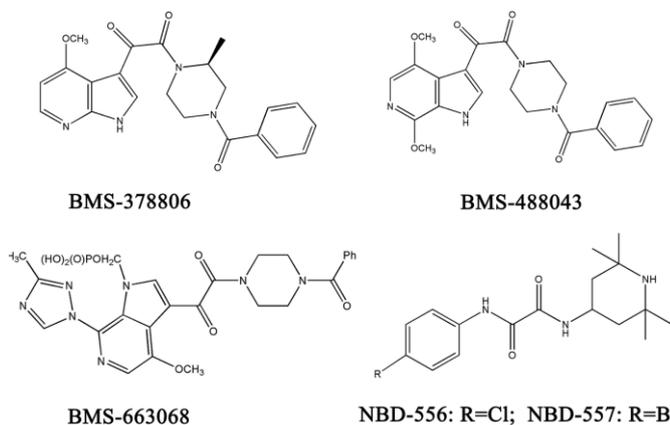


Figura 49. Estructura de algunos inhibidores de la unión del virus al receptor CD4.

Fuente: Tilton and Doms (2010).

Tipo de inhibidor	Mecanismo de acción	Fase de desarrollo	Vía de administración	Comentarios
<i>Inhibidores específicos del receptor CD4</i>				
rsCD4	Unión competitiva con la glucoproteína gp120	Fase 1-2	IV	Actividad limitada; desarrollo abandonado
TNX-355	Anticuerpo monoclonal contra el CD4; impide unión del virus al receptor de quimocinas	Fase 1-2	IV	Demostrada actividad dosis dependiente
PRO-542	Tetrámero de CD4 unido a una gammaglobulina	Fase 1-2	IV	Datos preliminares de actividad; Vm > 72 h
BMS-806	Se une a la gp120 bloqueando la unión de CD4	Preclínico		Rápida inducción resistencias
<i>Inhibidores inespecíficos de la unión gp120-CD4</i>				
Dextrán-sulfato	Unión electrostática a gp120; inhibe la interacción con CXCR4	Fase 1-2	IV	Actividad moderada; toxicidad elevada
PRO 2000	Unión a CD4; interfiere con la unión a gp120	Fase 2	Tópica	Estudiándose en África
Cianovirina-N	Unión a gp120; interfiere la interacción CD4-CXCR4	Preclínico	Tópica	Estructura proteica
<i>Inhibidores receptores de quimoquinas</i>				
SCH-D	Antagonista de RANTES, unión competitiva a CCR5	Fase 1-2	Oral	Actividad dependiente de la dosis; mutación cepas R5 a X4
PRO 140	Anticuerpo monoclonal anti-CCR5	Preclínico		Potencia (reducción 1,8 log CV)
UK 427	Actividad anti-CCR5	Fase 2-3		Desarrollo avanzado
AMD3100	"Biciclamo" inhibidor de CXCR4	Fase 2	IV	Poca potencia
<i>Inhibidores de la fusión de la membrana</i>				
Enfuvirtide (T-20)	Péptido interfiere la fusión mediada por gp41	Uso clínico	SC	Actividad mantenida durante 48 semanas en tratamiento de rescate
T-1249	Péptido; interfiere la fusión mediada por gp41	Fase 2	SC	Actividad contra cepas resistentes a T-20 (detenido el desarrollo)

Tabla 6. Sustancias inhibitoras de la entrada del VIH clasificadas en función de su diana.

Fuente: López-Aldeguer et al. (2005)

9.2.4.2 Inhibidores de la unión de gp120 y CCR5

La existencia de ligandos naturales para el receptor CCR5 que bloquean la infección por HIV, tales como MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) y RANTES (CCL5) fue el hilo conductor que llevó a una intensa investigación sobre fármacos capaces de impedir la entrada del virus. En un principio se pensó en la utilización directa de estas quimoquinas, pero pronto se vio que producen efectos secundarios no deseados, pudiendo derivar en una desregulación del sistema inmunitario. Actualmente, se viene investigando el efecto antiviral de modificaciones de RANTES

Otra estrategia seguida ha sido la de inhibir las interacciones gp120-correceptor mediante el empleo de un grupo de compuestos que se unen a un bolsillo hidrofóbico de las hélices transmembrana de CCR5 (Figura 9). Esta interacción conduce a un cambio estructural en los lazos extracelulares implicados en la interacción con HIV. Dentro de esta categoría está el Maraviroc, que fue aprobado en 2007 para el tratamiento de pacientes infectados con cepas de HIV resistentes a múltiples agentes antirretrovirales. Este compuesto, es efectivo sólo frente a cepas HIV R5-trópicas (es decir, aquellas que emplean CCR5 como correceptor).

En la **Figura 50** se muestra la estructura de estos inhibidores.

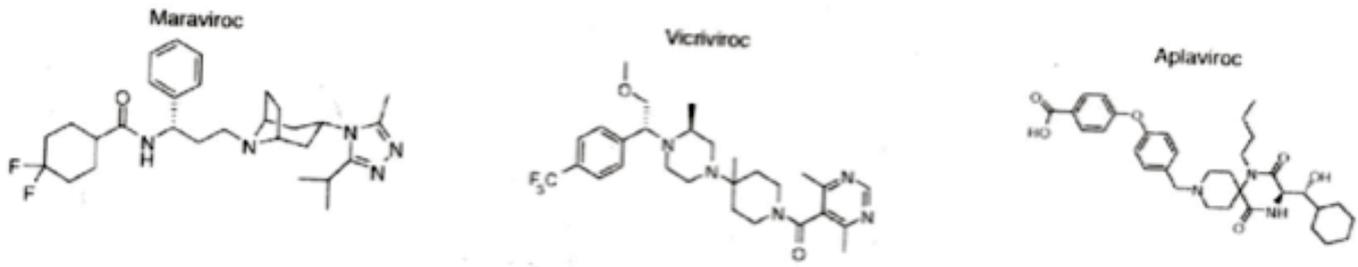


Figura 50. Estructura de distintos inhibidores de la unión de gp120 y CCR5.

Fuente: Tilton and Doms (2010).

A su vez, también se han desarrollado antagonistas del receptor CCR5, como Tak-220, SCH-C/D o UK-427,857 (Tabla 6).

9.2.4.3 Inhibidores de la unión de gp120 y CXCR4

Se han descubierto antagonistas del receptor CXCR4, como los biciclamos, que son fármacos muy activos contra VIH-1 y 2 en cultivos celulares, pero que se han descartado como fármacos en ensayos clínicos.

Además, la inhibición del correceptor CXCR4 no parece viable, ya que CXCR4, contrario a CCR5, 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.

9.2.4.4 Inhibidores de la fusión de las membranas celular y viral

Este proceso se encuentra mediado por la proteína viral gp41. Se han encontrado péptidos sintéticos correspondientes a los dominios HR1 y HR2 de gp41 que ejercen potentes efectos antivirales. El mecanismo de acción parece ejercerse a nivel de bloquear la reorganización de la gp41, proceso necesario para desencadenar la fusión; la unión competitiva de los péptidos a los dominios HR1 y HR2 sería responsable de dicho bloqueo.

El inhibidor de la fusión enfuvirtide (Figura 51) fue aprobado por la FDA de Estados Unidos para el tratamiento de pacientes en 2003. Enfuvirtide es un péptido sintético lineal de 36 aminoácidos con una secuencia idéntica a la región HR2 de gp41. Sin embargo, dado que las sustancias peptídicas no pueden ser administradas por vía oral (dada su labilidad) y deben ser inyectadas, existe una gran actividad de búsqueda de otro tipo de moléculas que tengan la capacidad de bloquear la fusión.



Figura 51. Secuencia de péptidos que inhiben la fusión de las membranas celular y viral.

Fuente: Tilton and Doms (2010).

9.3 Terapia HAART

La introducción en 1997 de un tratamiento consistente en la co-administración de tres drogas diferentes (terapia combinada triple), dos inhibidores de la RT (uno nucleosídico y otro no nucleosídico) y un inhibidor de proteasas, supuso un avance definitivo en la lucha contra la infección del HIV que pasó de ser una infección de mal pronóstico a una infección crónica controlable. Una de las razones del éxito de esta estrategia de tratamiento se encuentra en el hecho de que es muy poco probable la existencia de mutantes resistentes simultáneamente a las tres drogas al principio del tratamiento.

Estas poderosas combinaciones anti-HIV son conocidas como el tratamiento anti-retroviral sumamente activo (TARSA o HAART, "Highly Active Antiretroviral Therapy"). En la **Tabla 7** se muestran los fármacos actualmente empleados en distintas combinaciones, que se irán cambiando en función de posibles efectos secundarios o la aparición de resistencias.

FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES			
ITIAN	ITINAN	IP	IF
Zidovudina (AZT)	Nevirapina	Saquinavir	Enfuvirtida (T20)
Didanosina (ddI)	Efavirenz	Nelfinavir	
Lamivudina (3TC)		Ritonavir	
Zalcitabina (ddC)		Indinavir	
Estavudina (d4T)		Amprenavir	
Abacavir		Lopinavir	
Emtricitabina		Atazanavir	
ITIA nucleótidos		Fosamprenavir	
Tenofovir			

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITI-NAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP: inhibidores de la proteasa; IF: inhibidores de la fusión; ITIA nucleótidos: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos.

Tabla 7. Fármacos existentes contra el HIV que constituyen la denominada terapia HAART o TARSA.

Fuente: Santos and Fuertes (2006).

La administración de esta terapia disminuye los niveles de HIV-1 por debajo del límite de detección de los métodos clínicos de diagnóstico (50 copias de RNA de HIV-1 RNA por mililitro de plasma). Este tratamiento lleva a un incremento de linfocitos T CD4+, el restablecimiento parcial de la función inmunitaria y una disminución en las infecciones oportunistas y las muertes por SIDA. Esto ha provocado que la infección por HIV-1 haya pasado de ser una enfermedad de consecuencias mortales a una enfermedad crónica. Sin embargo, se ha comprobado que esta terapia no implica una cura, pues se ha demostrado que aun a bajos niveles se detectan células infectadas en pacientes tras años de tratamiento, debido a la persistencia del virus de forma no muy bien caracterizada, por lo que el virus no es destruido. Además, si se detiene el tratamiento, en poco tiempo (3-4 semanas) se observa un claro aumento en la carga viral de las personas infectadas (**Figura 52**).

Sin embargo, la gran mayoría (>95%) de las personas infectadas con HIV no tienen actualmente acceso a las drogas antirretrovirales.

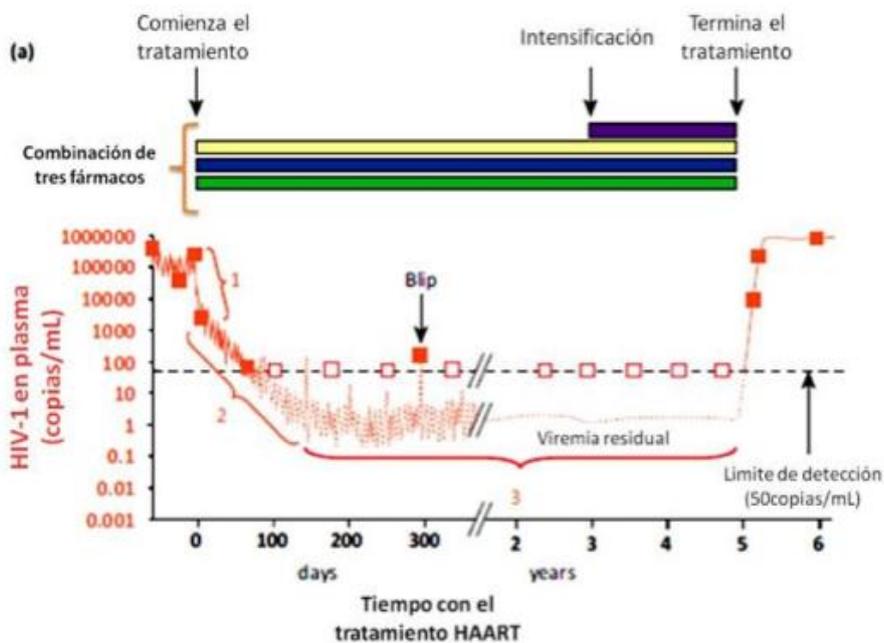


Figura 52. Evolución del número de copias del genoma de VIH a lo largo del tratamiento TARSA, manteniéndose bajo mientras dura el tratamiento pero disparándose en cuanto este se abandona.

Fuente: Adaptada de Durand et al. (2012).

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.

De esta manera, ni la respuesta inmunitaria ni los fármacos antirretrovirales pueden afectar al virus.

Cuando una célula T CD4+ encuentra su antígeno (presentado por una célula presentadora, APC) experimenta una transformación (se produce una activación del linfocito) y entra en ciclo celular, produciéndose una serie de rápidas divisiones que dan lugar a varias células efectoras activadas. Una vez ha desaparecido el antígeno, la mayoría de estas células efectoras mueren por mecanismos apoptóticos (que actúan como mecanismos compensatorios del sistema inmune). Sin embargo, algunas de estas células revierten a un estado G0 quiescente, persistiendo como células de memoria, preparadas para responder rápidamente en futuros encuentros con el mismo antígeno (**Figura 53a**). Este sería el curso normal de la respuesta mediada por linfocitos T CD4+.

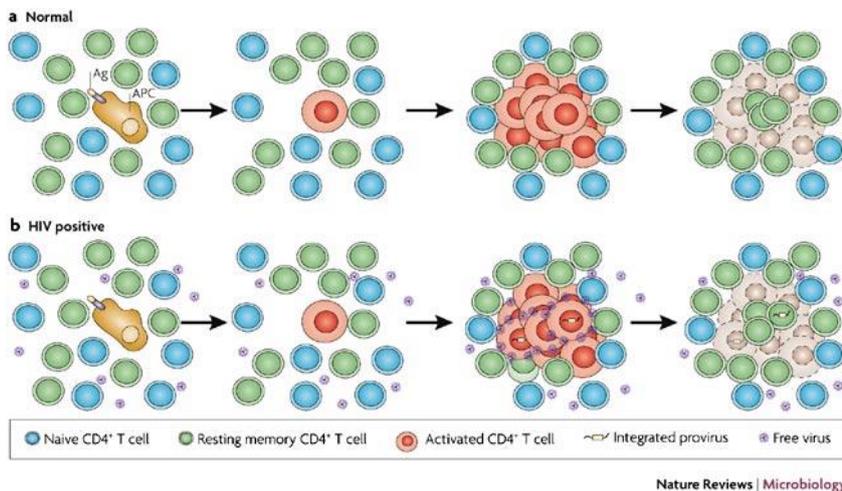


Figura 53.

a) Curso que sigue la respuesta de linfocitos T CD4+ en individuos no infectados

b) Curso que sigue la respuesta de linfocitos T CD4+ en individuos infectados por VIH

Fuente: Han et al. (2007)

Respecto al curso que sigue esta respuesta en pacientes infectados por HIV (**Figura 53b**) sucede de la misma manera que en el caso anterior, salvo que durante la activación de los linfocitos T el virus procede a realizar la infección, ya que HIV-1 se replica preferentemente en células T CD4+ activadas. No obstante, esas células sólo sobreviven unos días tras la infección. 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 (esto es, los linfocitos T de memoria no permiten la replicación viral. 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- κB) 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.

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”).

En algunos estudios se ha demostrado la presencia de virus competentes para la replicación y DNA de HIV-1 en linfocitos $T\gamma\delta$, que son 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 son los macrófagos, donde el virus puede persistir en su 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 estos son capaces de auto-renovarse y repoblar tejidos, *estableciéndose como células madre capaces de producir nuevas líneas fagocíticas*. Otras células importantes para la persistencia del virus 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 la forma de complejos inmunes, donde pueden persistir viables hasta al menos nueve meses. Estudios recientes han indicado que el HIV-1 podría también establecer latencia en células progenitoras hematopoyéticas.

El HIV-1 también se ha encontrado en el SNC, 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 que puede contener HIV latentes. *También se ha observado que el virus es capaz de establecer latencia en astrocitos.* La **Figura 54** muestra todos los tejidos y tipos celulares en los que se han encontrado HIV-1 latentes.

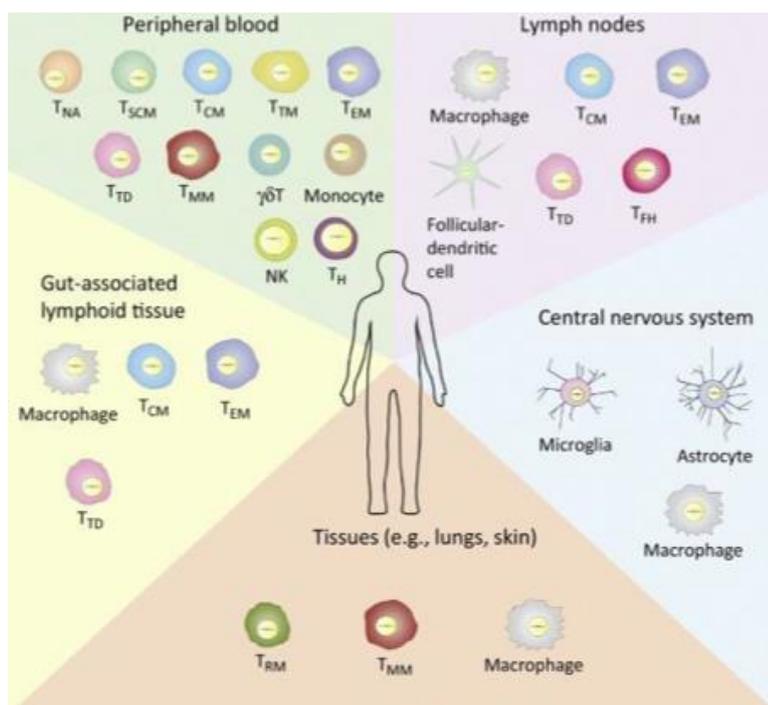


Figura 54. Tipos celulares en los que VIH puede establecer latencia.

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 mantiene 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 (**Figura 52**).

Además, hay que tener en cuenta que se trata de tratamientos caros y por tener efectos secundarios derivados de su uso prolongado. Se calcula que el tratamiento de una persona infectada por VIH cuesta entre 8000 y 10000 euros al año. Algunos pacientes están ya en su segunda década de tratamiento y en el mundo desarrollado unos 3 millones de personas están siendo tratadas; esto quiere decir que la terapia llega únicamente al 10 % de las personas infectadas.

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 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 para posibilitar una completa eliminación del virus

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

10.2.1 Utilización de nucleasas específicas de sitio

Una estrategia que se está ensayando actualmente es la utilización de nucleasas específicas de sitio para producir células resistentes a la infección por HIV-1. Las proteínas ZFNs son proteínas obtenidas por ingeniería molecular que contienen dos dominios: un dominio de dedo de zinc (“zinc finger domain”) con especificidad de reconocimiento de secuencia y un dominio endonucleasa. Cuando esta proteína encuentra su sitio de reconocimiento en el DNA produce una rotura en las dos cadenas que a continuación va a ser reparada por la célula mediante el mecanismo de unión de extremos no homólogos (“nonhomologous end joining”). Se han diseñado ZFNs específicas para impedir la expresión de CCR5 y CXCR4; estas ZFNs son introducidas en las células mediante vectores adenovirales o retrovirales o por métodos de transfección con nucleofectina. La alteración del gen CCR5 en células T CD4+ o en células hematopoyéticas conduce a menores cargas de HIV-1 en ratones “humanizados”. Actualmente se está realizando un ensayo clínico en personas infectadas con HIV-1. En este estudio, las células T CD4+ son colectadas mediante aféresis; a continuación, la ZFN específica de CCR5 es introducida en las células mediante un adenovirus, y finalmente las células modificadas genéticamente son introducidas en las personas. Una limitación de esta estrategia es que la ZFN específica de CCR5 no puede eliminar directamente a las células infectadas de forma latente.

Aféresis: Técnica por la que se separan los componentes de la sangre, siendo seleccionados los necesarios para su aplicación en medicina y devueltos al torrente sanguíneo el resto de componentes. El paciente o donante es conectado a la máquina de aféresis y la sangre es separada en sus distintos componentes en función de su densidad. El componente elegido es separado y recogido en una bolsa especial y las células restantes se devuelven al paciente o al donante.

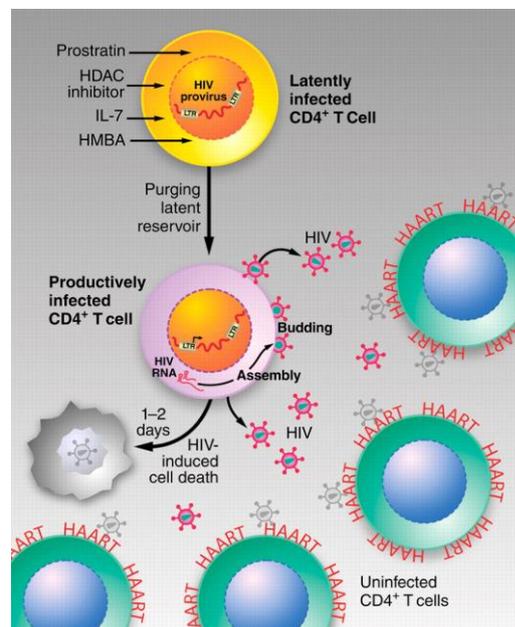
10.2.2 Activación de los virus latentes y destrucción de los mismos

Debido a las limitaciones ocasionadas por la estrategia descrita en el apartado anterior, actualmente 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. 28) mediante la completa eliminación del virus.

Mediante este abordaje, se pretende activar el virus que está latente en los linfocitos T de memoria, de tal manera que estas células producirían virus, destruyendo la célula infectada. Para evitar que el virus entre en las células de los alrededores, esta activación se realizaría en presencia de alta dosis de fármacos, de tal manera que los virus no serían capaces de entrar en estas células y serían eliminados por los fármacos (Figura 55).

Figura 55. Combinación de agentes activadores del virus con la terapia HAART para eliminar completamente el virus.

Fuente: Richman et al. (2009).



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:

a) *Linfocitos T en reposo*

En los linfocitos T en reposo, 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. Este silenciamiento está regulado por HDACs (“histone acetyltransferases”) y por HMTs (“histone methyltransferase”), que son reclutadas al promotor del HIV, induciendo un estado de heterocromatina. Se produce también la metilación de dos islas CpG por DNMTs (“DNA methyltransferase”), que participa también en la represión de la transcripción. Además, los factores de transcripción que participan en la activación de la transcripción del HIV-1 (como NF-κB y NFAT) se encuentran de forma inactiva secuestrados en el citoplasma. Así, por ejemplo, el NF-κB en las células en reposo se encuentra como un heterodímero p50/Rel A (p65) unido al factor IκB, que es el inhibidor de NF-κB (Figura 56a).

HDAC:
Enzima que participa en la regulación de la expresión génica mediante la eliminación de grupos acetilo de histonas o factores de transcripción. La deacetilación de histonas deriva en un estado más compacto de cromatina, lo que implica un

HMT:
Enzima que participa en la regulación de la expresión génica mediante la transferencia de uno, dos o tres grupos metilo a residuos conservados de arginina o lisina de las histonas. Según el número de grupos metilo que sean transferidos, y dependiendo del residuo y de la histona en el que se realicen, esto tendrá un efecto activador o represor de la expresión génica.

DNMT:
Enzima que participa en la regulación de la expresión génica mediante la transferencia de un grupo metilo a nucleótidos de citosina del ADN. Si se produce en un promotor de un gen, la metilación del ADN conlleva una represión de la transcripción. Este mecanismo está asociado también con procesos de gran importancia como el imprinting genómico, la inactivación del cromosoma X, la represión de elementos transponibles, el envejecimiento y la carcinogénesis.

b) *Linfocitos T activados*

Cuando se produce la activación de linfocitos T, 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. Mientras que en las células en reposo, como ya hemos visto, el factor NF-κB se encontraba unido al inhibidor IκB, tras la activación se produce la degradación de IκB. Esto permite la migración de NF-κB al núcleo y la unión al promotor de HIV del heterodímero p50-p65, que es la forma activa de NFκB. Este factor va a estimular la expresión de HIV, a través del reclutamiento de HATs ("Histone acetyltransferase") como p300/CBP y la remodelación de la cromatina mediante la acetilación de histonas.

HAT:

Enzima que participa en la regulación de la expresión génica mediante la transferencia de un grupo acetilo a residuos conservados de lisina en las histonas (u otras proteínas, como factores de transcripción). La acetilación de histonas está relacionada con la activación transcripcional y la formación de eucromatina. Es decir, que aumenta la expresión de ciertos genes.

A través de la vía PKC, que conduce a una liberación de calcio, la calcineurina desfosforila algunos componentes del factor NFAT, lo que induce su translocación al núcleo. Al igual que NF-κB, también una p300/CBP (**Figura 56b**).

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-κB 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.

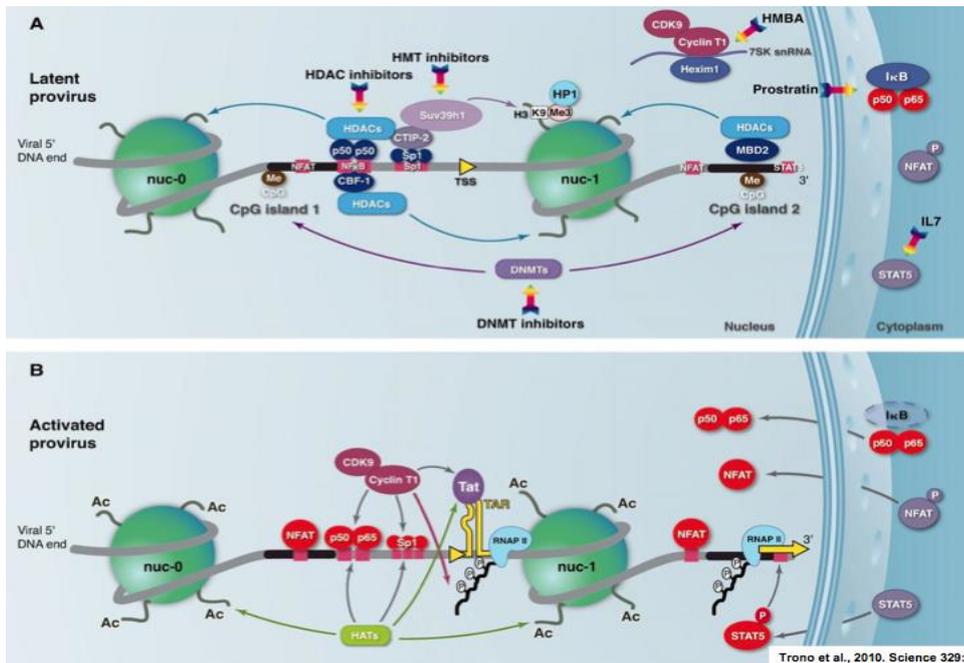


Figura 56.

a) Regulación de la latencia de HIV mediante diversos factores celulares

b) Regulación de la activación de VIH mediante distintos factores celulares

Fuente: Trono et al. (2010)

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 (**Figura 56**).

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, estas estrategias pueden resultar perjudiciales si se promoviera 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, 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 retrovirus contenidos en nuestro genoma.

De hecho, más del 40% del genoma humano deriva de tales retrovirus. 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 dichos inconvenientes, estas aproximaciones son interesantes porque persiguen erradicar la infección viral.

Como se ha mencionado anteriormente, sería necesario combinar la activación del provirus HIV latente con el tratamiento TARSA para producir la destrucción del virus activado y prevenir la expansión de HIV a otras células.

Prostatina:

Principio activo del té del árbol mamala, una planta medicinal empleada en medicina tradicional. Lleva siendo investigada desde hace 25 años por sus posibles aplicaciones terapéuticas contra enfermedades como el Alzheimer, el SIDA o la hepatitis.

11. Vacunas

La búsqueda por una vacuna frente al SIDA comenzó hace ya 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 9**).

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 8** 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.

11.1 Vacunas basadas en la inducción de una respuesta inmunitaria humoral

a) 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 (esto es, son capaces de neutralizar al virus in vitro). Desgraciadamente, en estos casos se observa una respuesta específica de cepa del virus. Es decir, 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.

b) Vacunas basadas en virus inactivados

Como intentos de mejorar la eficacia de la neutralización se han ensayado 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.

c) Vacunas basadas en pseudoviriones

Se ha planteado como una estrategia alternativa la posibilidad de que las proteínas Env podrían ser presentadas al sistema inmunitario embebidas en "pseudoviriones", estructuras artificiales que recuerdan partículas víricas. Los pseudoviriones se producen a partir de células en las que se insertan los distintos genes que dan lugar a las proteínas virales. Estas partículas son seguras, ya que se produce la partícula viral pero sin su material genético, ya que estas proteínas se producen a partir de moléculas que no se encuentran físicamente unidas.

Sin embargo, la principal limitación en este caso sería su producción, ya que son difíciles de producir en una forma estable.

11.2 Vacunas basadas en la inducción de una 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, así como presentadas por células especializadas denominadas células presentadoras o APCs (Antigen Presenting Cell). Para que una vacuna HIV estimule la inmunidad celular a través de MHC-I, debe inducir a que células seleccionadas, así como las APCs, sinteticen 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:

a) 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 patogénico, 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, no lo suficientemente fuertes para que se considere utilizar estas vacunas. Además, esta técnica requiere la producción de grandes cantidades de material para producir la vacuna.

b) 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, que contengan regiones antigénicas reconocidas por el sistema inmunitario. Estos péptidos son capaces de introducirse en células y serán presentados mediante MHC-I. Sin embargo, este mecanismo tampoco induce fuertes respuestas inmunitarias en humanos.

c) Vacunas de DNA

Una aproximación novedosa para inducir respuestas inmunitarias celulares consiste en la inyección de DNA desnudo de genes HIV. Aunque inicialmente 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 como 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.

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 8. Distintos tipos de vacunas contra el VIH.

Fuente: Adaptada de Scientific American (1998).

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
AIDSVAX B/B	gp120	B	Brasil, Haití, Perú, Trinidad y Tobago	2b
ALVAC vCP1452	Env-Gag-Pol-CTL	B	Brasil, Haití, Perú, 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	Env-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-	Env	A,B,C	USA	1
99-VP	Gag-Pol-Env	B	USA	1
GTU-Nef DNA	Nef	B	Finlandia	1
VCR4302 DNA	Gag-Pol	B	USA	1
Gag DNA	Gag	B	USA	1
PGA2/JS2 DNA	Gag, RT, Env, Tat, Rev, Vpu	B	USA	1
NefTat fusion/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	
LIPO-5T o LIPO-6T lipopeptide	Gag-Pol-Nef-TT-CD4	B	Francia	
GTU-Nef DNA	Nef	B	Finlandia	1
VCR4302 DNA	Gag-Pol	B	USA	1
Gag DNA	Gag	B	USA	1
PGA2/JS2 DNA	Gag, RT, Env, Tat, Rev, Vpu	B	USA	1
NefTat fusion/gp120	Nef-Tat, gp120	B	USA	1

Tabla 9. Vacunas contra VIH en distintas fases de ensayos clínicos.

Fuente: Adaptada de: <http://www.iavi.org>

12. Bibliografía

Referencias.

- **Alcamí, J. and Coiras, M.** (2011). Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(3):216–226.
- **Alizon, S., Magnus, C.** (2012). Modelling the Course of an HIV Infection: Insights from Ecology and Evolution. *Viruses*, 4(10): 1984-2013.
- **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: 78-83.
- **Barton, K., Winckelmann, A. And Palmer, S.** (2016). *HIV-1 reservoirs during suppressive therapy.* *Trends Microbiol* 24(5):345-55.
- **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.
- **Brenchley, M. and Douek, D.C.** (2008). HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunology* (2008) 1, 23–30.
- **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.
- **Coiras, M., Lopez-Huertas, M.R., Perez-Olmeda, M. and Alcamí, J.** (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 798-812.
- **Connor, R., Ho, D., Kuritzkes, D. and Richman, D.** (1997) Human immunodeficiency virus. In: *Clinical virology* (D.D. Richman, R.J. Whitley y F.G. Hayden, eds). Churchill Livingstone Inc., New York.
- **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.
- **Durand, C.M., Blankson, J.N. and Siliciano, R.F.** (2012). Developing strategies for HIV-1 eradication. *Trends Immunol.* 33: 554-562.
- **E.Santos Corraliza, A.Fuertes Martín** (2006). Side effects of antiretroviral therapy. *Fisiopatología, clinical manifestations and treatment.* *An Med Interna* 23(7)338-44.
- **Estcourt, M.J., McMichael, A.J., and Hanke, T.** (2004). DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol. Rev.* 199: 144-155.
- **Esté, J.A.** (2003). Virus entry as a target for anti-HIV infection. *Current Medicinal Chemistry* 1617-1632(16).

- **Fauci, A.S.** (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat. Med.* 9: 839-843.
- **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.
- **García, F., Álvarez, 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* Vol. 29. Núm. 4 de abril, 2011; 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 Alcami, J.** (2006) Retroviridae. En: *Virus patógenos* (Eds.: L. Carrasco y J.M. Almendral). Ed.Hélice, pp. 281-305.
- **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: 95-106.
- **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.
- **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.
- **Kilby, J. and Eron, J.** (2003). *Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. N Engl J Med.* 348(22):2228-38.
- **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-Aldeguer, J., Aguirrembegoa, K., Arribas, J., Esté, J. and Kindelán, J.**(2005). New targets and new drugs in the treatment of HIV. *Enferm Infecc Microbiol Clin. Suppl* 2:25-40.
- **Malim, M.H. and Emerman, M.** (2001) HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* 104:469-472.

- **Manches, O., Frleta, D. and Bhardwaj, N.** (2014). Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. Volume 35, Issue 3, 114–122.
- **Mann, J.M. and Tarantola, D.J.M.** (1998) HIV 1998: The global picture. *Scientific American*. July: 62-63.
- **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., Borrow, P., Tomaras, Georgia D., Goonetilleke, N., and Haynes, B.** (2011). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol.*; 10(1): 11–23.
- **McMichael, A.J. and Hanke, T.** (2003) HIV vaccines 1983-2003. *Nat. Med.* 9: 874-880.
- **Moir, S. and Fauci, A.** (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Apr; 9(4): 235–245.
- **Munawwar, A. and Singh, S.** (2016). Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression. *J Lab Physicians* 8(1): 5-18.
- **Nabel, G.J.** (2001) Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* 410: 1002-1007.
- **Naif, H.M. (2013).** Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep*; 5(Suppl 1): e6.
- **Nakatsuma, A., Kaneda, M., Kodama, H., Morikawa, M., Watabe, S., Nakaishi, K., Yamashita, M., Yoshimura, T., Miura, T., Ninomiya, M. and Ito, E.** (2015). Detection of HIV-1 p24 at Attomole Level by Ultrasensitive ELISA with Thio-NAD Cycling. *PLoS ONE* 10 (6): e0131319.
- **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.
- **Permanyer, M., Ballana, E., and Este, J.A.** (2010). Endocytosis of HIV: anything goes. *Trends Microbiol.* 18: 543-551.
- **Piao, D., Basavapathruni, A., Iyidogan, P., Guangxiu, D., Wolfgang, H., S. Ray, A., Murakami, E., Y. Feng, J., You, F., E. Dutschman, G., J. Austin, D., A. Parker, K., S. Anderson, K.** (2013). Bifunctional inhibition of HIV-1 reverse transcriptase: A first step in designing a bifunctional triphosphate. *Bioorg Med Chem.* 23(5): 1511-1518.
- **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.
- **Shattock, R.J., and Moore, J.P.** (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 25-2434.
- **Shearer, G.M.** (1998) HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity* 9: 587-593.
- **Stevenson, M.** (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 9: 853-860.
- **Taborda, N., Hernández, J., Montoya, C. and Rugeles, M.** (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;* 33:11-20.
- **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.
- **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, Y. and Yoder, A.** (2009). Chemokine coreceptor signaling in HIV-1 infection and pathogenesis. *PLoS Pathog* 5:e1000520.
- **Yang, W., Laeyendecker, O., Wendel, S.K., Zhang, B., Sun, S., Zhou, J.Y., Ao, M., Moore, R.D., Jackson, J.B., Zhang, H.** (2014). Glycoproteomic study reveals altered plasma proteins associated with HIV elite suppressors. *Theranostics* 4(12): 1153-63.
- **Yefei, H., Wind-Rotolo, M. Hung-Chih, Y., D.Siciliano, J. and F.Siciliano, R.** (2007). Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. *Nature Reviews Microbiology* 5, 95-106.

Direcciones web de interés.

- <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://genderedinnovations.stanford.edu/case-studies/hiv.html#tabs-2> Mapa mundial de la prevalencia del HIV en adultos.
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/> Información de la OMS sobre el HIV: síntomas, transmisión, factores de riesgo, diagnóstico, prevención, etc.
- http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/Get-on-the-Fast-Track_en.pdf Información del Programa de las Naciones Unidas sobre la situación actual del HIV.
- <http://www.nature.com/nri/posters/hiv/index.html>. Póster sobre la respuesta inmune ante el VIH.
- <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/90000-94999/93733/norma.htm>. Recomendaciones para el Diagnóstico y Tratamiento del VIH/SIDA en Pediatría, del Ministerio de Salud de Argentina.
- <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447>. Recomendaciones para el diagnóstico de VIH por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades.
- <http://www.infosida.es/las-pruebas-del-vih/las-pruebas-clasicas-para-vih-sida>. Pruebas clásicas para el VIH: ELISA y PCR.