



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 7 · Nº 2, Año 2001 · ISSN 1315-1746 · Depósito Legal pp 199202DF899 Suscrita a Lilacs, Asereme, Bireme

Virus de la Inmunodeficiencia Humana VIH 1

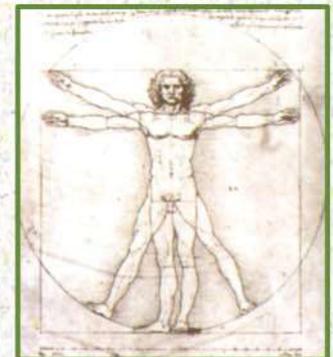
Biología Molecular del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Prisma de la Evolución y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Diagnóstico, Pronóstico e Interpretación de los Resultados de Laboratorio en la Infección por el VIH

Influencia de los Factores Genéticos del Huésped en la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Una Reflexión... Lo Biológico y Lo Ético





Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

ISSN: 1315-1746 - Depósito Legal: pp 199202DF899 - Suscrita a Lilacs, Asereme Bireme
Volumen 7 N° 2 Año 2001

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONSEJO DIRECTIVO

Editora

Dra. Ana Monzon de Orozco

Gerencia Editorial

Dr. Carlos Aponte

Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (S.V.B.E)

JUNTA DIRECTIVA

Presidente

Dr. Axel Rodolfo Santiago

Dirección General

Lic. Juana Vitelli de Flores

Dirección Científica

Dra. Ana Monzón de Orozco

Dirección Administrativa

Dra. Hilda Romero

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Dr. Julio Cesar González

Comisión de Estudio de Credenciales

Lic. Irene Mauri de Tami (Coordinadora)

Lic. Ludovina Guerra de Barreto

Lic. Dilia Heredia de Rubin

Comisión para otorgar unidades crédito

Lic. Rosandra Mazzali de Ilja (Coordinadora)

Lic. Josefina Guariguata

Lic. Graciela Maggi

Comisión de la calidad y sus sistemas de gestión

Josefina Guariguata (Coordinadora)

Adriana Márquez

Natalie Briones

José Luis Rodríguez

Marcel Mejías

Revista arbitrada dedicada a estudios humanos, animales y de laboratorio relacionados con la investigación biológica y clínica.

Publicada semestralmente por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Caracas, República Bolivariana de Venezuela.

Dirección: Av. Ppal de Los Chorros entre transversales Alfredo Jahn y Alvarez Michaud, Qta. Colegio de Bioanalistas, Caracas, Venezuela.

Coordinación y Edición:
Antonio Cárdenas Editores
Telf. 237.90.90 - 235.43.65



REGLAMENTO

Acta Científica de la Sociedad de Bioanalistas Especialistas es una publicación biomédica, de presentación semestral, arbitrada, contentiva de trabajos originales, reportes de casos clínicos, trabajos experimentales y revisiones en español e inglés, que contribuyen al avance del conocimiento en biología humana y animal.

Para la publicación de los trabajos, se deben enviar en original y tres copias adicionales del manuscrito a la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, dirigidas a la Dra. Ana Monzón de Orozco, Gerencia Editorial; Caracas, República Bolivariana de Venezuela.

Dirección de la sede: Av. Ppal. de Los Chorros entre transversales Alfredo Jahn y Alvarez Michaud Qta. Colegio de Bioanalistas. Caracas, Venezuela.

Se debe incluir una Carta de Presentación en la cual los autores aceptan con su firma que el trabajo sea publicado en la revista y que participaron en el desarrollo y ejecución del mismo. Además establecer que no está siendo enviado para publicación en otra revista. En caso de ser aceptado, la Sociedad no se hace responsable por el contenido expresado en el trabajo publicado.

Normas editoriales. Los trabajos deberán estar impresos a doble espacio, sobre papel blanco grueso, con amplio margen a los lados. La versión final deberá incluir además un disquete de 3 1/2 grabado en Word for Windows.

Los trabajos deben dividirse en: Título, Resumen en español, Palabras clave; Resumen traducido en Inglés, Palabras clave en inglés, Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Referencias Bibliográficas, Agradecimientos.

1. **Título:** Debe ser breve, explicativo y contener la esencia del trabajo, sin abreviaturas.
2. **Autores:** Deben indicarse los nombres y apellidos completos, sin señalar títulos profesionales.
3. **Direcciones:** Indicar la dirección completa de la institución donde se realizó el trabajo, y aquellas a las cuales pertenecen los autores, señalando con símbolos apropiados a qué autor corresponden. Indicar además, el autor principal y a quién se debe dirigir la correspondencia.
4. Incluir un grupo de **palabras clave**, en español y en inglés, apropiadas para la mejor ubicación en los índices internacionales.
5. Para el **resumen en Inglés** o la presentación completa del trabajo en este idioma, se recomienda asesoramiento con especialistas para una correcta redacción.
6. **Figuras y tablas:** Las figuras y tablas deben presentarse en hojas separadas y deben estar referidas en el texto.

Las figuras se deben identificar con números arábigos y pueden consignarse como fotografías en blanco y negro de buena calidad en cuanto a foco y contraste como gráficos obtenidos en computadora, preferiblemente con impresión láser. No se aceptarán fotocopias. Las fotografías y microfotografías deben ser reproducciones nítidas en blanco y negro. Su tamaño no se excederá el de la hoja impresa. Las fotografías a color serán costeadas por los autores. No deben hacerse montajes y al dorso indicar el número correspondiente y una flecha que señala la parte superior de la figura. Se debe indicar la magnificación de las microfotografías. Las fotografías y gráficos no deben tener incorporada la leyenda, éstas deben presentarse en hoja aparte, en forma suficientemente explicativa para que el lector no tenga que recurrir al texto.

Las tablas se deben identificar con números romanos, llevar un encabezamiento descriptivo, no se deben usar rayas verticales y las abreviaturas de deben explicar al pie de la tabla.

7. **Referencias Bibliográficas:** Estas deben colocarse en orden de aparición de autores y deben estar citadas en el trabajo. Los autores son responsables de la fidelidad de las referencias. No se aceptarán como referencias bibliográficas trabajos por publicar, en prensa, ni comunicaciones personales; sin embargo, este tipo de cita podrá ser incluida entre paréntesis en el texto del trabajo. Estas deben contener los apellidos de todos los autores y sus iniciales; título del trabajo, revista donde fue publicado, usando abreviaturas reconocidas internacionalmente para las publicaciones periódicas, año de publicaciones, volumen y páginas (primera y última). Se debe seguir estrictamente el siguiente estilo:

Publicaciones periódicas:

Erikson J., Franssila A., Ekstrand A., Saloranta C., Widen E., Schelin C., Groop L.: Early metabolic defects in persons at risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl J Med* 1989; 321:337-343.

Libros:

McGiff J.C., Nasjletti A.: Renal prostaglandin and regulation of blood en: Kahnn R.H., Landis W.E.M. Eds. Prostaglandin and cyclic AMP: biological actions and clinical application. New York: Academic Press, 1973. p. 119.

Memorias de Congresos:

Lian E.C.Y., Diez-Ewald M., Lian A.J.: Detection of hemophilic carriers by determination of the ratio between ristocelin cofactor activity and factor VIII activity. *Proceedings of the 16th. Congress Int Soc Hematol; Tokyo, Japan.* p. 327.

Se recomienda revisar cuidadosamente el último número de la revista como gula en la preparación del manuscrito.

Todos los aspectos no previstos en el presente reglamento serán resuelto por el Comité Editorial.

EDITORIAL

Tenemos un nuevo reto, desde el mes de marzo del presente año, nos ha tocado nuevamente formar parte de la Junta directiva de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Hemos aceptado este compromiso con gran sinceridad, responsabilidad y alegría. Todos los que conformamos esta Sociedad, sabemos lo que ha costado mantener en alto el nombre de nuestra profesión, elevando científicamente el verdadero valor de todos aquellos que de una manera u otra siguen contribuyendo a la ciencia en nuestro país.

Nuestra Sociedad sigue creciendo, próximamente celebraremos el XI Congreso Venezolano de Bioanálisis que conjuntamente con la Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela tenemos el honor de organizar. Durante este evento, de igual forma celebraremos las XIV Jornadas Científicas de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas y el II Encuentro del Colegio de Bioanalistas del Distrito Federal y Estado Miranda donde se rinde homenaje a la incansable luchadora gremial, Licenciada Margarita Iturriza quien es digna de nuestro mayor elogio y consideración.

Queremos desde ya, felicitar al comité organizador de este magno evento científico a través de su Presidenta Licenciada Fidas Herrera deseándoles el mayor de los éxitos. Todos sabemos lo difícil que es, en estos días comprometerse a realizar esta misión, pero estamos seguros que con el apoyo de todos los Bioanalistas, casas comerciales, invitados nacionales e internacionales conseguiremos nuevamente finalizarlo positivamente.

Es un orgullo para los Bioanalistas y para todos los investigadores del área de la Salud, contar con, "Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas", una revista científica única de nuestro gremio, que dirigida excelentemente por la Dra. Ana Monzón de Orozco, permite a todos nosotros la posibilidad de publicar nuestros trabajos científicos. Nues-

tra revista esta indexada en Lilacs y Asereme, lo que le da la altura necesaria para garantizar la lectura internacional de nuestros trabajos científicos. Una vez más, invitamos a que hagan suyo este órgano divulgativo. Esperamos contar, como siempre con su apoyo al enviar sus trabajos de investigación para ser publicados en nuevos números. Publicaremos igualmente, los trabajos correspondientes a los premios "Sociedad de Bioanalistas Especialistas" y premio "Estudiantes Dra. Franca Billi" que serán otorgados en nuestro evento científico. Este número está dedicado al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH1), enfocará diferentes aspectos relacionados a este Síndrome.

Desde el mes de marzo tenemos a la disposición de todos los interesados nuestra página Web cuya dirección es [WWW.bioanalistasespecialistas.com.ve](http://www.bioanalistasespecialistas.com.ve) <<http://www.bioanalistasespecialistas.com.ve/>> le invitamos a visitarla

Desearía agradecer a todos mis compañeros y amigos quienes de igual manera aceptaron el reto de formar parte de esta junta directiva. Especial saludo fraterno merece nuestra amiga la Licenciada Josefina Guariguata quien conjuntamente con su equipo estuvo dirigiendo esta Sociedad hasta febrero del presente año. Digo sin miedo a equivocarme que la labor desempeñada por esta excelente representante de nuestra Sociedad es digna de imitación, esperamos poder continuar su labor con la misma dedicación que ella mantuvo a través de los años.

Son tiempos difíciles para todos, no podemos permitirnos que esto amedrente nuestra labor, confiamos que sabremos cumplir con lo que se nos propuso, enaltecer al Bioanalista aquí y fuera de nuestras fronteras.

Dr. Axel Rodolfo Santiago S.
Presidente

INFORCIENCIA 2004

I Congreso Venezolano de Información en Ciencias de la Salud y XXIV Encuentro Anual de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas (ASEREME)

Fecha: Octubre 8 al 10 de 2004.

Lugar: Facultad de Farmacia, UCV

JUNTA DIRECTIVA - ASEREME:

<i>Dr. Herbert Stegemann</i>	<i>Presidente</i>	<i>hstegemann@cantv.net</i>
<i>Dra. Ana Monzón de Orozco</i>	<i>VicePresidente</i>	<i>famiorozco@cantv.net</i>
<i>Dr. Oscar Quirós Alvarez</i>	<i>Tesorero</i>	<i>oquiros@cantv.net</i>
<i>Dra. Maritza Landaeta de Jiménez</i>	<i>Secretario</i>	<i>maritzal@telcel.net.ve</i>
<i>Dr. Elias Fernández</i>	<i>Vocal</i>	<i>efm746@cantv.net</i>
<i>Lic. Alecia Acosta</i>	<i>Representante Sinadib</i>	<i>aacosta@epidauro.net.ucv.ve</i>

CURSOS PRECONGRESO:

- *Como escribir una tesis académica*
- *Formación de árbitros*
- *Transformación de revistas impresas a electrónicas*
- *Presentación en PowerPoint*

PROGRAMA CIENTÍFICO PRELIMINAR

- *Avances en tecnología de investigación-bibliotecas virtuales, derechos de autor*
- *Deposito legal*
- *Educación a distancia*
- *Factor impacto, su vigencia*
- *Formación de editores*
- *Internet I*
- *Periodismo Científico*
- *Proyecto SciELO*
- *Telemedicina*
- *Formación de editores.*

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

Dra. Cristina del Rosario Gutiérrez García

Departamento Virología, Sección de Programas Especiales, Hepatitis Sida
Instituto Nacional de Higiene

RESUMEN

Veinte años después de su descubrimiento, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se ha convertido en la pandemia más importante de las últimas décadas. El SIDA es causado por dos diferentes virus de inmunodeficiencia humanos, VIH-1 y VIH-2, pertenecientes a la familia Retroviridae. La partícula viral consiste de una envoltura de naturaleza lipoproteica, derivada de la membrana celular hospedera, que contiene las dos proteínas de envoltura viral, denominadas gp120 y gp 41. La envoltura rodea a la nucleocápside, estructura constituida por una cubierta intermedia o matriz y una cápside interna que está en estrecha interacción con el genoma viral representado por una molécula de ARN de doble cadena y polaridad positiva de longitud aproximada de 9.800 nucleótidos. Los genes del VIH se localizan en la región central del genoma integrado o provirus y codifica al menos nueve proteínas (estructurales, reguladoras y accesorias). El conocimiento del ciclo de vida del VIH provee las bases biológicas para el control de la epidemia. Una de las características principales del VIH es su rápida evolución, lo cual resulta en una diversidad genética considerable entre diferentes aislados del mundo entero. Existen 3 grupos principales, 9 subtipos y formas recombinantes descritas para el VIH-1. La variabilidad genética de este agente viral y en consecuencia, cualquier variación fenotípica influye sobre la patogénesis de la infección y el control de la enfermedad. Finalmente, se discuten las implicaciones de la diversidad genética observada en el VIH sobre el desarrollo de vacunas y terapias antiretrovirales eficaces contra este agente viral.

PALABRAS CLAVE: VIH, INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA, GENOMA, REPLICACIÓN, VARIABILIDAD.

SUMMARY

Twenty years after its recognition, the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) has become the most important pandemic in the last decades. AIDS is caused by two different human immunodeficiency viruses, HIV-1 and HIV-2, belonging to the Retroviridae family. The viral particle consists of lipoprotein envelope derived from host cell membranes which contains two viral envelope proteins, designated as gp120 and gp41. The envelope surrounds the nucleocapsid, a structure formed by an intermediate covering or matrix and an internal capsid that is tightly interacting with the viral genome represented by a positive-sense double stranded RNA molecule of approximately 9.800 nucleotides. The genes of HIV are located in the central region of the proviral DNA and encode at least nine proteins (structural, regulatory and accessory proteins). Understanding the HIV life cycle provides the biological basis for controlling the epidemic. One of the major characteristics of HIV is its rapid evolution, which has resulted in substantial genetic diversity amongst different isolates worldwide. There are 3 main groups, 9 subtypes and recombinant forms described to HIV-1. Genetic variability of this viral agent and any consequent phenotypic variation affect to pathogenesis of HIV infection and disease control. Finally, the implications of HIV genetic diversity on the development of efficient vaccines and antiretroviral therapies against this viral agent are discussed.

KEY WORDS: HIV, IMMUNODEFICIENCY ACQUIRED, GENOME, REPLICATION, VARIABILITY.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) constituye la primera pandemia de la segunda mitad del siglo XX¹. En 1981, se diagnosticaron los primeros casos de SIDA en jóvenes varones homosexuales. En 1983, Françoise Barré-Sinoussi y colaboradores del Instituto Pasteur de París y en 1984, un grupo encabezado por Robert C. Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, lograron independientemente identificar el agente causal de la enfermedad, un retrovirus. Los investigadores franceses lo denominaron LAV (siglas en inglés, virus asociado a la linfadenopatía) y el grupo norteamericano lo denominó HTLV-III (por virus linfotrópico T humano tipo III), relacionado con dos retrovirus linfotrópicos T humanos HTLV-I y HTLV-II, desencadenantes del proceso que causan la leucemia de linfocitos T^{1,2}. Más tarde, en 1986 un comité internacional de taxonomía viral sugirió la denominación de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para designar a LAV y HTLV-III, dado que ambos virus correspondían al mismo agente¹. El VIH ataca diversos tipos de células del organismo humano infectado con predilección por los linfocitos T CD4⁺, provocando el descalabro de su sistema inmunitario³. La consecuente disminución de esta subpoblación linfocitaria confiere al paciente vulnerabilidad ante cualquier infección "oportunist" causada por agentes que en circunstancias normales no dañarían a una persona sana⁴.

Se estima que aproximadamente 52,5 millones de personas en el mundo entero son portadoras del VIH y cerca de 22 millones de pacientes han muerto a causa del SIDA³. Más de las dos terceras partes de la población mundial infectada vive en el África Sub-Sahariana^{3,5}.

En América Latina, se estima que aproximadamente 1,5 millones de personas (adultos y niños) se encuentran infectadas por el VIH⁶. En general, estas cifras revelan que a partir de su primera identificación, hace más de veinte años, la incidencia de VIH/SIDA se ha elevado vertiginosamente en la población mundial, excediendo las expectativas de su impacto en cuanto a número de pacientes infectados y severidad de la enfermedad.

A continuación se tratarán aspectos fundamentales sobre la biología molecular del VIH con especial énfasis en las características estructurales del virus, su modo o estrategia de replicación y el influjo de su variabilidad genética en el control de la infección viral.

Características estructurales y organización genómica del VIH

El VIH pertenece a una familia de virus ARN designada *Retroviridae*¹. El virión infeccioso del VIH se observa al microscopio electrónico como una partícula esférica de aproximadamente 80 a 100 nm de diámetro. En la estructura del virión se distinguen tres capas concéntricas: una envoltura lipoproteica externa constituida por las dos glicoproteínas de la envoltura viral: la gp120 o glicoproteína de superficie y la gp41, unida a la anterior y embebida en la membrana lipídica del virus; una nucleocápside formada por una cubierta intermedia o matriz compuesta por la proteína p17 en estructura icosaédrica, localizada a muy poca distancia de la envoltura externa (a diferencia del HTLV-I y HTLV-II) y una cápside interna, constituida por la proteína p24 en disposición helicoidal y la proteína P9 (proteína de la nucleocápside), la cual encierra al genoma viral y a las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y proteasa, formando un nucleoide central cuya estructura semeja a un cono truncado (Figura 1)⁷.

El genoma viral consiste en dos hebras de ARN de 9,8 kb de longitud y polaridad positiva, el cual contiene al menos 9 genes dife-

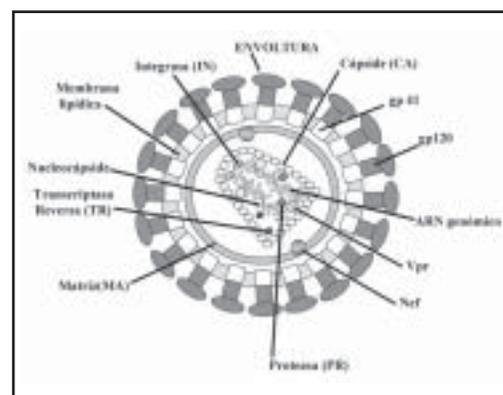


Figura 1. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humano.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología Molecular
del Virus
de Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

gp120 en la unidad trimérica permite la proyección de tres dominios de fusión que se insertan en la bicapa lipídica de la célula hospedera, lo cual promueve el proceso de fusión, permitiendo la liberación de la cápside viral en el interior de la célula. Así mismo, los viriones del VIH pueden entrar a las células por endocitosis. Por lo general, no se produce la infección productiva por esta vía, lo cual permite suponer la inactivación de estos viriones dentro de los endosomas²¹.

Transcripción y replicación viral

En el citoplasma de la célula se produce la decapsidación del virión, liberando el ARN genómico viral, el ARN de transferencia lisina, el cual actúa como un cebador para la transcripción reversa, la transcriptasa reversa, la integrasa, las proteínas de la matriz y la nucleocápside, la Vpr y diversas proteínas del hospedero (Figura 3). Posteriormente, se produce la transcripción reversa del ARN genómico a ADN viral por acción de la transcriptasa reversa y se forma el complejo de preintegración del VIH (CPI), constituido por el ADN viral de doble cadena, proteínas de la matriz, Vpr, las enzimas transcriptasa reversa e integrasa y el grupo de proteínas celulares de unión al ADN de elevada movilidad (en inglés, HMG1)²². A diferencia de la mayoría de los retrovirus animales, el VIH puede infectar células que no se encuentran en estado de división, tales como macrófagos diferenciados, lo cual requiere de la capacidad de cruzar la membrana nuclear intacta²³.

El CPI es transportado al interior del núcleo a través de un proceso mediado probablemente por las proteínas de la matriz, Vpr y/o integrasa^{22, 24, 25}.

El ADN viral se incorpora al genoma de la célula infectada para formar un provirus integrado mediante la acción de la integrasa viral. Las proteínas celulares HMG1(Y) y BAF ("barrier to autointegration", en inglés) son requeridas para la integración eficiente, aunque no se conocen sus funciones precisas²⁶. La integración puede permitir formas transcripcionalmente activas o latentes de la infección²⁷.

La transcripción del genoma viral resulta en más de una docena de diferentes transcriptos específicos. El proceso de transcripción es mediado por un promotor simple en la secuencia repetida terminal (LTR, en inglés) situada hacia el extremo 5'. La expresión del LTR 5' genera un ARN primario de 9 kb, el cual puede ser procesado para originar más de treinta ARNms alternativos o bien puede permanecer sin procesar y ser empaquetado dentro de los viriones como ARN genómico. Algunos transcriptos procesados en forma múltiple son transportados rápidamente al citoplasma en ausencia de secuencias de ARN inhibitorias (IRS, en inglés). Estos ARNms codifican las proteínas Nef, Tat y Rev. Otros transcriptos procesados de manera simple o no procesados permanecen en el núcleo y son relativamente estables. Estos transcriptos virales codifican las proteínas estructurales,

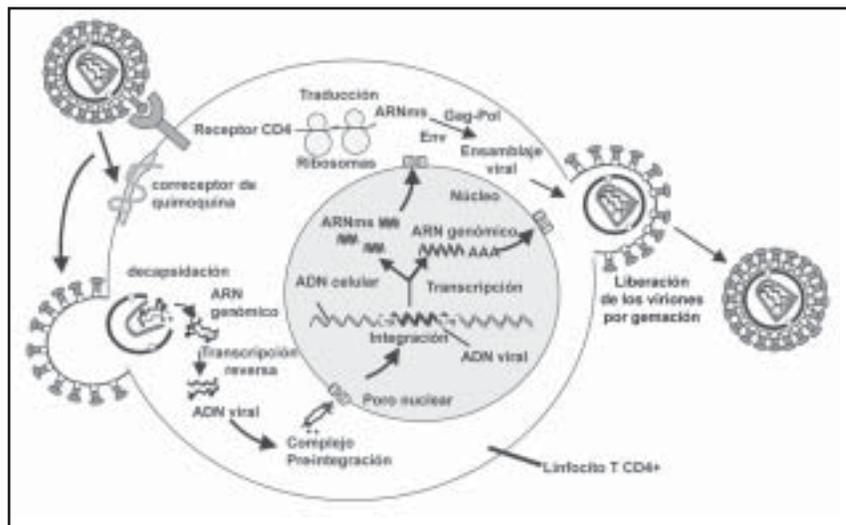


Figura 3. Ciclo infeccioso del VIH.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
de Biología Molecular
del Virus
de Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

enzimáticas y accesorias y representan los ARNs genómicos virales necesarios para el ensamblaje de los viriones infecciosos²⁸.

La regulación de la expresión genética del VIH es efectuada por una combinación de factores virales y celulares, siendo regulada a nivel transcripcional y posttranscripcional. Los genes del VIH pueden ser divididos en genes tempranos y genes tardíos. Los genes tempranos: *tat*, *rev* y *nef* son expresados de una manera independiente de la proteína Rev. Los ARNs codificantes de los genes tardíos: *gag*, *pol*, *env*, *vpr*, *vpu* y *vif* requieren a Rev para ser localizados en el citoplasma y expresados²⁹.

La proteína Tat de 14 Kd se une a una estructura en el extremo 5' de los ARN virales, denominada elemento de respuesta de la transactivación (TAR, siglas en inglés). Esta unión se produce conjuntamente con algunas proteínas celulares que contribuyen al efecto del Tat. La unión de Tat a TAR activa la transcripción del LTR del VIH en a menos 1000 veces, promoviendo la fase de elongación de la transcripción del VIH-1 para que puedan ser producidos los transcriptos completos. Por otra parte, la proteína Rev induce la transición de la fase temprana a la fase tardía de la expresión genética del VIH. La unión de Rev a su sitio de unión específica en el ARN viral ("Rev response element, RRE" en inglés) facilita la exportación de ARNs virales que contienen intrones (secuencias parcialmente o no procesadas) desde el núcleo al citoplasma. De esta manera, Rev disminuye la tasa de procesamiento del ARN viral. Los provirus que carecen de la proteína Rev funcional son transcripcionalmente activos pero no expresan los genes virales tardíos y por ende no producen viriones³⁰.

En contraste a Tat y Rev, los cuales actúan directamente sobre estructuras del ARN viral, la proteína Nef (27 Kd) modifica el medio ambiente de la célula infectada para optimizar la replicación viral e igualmente promueve la liberación de viriones más infecciosos^{31, 32}.

Otras proteínas virales igualmente participan en la modificación del medio ambiente en células infectadas. Tal es el caso de Vpr (15 Kd) cuya expresión es dependiente de Rev.

Esta proteína induce el detenimiento de la proliferación de células infectadas en la fase G2/M del ciclo celular, lo cual puede incrementar la expresión genética viral³³.

Ensamblaje viral y liberación de los viriones: Las nuevas partículas virales son ensambladas hacia la membrana plasmática (Figura 3). Diversas proteínas participan en el proceso de ensamblaje, incluyendo las poliproteínas Gag y Gag-Pol, al igual que Nef y Env. Una proteína humana de unión al ATP, denominada HP68, facilita los cambios conformacionales necesarios en Gag para el ensamblaje de las cápsides virales. La proteína Vif de 23 Kd juega un papel clave pero no bien entendido en el ensamblaje de los viriones infecciosos³⁴. En ausencia de Vif, se producen niveles normales de virus pero estas partículas virales no son infecciosas, lo cual trae como consecuencia la detención de los niveles de transcripción reversa en la célula infectada³⁵.

Luego del ensamblaje de los viriones, en el momento final de la maduración y gemación de las partículas se incorporan lípidos de la membrana de la célula infectada, así como las glicoproteínas virales de envoltura gp41 y gp120³⁴. Finalmente, se produce la salida por gemación a través de la membrana celular de los viriones maduros al exterior (Figura 3).

Clasificación del VIH

El SIDA es causado por dos diferentes lentivirus, pertenecientes a la familia Retroviridae, los cuales desde el punto de vista genético y antigénico se distinguen en: VIH tipo 1 (VIH-1), responsable de la pandemia a nivel mundial y el VIH tipo 2 (VIH-2), comúnmente encontrado en el Oeste de África y en la India³⁶. Análisis filogenéticos han demostrado que el VIH-2 se encuentra estrechamente relacionado con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV, siglas en inglés), presentando una homología del 75% con este virus³⁷. Desde el punto de vista clínico, el VIH-2 se diferencia del VIH-1 en que la enfermedad que produce es menos agresiva, parece evolucionar más lentamente hacia la destrucción del sistema inmunitario, su transmisión vertical (madre-hijo) parece ser más difícil y existe variación en la regulación del virus a

nivel genético³⁸. Por otra parte, los genomas del VIH-1 y VIH-2 tienen una similitud de sólo el 40-50%. Sin embargo ambos ocasionan una enfermedad clínicamente indistinguible³⁷. Los análisis filogenéticos de secuencias pertenecientes a los genes *env* y *gag* de diversos aislados del VIH-1 han demostrado la existencia de al menos 8 subtipos genéticos o clados del VIH-1, los cuales han sido designados como subtipos: A, B, C, D, E, F, G y H^{39, 40}. Estos subtipos genéticos forman el grupo principal o M (“major”, en inglés), responsable de la mayoría de los casos de SIDA en el mundo. Un segundo grupo de aislados muy heterogéneo, pertenecen al grupo O (“outliers” en inglés), el cual presenta al menos 3 subtipos y es encontrado en Cameroon, Gabon y Guinea Ecuatorial. Finalmente, el grupo N (“new”, en inglés) fue identificado en 1998 en dos pacientes de Cameroon^{41, 42}. Así mismo, se conocen al menos 5 subtipos del VIH-2³⁷.

Diversas estrategias metodológicas se han desarrollado para la caracterización y clasificación de los subtipos genéticos virales del VIH. Aunado a los estudios filogenéticos y de secuenciación, se ha implementado el análisis de la movilidad del ADN “heteroduplex” (“DNA heteroduplex mobility assay”, HMA) en los genes principales del virus a partir de células mononucleares de sangre periférica infectadas e inmunoensayos enzimáticos con péptidos sintéticos derivados de la tercera región inconstante (V3) de la gp120 viral^{43,44}. Es importante destacar que los diferentes subtipos genéticos o clados, no son necesariamente equivalentes a los subtipos antigénicos, cuya relevancia en la protección inducida por vacunas es poco conocida hasta el presente⁴⁵.

Distribución geográfica de los subtipos genéticos del VIH-1

Los subtipos genéticos del VIH-1 se encuentran distribuidos en diferentes regiones geográficas. Cepas virales pertenecientes al clado B prevalecen en América del Norte, América Latina y el Caribe, Europa, Japón y Australia. Casi todos los subtipos están presentes en el África sub-Sahariana. Los subtipos A y D predominan en el centro y oeste de África,

mientras que el subtipo C prevalece en el sur del Continente Africano^{37, 39}. En la actualidad, los virus pertenecientes al subtipo C presentan una amplia distribución geográfica, siendo responsables de la mayoría de las infecciones recientes a nivel mundial, incluyendo Asia, lo cual constituye un aspecto a considerar en el desarrollo de vacunas⁴⁶. El subtipo E fue identificado inicialmente en Tailandia e igualmente se encuentra presente en la República Central Africana^{39, 47}. El subtipo F predomina en América del Sur aunque fue descrito inicialmente en Brasil y en Rumania⁴⁸. El subtipo G fue encontrado en Rusia y Gabon, mientras que virus del subtipo H fueron aislados en Zaire y Camerún^{40,49}.

Variabilidad genética del VIH

La replicación del VIH mediante el uso de una transcriptasa reversa, carente de una capacidad de corrección de lectura perfecta, permite la producción de una elevada tasa de errores a nivel genómico, lo cual resulta en cambios de aproximadamente 10 bases genómicas por ciclo de replicación. Diversas mutaciones en el genoma viral, tales como: sustituciones, inserciones y deleciones, igualmente se producen con una frecuencia difícil de estimar³⁸. Esta alta tasa de error en la replicación, la elevada producción de viriones (10⁹ partículas virales) por día *in vivo*, la población cada vez más creciente de individuos afectados y la persistencia de la infección permite la generación de diversidad viral en 6 órdenes de magnitud por encima de la observada en las familias de genes de mamíferos⁵⁰. El gen *env* parece estar sujeto a la mayor variación genética, particularmente en la región V3 aunque en los otros genes igualmente pueden ocurrir alteraciones⁵¹.

El VIH-1 presenta una variabilidad genética continua en el organismo de un individuo infectado, dando origen a múltiples variantes a las cuales se les ha denominado “cuasi-especies virales”, cuya heterogeneidad es de aproximadamente 2-5% en el gen *env*⁵¹. Por otra parte, estudios de secuencias y análisis filogenéticos del gen *env* han demostrado un amplio rango de divergencia (20-30%) entre aislados de distintas regiones del planeta. Este fenómeno es atribuido a la amplia distribución geográfica y a la diversidad genética in-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología Molecular
del Virus
de Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

tra e inter-subtipos del VIH-1^{38, 47, 52}. Por esta razón, el desarrollo de vacunas basado en una protección inmunitaria del individuo dependiente de secuencias variables del VIH podría requerir la adaptación continua de vacunas específicas, como es el caso de las vacunas contra el virus de la influenza⁵³.

La variabilidad genética del VIH-1 se ha correlacionado igualmente con características de crecimiento de cepas virales *in vitro*. Los viriones provenientes de pacientes con infección en etapa tardía podrían inducir la formación de sincicios (SI) cuando son cultivados en líneas de linfocitos T inmortalizados, mientras que virus obtenidos de pacientes en la etapa temprana de la infección no tienen la capacidad de formar sincicios (NSI) ni de replicarse en estas líneas celulares sino más bien en cultivos primarios de células CD4+ (linfocitos T y macrófagos)¹⁸.

Adicionalmente, se ha evidenciado que la recombinación entre subtipos diferentes del VIH-1 (A/E, A/C, B/F, etc.) ocurre frecuentemente *in vivo*, generando virus viables con genomas mosaicos, fenómeno que contribuye con la variabilidad genética de este agente viral^{18, 54, 55, 56}. La presencia de estos virus recombinantes indica que la coinfección o la superinfección con diferentes variantes virales del VIH-1 se produce con frecuencia, sugiriendo que la infección activa con una cepa viral no necesariamente confiere una protección total contra la infección originada por otra cepa^{57, 58}.

Consideraciones finales

La presencia de formas latentes del VIH estables permiten explicar la naturaleza crónica de la infección. El estudio de métodos terapéuticos efectivos contra los reservorios de estas formas latentes contribuirá con la erradicación del virus.

La evaluación de los niveles de viremia mediante el análisis de carga viral del ARN genómico y ADN proviral aporta una importante información sobre el curso de la infección producida por VIH. Se ha demostrado que la determinación del ARN viral constituye un buen marcador en el monitoreo de la eficacia del tratamiento antiretroviral¹⁸. Se requiere de futuras investigaciones que per-

mitan dilucidar la relación entre la carga de ADN proviral y la respuesta al tratamiento. El impacto de la diversidad genética del VIH-1 en el desarrollo de drogas y vacunas contra la infección producida por este agente viral permanece incierto⁴⁶. Desde el punto de vista biológico, los principales obstáculos en el desarrollo de una vacuna preventiva y/o una terapia adecuada, comprenden: 1) la integración del ADN genómico en sitios activos del cromosoma celular, permitiendo una infección persistente que conduce finalmente a la destrucción de las células afectadas y su progenie; 2) la falta de un modelo experimental animal pequeño y realmente accesible para estudiar los mecanismos de citopatogénesis viral; 3) la variabilidad genética del VIH que ha permitido la emergencia de cepas virales resistentes a drogas y 4) la predilección del VIH en infectar células del sistema inmunitario y utilizar las mismas vías de activación inmunitaria para su propia replicación.

La extensa variabilidad genética observada en el VIH ha contribuido a limitar el conocimiento íntimo de los mecanismos patogénicos de progresión hacia el SIDA, lo cual ha influido a su vez en el desarrollo de pruebas diagnósticas, la falta de información sobre sus mecanismos de transmisión y posibles estrategias de prevención, el desarrollo de tratamientos y vacunas eficaces y finalmente, la aparición de cepas del virus resistentes a drogas antivirales.

Actualmente, la emergencia de variantes virales resistentes a múltiples drogas ("multidrug resistant", MDR en inglés) es cada vez mayor en pacientes tratados con dos o más clases de fármacos anti-retrovirales diferentes. Se ha sugerido que la presencia de una presión inmunológica selectiva por droga hace que el virus resistente sea el más competente (o "fit" en inglés) para replicarse y diseminarse en el organismo del individuo infectado. Sin embargo, a pesar de una disminución inicial y transitoria de "fitness" viral, las variantes MDR pueden conservar una óptima capacidad de replicación debido a la acumulación de mutaciones compensatorias. No obstante, aún no está claro cómo este "fitness" relativamente reducido pudiera eventualmente afectar el estado clínico de pacientes infectados con variantes MDR del VIH-1. Diversos

resultados obtenidos de experimentos realizados *in vitro* han propuesto que el potencial patogénico del VIH-1 se correlaciona con su capacidad de replicación⁵⁹. En la actualidad, se están desarrollando nuevas técnicas para determinar el potencial de replicación y comparar el "fitness" viral con la heterogeneidad genética del VIH-1.

REFERENCIAS

1. Gallo R.C.: The AIDS virus. *Sci. Am.* 1987; 256(1): 46-56.
2. Laurence J.: The immune system in AIDS. *Sci. Am.* 1985; 253(6): 84-93.
3. Silbana E.N, Stanczuk G., Kasolo F.: HIV/AIDS in Central Africa: patogénesis, inmunológica and medical issues. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 132 (3): 183-95.
4. Bushman F, Landal NR y Emini EA.: New developments in the biology and treatment of HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 11041-11042.
5. Piot P, Bartos M., Ghys PD, Walker N, Schwartlander B.: The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 2001; 410 (6831): 968-73.
6. Clark S. Experts predict global devastation due to HIV/AIDS. *Lancet* 2002; 360 (9327): 45.
7. Turner BG, Summers MF.: Structural biology of HIV. *J Mol Biol.* 1999; 285(1): 1-32.
8. Gotlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA.: Role of capsid precursor processing and myristylation morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 5781-5785.
9. Parkin NT, Chamorro M, Varmus HE.: Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on mRNA secondary structure. Demonstration by expression *in vivo*. *J Virol.* 1992; 66: 5147-5151.
10. Ruben S, Perkins A, Purcell R. Structural y functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* 1989; 63: 1-8.
11. Fisher U, Huber J, Boelens WC.: The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995; 82: 475-483.
12. García JV, Miller AD.: Downregulation of cell surface CD4 by *nef*. *Res. Virol.* 1992; 143: 52-55.
13. Schwartz O, Marechat V, Le Gall S.: Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nature Medicine* 1996; 2: 338-342.
14. Hoglund S, Ohagen A, Lawrence K.: Role of *vif* during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994; 201(2): 349-355.
15. Schubert D, Bour S, Ferrer-Montiel AV.: The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1. Vpu protein involve two separable structural domains. *J. Virol.* 1996; 70: 809-819.
16. Jowett JB, Planelles V, Poon B. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2+M phase of the cell cycle. *J Virol* 1995; 69: 6304-6313.
17. Wassef NM, Young J y Miller R.: Viral reservoirs/transient infection in HIV/AIDS: Where are we now and where should we go?. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2003; 19:333-344.
18. Katzenstein TL.: Molecular biological assessment methods and understanding the course of the HIV infection. *APMIS Suppl.* 2003; 114: 1-37.
19. Doms RW y Trono D.: The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev.* 2000; 14(21): 2677-88.
20. Zaitseva M, Peden K y Golding H.: HIV coreceptors: role of structure, posttransfusal modifications, and internationalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1614(1): 51-61.
21. Chan DC y Kim PS.: HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93(5): 681-4.
22. Miller MD, Farnet CM, Bushman FD.: Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol.* 1997; 71(7): 5382-90.
23. Pemberton LF, Blobel G, Rosenblum JS.: Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10(3): 392-9
24. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Rafner L, Stevenson M, Emerman M.: The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(15): 7311-5.
25. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D.: HIV-1 infection of nondividing cell through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(18): 9825-30.
26. Chen H, Engelman A.: The barrier to autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(26): 15270-4.
27. Adams M, Sharmeen L, Kimpton J, Romeo JM, García JV, Peterlin BM, Groudine M, Emerman M.: Cellular latency in human immunodeficiency virus infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(9): 3862-6.
28. Saltarelli MJ, Hadziyannis E, Hart CE, Harrinson JV, Felber BK, Spira TJ, Pavlakis GN. : Analysis human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing pattern during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals. *AIDS Res Hum Enteroviruses.* 1996; 12(15): 1443-56.
29. Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM y col.: Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J. Virol.* 1996; 70: 4283-4290.
30. Felber BK, Drysdale CM, Pavlakis GN.: Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J. Virol.* 1990; 64: 3734-3741.
31. Zheng YH, Plemenitas A, Linnemann T, Fackler OT, Peterlin BM.: Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol.* 2001; 11(11): 875-9.
32. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I y col. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product.: A positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 101-113.
33. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS.: The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2+M phase of the cell cycle. *J Virol.* 1995; 69(10): 6304-13.
34. Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR.: Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 2002; 415(6867):88-92.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Biología Molecular
del Virus
de Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

35. Madani N, Kabat D.: An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol.* 1998; 72(12): 10251-5.
36. Korber B, Theiler J y Wolinsky S.: Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science.* 1998; 280: 1868-1870.
37. Korber BTM, Allen EE, Farmer AD, Myers GL: Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *AIDS* 1995; 9 (suppl A): S5-S18.
38. Sharp PM, Robertson DL, Gao F, Hahn B.: Origins and diversity of human immunodeficiency virus. *AIDS* 1994; 4 (suppl1): S27-S42.
39. Louwagie J, McCutchan FE, Peteers M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen G, Franssen K, Gershey-Damet G-M, Deleys R, Burke DS: Comparison of gag genes from seventy international HIV-1 isolates provides evidence of multiple genetic subtypes. *AIDS* 1993; 7: 769-780.
40. Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN, Ndumbe PM, Delaporte E, Perret J-L, Atende C, Piot P, van der Groen G.: Genetic and phylogenetic analyses of env subtypes G and H in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994. 10: 877-879.
41. Gürtler L, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L.: A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MPV 5180) from Cameroon. *J Virol.* 1994. 68: 1581-1585.
42. Weiss RA, Wrangham RW.: From Pan to pandemic. *Nature.* 1999; 397: 385-386.
43. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H y Mullins JI.: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility analysis of HIV-1 env genes. *Science.* 1993; 262: 1257-1261.
44. Alcaro MC, Peroni E, Rovero P, Papini AM.: Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Curr Protein Pept Sci.* 2003; 4(4): 285-90.
45. Esparza J y Osmanov S.: HIV vaccines: a global perspective. *Curr. Mol. Med.* 2003; 3(3): 183-93.
46. Gaschen B, Taylor J, Yusim K.: Diversity consideration in HIV-1 vaccine selection. *Science* 2002; 296(5577): 2354-60.
47. Kalish ML, Baldwin A, Raktham S, Wasi C, Luo C-C, Schochetman G, Mastro T, Young N, Vanichseni S, Rübsamen-Waigmann H, von Briesen H, Mullins JI, Delwart E, Herring B, Esparza J, Heyward WL, Osmanov S.: The evolving molecular epidemiology of HIV-1 envelope subtypes in injecting drug users in Bangkok, Thailand: Implications for HIV vaccine trials. *AIDS.* 1995; 9(8): 851-7.
48. Dumitrescu O, Kalish ML, Kliks SC, Bandea CL, Levy JA.: Characterization of human immunodeficiency virus type 1 isolates from children in Romania: Identification of a new envelope subtype. *J Infect Dis.* 1994; 169: 281-288.
49. Bobkov A, Cheingson-Popov R, Garaev M, Rzaninova A, Kaleebu P, Beddows S, Bachmann MH, Mullins JI, Louwagie J, Janssens W, van der Groen G, MacCutchan FE, Weber J.: Identification of an env G subtype and heterogeneity of HIV-1 strains in the Russian Federation and Belarus. *AIDS.* 1994; 8: 1649-1655.
50. Walker BD, Korber BT. Immune control of HIV: the obstacles of HLA and viral diversity. *Nat Immunol.* 2001; 110(2): 135-8.
51. Wain-Hobson S.: The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genetics and Development* 1993; 3: 878-883.
52. Papathanasopoulos MA, Hunt GM, Tiemessen CT.: Evolution and diversity of HIV-1 in Africa- a review. *Virus Genes.* 2003; 26(2): 151-63.
53. Osmanov S, Heyward WL, Esparza J.: HIV-1 genetic variability: implications for the development of HIV vaccines. *Antibiotics and Chemotherapy.* 1996; 48: 30-38.
54. Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH.: Recombination in HIV-1. *Nature* 1995; 374: 124-126.
55. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BTM, Daiz RS, Bongertz V, Cavalcante S, Galvao-Castro B, Mullins JI, Mayer A.: Identification of HIV-1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically-linked individual from Brazil. *J Virol.* 1994; 68:6340-6346.
56. Comez Carrillo M, Salomon H, Pando MA, Kijak G, Avila MM.: Distribution of subtypes and recombinant of HIV. Situation Argentina. *Medicina (B. Aires).* 2001; 61(6): 881-9.
57. Negróni M y Buc H.: Mechanisms of retroviral recombination. *Annu Rev Genet.* 2001; 35: 275-302.
58. Allen TM y Altfeld M.: HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112(5): 829-35.
59. Maldarelli F.: HIV-1 fitness and replication capacity: what are they and can they help in patient management?. *Curr Infect Dis Rep.* 2003.; 5(1): 77-84.

EL PRISMA DE LA EVOLUCIÓN Y EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Monzón de Orozco, A^{1.}, Sánchez, M^{2.} & Aponte, C^{*3.}

¹Lab. de Inmunología. Instituto de Hematología y Oncología. Universidad Central de Venezuela (UCV). Apdo. 1040. Caracas, Venezuela

²Hospital José Gregorio Hernández. Parroquia San José. Caracas, Venezuela

³Gerencia de Docencia e Investigación. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Apdo. 1040. Caracas, Venezuela

RESUMEN

Entre los virus conocidos, uno de los cuales se le ha dedicado una extensiva atención es a la epidemiología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Más recientemente, el interés se ha expandido esencialmente al origen y evolución de su estructura genética, mecanismos patogénicos y respuesta inmune. Este artículo describe recientes trabajos para la comprensión del origen y evolución del VIH.

ABSTRACT

Among viruses, extensive attention has been devoted to the molecular epidemiology of human immunodeficiency virus (HIV). Recently, this interest has expanded essentially to the origin and evolution of viral genetic structure, pathogenic mechanism and immune response. This article describes recent work about the origin and evolution of HIV.

INTRODUCCIÓN

El Nostromo, una nave de cargo, se desplaza en medio de la inmensidad del espacio de regreso a la Tierra. Pero intercepta una llamada SOS proveniente de un planeta de explotación minera. Un grupo de los miembros del *Nostromo* salen a explorar el área. Kane (Jhon Hurt) descubre un recinto donde se encuentran varias estructuras orgánicas en forma de huevo. Kane se acerca a una de estas entidades y de la misma se proyecta un organismo que se le aferra fuertemente al rostro perforando la máscara de protección, ingresando inconsciente a la nave y con ese extraño organismo adherido a la cara. Los primeros análisis de laboratorio indican que el organismo estableció un nexo con el huésped manteniendo un intenso intercambio de fluidos. Horas más tarde la criatura se separa y muere. Kane se levanta al poco rato aparentemente sano y asintomático. Sin embargo, en su seno resguardaba, sin saberlo, un organismo parásito en desarrollo. Lenta y inexorablemente la muerte del actor estaba decretada. Nació así **Alien, el octavo pasajero**, (1979)¹ perforando la caja torácica de Kane. Todos los miembros del *Nostromo* quedaron expuestos a la mayor plaga jamás vista. Este film de Rindley Scottt parece en la actualidad una alegoría de la pandemia VIH/SIDA, la cual afecta a más de 40 millones de personas en el mundo y solamente para finales del año

* Autor al que debe dirigirse la correspondencia. Dirección de correo: Gerencia de Docencia e Investigación. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Apdo 1040, Caracas-Venezuela, Teléfax: (02) 693 45 51. Correo electrónico: capontet@hotmail.com

2001. Más de 25 millones pertenecen al África. El 95% de las nuevas infecciones por el VIH aparecen en aquellos habitantes de países pobres sin posibilidades de limitar la extensión de la enfermedad y la tasa de infecciones es de unas 5 millones de personas al año.^{2,3} El continente suramericano contribuye con 1.5 millones de infectados con unas 60 000 muertes para el final del 2002⁴. La diferencia es que ahora “Alien” no es una bestia que dobla la longitud promedio de un ser humano sino que mide el irrisorio diámetro de unos 90 - 140 nanómetros. Entidades microscópicas de geometría icosaédrica cubiertas de una delgada membrana constituida de lípidos. Estas estructuras pertenecen a una gran familia de virus denominada: *Retroviridae* (Los retrovirus).

La infección por retrovirus se traduce en el huésped en: oncogénesis^{5,6}, inmunodeficiencia^{7,8} o neurodegeneración^{9,10}. Si bien es cierto que el mecanismo preciso por el cual el VIH causa el SIDA permanece sin ser totalmente elucidado, el VIH induce una dramática disminución de células T CD4⁺ que conlleva a una severa alteración del metabolismo celular¹¹ e inmunodeficiencia^{12,13,14}. Durante la infección activa una sustancial cantidad de virus es presente en varios de los fluidos corporales con una importante utilización por parte del virus de diversos reservorios celulares (células T CD4⁺ de memoria y “naive”) y sistémicos (p. ej. El sistema nervioso central)^{14,15}. En el plasma el recambio de partículas virales es alto con la producción de alrededor de 10⁹ partículas/día; teniendo el virión una vida media de aproximadamente 6 horas^{16,17}. En el paciente VIH-1 positivo que se encuentra bajo terapia HAART la cantidad de viriones deviene prácticamente indetectable en sangre (< 50 copias de ARN VIH/ml de sangre). Sin embargo, al detener el tratamiento se dispara un aumento dramático de la viremia. Este aumento parece ser dependiente de compartimientos tisulares que actúan como reservorios de variantes de VIH¹⁸. Precisamente, VIH existe como una población de distintas variantes o “cuasiespecies”, pues la alta frecuencia de mutación del virus (3 x 10⁵ mutaciones/nucleótido/ciclo de replicación) acoplada a la alta tasa continua de producción viral son la base sobre la cual descansa gran parte del reservorio de

variantes dentro de un mismo hospedante y el blanco fértil para la acción de la presión de selección^{19,20,21}.

ORIGEN DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El descubrimiento de la variación genética y antagónica del VIH ha presentado una gran preocupación en relación con las estrategias necesarias para el desarrollo de terapias basadas en drogas antiretrovirales y el diseño de vacunas eficaces. Pero como dijera Theodosius Dobzhansky: “*Nada tiene sentido en biología excepto bajo el prisma de la evolución*”²². Por ende, la naturaleza e historia del VIH como entidad biológica sólo puede tener sentido si utilizamos el conocimiento que nos proporciona el prisma de la evolución. Desde la introducción del VIH en el hombre a partir del chimpancé alrededor de 1930 en África central occidental²³, el virus ha evolucionado en base a variación genética por mutación^{20,24}, recombinación²⁵, inserción y delección²⁶.

El grupo principal (M) HIV-1 domina la potencia epidémica global de la infección viral siendo filogenéticamente un único cluster en arreglo complejo con otros diferentes virus de inmunodeficiencia de simio (SIVcpz) y humano (grupo N y O). El grupo M es subdividido al menos en 12 distintos linajes o subtipos (A-D, F-H y J) y formas recombinantes (AE, AG, AG1)²⁷. El grupo O (de “outlier”) que se encuentra esencialmente distribuido al oeste del África central²⁸. Análisis filogenético del tipo HIV-2 conlleva a una subclasificación adicional en los subtipos A - F. Así, en la comunidad científica existe un cierto consenso respecto a que estas mayores subdivisiones podrían ser el producto de distintas introducciones humanas separadas²⁷. Es generalmente aceptado que al menos tres transmisiones separadas de chimpancés a humanos ha ocurrido, una por cada grupo de VIH conocido. En tanto, los primates han actuado como reservorio; existiendo no menos de 18 tipos distintos de SIV sin efecto clínico sobre su hospedero (*Cercopithecus*, *Chlorocebus*, *Cercocebus*, *Miopithecus*, *Colobus*, *Mandrillus*, *Pan*, *Erythrocebus* y *Papio*). Análisis genómico demuestra que las especies de SIV

relacionadas con HIV-1 y HIV-2 son SIVcpz y SIVsm, respectivamente. SIVcpz se encuentra en chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes*) mientras que SIVsm esta en monos mangabeys tiznados (*Cercocebus atys*)²⁷. Dada la información evolutiva contenida en el acervo macromolecular de cada tipo de VIH y el estatus geográfico ocupado por cada uno de ellos se han establecidos relaciones filogenéticas relevantes. Así, el VIH-2 es estrechamente similar al virus SIVsm y el rango de distribución de monos mangabeys tiznados en África es aceptado como el área de origen del VIH-2. Estas áreas (Senegal, Guinea-Bissau, Guinea y Costa de Marfil)²⁸ son los epicentros de dispersión del VIH-2. Por su parte, VIH-1 esta más estrechamente relacionado a nivel filogenético a SIVcpz de *P.t. troglodytes* y mantiene coincidencia geográfica (Gabón, Guinea Ecuatorial, Camerún y la República del Congo) para todos los grupos de VIH-1 con las áreas de caza y amaestramiento de chimpancés. Esto sugiere una posible ruta de transmisión zoonótica de VIH-1^{27,28}. Así mismo en diversos mercados del África Centro Occidental exhiben para su venta y consumo carne y órganos de primates lo que potencia la posible transmisión al hombre. Se estima que tal barrera inter especie fue cruzada hacia el año 1930. El potencial de recombinación entre VIH circulantes y posibles variantes SIV juega aún un rol de importancia en la aparición de virus con nuevas potencialidades biológicas. Para 1999, un alto número de recombinantes HIV-1 M fue reportado en la zona de Congo-Kinshasa^{29, 30}.

En la actualidad, se desestima en mucho la hipótesis que implicaba que la administración de la vacuna de polio oral en el Congo Belga durante los años '50 y '60 era responsable de la introducción del VIH en humanos³¹. Según Hooper, la cepa viral de la vacuna antipoliomelítica (CHAT) ha sido producida en células de chimpancés lo que hacia probable la transmisión del VIH al hombre. Sin embargo, S. Plotkin (2000) reportó que las vacunas americanas y europeas utilizadas hasta 1960 eran producidas sobre células de macacos provenientes de la India e Indonesia³². Además, varios testimonios, documentaciones de la época, análisis epidemiológico y datos moleculares parecen de-

mostrar que la contaminación por el VIH de las vacunas fabricadas es muy improbable.

EL PRISMA DE LA EVOLUCIÓN Y VIRUS ARN

Los virus ARN son los parásitos más comunes que infectan humanos, animales y plantas³³. La emergencia y reemergencia de nuevos patógenos pertenecientes a las familias ARN (*Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae*, *Myxoviridae*, *Picornaviridae* y *Retroviridae*) es producto de una incrementada adaptación de estos antagonistas a nuevos huéspedes en periodos de tiempo variables. Dicha adaptabilidad es favorecida por la enorme plasticidad genética existente en estas poblaciones en cuestión y la materialización de una alteración ambiental (tipo de huésped, presión inmunológica sobre el parásito, tipo de tejido o célula, presencia de drogas, antibióticos, entre otras alteraciones). Si dicha adaptabilidad la traducimos en términos de virulencia podemos observar que la velocidad de la misma incrementa rápidamente en los virus del tipo ARN, mientras que es menor en los virus del tipo ADN y en bacterias, y mucho más lenta en los eucariotes. Estos agentes frecuentemente tienen fenotipos que aumenta su supervivencia en nuevos habitats (factores de virulencia, habilidad de enlazar e invadir las células del huésped, y resistencia a las defensas químicas y celulares del huésped)³⁴. Esto sugiere que el tiempo de generación y la velocidad de mutación determina la velocidad de cambio del parásito³⁵. Los retrovirus, tal como el VIH, el cual replica continuamente y a una alta tasa, desarrolla un alto grado de diversidad de secuencia en cada uno de los huéspedes infectados³⁶.

Los mecanismos subyacentes bajo los cuales los virus escapan a las presiones que le son impuestas son múltiples. Así, tenemos la frecuente generación de mutaciones, la continua competición entre variantes genómicas y la selección de aquellas variantes mejor adaptadas³⁷. Diversos análisis^{38,39,40} del patrón de sustitución nucleotídica en el gen *env* viral han mostrado evolución en función de una selección positiva en el modelo VIH respecto a agentes de selección no totalmente defini-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
El Prisma de la
Evolución y el Virus
de la Inmunodeficiencia
Humana

do (respuesta inmune, utilización de correceptor, entre otros). En este mismo modelo, el gen *pol* (fracción proteasa/polimerasa) conlleva selección positiva en presencia de agentes antiretrovirales⁴¹. Todo esto en función de una maximización de la adaptabilidad del parásito dentro de un balance costo/beneficio de su asociación con un huésped dado. En este punto es importante recordar que en términos evolutivos la unidad de selección es el virus completo y no un gen o porción informativa del mismo.

La plasticidad genética existente en las poblaciones de virus ARN surge en cada generación por mutaciones nuevas, por recombinación homóloga y no-homóloga, y por rearrreglo genético³⁷. Así, para los virus VIH-1 subtipo C se han reportado de tres a cuatro secuencias “enhancer” NFkB, a diferencia de los otros subtipos virales que poseen dos de estas secuencias⁴². Las poblaciones virales ARN (replicones) almacenan gran número de alteraciones genéticas, sin que las mismas sean particularmente adaptativas a un momento dado⁴³. Con tasas de mutación por sitio nucleotídico de 10^{-3} - 10^{-5} para un genoma de 10 kb durante replicación y retrotranscripción se garantiza un promedio de 0.1 - 10 mutaciones⁴⁴. Por tanto, una población determinada de replicones puede presentar variantes denominadas cuasi-especies, esto es distribuciones dinámicas y complejas de poblaciones de replicones relacionadas pero no idénticas^{37, 43, 45}. Como ya sabemos la mayoría de la diversidad genética existente en las poblaciones de VIH surgen como consecuencia de mutaciones, recombinación y frecuentes inserciones y deleciones²⁶. VIH es considerado que existe como una población de distintas variantes o “cuasiespecies”⁴⁶. La diversidad genética en el seno de estas poblaciones de cuasi-especies constituye claramente un prerrequisito para el cambio evolutivo. Así, si todos los replicones fueran idénticos para una población dada, no podrá darse evolución hasta la aparición de un nuevo replicón por mutación. Por ejemplo, en el virus de la fiebre amarilla, la existencia de una atenuación de la virulencia parece corresponder a una alteración de la estructura secundaria de la región 3' no traducible⁴⁷. Ahora bien, en el proceso de evolución, la presión de selección ejercida por el

huésped impone condicionantes sobre la propia evolución del parásito, pero en tal proceso de coevolución cada uno de los protagonistas (huésped-parásito) está obligado a ajustar sus capacidades adaptativas para no quedar eliminado⁴⁸, el modelo de La Reina Roja. Así, las velocidades bajas de evolución observadas en arbovirus podrían ser debidas a restricciones impuestas por la alternancia de hospedantes durante el ciclo vital de virus⁴⁹. Dicha alternancia también podría ser observada para aquellos virus con tropismo celular diferencial. Por ejemplo, mutaciones específicas han sido detectada en el virus de la linfocoriomeningitis murina asociadas con su tropismo por neuronas o por células linfocitarias⁵⁰. Sin duda, en ambos casos arriba citados claramente se observa una coadaptación genética provocada por un aumento de “fitness” en la relación huésped-parásito. Si intentamos integrar los conceptos de coevolución y el de “cuasiespecies”, basados en el modelo de La Reina Roja, para evaluar el devenir de una infección podríamos predecir fluctuaciones importantes en ambas poblaciones (huésped-parásito). Así, sabemos que la tasa crítica de error (fidelidad) aceptada para la polimerasa RNA viral dependerá tanto de la complejidad de la información ha ser mantenida como de la estabilidad superior de la secuencia “master” sobre el resto de replicones competitivos⁵¹. Pero también dicha fluctuación intrínseca de la población viral es fuertemente dependiente de los factores de resistencia del huésped. Recientemente, Crotty et al. (2001)⁵², utilizando ribavirina, inducen “error catastrophe” en virus ARN. Ribavirina actúa como un potente mutágeno para virus ARN. En el caso de poliovirus, el tratamiento con 400mM de ribavirina aumenta a más de 4X el promedio de mutaciones / genoma^{52,53}. Estos datos experimentales demuestran que existe una tasa de mutación límite por debajo de la cual se garantiza la viabilidad de la población viral. Es decir, en poblaciones virales ARN se observa una importante correlación entre exposición a la ribavirina y la disminución de la infectividad. Así, parece existir un límite intrínseco de variación genética para un sistema dado.

Todo diseño matemático de predicción sobre la estabilidad coevolutiva huésped-parásito

debe parametrizarse en función de la virulencia, la transmisibilidad, la heterogeneidad intrínseca de la población viral y la resistencia del huésped (status inmune, terreno genético, entre otros). Sin embargo, parece ser que la estabilidad de tales poblaciones descansa de manera directa en el potencial que estas mismas poblaciones tienen para realizar cambios evolutivos a corto plazo bajo presiones selectivas fluctuantes. Ciertos modelos propuestos^{54,55,56} predicen tanto equilibrios estables como inestables (tendientes a extinción) para una relación huésped-parásito dada. Análisis sobre el patrón de sustitución nucleotídica en el gen viral *env* han detectado evolución bajo presión selectiva positiva^{57,58,59}. Recientes análisis utilizando el modelo VIS revela la existencia de acumulación de sustituciones aminoacídicas en varias regiones epitópicas blanco HCM clase I-restringidas y que originalmente fueron reconocidas por actividades CTL⁶⁰. Una importante proporción de estos epítopes variantes poseen una inmunogenicidad disminuida. Existe una fuerte selección por aquellos virus que pueden evadir la respuesta inmune y, así tenemos que virus de escape anticuerpo tienden a poseer un incremento en el "fitness" replicativo en el sistema modelo macaco-SIV (Virus de inmunodeficiencia simio)³⁶. Así también, la introducción de myxoma virus como agente de control biológico de conejos resultó en una rápida evolución hacia la disminución de la virulencia en pocos años⁶⁰.

Por tanto, intentar una aproximación de los mecanismos sobre los cuales descansa el devenir evolutivo del virus de la inmunodeficiencia humana conlleva a considerar los elementos ya destacados en el apartado anterior para los virus RNA. Una perspectiva "ecológica" podría ser de ayuda para estudiar la naturaleza dinámica de las diversas presiones selectivas (p.ej. la respuesta inmunológica del huésped y la acción de antiretrovirales) ejercidas sobre el virus durante el curso progresivo de la enfermedad en un paciente dado³⁴. Por tanto, es muy probable que condiciones ambientales específicas (considerando que para un parásito obligatorio el medio ambiente es representado por su huésped específico) sean necesarias para la generación de diferencias en adaptabilidad ("fitness") entre variantes virales.

REFERENCIAS

1. SCOTT, R. (1979). Alien. El octavo pasajero. FOX
2. THE BODY. (2001). Aids Epidemic update: December 2000. Disponible en <http://www.thebody.com/uniaids/update/overview.html>
3. RAMONET, I. (2004) La Mort Inégale. En Apartheid Medicale. *Maniere de voir. Le Monde Diplomatique*. Février-Mars. 73: 6-7
4. SCHALCHLI, I. (2003). Le SIDA. En Bac to Basic. *La Recherche*. 370: 83 - 86
5. CANN, A. J. (1997) Cell transformation by retroviruses. In *Principle of Molecular Virology*. Academic Press. pp 216-221
6. LÖWER, R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *TIM*. 7: 350-356
7. CLEMENTS, J. & PAYNE, S. (1994) Molecular basis of the pathobiology of lentivirus. *Virus Res*. 32: 97-107
8. LEVY, J. (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection *Microbiol. Rev*. 57:183-289
9. PRICE, R. (1996) Neurological complications of HIV infection. *The Lancet*. 348: 445-452
10. FUJINAMI, R. & LIBBEY, J. (1999) Endogenous retroviruses: are they the cause of multiple sclerosis. *TIM*. 7: 263-264
11. DE SIMONE, C, FAMULARO, G., CIFONE, G. & MITSUYA, H. (1996). HIV infection and cellular metabolism. *Imm.Today*
12. OLESKE, J., MINNEFOR, A., COOPER, R., THOMAS, K., DELACRUZA, AHDIEH, H., GUERRERO, I., JOSHI, V., AND DESPOSITO, F. (1983) Immune deficiency syndrome in children *JAMA*. 249: 2345-2349
13. SCHITTMAN, S. & FAUCI, A. (1994). Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: an update. *Ad. Int. Med*. 39:305-355
14. BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J. C. & REY, F. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency virus. *Science*. 220: 868-871
15. GRAZIOSI, C., PANTALEO, G., DEMAREST, J.F. et al. (1993). HIV-1 infection in the lymphoid organs. *AIDS (suppl 2)*: S53-S58
16. CAVERT, W. & HAASE, A. T. (1998). A national tissue bank to track HIV eradication and immune reconstitution. *Science* 280: 1865-1866
17. HO, D.D., NEUMANN, A.U. & PERELSON, A.S. et al. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4+ lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 373: 123-126
18. CHUN, TW, DAVEY, RT JR, OSTROWSKI, M, SHAWN, JUSTEMENT, J, ENGEL, D, MULLINS, JI, FAUCI, AS. (2000) Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nature Medicine*. 6: 757
19. WEI, X., GHOSH, S.K., TAYLOR, M.N. et al. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373: 117-122
20. COFFIN, J.M. (1996) HIV viral dynamics. *AIDS* 10 (suppl 3): S75-S84
21. PHILLIPS, RE., OXENIUS, A., PRICE, DA., BANGHAM, CHRM. (2000). AIDS: The evolving story. *TIM*. 8: 147-147
22. DOBZAHANSKY, T. (1951). Genetics and the origin of species. New York. Columbia University Press.
23. BIRX, D.L., VANCOTT, TH., MICHAEL, N. et al. (1996) Summary of track A: Basic science. *AIDS* 10 (suppl 3): S85-S106



24. ROBERTS,JD. ET AL. (1988) The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 242: 1171-1173.
25. BURKE, DS. (1997). Recombination in HIV: An important viral evolutionary strategy. *Emerg. Inf. Dis.* 3: 253-258
26. KORBER, B., THEILER, J., WOLINSKY, S. (1998). Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science*. 280: 1868-1871
27. HAHN, BH., SHAW, GM., De COCK, KM., SHARP, PM. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287: 607-614
28. COHEN, J. (1999). AIDS virus traced to chimp subspecies. *Science*. 283: 772-773
29. SHARP, PM., BAILES, E., CHAUDHURI, RR., RODENBURG, CM, SANTIAGO, MO., HAHN, BH. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* 356: 867-876.
30. VANGROENWEGHE, D. (2001) The earliest cases of human immunodeficiency virus type 1 group M in Congo-Kinshasa, Rwanda and Burundi and the origin of acquired immune deficiency syndrome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.Sci.* 356: 923-925
31. HOOPER E. (1999) The river: a journey back to the source of HIV and AIDS. London: Allen Lane.
32. NANICHE, D. (2001) Origine du SIDA: La fin d'une polémique? *La Recherche*. 338: 14-15
33. MURPHY, FA. (1996) Virus taxonomic. In *Fields Virology*, ed. BN. Fields, DM. Knipe, PM Howley, RM. Channock, JL. Melnick, et al. pp. 15-57. Philadelphia:Lippincott-Raven
34. LEVIN, BR. LIPSITCH, M. & BONHOEFFER, S. (1999). Population biology, evolution, and infectious disease: Convergence and synthesis. *Science*.283: 806-809
35. EBERT D. (1998) Experimental evolution of parasites. *Science* 20:1432-5
36. OVERBAUGH, J. & BANGHAM, CH.R.M. (2001). Selection forces and constraints on retroviral sequences variation. *Science*. 292: 1106-1109
37. DOMINGO E, MENENDEZ-ARIAS L, HOLLAND JJ. (1997) RNA virus fitness.: *Rev Med Virol.* 7(2):87-96
38. CHUN TW, CARRUTH L, FINZI D, SHEN X, DIGIUSEPPE JA, TAYLOR H, HERMANKOVA M, CHADWICK K, MARGOLICK J, QUINN TC, KUO YH, BROOKMEYER R, ZEIGER MA, BARDITCH-CROVO P, SILICIANO RF.(1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*.387, 183-188.
39. BONHOEFFER, S., HOLMES, E.C. & NOWAK, M.A. (1995). Causes of HIV diversity. *Nature*. 376: 125
40. WOLFS, T.F.W., ZWART, G., BAKKER, M. & GOUDSMIT, J. (1992) HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission *Virology*. 189: 103-110
41. CLAVEL, F., RACE, E. & MAMMANO, F. (2000). HIV drug resistance and viral fitness. *Adv. Pharmacol.* 49: 41-65
42. ESSEX, M. (1999). Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Adv. In Virus Res.* 53: 71-80
43. EIGEN, M. (1993). The origin of genetic information: Viruses as models. *Gene*. 135: 37-47
44. DRAKE, (1993). Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4171-4175
45. EIGEN, M. (1998). Molecular quasi-species. *J. Phys. Chem.* 92: 6881-6891
46. EIGEN, M. (1996). On the nature of viral quasi-species. *Trends Microbiol.* 4: 212-214
47. PROUTSKI V, GAUNT MW, GOULD EA, HOLMES EC. (1997) Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J Gen Virol.* Pt7:1543-9.
48. VAN VALEN, L. (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theo.* 1: 1-30
49. NOVELLA, IS., CLARKE, DK., QUER, J., DUARTE, EA., LEE, CH. et al (1995) Extreme fitness differences in mammalian and insect host after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *J. Virol.* 69: 6805-6809
50. DOCKTER, J., EVANS, CF., TISHON, A., OLDSTONE, MBA. (1996). Competitive selection in vivo by a cell for one variant over another: implications for RNA virus quasispecies in vivo. *J. Virol.* 70: 1799-803
51. SWETINA, J. & SCHUSTER, P. (1982) Self-replication with error –a model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* 16: 329-345
52. CROTTY, SH., CAMERON, CE., ANDINO, R. (2001) RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *PNAS* 98: 6895-6900
53. CROTTY, SH. & ANDINO, R. (2002) Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microb. Inf.* 4: 1301-1307
54. THOMPSON, JN. (1999). The evolution of species interactions. *Science*. 284: 2116-2118
55. EARN, DJD. & ROHANI, P. (1999). Complex dynamics in ecology. Section: news comment. *TREE* 14: 43-44
56. MAY RM, ANDERSON RM. (1983). Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 219(1216):281-313.
57. SIMMONDS, P., ZHANG, LQ., McOMISH, F., BALFE, P., LUDLAM, CA., LEIGH BROWN, AJ (1991) Discontinuous sequence change of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 env sequences in plasma viral and lymphocyte-associated proviral populations in vivo: implications for models of HIV pathogenesis. *J. Virol.* 65: 6266-6276
58. LEIGH BROWN, AJ & CLELAND, A. (1996) Independent evolution of the env and pol genes of HIV-1 during zidovudine therapy. *AIDS.* 10: 1067-1073
59. FROST, SDW., GÜNHARD, HF., WONG, JK., HAVLIR, D., RICHMAN, DD., LEIGH BROWN, AJ. (2001). Evidence for positive selection driving the evolution of HIV-1 env under potent antiviral therapy *Virology*. 284:250-8.
60. EVANS DT., ET AL (1999). Virus-specific cytotoxic T- lymphocyte response select for amino acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med.* 5: 1270-1276

DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LABORATORIO EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Lic. María Eugenia Pacheco

*Departamento de Virología, Jefe de la Sección de Programas Especiales: Hepatitis y SIDA
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*

Dra. Ana Monzón de Orozco

Jefe del Laboratorio de Inmunología. Instituto de Hematología y Oncología

RESUMEN

Durante la infección con VIH hay la aparición de muchos indicadores biológicos de infección, replicación o ambas.

Las técnicas más comúnmente usadas para el diagnóstico y monitoreo de la infección son: los ensayos serológicos (Inmunoenzimáticos, confirmatorios), detección de proteína viral (Ag p24), cultivo de virus y pruebas moleculares (PCR, Carga viral, determinación de CD4, CD8 y relación de CD4/CD8).

Entre los ensayos serológicos, los inmunoenzimáticos son los más utilizados para la determinación de anticuerpos, ellos emplean una variedad de antígenos o proteínas virales estructurales en una serie de formatos que incluyen ensayos indirectos, competitivos, en sándwich y de captura. Los ensayos confirmatorios son altamente específicos y se utilizan para confirmar todos los ensayos inmunoenzimáticos Reactivos.

La detección de proteína viral circulante, cultivo de virus y pruebas moleculares se utilizan para el diagnóstico en niños hijos de madre seropositivas, en adultos en periodo de ventana inmunológica, para medir replicación viral, progresión de la enfermedad, evaluación de la terapia antirretroviral entre otras.

La determinación cuantitativa de la viremia pone de manifiesto que el aumento del número de virus en sangre periférica se relaciona con un mayor riesgo de progresión clínica de la infección por VIH, las técnicas más usadas son las de amplificación de ácidos nucleicos y amplificación de señal.

La determinación de células en pacientes infectados con VIH se conoce con el nombre de inmunofenotipo, la razón primaria para el inmunofenotipaje de pacientes con infección por VIH es el conteo de linfocitos TCD4, TCD8 relación TCD4/TCD8.

Las características de la infección por VIH hacen de esta enfermedad una excelente candidata para la aplicación de marcadores clínicos en el manejo de pacientes, en la práctica médica y en la toma de decisiones

ABSTRACT

During the HIV infection appears many biological infections, replication or even both of them.

The commonest applied techniques for diagnosis and study of this infection are: serologic assay (immunoenzymatics, confirmatories), virus culture and molecular tests (PCR, Viral load, CD4 determination, CD8 and relation CD4/CD8).

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2001; 7 (2): 24-36

In all serological assays the immunoenzymatic are the most used to determinate antibodies, using a variety of antigens or structural virus proteins in a series of formats including indirect assay, competitive, capture and sandwich assay. The confirmation assays are highly specific and are used to confirm all the immunoenzyme Reactive assays.

The detection of circulate virus protein, virus culture and molecular tests are used for the diagnosis with children who have seropositive mothers, in adults through the immunological window, period to measure the virus replication, the progress of diseases and to evaluate the antiretroviral therapy.

The quantitative determination of viremia shows that the increasing of viruses' periphery blood is related with a number in major risk of HIV clinical infection progress, the most used techniques are amplification of nucleic acids and signed amplification.

The cell determination for HIV infected patients is known as immunophenotype; the first reason for using this technique is to count the lymphocytes TCD4, TCD8 and relation TCD4/TCD8.

The HIV infection characteristics make this to be and excellent candidate for the application of clinical markers in patient's treatment and in the medical practice and the decision choice.

INTRODUCCIÓN

Durante la infección del VIH hay la aparición de muchos indicadores biológicos de infección viral, replicación o ambos en los diferentes estadios clínicos; tales indicadores incluyen: viremia, anticuerpos contra las proteínas virales, proteínas virales circulantes y marcadores no específicos de infección tales como neopterina, $\beta 2$ microglobulina y cambios en el número absoluto de la relación de células CD4 / CD8^{1,2}.

Los marcadores más comúnmente usados son: los ensayos serológicos, la detección de proteínas virales, cultivo de virus y pruebas moleculares que se usan para diagnóstico de la infección, monitoreo de la progresión de la enfermedad, evaluación de la eficacia de las drogas antiretrovirales y el diagnóstico de la infección en recién nacidos hijos de madres seropositivas.¹

Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para determinación de anticuerpos contra el VIH son a menudo los más utilizado para el diag-

nóstico de la infección. Hoy día existen ensayos que permiten simultáneamente detectar anticuerpos a proteínas virales tanto del VIH1 como del VIH2 en un solo ensayo, permitiendo así cambios en los algoritmos y simplificación de los ensayos.¹

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIH

Ensayos de diagnóstico iniciales

Ensayos inmunoenzimáticos (EIA)

Estos emplean una variedad de antígenos o proteínas virales estructurales tanto del VIH1 como del VIH2, los antígenos incluyen: lisado viral completo, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, algunos ensayos emplean una combinación de tipos de antígenos para alcanzar la sensibilidad deseada y son usados en una variedad de formatos, incluyendo ensayos indirectos, competitivos, en sandwiches y anticuerpos de captura, todos estas modalidades y antígenos han sido usados para mejorar la sensibilidad y especificidad de los mismos.

Los EIA indirectos son los más usados para la detección de anticuerpos. El lisado viral completo, la (las) proteína(s) recombinante(s) o el(los) péptido(s) sintético(s) se une a un soporte sólido y el suero del paciente es incubado con el antígeno ya fijado. La detección del complejo antígeno-anticuerpo se revela con un conjugado anti-IgG humana marcado con una enzima: tal como la fosfatasa o la peroxidasa, luego en presencia del sustrato hay un cambio de color que es proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en el suero o plasma.

Los EIA competitivos usan los mismos antígenos que el método indirecto, los cuales se unen a una fase sólida. El suero o plasma del paciente se añade al pozo simultáneamente con un anticuerpo específico anti VIH estándar marcado con una enzima. Estos ensayos son seguros y precisos, en contraste con los métodos indirectos. La intensidad de la reacción del color está inversamente relacionada con la cantidad de anticuerpos presente en la muestra.

Los EIA en “sándwich” de tercera generación usa antígenos recombinantes en fase sólida, los anticuerpos específicos se unen al antígeno, la unión antígeno – anticuerpo se detecta añadiendo un antígeno conjugado a una enzima que al reaccionar con el sustrato produce una reacción de color, el cual es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra. Estos ensayos proveen mayor sensibilidad para la detección temprana de la infección debido a la habilidad para detectar anticuerpos IgM, y son menos costoso.

Los EIA en captura (GACELISA) es un test versátil altamente sensible por su capacidad de detectar bajas concentraciones de anticuerpos, es el método preferido para muestras de orina o fluido oral.

La sensibilidad y especificidad de los EIA están entre 98.1% y 100% cuando son comparados con los ensayos confirmatorios (Western-blot).

Aunque los EIA son altamente sensibles, pueden ocurrir resultados falsos negativos y falsos reactivos:

Falsos Negativos:

- Etapa de seroconversión, esta puede ir desde dos semanas después de la infección hasta 2 a 3 meses, en algunos casos inusuales hasta después de los 5 meses o más tarde en individuos inmunocomprometidos.
- La mayoría de los EIA detectan con más sensibilidad las inmunoglobulinas de tipo IgG y pueden producir falsos negativos después del comienzo de la respuesta inmunológica en el período de producción de anticuerpos de tipo IgM.
- En personas infectadas con cepas altamente divergentes a la cepa VIH1 clasificadas como subtipo O, sin embargo hoy en día la mayoría de los Kit detectan este subtipo.

Falsos Reactivos:

Pueden ocurrir y causar considerable ansiedad si estos resultados se reportan al paciente independientemente del test confirmato-

rio. En general, la probabilidad de que un resultado EIA sea falso positivo está inversamente relacionada con la intensidad de la reacción. En poblaciones con baja prevalencia, el 86.7% de los sueros fuertemente reactivo reportaron el Western-blot o el cultivo de virus positivo. Por otra parte, los sueros moderadamente reactivo por los EIA fueron positivos por el Western-blot o por cultivo de virus sólo en el 1.9% de las veces. La mayoría de los falsos reactivos se deben:

- Errores técnicos asociados con la realización del test: p.ej. fallas en la colocación de las muestras en la placa, contaminación de los pozos con muestras positivas, entre otras
- Mal funcionamiento de los lavadores de tipo automático.
- Sueros tratados por calor, lipémicos y sueros hemolizados.
- Se ha reportado falsos reactivos en 19% de pacientes hemofílicos, 13% de los pacientes alcohólicos con hepatitis, 4% de pacientes hemodializados y 24% de los pacientes con un test VDRL reactivo.
- En pacientes con múltiples transfusiones sanguíneas.

Otros tipos de test de screening son los métodos rápidos:

1. *Ensayo de Aglutinación*

Estos no tiene licencia por el FDA pero son ampliamente usados en Asia, Australia, América Latina y Africa. La complejidad de estos ensayos es comparable a los EIA excepto que no requieren aparatos de lectura, se usan para estudios de seroprevalencia en laboratorios alejados o aislados de los centros de referencia y que controlan un bajo volumen de población. El costo es comparable a los EIA y son menos sensibles y específicos.

2. *Test de Aglutinación en partículas de Latex:*

No es de amplia aceptación debido a su costo, dificultad para la lectura, y su menor sensibilidad y especificidad comparado con los EIA.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

Por razones ya mencionadas y a las considerables implicaciones psicológicas y sociales de un falso reactivo, es inapropiado tomar decisiones médicas solamente con resultados de las pruebas EIA. A todas las muestras con resultados EIA reactivas se les deben realizar los test confirmatorios respectivos.

Ensayo Confirmatorio o Suplementario

Son altamente específicos y se usan para confirmar todos los ensayos iniciales que den resultados reactivos.

1. *Western-blot (WB):*

Es el método confirmatorio más ampliamente usado y consiste en tiras de nitrocelulosa con las proteínas de virus separadas según su peso molecular. El virus concentrado y parcialmente purificado es degradado y sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida y seguidamente electrotransferido a papel de nitrocelulosa. La reacción para detectar la presencia de anticuerpo es similar a otros métodos inmunoenzimáticos. La lectura de las tiras de WB se basa en la observación de las bandas características. Estas bandas son: proteínas de envoltura (env): gp160, gp120, gp41; proteínas de la polimerasa (pol): p66, p51, p31 y proteínas de core (gag): p55, p24, p17^{1,2}.

La mayoría de los reportes indican que los anticuerpos para las proteínas de la región (gag) son las primeras que aparecen después de la seroconversión, éstas pueden disminuir, persistir o llegar a ser indetectables con el comienzo de los síntomas. Los anticuerpos a la glicoproteína de transmembrana (gp 41) puede ser detectada en todas las personas infectadas independiente del estadio clínico.

El criterio de interpretación tiene énfasis sobre la presencia de patrones positivos de anticuerpos contra la región de glicoproteínas de la región (env) y la proteína p24 de la región (gag).

La selección del criterio de interpretación es complicada por la especial necesidad de pruebas en diferentes situaciones y la necesidad

de aplicar un criterio de interpretación simple en cada caso. Cuando la población de estudio es de alto riesgo (usuarios de drogas intravenosas u homosexuales) es importante que el criterio de positividad sea amplio en la etapa temprana de la infección, cuando sólo pocas bandas estén presentes; si la prevalencia de la infección es alta, el valor predictivo de patrones de pocas bandas es alto. En una población con baja prevalencia (donadores de sangre) es considerable utilizar un criterio más exigente ya que en esta población un patrón de pocas bandas en WB tiene un más bajo valor predictivo.²

La selección del criterio de interpretación es más complicado en poblaciones donde están presente el VIH1 y VIH2.

En la siguiente tabla podemos observar algunos criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Control Disease Center (CDC) y la Federal Drug Administration (FDA):

Organización	Criterio + VIH1	Criterio + VIH2
CDC	Dos bandas cualquiera de: p24, gp41, gp120, gp160	
FDA	P24, p31 y gp41 o gp120-160	
OMS	Dos bandas de env con o sin bandas de gag o pol	Dos de env con o sin gag o pol

Cuando no se presente estos patrones deberá considerarse el WB indeterminado, estos ocurren frecuentemente en personas que no están infectadas con VIH, patrones de bandas del gag p24 y p17 son las más comunes, aparecen en 10% a 15% de personas que no están infectadas.

Personas con patrones de WB indeterminados que permanecen estables por meses o años probablemente no están infectados, se sugiere que personas sin factores de riesgos para la infección pero con persistentes y estables patrones de WB indeterminados, deben ser monitoreadas a los 6 meses, si no desarrollan bandas adicionales estos pudieran corresponder a que no están infectados y se pueden recurrir a las pruebas moleculares

donde se hace la detección directa del genoma viral.³

EL WB presenta algunas desventajas como: ser una prueba relativamente lenta, cuidadosa de realizar y subjetiva en la lectura de resultados.

2. Ensayos de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Los ensayos de IFI, ofrecen un método alternativo que ha demostrado ser tan sensible y específico como el WB. Se basa en el uso de células infectadas que son fijadas a un portaobjetos, utilizando como control células no infectadas del mismo origen. El suero problema es incubado para reaccionar con los antígenos presentes en las células infectadas y su presencia se demuestra por medio de un antisuero anti IgG humano marcado con un fluorocromo. La lectura de resultado se realiza con un microscopio de fluorescencia. La IFI es una técnica rápida, económica y fiable, su mayor limitación está en la subjetividad de interpretación de la lectura de la lámina.

3. La Radioinmunoprecipitación (RIPA):

Es una técnica de confirmación compleja, ya que para llevarla a cabo es necesario utilizar cultivos celulares, replicar el virus, marcar con isótopos, inmunoprecipitar, correr electroforéticamente en gel de poliacrilamida y finalmente, mediante autoradiografía detectar las bandas. El patrón es similar al WB pero, en este caso, las glicoproteínas de alto peso molecular son detectadas, en su estado soluble, con una mayor sensibilidad.

Esta técnica es demasiado laboriosa y costosa, se usa para investigación. Puede usarse en caso de WB indeterminado ya que es más sensible para detectar anticuerpos contra la glicoproteína de env.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

Muestras utilizadas para las pruebas serológicas

- Suero o plasma: las muestras pueden ser enviadas desde el interior del país a una temperatura de 4°C en un período de 48 horas, o a -20°C si se requiere de un

mayor tiempo de transporte. Es el tipo de muestra más ampliamente utilizada en los distintos laboratorios.

- Sangre fresca sobre papel de filtro: se ha usado para screening de recién nacidos. Se usa en caso donde la recolección y el almacenaje del suero o plasma se dificulta o es imposible. Las muestras pueden ser guardadas al menos 45 días a temperatura ambiente, aún en áreas tropicales, sin perder la sensibilidad. Para almacenajes a largo plazo, las muestras deben ser guardadas en un recipiente con un desecador a -20°C. La desventaja es que las muestras deben ser tomadas en forma fresca, segura y uniforme, el círculo del papel debe estar saturado con la muestra.
- Fluido Oral: Ha sido propuesto como una alternativa no invasiva para medir anticuerpos a una gran variedad de agentes virales, sin embargo tiene muchas desventajas: (a) no hay ningún test de este tipo aprobado de manera internacional (p.ej. FDA), (b) algunos fluidos orales no contienen suficientes concentraciones de IgG para la sensibilidad del test y (c) Finalmente, el uso del fluido oral puede ser de alto riesgo para la exposición de ciertos agentes infecciosos tales como el *Mycobacterium*.
- Orina: Semejante al fluido oral ha sido propuesto como una alternativa no invasiva y las desventajas son las mismas que la enunciadas para el fluido oral.

Otras técnicas serológicas han sido desarrolladas con el propósito de resolver problemas diagnósticos como los que se producen con niños menores de 15 meses nacidos de madres seropositivas. En estos casos, debido a la presencia de anticuerpos maternos en la sangre de los niños, son prácticamente inútiles las técnicas habituales de detección de anticuerpos. Estos métodos nos permiten detectar la producción *in vitro* de anticuerpos a partir de los linfocitos de sangre periférica de los niños infectados (IVAP, ELISPOT) donde los linfocitos del niño son separados de la sangre completa, lavados y en un medio de crecimiento son estimulados para producir anticuerpos con cualquier mitógeno, los linfocitos B sensibilizadas al VIH producirán anticuerpos que se liberarán en el

sobrenadante del cultivo y que podrán ser detectados usando los métodos estándar. Sin embargo, estas pruebas pueden producir una proporción importante de resultados falsos positivos y falsos negativos.

1. *Falsos Positivos:*

Se han reportado en infantes no infectados durante los primeros 2 meses de vida debido a anticuerpos anti HIV maternos adheridos a las células B del infante en el cultivo.

2. *Falsos Negativos:*

Se han reportado en niños y adultos infectados – HIV con inmunodeficiencia avanzada quienes no pueden producir anticuerpos o en aquellas con infección latente que no tienen una replicación viral activa. La replicación activa de virus es el estímulo para la replicación de las células productoras de anticuerpos. La supresión de la replicación viral por mecanismos inmunes o por terapia antiviral puede suprimir la producción de anticuerpos por debajo de los niveles de detección.

Detección de proteínas vírales (antígenos virales)

Detección del antígeno p24

El primer uso para la detección de antígenos virales del VIH fue para monitorear el crecimiento del virus en los cultivos celulares. Se realiza mediante una técnica inmuno-enzimática y determina un antígeno del core: la proteína p24 en suero, plasma y líquido cefaloraquídeo.^{2,3}

Se utilizan dos sistemas ELISA de captura, el clásico sandwich o el competitivo. Estas pruebas ayudan a medir el grado de replicación vírica en los fluidos corporales.

El límite de la prueba es que detecta antígeno p24 libre en suero y plasma. Desafortunadamente, la mayoría del antígeno p24 presente después de la seroconversión existe como un complejo antígeno-anticuerpo y no es detectado con los Kits comerciales. Sin embargo, recientemente, se ha introducido una modificación del ensayo en donde se utiliza

un reactivo ácido que disocia estos complejos mejorando la sensibilidad de los mismos.⁴

Hoy día estos ensayos se utilizan para: (a) determinar la evolución de la infección, (b) diagnóstico en niños y en adultos en período de ventana inmunológica, (c) como factor de pronóstico de enfermedad y (d) para medir replicación viral en cultivo.

Aislamiento del Virus

El aislamiento del VIH se puede realizar a partir de células procedentes de individuos infectados o a partir de fluidos acelulares, así como del plasma. Estas células o fluidos son puestas en contacto con células susceptibles que facilitan la replicación vírica y por tanto su aislamiento. Existen diversas líneas celulares sensibles a la replicación viral, pero son los linfocitos de sangre periférica de individuos seronegativos estimulados con mitógenos, los que muestran una mayor sensibilidad para el aislamiento del virus.¹

Habitualmente, el aislamiento del virus se realiza a partir de linfocitos periféricos obtenidos de sangre total de la persona infectada, utilizando para su separación gradientes de Ficoll-Hypaque y posterior centrifugación. Cuando el cocultivo se realiza con linfocitos normales de sangre periférica, el donante deberá carecer de anticuerpos frente al VIH y al virus de la hepatitis B.

La demostración de la presencia de virus en cultivo, se puede establecer por diversos métodos:

- a. Observación directa mediante el microscopio óptico para detectar el efecto citopático, que consiste en células multinucleadas gigantes y muerte celular.
- b. Detección de antígenos en las células mediante la técnica IFA.
- c. Detección de antígenos p24 en el sobrenadante de los cultivos mediante la técnica de ELISA.
- d. Determinación de la actividad de la enzima transcriptasa reversa.
- e. Detección de ADN proviral o ARN viral mediante las técnicas de hibridación o PCR.

- f. Detección de las partículas virales mediante tensión negativa y visualización por microscopía electrónica.

Aunque el aislamiento del virus es pobre para ser usado como diagnóstico por su relativa insensibilidad, alto costo y requiere de un enorme tiempo para su realización, los cultivos sirven como estándar para otros test diagnóstico que han sido establecidos. Además, sirven para identificar nuevas variantes virales, en el diagnóstico en niños y en adultos en período de ventana.

DETECCIÓN DIRECTA DEL VIH UTILIZANDO TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Aunque las partículas virales infecciosas del VIH encapsidan dos cadenas simples de ARN como información genética, en su ciclo de vida incluye una conversión a doble cadena de ADN denominado provirus, el cual se integra dentro de los cromosomas de la célula huésped.^{5,6}

Debido a la baja frecuencia de células mononucleares periféricas infectadas con el VIH1 en una persona seropositiva, las técnicas de biología molecular convencionales no son lo suficientemente sensibles para detectar y caracterizar el ADN proviral directamente de linfocitos de pacientes. Por lo tanto este ADN debe ser primero amplificado para obtener niveles detectables utilizando la técnica del PCR.⁶

Para el estudio de la infección por VIH, el PCR ha demostrado tanto utilidad clínica como de investigación:

- Detección directa y cuantificación del ADN-VIH de células de personas infectadas.
- Detección en personas infectadas durante el período de ventana (antes de la generación de anticuerpos específicos para el VIH).
- Para resolver el estatus de infección de individuos con WB indeterminado.

- Para diagnóstico en neonatos de infección por VIH.
- Para diferenciar infección entre VIH1 y VIH2.
- Para definir patrones de transmisión y evolución del virus a través de las poblaciones.

El método de amplificación de ADN PCR, utiliza dos oligonucleótidos (primers) de secuencia conocida separadas por unas 10 a 300 bases y que son complementarias a las bandas del ADN diana. Tras la desnaturalización del ADN y anillamiento de los primers tiene lugar la incorporación de deoxinucleósidos trifosfato mediante la intervención de una enzima. Puesto que las bandas recién sintetizadas de ADN pueden servir como moldes por si mismas, la repetición de ciclos de desnaturalización, anillamiento y alargamiento da lugar a un crecimiento exponencial de copias de la región flanqueada por los primers. El ADN vírico amplificado por este procedimiento puede ser detectado por hibridación o por una corrida electroforética en gel de agarosa. Este método permite la amplificación de las regiones del genoma vírico más de 100.000 veces. La técnica puede ser realizada en 2 días.

Para determinar ARN VIH circulante se usa la metodología de PCR ARN (RT PCR), donde hay un paso previo de copiar ADN del ARN usando la enzima transcriptasa reversa antes de la amplificación del ADN.

PCR in situ, ha sido usada para la detección directa del ADN proviral de tejido fijado en formalina. Sin embargo una limitación ha sido la imposibilidad de localizar ADN amplificado en células o secciones de tejido. Esta limitación ha sido solventada utilizando una combinación de PCR con hibridación in situ. Esta técnica permite la localización de segmentos de ADN amplificados específicos dentro de células aisladas y secciones de tejido.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN INFANTES HIJOS DE MADRES SEROPOSITIVAS

Debido a que los anticuerpos maternos tipo IgG-VIH, pasan la barrera transplacentaria virtualmente todos los recién nacidos hijos



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

Algoritmo usado para la detección de la infección por el VIH usando técnicas serológicas

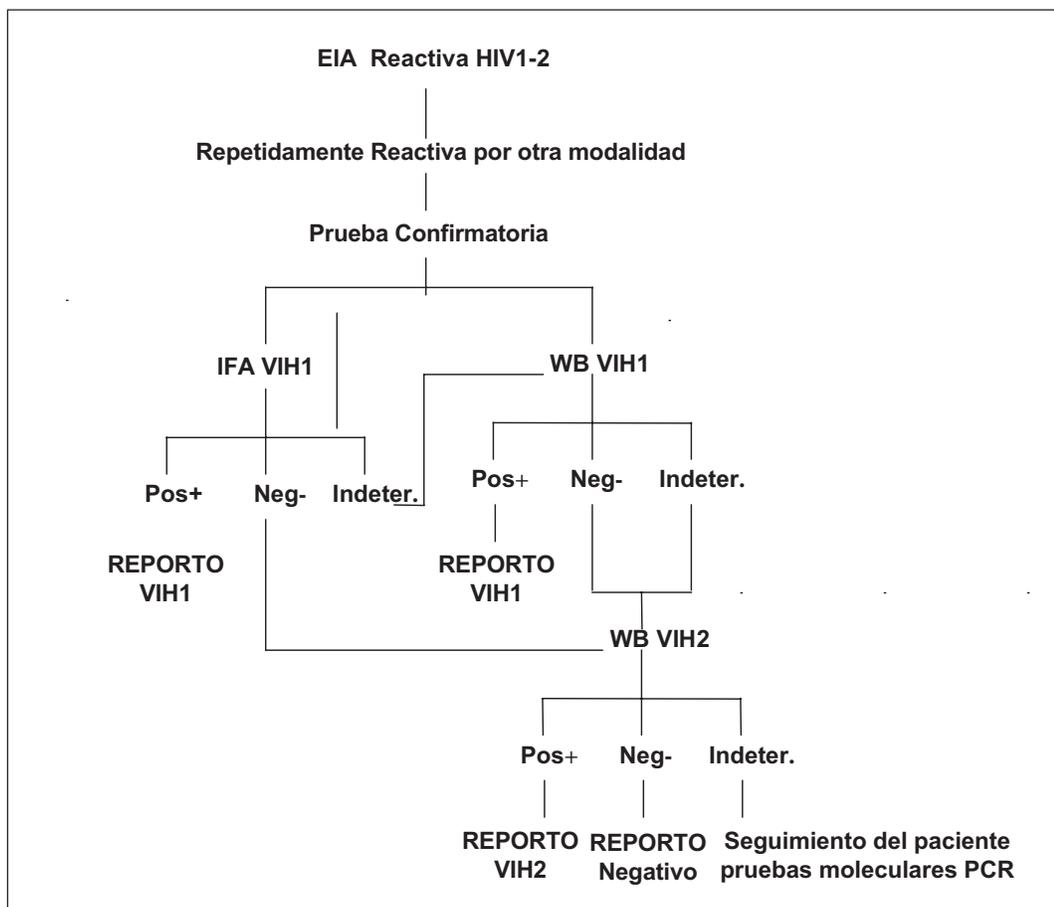


Figura 1.

de madres seropositivas tienen la presencia de anticuerpos, lo cual no necesariamente indica infección por el virus. Estudios han demostrado que acerca del 20% al 30% de recién nacidos adquiere la infección por el VIH, sin embargo hoy día con el uso de tratamiento antiretroviral, se ha reducido a un 8% la transmisión, mientras que el 100% de estos niños dan resultados para ensayos EIA o WB positivos, estos anticuerpos maternos pueden persistir hasta los 15 a 18 meses de edad. Los métodos estándar de EIA y WB la mayoría detectan eficientemente IgG y no pueden diferenciar anticuerpos maternos del infante¹.

Sin embargo, se ha sugerido para resolver este problema: observar la aparición de nuevas bandas en los ensayos de WB en muestras obtenidas durante el primer año de vida.

Nuevas bandas indicarán producción de anticuerpos por el infante y así, la presencia de infección. Sin embargo, esto no aparece sino muchos meses después.

También se ha usado monitorear el título de anticuerpo durante el primer año de vida. Un aumento de título indicará producción de anticuerpos y así infección, y una caída de título de anticuerpo indicará no infección. Aunque teóricamente aplicable para el VIH hay estudios que muestran que el título de anticuerpos medido por la lectura de densidad óptica de los EIA no siempre se correlaciona con el estatus de infección del infante. Ensayos de IgM e IgA específica para VIH no son usados rutinariamente. En la figura 2 se muestra el algoritmo de diagnóstico corrientemente usado para la infección del VIH en los niños hijos de madres seropositivas.

Algoritmo de Diagnóstico para infantes hijos de madres infectadas con el VIH

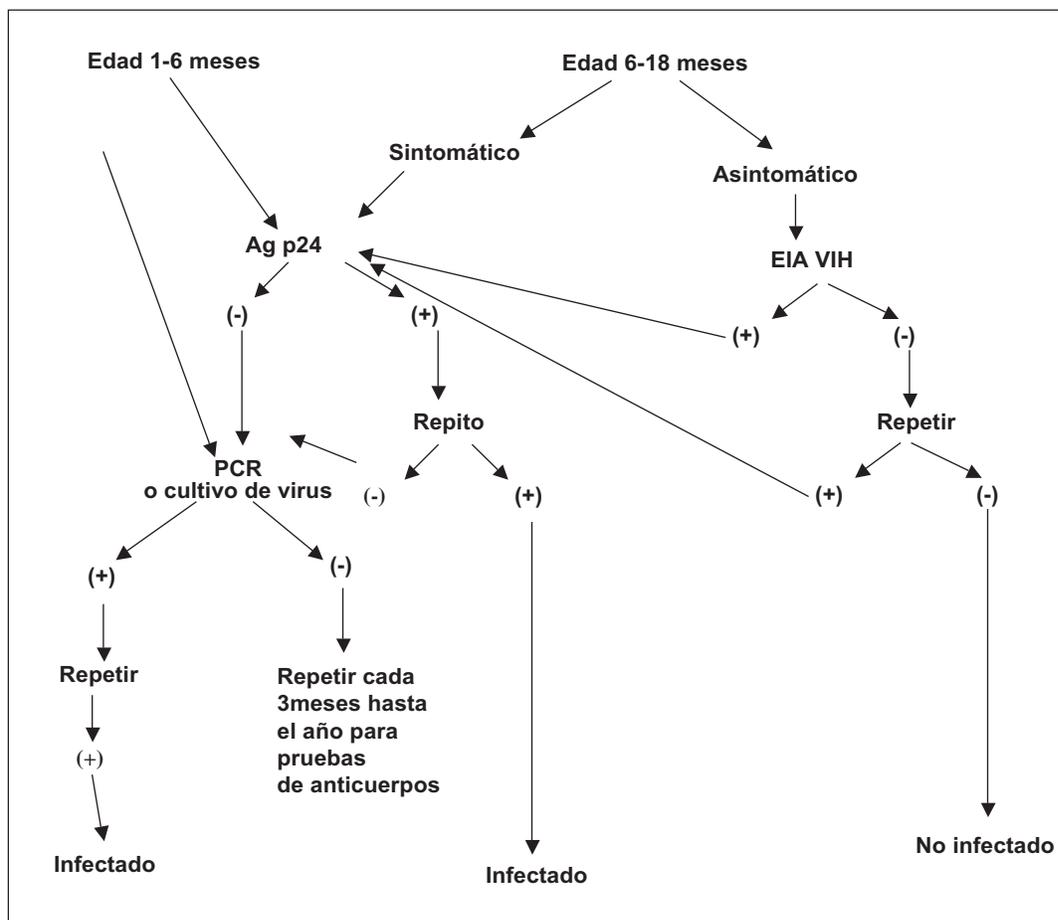


Figura 2.

Para niños de 1 a 6 meses de edad, el PCR y el cultivo de virus son recomendados debido a su gran sensibilidad para esta edad. Los ensayos de antígeno p24 es otra opción, particularmente en niños de 3-6 meses de edad ya que este test tiende a dar falsos negativos en infantes por debajo de 3 meses. Los ensayos de producción de anticuerpos *in vitro* no se usarán para el diagnóstico en niños por debajo de 2 meses de edad.

Para niños de 6-18 mese de edad un ensayo de anticuerpo estándar inicial debe realizarse para determinar si hay seroreversión (pérdida de anticuerpos maternos). Si el test de anticuerpos es negativo y repetidamente probado, este niño debe ser considerado no infectado a menos que posteriormente revele otros signos o síntomas de infección por VIH. Niños de 6-18 meses con ensayos de anti-

cuerpos positivos serán probados con otros ensayos como se indica en el algoritmo. Hasta que estos ensayos para el diagnóstico temprano nos den un resultado firmemente establecido, deben ser repetidos y de ser posible otros test deben ser utilizados para confirmar el diagnóstico.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL

Tras la seroconversión, los pacientes infectados suelen pasar a una fase asintomática que puede durar varios años. Este período se caracteriza por una escasa viremia persistente y una disminución progresiva del número de linfocitos T CD4+, que origina una situación de inmunodeficiencia grave, múltiples infecciones oportunistas, tumores malignos y por último, la muerte. Aunque la cantidad de vi-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

rus en la sangre periférica es relativamente pequeña durante la fase asintomática de la infección, los procesos de replicación y eliminación del virus parecen ser procesos dinámicos en los que una elevada tasa de producción de virus e infección de los linfocitos CD4+ se ve equilibrada por una tasa igualmente alta de eliminación vírica, muerte de las células infectadas y reposición de linfocitos CD4+ lo cual se traduce en el mantenimiento de niveles relativamente estables tanto de viremia como de linfocitos CD4+. ^{7,8,9,10}

Las determinaciones cuantitativas de la viremia han puesto de manifiesto que el aumento en el número de virus en sangre periférica podría estar relacionado con un mayor riesgo de progresión clínica de la infección por el VIH, mientras que el descenso de la viremia podría asociarse a un menor riesgo de progresión clínica. La cantidad de virus en sangre periférica puede cuantificarse de varias formas:

- a. Determinación de antígeno p24 de VIH en suero
- b. Cultivo cuantitativo del VIH a partir del plasma
- c. Determinación directa de ARN vírico en el plasma, mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o amplificación de señales.

Las pruebas EIA para determinar antígeno p24 libre como marcador de la cantidad de virus es limitada, ya que este antígeno sólo es detectable en el 20% de los pacientes asintomáticos y en torno al 40% a 50% de los pacientes sintomáticos.

La utilidad de los cultivos cuantitativos es escasa para monitorear la viremia en los pacientes infectados por el VIH, ya que sólo una pequeña parte de las partículas víricas son infecciosas *in vitro*. A menudo, los virus infecciosos resultan indetectables en los pacientes asintomáticos.

Las técnicas con mayor sensibilidad y especificidad para cuantificar el ARN del VIH son las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos o amplificación de señales¹¹. Estas pruebas pueden utilizarse junto a los datos clínicos y otros marcadores analíticos, como un indicador de pronóstico de la enfermedad, como

medida basal en el inicio de tratamiento, de ayuda para valorar el cambio de los valores plasmáticos del ARN del VIH como marcador indirecto de la respuesta vírica al tratamiento antiretroviral, también puede utilizarse para pronosticar la eficacia a largo plazo del tratamiento antiretroviral en los ensayos terapéuticos y en los programas individuales de tratamiento, como factor pronóstico y de tratamiento en la transmisión vertical de madre a hijo.¹¹

La carga viral se refiere a una medida del número de copias de ARN del VIH por volumen de plasma (ml).

Hay tres metodologías de laboratorio que han sido desarrolladas para las pruebas:

1. La reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (RT-PCR), donde hay amplificación del ARN, método de Amplicor ROCHE.
2. Quantiplex, denominada bDNA o cadena ramificada de ARN-CAIRON
3. Amplificación NASBA basada en secuencia de ácidos nucleicos-ORGANON

Los resultados se expresan en copias de ARN por mililitro de plasma y su logaritmo.

Las tres tienen un método estándar con una sensibilidad entre 400 y 750000 copias por mililitro de plasma y el método ultrasensible entre 50 y 50000 copias por mililitro de plasma.¹² Es recomendable usar siempre la misma metodología para el seguimiento de los pacientes.

El algoritmo para utilizar estos dos métodos es el siguiente:

- a. Método estándar :
 - para pronóstico de la infección
 - como medida basal para comienzo del tratamiento antiretroviral
 - para seguimiento inicial después del tratamiento
- b. Método Ultrasensible:
 - Cuando por el método estándar da 5000 copias o menos
 - Para seguimiento del tratamiento

Es esencial establecer un nivel basal de la carga viral. Se consigue este nivel estableciendo un promedio de los resultados de dos prue-

bas separadas por 2 a 4 semanas. El nivel basal de ARN de VIH sirve como un nivel contra el cual se pueden comparar resultados futuros, para tomar decisiones sobre el tratamiento a seguir y para cambios de tratamientos, ya que se deben basar en un incremento sostenido de la carga viral y no sobre un resultado único. Ciertos cofactores, como las inmunizaciones contra la influenza, brotes del herpes simple y otros, incrementan transitoriamente los niveles de VIH en la corriente sanguínea. Por estas razones los pacientes no deben someterse a la prueba de la Carga Viral por 4 a 6 semanas después de experimentar uno o más de estos eventos. Debe considerarse hacerse una prueba de la carga viral cada 3 a 4 meses para confirmar que los medicamentos antiretrovirales estén haciendo su efecto. Al evaluar los resultados de la carga viral es importante anotar que sólo los incrementos o las reducciones en 0.5 log o más son considerados como cambios significativos que podrían ameritar cambios en el régimen antiviral¹³.

Interpretación de los Resultados

1. Carga viral alta mayor de 100 mil copias: esto indica un riesgo más alto para la progresión de la enfermedad.
2. Carga viral baja menor de 10 mil copias: este resultado indica que el riesgo de la progresión de la enfermedad es relativamente baja en el futuro cercano.
3. Una carga viral indetectable menos de 50 copias: no significa que la infección del VIH se ha curado, sino que la prueba no es lo suficientemente sensible para encontrar cantidades más pequeñas de virus en plasma.

Nota: La carga viral sólo mide la cantidad de ARN viral en plasma no así en los santuarios del virus y en otras células.

Tipo de muestra: plasma, separado de la sangre total, tomado con EDTA con un tiempo no mayor de 4 horas de separado, mantenido el plasma hasta 4 días a 4°C y si es mayor tiempo a -20°C.

Debido a la alta diversidad de cepas divergentes del VIH a la aparición de variantes

resistentes a las drogas, virus con resistencia preexistente, es necesario, en un futuro inmediato, los estudios de genotipo y fenotipo para tomar decisiones relacionadas al tratamiento y ayudar así a mejorar sustancialmente las posibles fallas de la terapia.

USO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ENUMERAR POBLACIONES DE LINFOCITOS EN LA ENFERMEDAD DEL VIH

La determinación de células T en pacientes infectados por VIH1 se conoce con el nombre de inmunofenotipo. El inmunofenotipo combina el uso de anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo (identifica población de células) y el citómetro de flujo (evalúa estas células individuales rápidamente en un análisis multiparamétrico correlacionado).¹⁴

La sangre completa anticoagulada se combina con anticuerpos monoclonales específicos para antígenos celulares de interés e incubados, permitiendo que la reacción antígeno-anticuerpo tenga lugar. Las células rojas son lisadas, y las muestras entonces son introducidas en el citómetro de flujo y analizadas por patrones de fluorescencia.¹⁵

La muestra más recomendada: sangre completa tomado en tubo con EDTA, puede ser conservada a temperatura ambiente hasta 24 horas.

La razón primaria para el inmunofenotipaje de pacientes con infección por VIH es el conteo de linfocitos T CD4+. Una de las primeras anomalías encontradas en lo que nosotros conocemos como SIDA es la disminución en el porcentaje y número absoluto de células T CD4. Esta disminución es progresiva a través de la infección¹⁶. Las células T CD4+ son importantes en la inmunidad celular y en la humoral; ellas inducen células efectoras a realizar sus funciones inmunológicas, las cuales incluyen: producción de anticuerpos, hipersensibilidad de retardada e inmunidad mediada por células. La disminución de estas células en la infección por VIH, se correlaciona *in vivo* con la disminución de las respuestas a reconocer antígenos y con una incrementada susceptibilidad a infecciones oportunistas y sarcoma de Kaposi. *In vitro*, la



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

disminución de la respuesta a los mitógenos y antígenos se correlaciona con una disminución del número de células T CD4. La citotoxicidad celular mediada por células (T CD8+) se incrementa tempranamente en la infección por VIH, pero durante el último estadio de la enfermedad esta respuesta está disminuida. La producción de anticuerpos (por células B) se incrementa durante la infección temprana propia de la activación policlonal de las células B, pero aún esta respuesta disminuye con la progresión de la enfermedad.

Estudios clínicos tempranos sobre la relación de CD4-CD8, el cual es un número derivado de dividir el porcentaje de CD4 por el porcentaje de CD8, debido a la gran afluencia de células CD8 hay una disminución del radio en el estadio temprano de la infección, por lo que el uso de éste no es de mucho valor. La mayoría de los clínicos se interesan más en el número y porcentaje de células CD4 como un indicador de inmunosupresión. De otro lado, las células T CD8 pueden tener un papel protector en el período temprano de la infección, en el estadio de SIDA las células T CD8+ disminuyen significativamente.

Las células TCD4 + han sido utilizadas como marcadores inmunológicos en la infección por VIH. Los resultados son expresados como el porcentaje de células mononucleares de sangre periférica que son CD4+. En personas no infectadas por VIH aproximadamente el 20 al 40 % de células T son CD4+. El porcentaje de células TCD4+ es multiplicado por la cuenta absoluta de linfocitos y se obtiene el número total de células T ayudadoras. Este valor es usualmente de 500 a 1500 células por mm³ en ausencia de infección por VIH.

LA VARIACIÓN DE CÉLULAS TCD4+

La variabilidad diaria e interlaboratorio de este parámetro es considerable, debido a las fluctuaciones de la cuenta de células blanco en la sangre y a la cuenta diferencial de leucocitos, por esta razón algunos autores se han inclinado por el uso del porcentaje de las células TCD4+ más que por los valores absolutos. El porcentaje de células TCD4+ es algunas veces más exacto y reproducible, los dos índices son clínicamente intercambiables pero

la cuenta absoluta de células TCD4+ tiene un uso más amplio.

La subpoblación de CD4 y CD8 han sido enumeradas usando inmunofenotipaje de 2, 3 y 4 colores para ayudar a determinar si hay una subpoblación de estas células que es importante en la progresión de la enfermedad. Se ha encontrado una disminución de las células B y NK en la infección por VIH, de valor clínico y predictivo en estudio.

LIMITACIONES DE LA CUENTA DE CÉLULAS TCD4+ COMO MARCADOR CLÍNICO

Las características de la infección por VIH hacen de esta enfermedad una excelente candidata para la aplicación de marcadores clínicos en el manejo de pacientes, en la práctica médica y en la toma de decisiones.

La cuenta de células TCD4+ cae invariablemente con la progresión por la infección por VIH, de allí que cualquier tratamiento, el cual resulte en un incremento en la cuenta de células TCD4+ debe, en teoría, ser asociado con mejoría clínica.

Cambios en las células TCD4+ en pacientes asintomáticos durante tratamiento, han mostrado correlacionar significativamente con progresión de la enfermedad y sobrevida. Sin embargo la cuenta de células CD4+ parece ser un marcador incompleto de respuesta a la terapia y mejoría clínica.

Una de las limitaciones de utilizar la cuenta de células TCD4+ como un verdadero marcador clínico es la carencia de un rango normal preciso. Las variaciones diurnas y otros factores no relacionados con la infección por VIH, los cuales, se sabe afectan la cuenta de células TCD4+, por ejemplo, edad mayor de 60 años, la raza asiática, nutrición protéica deficiente, ejercicio e infección pueden independientemente causar disminución de estas células TCD4+. Otros factores como la ansiedad producen aumento, además, ensayos estándares para medir la cuenta de células TCD4+ pueden mostrar variaciones intraensayos de un 10%. Todo esto establece claras limitaciones para utilizar el número de células TCD4+ como un marcador clínico ideal en la infección por

VIH. A pesar de todas estas limitaciones en la determinación de células TCD4+, estudios indican que los niveles de ARN-VIH constituyen un fuerte marcador de progresión temprana en la infección, pero cuando aumenta el tiempo con la infección por VIH, marcadores como la cuenta de células TCD4+y la función de las células T gana poder predictivo. En los últimos estadios de la infección, la medida de la deficiencia inmunológica puede ser un marcador más poderoso de pronóstico que las medidas de marcadores virológicos como la carga viral.

Esto es consistente con la hipótesis de que la replicación viral es el principal factor que lleva a destrucción de las células TCD4+ y a fallas funcional de estas células, lo cual hace al paciente vulnerable a infecciones oportunistas y malignidades relacionadas con el VIH. Así la determinación de ARN-VIH, en los últimos estadios de la infección debe estar relacionada con el estado inmunológico del paciente indicando que el manejo adecuado requiere la combinación de la evaluación de niveles ARN-VIH, cuenta de células TCD4+ y la activación de las células T.

PANEL DE ANTICUERPOS BÁSICOS RECOMENDADOS PARA LA EVALUACIÓN EN LA INFECCIÓN POR VIH

El Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los E.U.A División de SIDA (NIAD DAIDS) recomienda para los estudios clínicos de SIDA el siguiente panel de anticuerpos: CD14 y CD45; control isotópico; CD3/CD4 y CD3/CD8. El CD19 es recomendado para muestras pediátricas. Para el grupo de estudios clínicos (ACTG) de este Instituto el marcador más importante es la cuenta de células TCD4+. Hoy en día ha adquirido importancia el estudio de células TCD8 y sus marcadores de activación.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Diagnóstico, Pronóstico
e Interpretación
de los Resultados
de Laboratorio en la
Infección por el VIH

REFERENCIAS

1. Schochetman G., Richard J. AIDS TESTING. Center for Disease Control and Prevention. Second Edition. 1994.
2. A. García Sáiz. Diagnóstico Viroológico en la infección producida por el VIH. Revisión. Publicación oficial de la Sociedad Interdisciplinaria de SIDA. Vol 1, N° 2 : 41-45; 1990.
3. Center for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report. Atlanta: CDC, July 1993.
4. Marcus R, CDC Cooperative Needlestick Surveillance Group, Surveillance of health care workers exposed to blood from patients infected with the Human Immunodeficiency Virus. N Engl J Med 1988; 319: 1118-1123.
5. Henry A. Erlich. PCR Technology 1992
6. Kwok, S and Sninsky, J.J 1993. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications. Eds. Persing, D.H., Smith, F.C., Tenover, T.J., White, T.J., ASM Press, Washington, D.C.
7. BETA: Boletín de Tratamientos Experimentales contra el SIDA. La prueba de la Carga Viral del VIH. Julio 1996.
8. Jay A., Levi, MD. Human Immunodeficiency Viruses and the Pathogenesis of AIDS. JAMA, May 26. 1989. Vol 261, N° 20.
9. Wain-Hobson S. Confusión Viroológica. Reimpreso de Nature, vol 373, Enero 12. 1995.
10. David D. Ho, Avidan U. Neumann, Alan S, Wen Chen, John M. Leonard & Martin Markowitz. Recambio rápido de los viriones plasmáticos y los linfocitos CD4 en la infección por VIH-1. Nature vol. 373 Enero 12. 1995.
11. National AIDS Treatment Information Project: Las pruebas de Carga Viral. <http://www.kff.org>.
12. Sun, R, Ku, J, Jayakar, H, et al 1998. Ultrasensitive Reverse Transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency Virus type 1 RNA in plasma. Journal of Clinical Microbiology 36:2964-2969.
13. Perrin, L. 1997. Detection of low HIV-RNA levels in plasma. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14: 179-183. Loken MR, Stall AM. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology, J Immunol Methods 1982; 50:85-112.
14. Loken MR, Stall AM. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology, J Immunol Methods 1982; 50:85-112.
15. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 1979; 123:1312-1317.
16. Simon D.W Frost, Colin A. Michie. Lymphocyte dynamics, apoptosis and HIV infection. TRENDS IN MICROBIOLOGY 77 vol 4. February 1996.
17. Shirazian D, Herzlich BC, Mokhtarian F, Spatoliatore G, Grob D. Needlestick injury; blood cells and acquired immunodeficiency syndrome. Am J Infect Control 1992; 20:133-137.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES GENÉTICOS DEL HUÉSPED EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)*

(HOST GENETIC INFLUENCES ON HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION)

Carlos Darío Ramírez M.

Cátedra de Bioquímica, Departamento de Ciencias Fisiológicas,
Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela (UCV).
Apartado Postal 6750, Carmelitas, Caracas 1010, Venezuela.
Telefax: +58-212-5621643. E-mail: carlosdarioaramirez@yahoo.es

RESUMEN

Después de la exposición a un patógeno, el huésped puede resistir la infección, permanecer sub-clínicamente infectado, o progresar a través de múltiples etapas desde una infección leve a estados muy severos. Secuelas crónicas pueden o no ocurrir. Una compleja trama de factores virales y del huésped, muchos de los cuales sólo recientemente se comienzan a entender, determinan el curso de la infección por VIH. La existencia de individuos que han estado expuestos y que no desarrollan la enfermedad (no infectados) sugiere la existencia de inmunidad natural y adquirida al VIH, y esto es un determinante principal del resultado clínico. Hasta el presente han sido identificados diversos factores genéticos del huésped que determinan la infección por VIH. Varios genes y polimorfismos han sido identificados que confieren susceptibilidad (riesgo) y/o resistencia a la infección por VIH, entre los que podemos citar a los receptores de quemoquinas y sus ligandos CCR5-D32, CCR2-V64I, el factor 1 derivado de las células del estroma (SDF1), CX3CR1, y los polimorfismos del promotor de CCR5; los alelos clase I y II del HLA; así como también los distintos factores solubles inhibitorios; las citoquinas, que intervienen en las infecciones concomitantes que afectan el curso clínico de la enfermedad, y un nuevo gen recientemente identificado, CEM15/APOBEC3G. Se discuten en esta revisión, los aspectos relacionados con las interacciones entre los genes y sus efectos sobre la infección por VIH, las investigaciones relacionadas con estos genes, y las nuevas tendencias en el desarrollo de estrategias terapéuticas como la fármaco-genética y el desarrollo de vacunas, basados en el conocimiento de la genética molecular del virus y su huésped. La efectividad de dichas estrategias ayudará a trazar nuevas líneas de investigación y de desarrollo, en cuanto al control y prevención de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: VIH, INTERACCIÓN HUÉSPED-PATÓGENO, CCR5, CCR2, SDF1, CX3CR1, HLA, CITOQUINAS, QUEMOCINAS, CEM15/APOBEC3G, SUSCEPTIBILIDAD, RESISTENCIA.

* Esta revisión está basada en una conferencia del autor en el "Segundo Curso Internacional Sobre Manejo Integral de Pacientes Infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)", que se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" de Caracas en Septiembre de 2002.

ABSTRACT

After the pathogen exposure, the host can resist the infection, remain sub-clinically infected or progress through of multiple stages from a negligible infection to very serious stages. Chronic sequels can be present or not. A complex network of host and viral factors, many of which are only beginning to be understood, determines the course of HIV-infection. The existence of long-term non-progressors and exposed to the infection, but yet uninfected, suggest that natural and acquired immunity to HIV exist and is a major determinant of clinical outcome. To date, have been identified several host genetic factors that confer susceptibility and resistance to HIV-infection. Some of these identified factors are chemokine receptors family members and its ligands; CCR5-D32, CCR2-V64I, SDF1, CX3CR1. Others are the host's human leucocytes antigen (HLA) alleles and haplotypes class I and II, several others soluble factors and cytokines, that determines clinical course of disease, and a novel gene CEM15/APOBEC3G, recently identified. This review will focus on the interactions between these genes and its effects on HIV-infection and progression to AIDS, and the application of this knowledge to therapeutic strategies involving new chemotherapeutic agents, immune modulation, and vaccine development, based on molecular genetics of virus and host. Effectiveness of such strategies can be used to delineate new investigations related to control and prevention of disease.

KEYWORDS: HIV, HOST-PATHOGEN INTERACTION, CCR5, CCR2, SDF1, CXCR1, HLA, CYTOKINES, CHEMOKINES, CEM15/APOBEC3G, SUSCEPTIBILITY, RESISTANCE.

INTRODUCCIÓN

El número acumulado de individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ha superado la barrera de 20 millones por año. La infección por VIH también supera a la malaria como la principal causa de infección mortal entre los adultos a nivel mundial. El VIH-1 ataca directamente las defensas del huésped infectando a los linfocitos T, macrófagos y células dendríticas del sistema inmune y se replica mejor cuando estas células se activan. Por lo tanto, los eventos que disparan la respuesta inmune específica a la infección, exponen al sistema inmune a ciclos repetidos de activación y subsiguiente infección

de las células inmunitarias, y destrucción. En los últimas dos décadas, una investigación extensa e importante ha dado lugar al inicio del conocimiento de cuál es el mecanismo de entrada del VIH-1 en las células del huésped, su replicación, cuáles son las células blanco susceptibles y la generación específica de inmunidad, lo cual ha permitido el estudio de la transmisión viral y la progresión de la enfermedad, para dar lugar a lo que hoy día se conoce como la "patogénesis del VIH".

Marcadas diferencias individuales en la susceptibilidad a la infección y la progresión de la enfermedad han sido observadas en casi todas las infecciones. Esta revisión analizará la reciente evidencia de la influencia de los factores genéticos del huésped sobre la transmisión del VIH-1 y la progresión del síndrome de inmunodeficiencia humana. Estos genes han sido clasificados en dos categorías: primera, los genes que codifican receptores celulares, ya sea que estos medien la entrada a la célula o sirvan de ligandos para estas proteínas; segunda, los genes dentro del sistema principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) los cuales regulan la respuesta inmune del huésped a la infección.

La biología de la entrada celular del VIH-1

La entrada celular del VIH-1 requiere la unión tanto a células CD4⁺ [1-3], como a uno de los siete receptores de las quemocinas que están acoplados a proteínas G, los cuales actúan como co-receptores [4-11] (Figura 1). Las cepas de VIH-1 han sido caracterizadas previamente por su capacidad para producir sincicio posteriormente a la infección, en líneas celulares neoplásicas (fenotipo viral) [12, 13]. Los virus que inducen sincicio (SI) son frecuentemente hallados en estadios tardíos o progresivos de la enfermedad, mientras que aquellos virus que no inducen el sincicio (NSI) están presentes a todo lo largo de la enfermedad [12, 13]. El VIH-1 también puede ser clasificado por su capacidad para infectar primariamente macrófagos y líneas celulares T CD4⁺ (tropismo celular). Todos los aislados de VIH-1 se pueden replicar en células T primarias. Sin embargo, los aislados SI que han sido adaptados a líneas celulares T no pueden replicarse en los macrófagos, mientras



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Influencia de los Factores
Genéticos del Huésped
en la Infección por el
Virus de la
Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

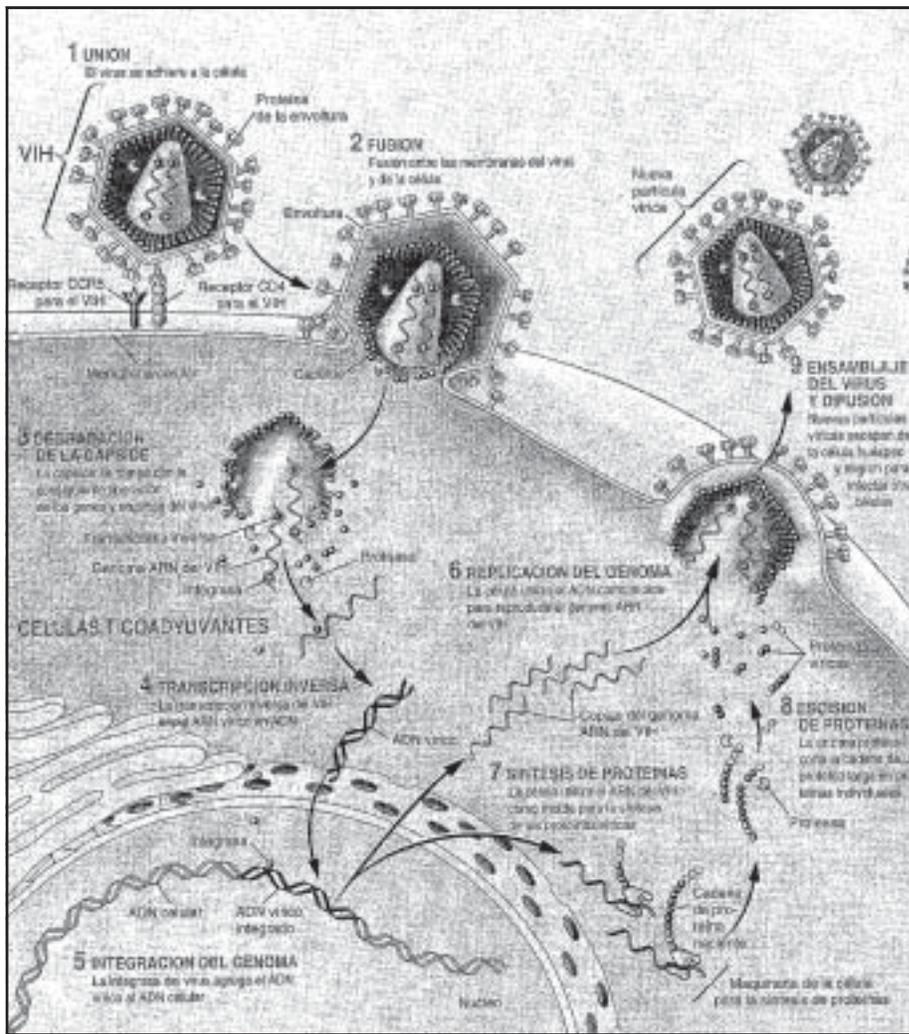


Figura 1. Ciclo de vida del virus de inmunodeficiencia humana, en el que se observan los principales pasos del mismo.

que algunos, pero no todos, aislados primarios NSI y SI pueden infectar macrófagos. Este simple paradigma se complica por la presencia de cepas de VIH-1 con tropismo dual que contienen tanto constituyentes NSI como SI capaces de infectar a líneas celulares T y macrófagos. Clones con tropismo dual molecular también han sido descritos [4].

QUEMOCINAS, CITOQUINAS Y OTROS FACTORES SOLUBLES

Con el descubrimiento de la familia de los receptores de las quemocinas como co-receptores de la entrada del VIH, las cepas de VIH-1 también pueden ser clasificadas por la utili-

zación del co-receptor. Estrictamente, los virus NSI utilizan primariamente a CCR5 como receptor y son llamados “R5 VIH-1”, mientras que los virus SI emplean el receptor de quemocinas CXCR4 y son llamados “X4 VIH-1” [14]. Sin embargo, muchos aislados primarios SI usan CXCR4 en conjunto con CCR5 (R5X4 VIH-1) [14-16]. No todos los aislados SI son capaces de infectar macrófagos [17] y no todos los aislados que usan CCR5 pueden infectar macrófagos [16, 18]. Algunos aislados pueden infectar macrófagos [17]. De manera que la intersección entre el fenotipo viral, el tropismo celular y la utilización del co-receptor es un tanto compleja y no puede ser vista como una simple generalización.

Las quemocinas

Un hecho importante en el entendimiento de la patogénesis del VIH, así como también de los factores del huésped que pueden afectar el la progresión de la enfermedad y la susceptibilidad a la infección, fue la identificación en 1996 de los receptores de las quemocinas como necesarios co-receptores para la entrada del VIH en las células CD4⁺ [7-11]. Las quemocinas son sustancias quemo-atrayentes secretadas en el sitio de la infección o en las heridas [19]. Se conoce desde mediados de 1980 que la presencia de CD4 sobre la superficie de la célula es necesaria pero no suficiente para la entrada del VIH dentro de la célula. Además, es conocido que las células CD8 secretan sustancias que interfieren con la capacidad del VIH para infectar las células. En el año de 1995, Cocchi y colegas [20] identificaron estas sustancias como RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted); proteína inflamatoria del macrófago-1a (MIP-1a); y MIP-1b. Se ha sugerido que estas sustancias se unen a un receptor que el virus requiere para la entrada a la célula.

En 1996, Feng y colegas [11] aislaron CXCR4 (originalmente referido como una "fusina"), un receptor de quemocinas localizado sobre células T, que las células T-trópicas del VIH usa como co-receptor junto con CD4. Sin embargo, se conoce que RANTES, MIP-1a, y MIP-1b suprimen a los macrófagos trópicos (M-trópicos) pero no a los virus T-trópicos. En este mismo año, varios grupos publicaron resultados mostrando que el receptor para RANTES, MIP-1a, y MIP-1b era un receptor de quemocina llamado CCR5 (originalmente llamado "CKR-5") que está presente en macrófagos, monocitos y en algunas células T [7, 9, 10]. El VIH usa estos receptores de quemocinas como co-receptores para la entrada. La interacción entre la proteína de la cubierta del virus gp120 y CD4 induce un cambio conformacional que permite la interacción entre el virus y el receptor de la quemocina y la fusión del virus en la membrana de la célula huésped [21-24].

De manera que el modelo actual es que las cepas M-trópicas de VIH infectan macrófagos, monocitos y células T, empleando la

expresión de CD4 y CCR5 del huésped como co-receptores. Las cepas T-trópicas infectan células T usando CD4 y CXCR4 como co-receptores [14] (figura 2). Sin embargo, el sistema de quemocinas es complejo y a menudo redundante, y este modelo no siempre se aplica. Por ejemplo, algunas cepas M-trópicas del VIH pueden usar otros co-receptores como CCR2 o CCR3, en lugar de CCR5 para entrar a los macrófagos. Además, han sido aisladas variantes que inducen sincicio con tropismo dual que pueden usar CCR5 o CXCR4 como co-receptores [4, 8, 25].

Los ligandos naturales del huésped para estos co-receptores son relevantes puesto ellos pueden interferir con la entrada del VIH dentro de las células blanco. CCR5 se une a RANTES, MIP-1a, y MIP-1b, que son miembros de la familia de las b-quemocinas y a menudo son llamadas como quemocinas que usan CCR5. CXCR4 se une a un miembro de la familia de las a-quemocinas, el factor 1 derivado de las células del estroma (SDF-1). CCR2 se une a la proteína quemoatáctica del monocito-1 (MCP-1) por medio de MCP-5. CCR3 se une a MCP-3 y MCP-4 y a las eotaxinas 1 y 2 [19].

Los ligandos para los receptores de las quemocinas pueden bloquear la entrada viral interfiriendo con la unión del virus al recep-

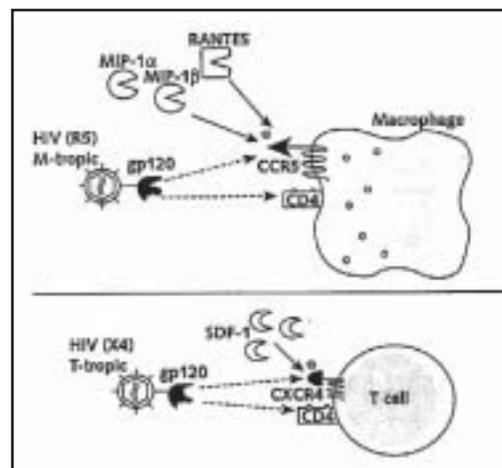


Figura 2. Interacción del VIH y sus co-receptores. La interacción de la proteína de la envoltura del virus, gp120, y CD4 induce un cambio conformacional que permite la interacción entre el virus y el receptor de quemocina, y la fusión del virus y la membrana de la célula huésped.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas
Influencia de los Factores
Genéticos del Huésped
en la Infección por el
Virus de la
Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

tor o por “down-regulation” del receptor [26]. Las quemocinas RANTES, MIP-1a y MIP-1b, pueden bloquear las cepas M-trópicas de VIH, mientras que el SDF-1 puede bloquear cepas T-trópicas. Las células T CD4 de personas expuestas y no infectadas producen niveles aumentados de RANTES, MIP-1a, y MIP-1b para suprimir la replicación de cepas M-trópicas del VIH-1 [27, 28]. Altos niveles de estas quemocinas han sido asociados con progresión baja de la enfermedad [29]. Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias cuantitativas en la producción de RANTES, MIP-1a o MIP-1b en células mononucleares de sangre periférica en parejas heterosexuales discordantes [30] o entre no-progresores a largo plazo y progresores [31].

Los hallazgos de que los receptores de quemocinas son usados por el VIH como co-receptores para la entrada a la célula, dieron como resultado el descubrimiento de factores genéticos del huésped que pueden afectar la susceptibilidad a la infección con VIH o la velocidad de progresión de la enfermedad, una vez que el individuo se infecta. El mejor caracterizado de estos rasgos genéticos es la mutación CCR5-D32, que fue identificada en 1996 [32-34]. La mutación es una delección de 32 pares de bases en el segmento del gen que codifica para la segunda asa (loop) extracelular de la proteína, que da como resultado una proteína acortada. El mecanismo de resistencia a la infección en individuos con exposición repetida fue dado por estos estudios, en los que individuos homocigotos para la mutación eran resistentes a la infección con VIH, no obstante estar infectados con cepas T-trópicas del virus. Dean y colegas [32] estudiaron una cohorte de personas con hemofilia, usuarios de drogas intravenosas, y hombres homosexuales. Diecisiete de 612 personas no infectadas (comparadas con 0 de 1343 personas infectadas) fueron homocigotos para la mutación CCR5-D32. Además, en el estudio multicéntrico del SIDA en Chicago [35] en la cohorte de hombres homosexuales, la homocigosis del alelo fue de 3.6% entre personas no infectadas comparada con 1.4% de prevalencia en muestras de sangre de hombres caucásicos y 0% de prevalencia entre personas infectadas con VIH. Existen algunos reportes de personas infectadas con VIH y que son homocigotos

para la mutación CCR5-D32 [36-39]. Un estudio de una persona demostró que el virus aislado era homogéneo, T-trópico, inductor de sincicio y usaba exclusivamente CXCR4 para la entrada [40].

Con pocas excepciones [34, 41], muchos estudios han encontrado que las personas heterocigotas para la mutación CCR5-D32 no son menos susceptibles a la infección [32, 34, 40]. Algunos datos sugieren, sin embargo, que los heterocigotos para la mutación CCR5-D32 tienen progresión retardada para el SIDA o la muerte [34, 42-46]. En el estudio de Dean y colegas [32], la frecuencia de heterocigotos fue significativamente mayor en no-progresores a largo plazo que en progresores y progresores rápidos. Liu y colegas [33] encontraron que en células mononucleares de sangre periférica de padres de personas homocigotos no-infectadas, el virus se replicaba menos eficientemente. Presumiblemente, la heterocigosis limita el número de co-receptores disponibles para la unión del VIH. De hecho, la densidad de CCR5 sobre la superficie de células T CD4⁺ ha sido correlacionada con carga viral, en personas con infección por VIH y no tratadas [47].

Otras Mutaciones en la región codificadora del gen CCR5 han sido identificadas [48]. Una mutación puntual en CCR5, una sustitución TA en la posición 303, codifica para una proteína truncada, que cuando se encuentra en heterocigotos compuestos con D 32, produce un fenotipo de resistencia a aislados primarios de VIH-1 *in vitro* [49, 50].

Otra mutación que afecta la progresión de la enfermedad es CCR2-V64I, la cual da lugar a niveles normales de expresión del receptor CCR2. Esta mutación no ha sido reportada como afectadora de la susceptibilidad a la infección, pero en individuos infectados con VIH homocigotos o heterocigotos para esta mutación, la progresión del SIDA o la muerte es más lenta [42, 43, 45, 51]; algunos estudios; sin embargo, no han confirmado este efecto sobre la progresión de la enfermedad [46, 52]. A diferencia de la mutación CCR5, que se encuentra primariamente en personas de origen caucásico, la frecuencia del alelo CCR2-V64I es de 10% a 25%, en negroideos y caucásicos, respectivamente, y en todos los

grupos étnicos estudiados. Los estudios con trabajadores sexuales infectados en Nairobi, sugieren que la presencia de la mutación ayuda a explicar la baja progresión en 21% a 46% de los progresores lentos [53].

El factor derivado de las células del estroma 1, SDF-1, es una tercera clase de factor genético que puede afectar la progresión del SIDA. Ha sido demostrado que el SDF-1 bloquea la infección con la variante X4 del VIH-1 [5]. El gen mutado, SDF-1 3'a, involucra una mutación en una región no transcrita del gen y puede regular positivamente la síntesis de SDF-1, inhibiendo competitivamente las cepas T-tropicas del VIH. Las personas con infección por VIH que tienen esta mutación en forma homocigoto, tienen una progresión retardada al SIDA, pero no presentan susceptibilidad disminuida a la infección con VIH [43, 51]. Por el contrario, otros estudios han mostrado que la homocigosis de SDF-1 3'a está asociada con progresión acelerada de la enfermedad [54, 55], replicación viral incrementada [36], o no efecto sobre la progresión de la enfermedad [45]. Sin embargo, uno de estos estudios [55] demostró una supervivencia prolongada después del diagnóstico del SIDA, lo cual sugiere un efecto protector a largo plazo del estado homocigoto.

Otros polimorfismos genéticos han sido identificados dentro de la región promotora o reguladora de CCR5, los cuales pueden afectar la transmisión del VIH o la progresión de la enfermedad, posiblemente a través de efectos sobre los niveles de expresión de CCR5 [56]. Las personas infectadas con VIH que son homocigotas para el alelo 59029-G dentro de la región promotora reguladora pueden progresar al SIDA más lentamente que aquellas que son homocigotas para el alelo 59029-A [57]. Otros haplotipos del promotor dan lugar a una progresión más rápida de la enfermedad [43]. La homocigosis para el alelo CCR5-59356-T, un polimorfismo que ocurre más frecuentemente en personas de origen africano que en Caucásicos o Hispánicos, ha sido asociado con una tasa ancestral de transmisión perinatal del VIH-1 [58].

El CX3CR1 ha sido descrito como un co-receptor del VIH, que se expresa principalmente en cerebro, cuyo ligando es la fractalquina. La homocigosis para el alelo CX3CR1-I249

M280, ha sido asociada con progresión acelerada de la enfermedad [59]. Trabajos recientes han sugerido además, que los polimorfismos en el promotor de RANTES pueden influenciar los riesgos para la infección por VIH y la progresión de la enfermedad [60]. Estos hallazgos pueden explicar los resultados previos sobre el papel putativo protector de RANTES.

Las citoquinas

Las quemocinas son un sub-grupo de la red compleja de las citoquinas. Estas son secretadas por las células del sistema inmune y otros tipos de células, como los fibroblastos, y están involucradas en la inmuno-regulación. El continuo balance de la replicación del VIH en el huésped está determinado por la red de citoquinas, las cuales pueden ser tanto inhibitorias como estimulantes e incluso exhibir simultáneamente ambas propiedades. Los estudios *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica y de nódulos linfáticos de personas infectadas por VIH, indican que estas citoquinas controlan la replicación del VIH. Algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral-a (TNF-a), el factor de necrosis tumoral-b (TNF-b), interleucina-1 (IL1), y la interleucina-6 (IL-6) son citoquinas pro-inflamatorias cuyos niveles están elevados en personas infectadas con VIH y que aumentan la replicación del VIH [61, 62]. El TNF-a es quizás el más importante y potente de las citoquinas que induce el VIH, activa a NK-kB, un factor de Transcripción celular que induce la expresión de VIH [63, 64]. Por contraste, el interferón-a, el interferón-b, y la interleucina-16 suprimen la replicación del VIH [65]. Otras citoquinas, tales como la interleucina-2, la interleucina-4, la interleucina-10, el TGF-b y el interferón-g, inducen o suprimen la expresión del VIH, dependiendo de las condiciones experimentales [66-69], aun cuando su papel *in vivo* no está claro. Importantes interacciones ocurren entre estas citoquinas. La interleucina-10 inhibe la replicación del VIH bloqueando la secreción del TNF-a y la interleucina-6 [70]. Además, las redes de quemocinas e interleucinas pueden interactuar. Por ejemplo, la interleucina-2 regula negativamente la expresión de CCR1, CCR2 y CCR3, mientras que otras citoquinas pueden afectar la



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Influencia de los Factores
Genéticos del Huésped
en la Infección por el
Virus de la
Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

expresión de CCR5 y CXCR4. Se ha observado también que existe una variabilidad individual en el balance de estas citoquinas y que la misma puede afectar la progresión de la enfermedad [71].

Otros factores solubles

En 1996, Walter y colegas [72] demostraron que la eliminación de las células CD8 de células mononucleares de sangre periférica de pacientes infectados con VIH, daba lugar a un incremento importante de la replicación viral en las células CD4 restantes. Esta supresión del VIH por parte de las células CD8 se pensaba estaba mediada, al menos parcialmente, por factores solubles, ya que la supresión ocurre sin que medie el contacto célula-célula entre las células efectoras CD8 y las células CD4, lo cual implica la existencia de una membrana semipermeable. Una conclusión lógica podría ser que las quemocinas, las cuales son los ligandos naturales para los co-receptores del VIH y que suprimen la infección del VIH *in vitro*, son en realidad estos factores. Sin embargo, otros estudios de la actividad supresora de las células CD8 sugieren que no son RANTES, MIP-1a o MIP-1b, los responsables de la actividad supresora mediada por estos factores solubles. La identificación de tales factores ha resultado elusiva [62, 71, 73]. Aun hoy existe la controversia sobre la identificación y el papel de factores solubles no-citolíticos, no restringidos por HLA en células CD8, en la prevención de la adquisición de la infección por VIH y en el control de la progresión de la enfermedad [73, 74, 75].

La lectina que une manosa (MBL, Mannose-binding lectin), es una lectina calcio-dependiente que juega un papel muy importante en la inmunidad innata a las infecciones, y que actúa por activación de la vía clásica del complemento y la fagocitosis. Esta lectina actúa como un factor opsónico que se puede unir a diferentes patógenos, incluyendo al VIH [76]. Bajas concentraciones séricas de MBP pueden tender a un defecto opsónico [77, 78], y son el resultado de tres sustituciones nucleotídicas independientes en el exón 1 [79, 80] y de polimorfismos de la región promotora del gen MBP [81]. Diversos estudios *in vitro* han mostrado que MBL es capaz de

unirse al antígeno de superficie gp120 del VIH, y diversas variantes de este gen están asociadas con un incremento del riesgo de la infección por VIH en Escandinavos [82]. Estas variantes alélicas están relacionadas con una supervivencia corta después del diagnóstico del SIDA. La tasa de progresión de la enfermedad no pudo ser evaluada, ya que se desconocía la fecha de seroconversión de los pacientes infectados. No obstante que la concentración de lectina en suero se correlaciona con los genotipos de la MBP, la misma no difiere significativamente entre los pacientes en las diferentes etapas de la enfermedad. Puesto que las serina-proteasas asociadas con MBP usan a C4 para activar el complemento [83], diversos autores proponen que la variante con alelos nulos de C4 asociada con progresión rápida al SIDA, en conjunto con las variantes del gen MBP, son cofactores en la progresión de la enfermedad [84, 85].

EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El complejo de genes de histocompatibilidad, localizado en el cromosoma 6 humano, contiene muchos genes individuales que regulan la función o respuesta inmune. Este complejo está compuesto de moléculas de clase I (A, B, C, D, E, F, G), clase II (DM, DP, DQ, DR), genes que codifican para TAP (Transporter for Antigen Processing), polipéptidos de bajo peso molecular del proteasoma, factores del complemento (Bf, C2, C4), y el factor de necrosis tumoral, entre otros muchos genes [86]. El papel de los genes HLA del huésped en la progresión del SIDA, han sido estudiados en diferentes poblaciones y entre diversos grupos de riesgo. Dos haplotipos extendidos, HLA A1-Cw7-B8-DR3-DQ2 [87-89] y HLA A11-Cw4-B35-DR1-DQ1 [88, 89, 90, 91], han sido asociados con una progresión más rápida del SIDA, medida por medio de disminución o declive de las células T CD4⁺, SIDA vs. VIH-1 + SIDA-libre, y tiempo para el SIDA. Sin embargo, el estudio de Kaplan y colegas [89], reportaron una asociación entre DR1 y un declive menor de las células T CD4⁺. Sin embargo, han sido reportados diversas asociaciones entre otros alelos del HLA y la progresión rápida del SIDA: A23 [91,92], A24 [94], A26 [91, 92],

B21 [89], B38 [92]. En otros estudios se ha reportado asociación con la progresión retardada del SIDA y DR4 [89, 93], DR7 [90-92], B17 [94], B27 [91, 92], B51 [91], y B57 [91, 92]. Algunos alelos clase II DR5 y DR6 están asociados en algunos estudios con progresión rápida de la enfermedad [91-93], pero se correlacionan con progresión baja de la enfermedad en otro estudio [95]. En un estudio reciente, Migueles y colegas [96] con una cohorte más estrictamente definida de potenciales progresores a largo plazo (personas con conteo estable de células CD4 y niveles de ARN vírico < 50 copias/mL después de al menos de dos años de infección por VIH no tratada, muchos de los cuales permanecieron infectados por más de 13 años) demostraron una asociación dramática entre el alelo de clase I B*5701 y la infección no progresiva. En 85% de estos no-progresores (11 de 13), y sólo el 9.5% de los progresores (19 de 200) tenían este alelo.

El papel exacto de los haplotipos HLA en la progresión del SIDA es aún controversial. Varias teorías han sido propuestas para explicar la asociación entre los haplotipos HLA y la progresión de la enfermedad [97, 98]. Un posible mecanismo es la capacidad variable de diferentes moléculas HLA en la presentación de antígenos HIV-1 e inducir una fuerte respuesta inmune. Se puede especular que algunas moléculas HLA, tales como B35, asociadas con la progresión acelerada del SIDA, fallan en la presentación de epitopos a los linfocitos T citotóxicos (CTL). Tomiyama y colegas [99] demostraron que, no obstante las moléculas HLA B35 son capaces de presentar muchos epitopos VIH-CTL, las mutaciones naturales de los epitopos HLA B35 restringidos VIH-CTL afectan el reconocimiento de los CTL por medio de mecanismos que reducen la unión del péptido y el reconocimiento del receptor de las células T (TCR). Otro mecanismo propuesto está basado en el mimetismo de la región gp120 del VIH. Un reciente estudio demostró una considerable homología entre los productos de DR5 y DR6, y la región carboxilo-terminal del asa V3 de la envoltura del VIH-1 [95]. En este estudio, los alelos DR fueron asociados con la progresión retardada del SIDA, y los autores propusieron que estos alelos pueden sesgar el repertorio de TCR anti-VIH por

medio de un mecanismo de mimetismo. Esto sugiere que el mimetismo del HLA puede influenciar el resultado por pérdida de las células T CD8 auto-reactivas, que podrían de otra manera ser dañinas para el huésped por destrucción de las células T CD4 infectadas con VIH.

EL GEN CEM15/APOBEC3G

Los virus han desarrollado diversas estrategias no-inmunes para contrarrestar los mecanismos de los huéspedes que le confieren resistencia a las infecciones. Las proteínas Vif (Virion infectivity factor) son codificadas por los virus de inmunodeficiencia de los primates, y más notablemente por el VIH-1 humano. Estas proteínas son potentes reguladores de la infección y la replicación, y son por consiguiente, esenciales para las infecciones patogénicas *in vivo*. La proteína Vif del VIH-1, parece requerirse durante las etapas tardías de la producción del virus, para la supresión de un fenotipo antiviral innato que reside en los linfocitos T humanos. De manera que, en ausencia de Vif, la expresión de este fenotipo da lugar a progenies de viriones no infecciosos [100, 101, 102]. En el año 2002, Sheehy y colegas [103] aislaron un gen humano (CEM15/APOBEC3G; apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) que inhibe la infección por VIH y que es suprimido por la proteína Vif. Esta proteína facilita la infectividad de la partícula bloqueando la actividad inhibitoria de CEM15, la proteína celular encapsulada del virión que es capaz de inducir hipermutación GA en el ADN viral recién sintetizado [104, 105]. Muy recientemente, Mariani y colegas [106] reportan la formación de un complejo de Vif con la APOBEC3G humana, el cual previene su encapsulación en el virión. Pero en el caso del ratón, no se puede formar un complejo estable. La proteína Vif reduce dramáticamente la cantidad de APOBEC3G humana encapsulada en los viriones VIH, pero no previene la encapsulación de la APOBEC3G del ratón. Por lo tanto, estas enzimas son potentes inhibidores de la replicación del VIH-1 en estado nativo. Esta interacción especie-específica puede jugar un papel en la restricción VIH-1 en los humanos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que existe la posibilidad de intervención terapéu-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Influencia de los Factores
Genéticos del Huésped
en la Infección por el
Virus de la
Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

tica, ya sea induciendo APOBEC3G o bloqueando su interacción con Vif, lo cual puede ser beneficioso clínicamente.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La asociación del VIH con ciertos haplotipos HLA y mutaciones en los genes de los receptores de las quemocinas, apoyan un componente genético en la patogénesis del SIDA. Las discrepancias en los resultados (frecuencias y polimorfismos), así como también la presencia de diversos genes ponen de manifiesto la heterogeneidad del SIDA y de su componente inmune. Los resultados experimentales apoyan la presencia de genes trabajando independientemente (heterogeneidad) o en interacción (epistasia), así como también su interacción con el ambiente. Los nuevos genes hallados, de inmunidad natural a la infección, abren una nueva perspectiva en cuanto a las posibilidades terapéuticas, que incluyen el tratamiento en etapas tempranas, modulación inmune, vacunación terapéutica y el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos y de terapia génica.

REFERENCIAS

- Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA: The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retroviruses. *Nature* 1984, 312:763-767.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Herculant T, Gluckman JC, Montagnier L: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984, 312:767-768.
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R: The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986, 47:333-348.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW: A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996, 85:1149-1158.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTER/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996, 382:829-832.
- Berson JF, Long D, Doranz GJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW: A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 1996, 70:6288-6295.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA: CC CKR5: a RANTES, MIP-1a, MIP-1b receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996, 272:1955-1958.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath, PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W et al.: The b-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996, 85:1135-1148.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM et al.: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381:661-666.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokines receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996, 381:667-673.
- Feng Y, Broder C, Kennedy PE, Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* 1996, 272:872-877.
- Fenyo EM, Morfeldt ML, Chiodi F, Lind B, von Geigerfelt A, Albert J, Olausson E, Asjo B: Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolation. *J Virol* 1988, 62:4414-4419.
- Tersmette M, Lang JMA, de Goede REY, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J, Miedema F: Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989, 8645:983-985.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo E-M, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, Sattentau OJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA : A new classification for HIV-1. *Nature* 1998, 391:240.
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. *J Exp Med* 1997, 185:621-628.
- Dittmar MT, McKnight A, Simmons G, Clapham PR, Weiss RA, Simmonds P: HIV-1 tropism and coreceptor use. *Nature* 1997, 385:495-496.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S: Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* 1996, 70:9055-9059.
- Cheng-Mayer C, Liu R, Landau NR, Stamatatos L: Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 and utilization of the CC-CKR5 coreceptor. *J Virol* 1997, 71:1657-1661.
- Luster AD: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998, 338:436-445.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P: Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995, 270:1811-1815.
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernández-Ramos N, Sung Y, Kwong PD, Hendrickson WA, et al.: A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 1998, 280:1949-1953.
- Wyatt R, Sodroski J: The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998, 280:1884-1888.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA: Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and neutralizing human antibody. *Nature* 1998, 393:648-659.
- Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, et al.: CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996, 384:179-183.



25. Simmons G, Wilkinson D, Reeves JD, Dittmar MT, Beddows S, Weber J, et al.: Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol* 1996, 70:8355-8360.
26. Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, et al.: HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997, 186:139-146.
27. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter N, et al.: Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures. *Nat Med* 1996, 2:412-417.
28. Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillet C, et al.: Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4⁽⁺⁾ T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* 1997, 186:455-460.
29. Ullum H, Cozzi Lepri A, Victor J, Aladdin H, Phillips AN, Gerstoft J, et al.: Production of beta-chemokines in human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence that high levels of macrophage inflammatory protein-1beta are associated with decreased risk of HIV disease progression. *J Infect Dis* 1998, 177:331-336.
30. Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Blé C, Meacci F, et al.: HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med* 1997, 3:1250-1257.
31. McKenzie SW, Dallalio G, North M, Frame P, and Means RT Jr: Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection. *AIDS* 1996, 10:F29-F33.
32. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, et al.: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996, 273:1856-1862.
33. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al.: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996, 86:367-377.
34. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, farber CM, et al.: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996, 382:722-725.
35. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, et al.: The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996, 2:1240-1243.
36. Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, Ridolfo AL, Zhou D, Berlusconi A, et al.: Homozygous D32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1 infected patient. *AIDS* 1997, 11:F67-F71.
37. Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T: HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele [Letter]. *Nat Med* 1997, 3:252-253.
38. O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael N, et al.: HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32 [Letter]. *Lancet* 1997, 349:1219.
39. Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C: HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR delta 32. Seroco Study Group [Letter]. *Lancet* 1997, 349:1219-1220.
40. Michael NL, Nelson JA, KewallRamani VN, Chang G, O'Brien SJ, Mascola JR, et al.: Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta 32. *J Virol* 1998, 72:6040-6047.
41. Hoffman TL, MacGregor RR, Burger H, Mick R, Doms RW, Collman RG. CCR5 genotypes in sexually active couples discordant for human immunodeficiency virus type 1 infection status. *J Infect Dis* 1997, 176:1093-1096.
42. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, et al.: Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1996, 277:959-965.
43. Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, et al.: Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 1998, 282:1907-1911.
44. de Roda Husman AM, Koot M, Cornelissen M, Keet IP, Brouwer M, Broersen SM, et al.: Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997, 127:882-890.
45. Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Theodorou I, van Rij R, Prins M, et al.: C-C chemokine receptor variants, SDF-1 polymorphism, and disease progression in 720 HIV-infected patients. SEROCO Cohort. Amsterdam Cohort Studies on AIDS [Letter]. *AIDS* 1999, 13:624-626.
46. Ioannidis JP, O'Brien TR, Rosenberg PS, Contopoulos-Ioannidis DG, Goedert JJ: Genetic effects on HIV disease progression [Letter]. *Nat Med* 1998, 4:536.
47. Reynes J, Portales P, Segondy M, Baillat V, André P, Réant B, et al.: CD4⁺ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2000, 181:927-932.
48. Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien SJ, Dean M: Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am J Hum Genet* 1997, 61:1261-1267.
49. Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, González-Canali G, Métais P, et al.: HIV-1 resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998, 351:14-18.
50. Garred P: Chemokine-receptor polymorphisms: clarity or confusion for HIV-1 prognosis? *Lancet* 1998, 351:2-3.
51. Hendel H, Hénon N, Lebuane H, Lachgar A, Poncelet H, Caillat-Zucman S, et al.: Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998, 19:381-386.
52. Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, Krol A, Brouwer M, Schuitemaker H: No evidence for an effect of the CCR5D32/* and CCR2b 64I/* mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1 infected injecting drug users. *J Infect Dis* 1999, 179:825-831.
53. Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL: CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in

- African women. University of Nairobi Collaboration for HIV research [Letter]. *Lancet* 1998, 351:1632-1633.
54. Brambilla A, Villa C, Rizzardi G, Veglia F, Ghezzi S, Lazzarin A, et al.: Shorter survival of SDF-1-3'A/3'A homozygotes linked to CD4⁺ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000, 182:311-315.
 55. van Rij R, Broersen S, Gousmit J, Coutinho R, Schuitmaker H: The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 1998, 12:F85-F90.
 56. Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK: The human CC chemokine receptor % (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem* 1997, 272:30662-30671.
 57. McDermontt DH, Zimmermann PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM: CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 1998, 352:866-870.
 58. Kostrikis L, Neumann A, Thomson B, Korber BT, McHardy P, Karanikolas R, et al.: A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants. *J Virol* 1999, 73:10264-10271.
 59. faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneesberghe C, Genin E, Autran B, et al.: Rapid progression to AIDS in HIV⁺ individuals with a structural variant of the chemokine receptor Cx3CR1. *Science* 2000, 287:2274-2277.
 60. McDermott D, Beecroft MJ, Kleeberger C, Al-Sharif F, Ollier W, Zimmerman P, et al.: Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 2000, 14:2671-2678.
 61. Folks TM, Justement J, Kinter A, Dinarello CA, Fauci AS: Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* 1987, 238:800-802.
 62. Moriuchi H, Moriuchi M, Combadiere C, Murphy PM, Fauci AS: CD8⁺ T-cell derived soluble factor(s), but not b-chemokines RANTES, MIP-1a, and MIP-1b, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:1030-1035.
 63. Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB: Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:5974-5978.
 64. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2336-2340.
 65. Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R: HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995, 154:2448-2459.
 66. Kinter AL, Poli G, Fox L, Hardy E, Fauci A: HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J Immunol* 1995, 154:1448-2459.
 67. Valentine A, Lu W, Rosatti M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, et al.: Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:8886-8891.
 68. Weissman D, Poli G, Fauci AS: IL-10 synergizes with multiple cytokines in enhancing HIV production in cells of monocytic lineage. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999, 9:442-449.
 69. Poli G, Kinter AL, Justement JS, Bressler P, Kehrl JH, Fauci AS: Transforming growth factor beta suppresses human immunodeficiency virus expression and replication in infected cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Exp Med* 1991, 173:589-597.
 70. Weissman D, Poli G, Fauci AS: Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of the tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994, 10:1199-1206.
 71. Kinter AL, Ostrowski M, Goletti D, Oliva A, Weissman D, Gantt K, et al.: HIV replication in CD4⁺ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of the other endogenous cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14076-14081.
 72. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986, 234:1563-1566.
 73. Stranford S, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Snisky J, et al.: Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8⁽⁺⁾ cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:1030-1035.
 74. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E: Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8⁺ T cells. *Immunol Today* 1996, 17:217-224.
 75. Furci L, Loverro P, Lopalco L, Sinnone M, Lazzarin A, Lusso P: Nonlytic suppressive activity against different biological variants of HIV-1 by CD8⁺ T lymphocytes from exposed uninfected individuals [Abstract]. In: 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, California, 30 January-2 February 2000. Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health; 2000. Abstract no. 159.
 76. Turner MW: Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996, 17:532-540.
 77. Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A: Increased frequency of homozygosity of abnormal mannose-binding protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 1995, 346:941-943.
 78. Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thurz M, Gorchein A, Monteil MA, Turner MW: Mannose-binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995, 345:886-889.
 79. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AVS, Laud YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW: High frequency in African and non-African populations of independent mutations in the mannose-binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992, 1:709-715.
 80. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A: A new frequent allele in the missing link in the structural polymorphism of the human mannose-binding protein. *Immunogenetics* 1994, 40:37-44.
 81. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A: Interplay between promoter and structural gene variants control basal se-

- rum levels of mannose-binding protein. *J Immunol* 1995, 155:3013-3020.
82. Garred P, Madsen HO, Baslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A: Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997, 349:236-240.
 83. Matsushita M, Fujita T: Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992, 176:1497-1502.
 84. Cameron PU, Mallal SA, French MAH, Dawkins RL: Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection: ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. *Hum Immunol* 1990, 29:282-295.
 85. Hentges F, Hoffman A, Oliveira de Araujo F, Hemmer R: Prolonged clinically asymptomatic evolution after HIV-1 infection is marked by the absence of complement C4 null alleles at the MHC. *Clin Exp Immunol* 1992, 88:237-242.
 86. Parham P, Ohta T: Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 1996, 272:67-73.
 87. Steel CM, Beatson D, Cuthbert RJG, Morrison H, Ludlam CA, Peutherer JF, Simmonds P, Jones M: HLA haplotype A1 B8 DR3 as risk factor for HIV-related disease. *Lancet* 1988, 1:1185-1188.
 88. Cameron PU, Mallal SA, French MAH, Dawkins RA: Major histocompatibility complex genes influence outcome of HIV infection: ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. *Hum Immunol* 1990, 29:282-295.
 89. Kaplan C, Muller JY, Doinel C, Lefrere JJ, Paquez F, Rouger P, Salmon D, Salmon C: Susceptibility to acquired immune deficiency syndrome in HIV-1-seropositive subjects. *Hum Hered* 1990, 40:290-298.
 90. Louie LG, Newman B, King MC: Influence of host genotype on progression to AIDS among HIV-infected men. *J Acquired Immune Def Syndr* 1991, 4:814-818.
 91. Kaslow RA, Carrington MN, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner WA, Phair J, Erlich H, Mann DL: Influence of combination of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996, 2:405-410.
 92. Keet IPM, Tang J, Klein M, Le Blanc S, Goedert J, Mann D, Miedema F, Goudsmit J, Carrington M, Coutinho RA, Kaslow RA: Persistent association between HLA and AIDS in three prospective seroconverters cohorts. *The 4th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections 1997*, 208.
 93. Donald JA, Rudman K, Cooper DW, Baumgart KW, Garsia RJ, Gatenby PA, Rickard KA: Progression of HIV-related disease is associated with HLA DQ and DR alleles defined by restriction fragment length polymorphisms. *Tissue Antigens* 1992, 39:241-248.
 94. Santagostino E, Fabio G, Gringeri A, Zarantonello M, Scorza Smeraldi R, Mannucci PM: HLA antigens in haemophiliacs with long term non progressive HIV infection. In *XIth International Conference on AIDS 1996*, Vancouver, Canada.
 95. Itescu S, Rose S, Dwyer E, Winchester R: Certain HLA-DR5 and -DR6 major histocompatibility complex class II alleles are associated with CD8 lymphocytic host response to human immunodeficiency virus type 1 characterized by low lymphocyte viral strain heterogeneity and slow disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:11472-11476.
 96. Migueles SA, Sabbagian MS, Shupert W, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al.: HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:2709-2714.
 97. Westby M, Manca F, Dalgleish AG: The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996, 17:120-126.
 98. Just JJ: Genetic predisposition to HIV-1 infection and acquired immune deficiency virus syndrome. *Hum Immunol* 1995, 44:156-169.
 99. Tomiyama H, Miwa K, Shiga H, Moore YI, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M: Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol* 1997, 158:5026-5034.
 100. Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, Sodroski J: Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 1992, 66:6489-95.
 101. Simon JH, Gaddis NC, Fouchier RA, Malin MH: Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 1998, 12:1368-1369.
 102. Inubushi R, Adachi A: Cell-dependent function of HIV-1 Vif for virus replication (Review). *Int J Mol Med* 1999, 3:473-6.
 103. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH: Isolation of a human gene that inhibits HIV-infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002, 418:646-50.
 104. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L: The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized DNA. *Nature* 2003, 424:94-8.
 105. Harris RS, Neuberger MS, Malim MH, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger S, Malim MH: DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 2003, 113:803-809.
 106. Mariani R, Chen D, Schrofelbauer B, Navarro F, König R, Bollman B, Munk C, Nyman-McMahon H, Landau NR: Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 2003, 114:21-31.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Influencia de los Factores
Genéticos del Huésped
en la Infección por el
Virus de la
Inmunodeficiencia
Humana (VIH)

UNA REFLEXIÓN... LO BIOLÓGICO Y LO ÉTICO

Dr. Carlos Aponte*

Gerencia de Docencia e Investigación. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".
Apdo. 1040. Caracas, Venezuela

INTRODUCCIÓN

Aquello que es referencial a lo biológico es lo que denominamos *vida* o lo asociado a ella. Cuando hablamos de lo vivo solemos referirnos a lo que caracteriza ese estado tan particular de la materia: Así, toda entidad que demuestra poseer capacidad metabólica, reproductiva y evolutiva es una unidad viviente. Eso que llamamos vida se monta sobre el único ejemplo que conocemos de la misma: la que se encuentra en el planeta Tierra...Nuestro único referencial son esas diversas unidades carbonadas (todas estas estructuras incluyendo su propio cuerpo amigo lector se construye a base de átomos de carbono) que observamos alrededor nuestro (perros, gatos, insectos, hermosas mujeres, entre otros). La aparición del hombre sobre el planeta hace unos 100 000 años por un extenso proceso evolutivo, lleno de dificultades, se traducirá en la llegada del simbolismo y la valorización trascendente de la vida a través de espíritu y razón. La encefalización creciente de nuestro cerebro aumentó las potencialidades de las habilidades humanas y sin duda incrementó sus niveles de socialización. Estas unidades vivientes insólitas comenzaron a preguntarse sobre la existencia de sí mismo y de la otredad. Otredad no sólo referida al equivalente humano que nos encara sino a las otras especies microscópicas y macroscópicas que comparten el planeta con nosotros. La Hélade, esas pequeñas comunidades separadas, independientes, pero con una lengua y política comunes que constituyeron la Grecia Antigua será el escenario donde se montará la mayor de las epopeyas humanas. Fue en Jonia s. - VIII, costa de la llamada Asia Menor (hoy, Turquía) donde se gesta tal epopeya, la mayor de las proposiciones humanas: *La proposición filosófica*. Definida por Sócrates como el amor a la sabiduría, fue "*el asombrarse ante lo real delante de mi*" lo que constituyó el piso sólido sobre lo cual se estructurará lo trascendente humano.

"*Ethos*" proviene precisamente de la voz griega que significa costumbre y de la misma deriva la palabra "*Etica*". Pero este término "*ethos*" para algunos se encuentra asociado a la personalidad moral. Así, se comienza a dilucidar el "*ethos*" en función de una orientación adquirida o asumida por el hombre frente a una realidad dada. Para la ética la realidad se golpea desde las preguntas de ¿Qué es el **bien**? ¿Qué es el **mal**? ¿Qué es **virtud**? ¿Qué es **felicidad**? ¿Qué es **la verdad**? ¿Qué es **lo justo**? Cuando la realidad que nos impele a decidir sobre ella es de carácter biológico entonces toda la historia de simbolismo y trascen-

* Autor al que debe dirigirse la correspondencia. Dirección de correo: Gerencia de Docencia e Investigación. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Apdo 1040, Caracas-Venezuela, Teléfax: (02) 693 45 51. Correo electrónico: capontet@hotmail.com
Artículo aparecido en: *A Ciencia Cierta Rangeliano*

dencia de lo vivo nos arremete y nos cuestiona. Así, por ejemplo, ¿Qué derechos podríamos esgrimir cuando un padre decide hacer una replica (clon) de su hijo muerto? ¿Qué pensar sobre un investigador que utiliza tejidos de fetos abortados para remediarle un parkinson a un hombre adulto? ¿Qué decidir frente a unos ecologistas que arremeten contra un centro de investigación animal por aquello de que los animales también tienen derechos ineludibles? ¿Qué opinar sobre un cazador que mata varios gorilas (especie en vías de extinción) para venderlos y así darle de comer a su familia? ¿Qué decir de un médico que utiliza una nueva droga en pacientes sin haber sido esta droga ensayada aun en animales? ¿Qué proponer a las compañías farmacéuticas respecto a una pandemia que mata alrededor de 48 millones de personas y los precios exorbitantes de las medicinas que ellos producen para paliar estos efectos? ¿Puede moralmente un médico decidir sobre la vida de un ser que ha de nacer malformado? Así, muchas otras e inmensas preguntas. El hombre ha intentado a lo largo de su atropellada carrera evolutiva de encarar los problemas de lo biológico de una muy diversa manera. Aquí vamos a resumir en tres grandes ideas filosóficas la historia de la ética: (1) La ética aristocrática, (2) La ética meritocrática y (3) la ética utilitarista.

LO BIOLÓGICO Y LO ÉTICO

En los últimos años y con el advenimiento reciente de la secuenciación del genoma humano, un sinnúmero de genes han sido propuestos como codificadores de caracteres fenotípicos bien particulares a pesar de sus características esencialmente compleja: el gen de la homosexualidad, el gen de la violencia, el gen de la psicosis maniaco-depresiva, el gen de la búsqueda de novedad, el gen de la utilización de reglas gramaticales, entre muchos otros. Sin embargo, aquí es esencial diferenciar entre enfermedades monogénicas (debido a mutación en un único gen) y enfermedades complejas (multifactoriales). Para la fenilcetonuria, la mucoviscidosis, ciertas miopatías, la enfermedad de Tay-Sachs o la anemia falciforme, la asociación con marcadores genéticos bien definidos está establecida; no así para enfermedades cuya asociación se establece en tér-

minos de complejidad: las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades psiquiátricas, diabetes mellitus tipo I, asma, entre otras. Esta distinción no siempre es clara, ya que ningún gen en particular “actúa en el vacío, en la ausencia total de otros factores genéticos y en un conjunto de interacciones múltiples. Por lo tanto, la probabilidad que se manifieste una enfermedad genética varía según las circunstancias. Según los geneticistas cuantitativos, la parte perteneciente a los genes y aquella al ambiente definen una ecuación: $V_P = V_G + V_E$, siendo V_P , la variancia observada en el “trait” estudiado, V_G , aquella relativa a los genes y V_E , la relativa al ambiente. Todas estas variables pueden ser descompuestas, siendo V_G : genes ejerciendo un efecto dominante y genes ejerciendo efectos aditivos. V_I , genes en interacción con ellos o con otros genes. Además, los cuantitativistas asumen que V_E debe ponderarse en función de cada factor ambiental potencialmente involucrado en la enfermedad dada; tabaco (V_I), alimentación (V_a), obesidad (V_o), la actividad física (V_{ap}), stress (V_s), etc., solamente si consideramos como ejemplo las enfermedades cardiovasculares. La dirección OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) ha publicado, al momento, más de 1000 genes en los cuales al menos una mutación relacionada con enfermedad ha sido identificada.

Existen varias técnicas de biología molecular que permiten sondear genes o regiones codificadoras en el ADN que pueden ser a su vez factores de riesgo para la enfermedad considerada. Desde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pasando por las técnicas análisis de fragmentos de restricción, SSCP (single-strand conformation polymorphism), análisis de heteroduplexes y las metodologías de secuenciación, base por base, del gen en cuestión, hoy por hoy tenemos la posibilidad de tamizar la población respecto a varios genes de importancia patológica. Así, dos de los primeros grandes éxitos del “carrier screening program” fue, sin dudas, la fenilcetonuria y la anemia falciforme. Hoy, más de 1.4 millones de personas han sido tamizados para la enfermedad de Tay-Sachs. Recientemente, la localización de regiones genómicas conteniendo factores de riesgo para el autismo en los cromosomas 2, 7 y 16 abre la puerta para el establecimiento de la base genética del autismo como también para



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Lo Biológico y lo Ético

los “carrier screening program” respecto a la enfermedad en cuestión. ¿Para cuando el “carrier screening program” para los genes de las enfermedades cardiovasculares, la violencia, la homosexualidad o la búsqueda de novedad, etc.?

La introducción desarrollada en los párrafos anteriores me permite puntualizar el enorme esfuerzo que los investigadores han implementado y la dificultad que conlleva definir genes y enfermedad. Y aún más para aquellos genes que se clasifican forzosamente como patológico. En las sociedades contemporáneas, esa confrontación permanente con los problemas de la agitación urbana, la inmigración, la delincuencia, entre otros, permite que la explicación biológica de la conducta humana seduzca a la opinión pública deviniendo en una especie de refugio de nuestros temores. Es decir, el viejo fantasma de Galton aparece con su antigua apología eugenésica. Así, como decía un periodista americano: *El crimen se asocia a la homosexualidad, la vagabundería, el divorcio, la esquizofrenia, el alcoholismo, la temeridad, el liberalismo político, la inteligencia, la religiosidad, el cáncer y los ojos azules dentro de la lista de aspectos de la vida humana por la cual la biología y el destino parecen sinónimos*. Así, por ejemplo, Franz Joseph Gall (s. XVIII) afirma que existe una carta formada sobre la superficie del cerebro y que se refleja sobre la superficie del cráneo y que alista 26 fuerzas primitivas humanas (la reproducción, el amor a los hijos, la amistad, el odio, el instinto de matar o de robar, entre otros) que son accesible a estudio y a manipulación. Por tanto, el incremento de la criminalidad, la locura, el suicidio, el alcoholismo y la agitación social puede tener una forma de control directo ejecutado por la mano precisa de la ciencia. En 1911, aparece una obra titulada: *Heredity in relation to Eugenics* de Charles B. Davenport. En dicha obra, Davenport “demuestra” que los comportamientos anormales son caracteres hereditarios de fluidez mendeliana: “una afeción del espíritu o del cerebro que se transmite con la misma regularidad y la misma constancia que el color de los ojos o de los cabellos” (Henry H. Goodard. 1908). Mucho de este tipo de análisis aún hoy se conserva como ya lo refleje en la introducción. Para la mayoría de estos estudios, todo comportamiento es

biológico, es genético. Y ya como dijera Kevles & Kevles (1998) “*Todo el mundo quisiera ver esta epidemia de problemas sociales desaparecer de un solo golpe de varita mágica*”. Hoy como ayer la opinión pública pone sus esperanzas en la ciencia, pero a pesar de la tentación de pensar que los comportamientos son innatos, una enorme cantidad de ellos son producto del aprendizaje.

Lo ético suele trascender las leyes, aunque en mucho estas se construyen sobre principios éticos. Cuando tomamos decisión(es) sobre un aspecto dado de la realidad biológica sin duda estamos asumiendo una actitud u orientación sobre la realidad que tenemos al frente. Si miramos según la óptica occidental pudiéramos considerar tres visiones fundamentales de la ética según su historia y verter así sus consideraciones sobre problemas biológicos concretos. Una primera aproximación de la ética occidental es de carácter: 1. *Aristocrático*. Nacida muy tempranamente en el seno de la sociedad griega, esta ética toma en consideración en lo esencial los talentos naturales o innatos del individuo. Así, toda decisión ética de posición aristocrática toma en consideración lo que es “bueno” o “malo” por naturaleza. Por tanto, un individuo podrá ser músico, poeta, matemático, economista o pobre si éste es así por naturaleza. Nada hace la historia individual y o colectiva del individuo pues “*el niño nació así*”. Por tanto, bajo esta óptica, podríamos imaginar que si un “carrier screening program”, diseñado para detectar genes asociados a la violencia en un población dada, detecta tres sujetos portadores de dichos genes, a la sociedad le esta perfectamente lícito eliminar tales individuos. 2. La ética *meritocrática* asume como esencial las filosofía asociadas a la *libertad*. Ya Rousseau había delineado los fundamentos de la moral meritocrática. En lo esencial se define en términos de igualdad, universalidad y libertad. Es la ética cuya proposición sobre el individuo es la de un ser de proyecto y de trascendencia. Así, no es necesario ni suficiente que un ser tenga el talento natural hacia la matemática, la música, la poesía, la política, etc, sino lo único que le es necesario para permitirse la música, la poesía, la matemática, la política, etc es la de haber nacido, es la de “ser”. A no ser que incapacidades biológicas extremas impidan la función correspondiente. Por tan-

to, estamos ante una perspectiva antinaturalista, es decir el hombre opera con libertad a pesar de las limitaciones que pudiese ofrecer la naturaleza. Aquí, el instinto vs. la razón. Así, imaginemos que el racismo tiene una base biológica, entonces ¿Está la sociedad condenada a padecer semejante flagelo? Pues, NO, si lo vemos bajo la óptica meritocrática. La educación debería imponer las condicionantes necesarias para que los individuos hiciesen prevalecer la razón por encima del salvajismo. 3. La ética utilitarista domina y se expande desde el mundo anglosajón. Aquí, lo esencial es que una acción se definirá como “buena” si la misma ha producido el mayor bienestar al mayor número de personas comprometidas con el acto. Sin duda, la gran problemática del utilitarismo es el concepto de sacrificio en una entidad biológica que piensa sopesando entre “mi bienestar” personal y aquel de la mayoría. En esta tercera óptica, el hombre ya no es empujado por virtudes naturales (ética aristocrática), o por virtudes trascendentes al ser mismo (ética meritocrática); sino por el *placer* puro y simple (“*faire plaisir*”). Ya no importa los valores simbólicos de un hecho, acto o entidad sino cuan rentable es para mi bienestar. El bien-estar en el instante presente. A partir de esta visión filosófica del mundo, por ejemplo, ¿Es rentable traer un niño malformado a pasar trabajo en este mundo?

No voy a tomar partido ante ninguno de estos principios éticos que nos guían. En esto somos Juez, testigo y parte. Lo que si podemos decir a grandes voces es lo que recoge la comisión jurídica del CIB (Comité Internacional de Bioética) de la UNESCO en el artículo 2 de la Declaración sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos:

- a) Cada Individuo tiene derecho al respeto de su dignidad y derechos, cualesquiera que sean sus características genéticas.
- b) Esta dignidad impone que no se reduzca a los individuos a sus características genéticas y que se respete su carácter único y su diversidad.

No importa que grado de predisposición genética poseemos, nuestro comportamiento es

el resultado de un interacción compleja entre los genes y el medio ambiente. Sabemos desde hace mucho la fuerte correlación que existe entre violencia, traumatismo cerebral y los malos tratos a repetición sufridos durante la infancia. Aquí, es tentador parafrasear a Paul Billings: “*Nosotros conocemos las causas de la violencia dentro de nuestra sociedad: la pobreza, la discriminación, las fallas del sistema educativo. No son los genes los que provocan esta violencia, sino nuestro sistema social*”.

UNA RECOMENDACIÓN A LO HUMANO

Interesantemente, a veces no nos percatamos de lo susceptibles que podemos ser a los condicionantes implícitos de nuestro juicio y nuestro comportamiento; y que son especialmente pernicioso ya que actúan al margen de nuestra conciencia. Así investigaciones recientes en sicología social han puesto de manifiesto la relación que existe entre memoria latente y los prejuicios que tenemos respecto al sexo, la raza y las minorías. Aunque no seamos concientes de albergar estereotipos, una vez activados ejercen una poderosa influencia sobre nuestro juicio. No hay duda que al establecer juicios de valor entramos sobre una línea bien difusa de la ética y lamentablemente para muchos los genes no serán el argumento sobre el cual nos escudaremos para resolver los problemas sociales que padecemos.

Es sólo a través de la comprensión de las leyes y el conocimiento integral de lo humano como individuo y especie que lograremos estar en un mundo más justo, más libre y más fraterno.

REFERENCIAS

- FERRY, L. & VINCENT, J-D. (2000). Qu'est-ce que l'homme? Sur le fondamentaux de la biologie et de la philosophie. Ed. Odile Jacob.
- KEVLES, BH. & KEVLES, DJ. (1998). La biologie des boucs emissaries. *La Recherche*. 311: 58-63
- APONTE, C. (2001). La Biología Molecular: En Medicina, Bioanálisis y Farmacia. *Act. Cient. de la Soc. Bioanal. Esp.* 7: 5-16



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Contenido

Biología Molecular del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) Dra. Cristina del Rosario Gutiérrez García	9
El Prisma de la Evolución y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana Monzón de Orozco, A., Sánchez, M. & Aponte, C.	18
Diagnóstico, Pronóstico e Interpretación de los Resultados de Laboratorio en la Infección por el VIH Lic. María Eugenia Pacheco, Dra. Ana Monzón de Orozco	24
Influencia de los Factores Genéticos del Huésped en la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) Dr. Carlos Darío Ramírez M.	37
Una Reflexión... Lo Biológico y Lo Ético Dr. Carlos Aponte	49