



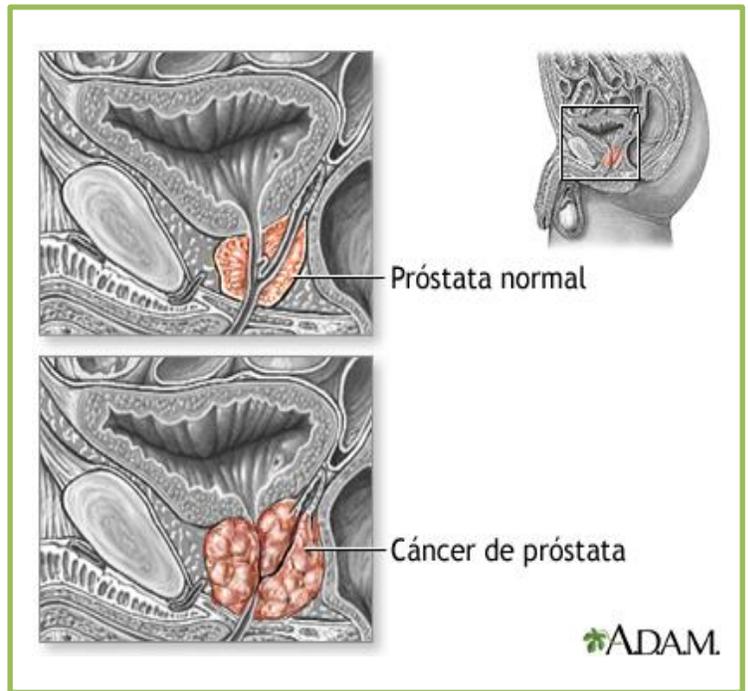
Universidad del Sureste
Escuela de Medicina
SOLIS PINEDA IRVIN URIEL
Grado.4 Grupo. A

Biología molecular
Investigación

QUIMICO. Nájera Mijangos Hugo

1: BIOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER DE PROSTATA.

Es la neoplasia más común y la segunda con mayor mortalidad en varones. La mayoría de los casos corresponden a adenocarcinomas en la zona periférica de la glándula. El diagnóstico se realiza mediante la biopsia prostática, se aconseja realizar screening con la cuantificación del antígeno prostático específico y el tacto rectal. Entre los tratamientos se cuenta con la cirugía, radioterapia y en algunos casos la quimioterapia



GENES ALTERADOS

Las firmas de expresión genética se han descrito por primera vez en 2006, para la estadificación patológica del PC como una correlación molecular con el sistema de Gleason. Utilizando la microdissección de tejidos se obtuvieron y combinaron con las células prostáticas benignas, grupos específicos de células cancerosas correspondientes a los patrones de Gleason más frecuentes (3, 4 y 5), procedentes de 29 muestras de prostatectomía radical. Se identificó un panel de 86-genes y capaz de distinguir carcinomas de grado bajo (Gleason 3) y de alto (Gleason 4 y 5). Además, este modelo tenía un 76% de precisión cuando se validó con un grupo independiente de carcinomas de próstata. En otro estudio, el gen DD3 fue descrito como altamente expresado en la microdissección de cáncer de próstata. El gen DD3 fue posteriormente llamado antígeno de cáncer de próstata 3 (PCA3) y, en un estudio diseñado para evaluar su potencial de diagnóstico en más de 100 hombres, se detectó PCA3 en hasta un 95% de las muestras de CP y su expresión resultó ser más de 60 veces mayor en los tejidos prostáticos malignos que en los benignos. A nivel celular, la determinación del PCA3 puede separar las células prostáticas benignas de las malignas con una precisión del 100%. Actualmente se está investigando a fondo la sobreexpresión de este gen en los fluidos corporales que contienen material celular prostático (como el semen y orina), con los primeros estudios que muestran niveles superiores de PCA3 en orina al PSA en el diagnóstico del CP.

Se cree que es crucial la inestabilidad genómica en la carcinogénesis de la próstata, así como en otros cánceres. La acumulación de los polimorfismos genéticos que regulan la proliferación y la muerte celular se han observado durante muchos años en el CP. La heterogeneidad de la expresión génica en el CP es muy común y debida a muchas aberraciones cromosómicas diferentes. En las últimas décadas, estas anomalías han sido estudiadas con muchas técnicas, como la pérdida de heterocigosidad (LOH) y perfiles de ADN. Las innovaciones en la citogenética molecular, tales como la hibridación genómica comparada (CGH) y la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) han mostrado algunas de las predominantes.

regiones cromosómicas implicadas en la carcinogénesis del CP. Las alteraciones más comunes son las pérdidas en 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, y 18q y las ganancias en 1q, 2p, 7, 8q, 18q y Xq. Se ha sido utilizado FISH para descubrir los genes objetivos de algunas de estas alteraciones, que podrían utilizarse como marcadores moleculares de la enfermedad, como la AR (Xq12), EIF3S3 (8q23) y MYC (8q24) (20). Más recientemente, un estudio diseñado para comparar la precisión del array comparativo de hibridación genómica (aCGH) con el CGH convencional y el análisis LOH se ha demostrado que aCGH es un instrumento poderoso y preciso para la detección completa de las pérdidas en las secuencias de ADN (21). La ventaja de aCGH es la capacidad para probar un mayor número de muestras con el fin de identificar las características genéticas comunes, así como una mayor precisión que el CGH convencional (21). En otro estudio, una evaluación aCGH de líneas de células prostáticas, xenoinjertos de cáncer de próstata y adenocarcinomas identificados primarios y metastásicos, identificó 3 genes sobreexpresados en el cáncer de manera significativa en comparación con el tejido prostático normal, que puede considerarse marcadores putativos de progresión para CP (PDP, situado en 8q22.1, PABPC1 situado en 8q22.3, y KIAA0196 ubicado en 8q24.13). Otro estudio aCGH muy interesante, compuesto por 64 pacientes previamente sometidos a prostatectomía radical, que estaban en riesgo intermedio o alto de recurrencia postoperatoria se identificaron 40 marcadores candidatos asociados con potencial metástasis. En concreto, la pérdida en 8p23.2 estaba relacionada con la enfermedad en etapa avanzada y el aumento en 11q13.1 resultó ser un factor predictivo de recidiva postoperatoria, independientemente de su grado y estadio. El mismo grupo comparó clones identificados por el aCGH con el nomograma de Kattan, en relación con los resultados bioquímicos. Este estudio preliminar reveló una exactitud de 78% de los clones para detectar firmas genómicas de metástasis en los tumores primarios, en comparación con una exactitud de 75% del nomograma de Kattan. Por lo tanto, se deben diseñar otras cohortes de validación más numerosas con el fin de evaluar estas alteraciones genéticas como marcadores de resultados para el CP. Las mutaciones somáticas acumuladas durante la carcinogénesis pueden ser usadas para los tratamientos farmacológicos específicos, ya que muchas proteínas expresadas en las células del cáncer son

diferentes a las de correlación normal. Esto ya está siendo estudiado en la próstata y en otros tipos de cáncer.

El gen KLF6 (Krüppel-como factor de transcripción del dedo de zinc) es un gen supresor de tumores que con frecuencia se inactiva por la pérdida de heterocigosidad (LOH), la mutación somática y/o disminución de la expresión en el cáncer. Codifica una familia de proteínas generadas a través de splicing alternativo que participa en la regulación del desarrollo y progresión del cáncer. El empalme alternativo del gen KLF6 tiene como resultado la producción de al menos cuatro isoformas de corte y empalme alternativo. La variante de empalme KLF6 1 (KLF6-SV1) es una variante oncogénica sobreexpresada en la próstata y otros cánceres, que ha demostrado ser biológicamente activa y que promueve el crecimiento y difusión del tumor.

En un estudio multiinstitucional de 3411 hombres, una línea germinal KLF6 polimorfismo de un solo nucleótido se asoció con un aumento del riesgo relativo de cáncer de próstata en los hombres. La KLF6-SV1 también conduce a la disminución de la expresión de p21 y a aumentar el crecimiento celular, así como una regulación ascendente en el tumor en comparación con el tejido prostático normal. Además, otros estudios demostraron que KLF6 induce la apoptosis en las células de CP, y la inhibición del KLF6-SV1 da como resultado la regresión del tumor "in vivo". En conjunto, estos datos sugieren que la familia KLF6 puede ser utilizada para el tratamiento específico de cáncer de próstata.

Utilizando un enfoque bioinformático (atípico perfil de análisis de cáncer - COPA), identificaron los genes que están sobreexpresados en un subgrupo de tumores de próstata. Utilizando el COPA, se encontró que el 5' UTR del gen TMPRSS2 andrógeno-regulado se fusionó con genes de la familia ETS de transcripción, dando lugar a la sobreexpresión de los factores de transcripción oncogénico. También demostraron en una línea celular de cáncer de próstata que la expresión de ERG está regulada por los andrógenos. Por otra parte, un estudio reciente mostró una tendencia significativa en la frecuencia de las fusiones TMPRSS2-ERG en diversos tejidos: 2,4% en la hiperplasia benigna de próstata, 20% en neoplasia de alto grado intraepitelial prostática y el 50% en CP localizado. Otros autores también han confirmado la presencia de las fusiones recurrentes de genes, apoyando su papel potencial como marcadores precoces del CP.

Muchas alteraciones epigenéticas contribuyen a la formación del cáncer de próstata, como con otros cánceres humanos. Tal vez una de las características más interesantes de los cambios epigenético es la reversibilidad, ya que la secuencia de ADN se mantiene intacta. Cabe destacar que los cambios epigenéticos generalmente aparecen antes y más consistentemente durante la carcinogénesis. La hipermetilación del ADN es la anomalía epigenética más común del cáncer. Se piensa generalmente que la carcinogénesis puede estar influenciada por el

silenciamiento de genes supresores de tumores, especialmente debido a la hipermetilación de islas CpG en sus regiones promotoras. En consecuencia, la hipermetilación del ADN puede ser utilizado como un objetivo para la clonación de nuevos genes supresores de tumor.

La hipermetilación es responsable de la inactivación de muchos genes en el cáncer de próstata, como el APC, CDH1, MDR1 y RASSF1A. Sin embargo, sólo unos pocos genes son candidatos potenciales, como marcadores tumorales para el diagnóstico precoz y la evaluación de riesgo de CP. Chung et cols., utilizando ampliación de isla CpG metilada, junto con el análisis representativo de la diferencia, de 8 genes seleccionados (NKX2-5; SPOCK2 r; GALR2; LSTN1; NSE1; DPYS; FOXN4; SLC16A12) con más metilación en cáncer de próstata en comparación con la próstata normal adyacente.

La combinación de algunos de estos genes fue capaz de diferenciar cáncer de la próstata normal hasta con un 96% de precisión, ofreciendo nuevos posibles biomarcadores para la detección del CP. Ellinger et al., también estudiaron la hipermetilación en el PC utilizando una metilación-específica por reacción encadena de la polimerasa. Se evaluaron controles de nueve localizaciones genéticas en 80 pacientes con CP y 26 con hiperplasia benigna de la próstata (HPB). La hipermetilación fue más frecuente en el CP que en las muestras de HPB. La hipermetilación en una única localización genética no se correlacionó con ninguna variable clínicopatológicas. Por otra parte, la hipermetilación en dos genes se correlacionó significativamente con el estadio patológico y/o escala de Gleason. La hipermetilación de TIG1 y GSTP1 fue capaz de distinguir el CP de la HBP con 85% especificidad y 93% de sensibilidad. Además, la hipermetilación del ADN en más de cinco genes, se correlaciona significativamente con la tasa de recurrencia de PSA tras la prostatectomía radical. Muchos otros genes candidatos también se han asociado con la susceptibilidad del CP (HPC1 , HPC2 , PCAP y progresión (Hepsin , GST-pi , p27, E -cadherina , NKX3.1 , utilizando diferentes técnicas de biología molecular. Creemos que en un futuro próximo, se utilizará de forma habitual un perfil molecular de los tumores de próstata para el pronóstico y tal vez para ayudar en la orientación del tratamiento.

Fagos Los bacteriófagos (o simplemente fagos) son virus de ADN de cadena simple que infectan a las bacterias gram negativas. Las partículas más comunes del fago utilizadas para la investigación es la cadena Fd, que consiste en una cápside cilíndrica de proteína que encierra un genoma ADN de cadena simple con 11 genes y alrededor de 6400 nucleótidos. La partícula de virus está formada por proteínas pVIII (cuerpo viral) y proteínas PIII, PVI, PVII y pXIX (viral final)

En la mayoría de los casos, la proteína PIII proteína se utiliza para exponer péptido. La tecnología de fagos fue originalmente introducida para rastrear los puntos de unión de las inmunoglobulinas. La tecnología se basa en un enfoque combinatorio que permite la presentación de colecciones de péptidos en la superficie de fagos filamentosos, que conducirá a la selección de proteínas, incluyendo anticuerpos,

con una alta afinidad y especificidad a casi cualquier objetivo, sin nociones preexistentes sobre la naturaleza de los objetivos.

Hasta 1010 variantes de péptidos exógenos pueden ser introducidos en el genoma del fago y expresados por las proteínas del fago. Además, las partículas del fago pueden resistir muchas condiciones difíciles, tales como el pH bajo y bajas temperaturas, sin perder infectividad. De hecho, la mayoría de los protocolos usan pH bajo para disociar fago de un objetivo. La investigación de los bacteriófagos ofrece la posibilidad de distinguir la especificidad de unión de péptidos de diferentes objetivos, tales como proteínas, tejidos, órganos o incluso animales vivos. Normalmente la selección de afinidad de los péptidos de una biblioteca de fagos (llamada “ciclo de selección”) se define en 5 pasos fundamentales: la creación de una biblioteca principal o ampliación de una biblioteca existente, la exposición del fago a un objetivo específico, la eliminación de aglutinantes no específicos (lavado/perfusión), recuperación del fago dirigido a un objetivo por elución o infección bacteriana directa y la amplificación de los fagos recuperados. Esta panorámica se repite, por lo general, varias veces hasta que se selecciona una población de mejores aglutinantes. Al secuenciar el genoma codificando el péptido mostrado, es posible determinar y reproducir su secuencia como péptido recombinante o sintético. De esta manera uno puede determinar finalmente los ligandos específicos y selectivos a los receptores de destino.

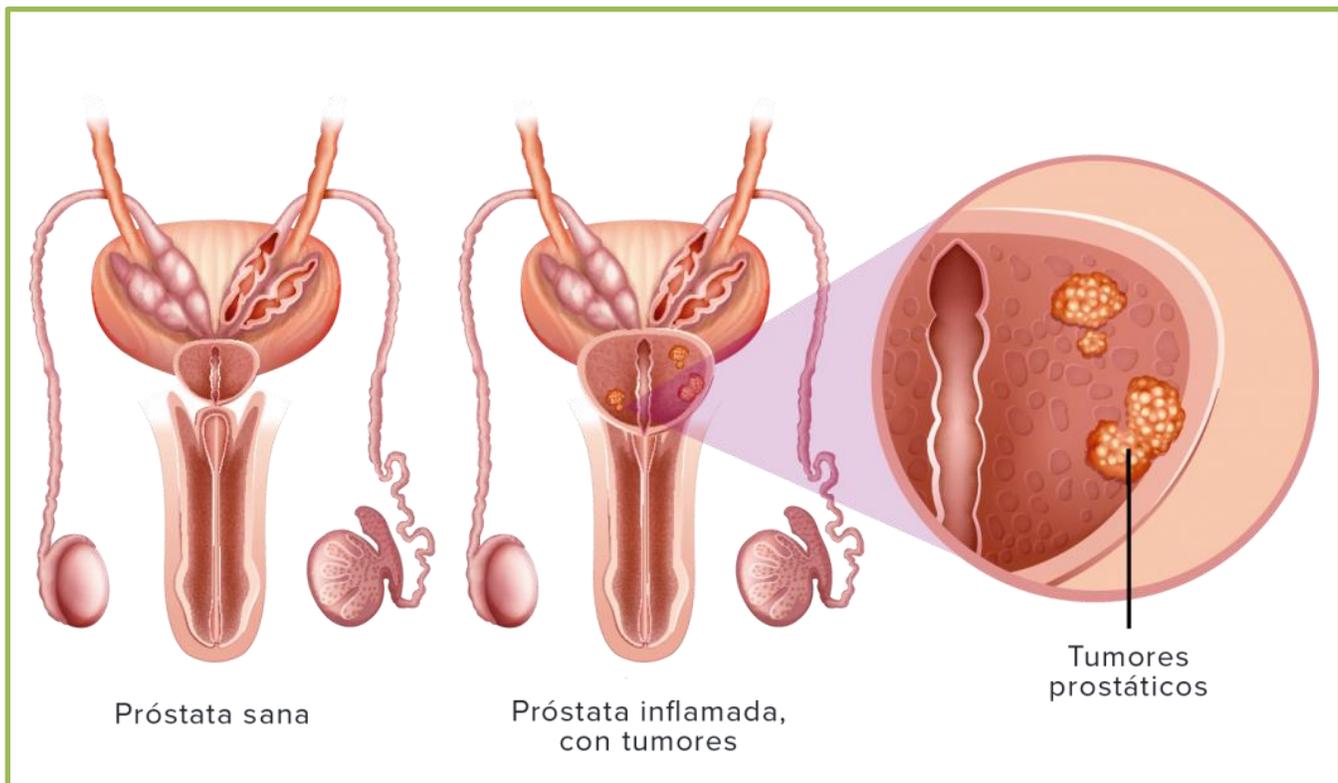
TABLA I. MARCADORES MOLECULARES CANDIDATOS DESCRITOS EN ESTA REVISIÓN Y SU PAPEL POTENCIAL EN LA EVALUACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

Marcador Potencial	Posible papel en el cáncer de próstata (CP)	Referencias
DD3	CP diagnóstico	14-19
AR, MYC, EIF3S3	CP diagnóstico	20
PDP, PABPC1, KIAA	CP diagnóstico	22
KLF6	CP tratamiento	26-28
TMPRSS2-ERG fusion	CP marcador precoz	29-34
NKX2-5, r SPOCK2, GALR2, LSTN1, NSE1, DPYS, FOXN4, SLC16A12	CP exploración	40
TIG1, GSTP1	CP diagnóstico	41
HPC1	CP susceptibilidad	42
HPC2	CP susceptibilidad	43
PCAP	CP susceptibilidad	44
Hepsin	CP progresión	45
GST-pi	CP progresión	46
P27	CP progresión	47,48
E-cadherin	CP progresión	49-51
NKX3-1	CP progresión	52
GRP78	Marcador para enfermedad avanzada	58,67

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.

A menudo, el cáncer de próstata en estadio inicial no tiene síntomas ni signos. Normalmente se detecta mediante un análisis del PSA o un DRE, un proceso llamado detección. Si se sospecha la presencia de cáncer de próstata en función de un análisis del PSA o un DRE, se requieren más controles y pruebas para diagnosticar cáncer de próstata. Cuando el cáncer de próstata provoca efectivamente síntomas o signos, generalmente se diagnostica en un estadio posterior. Estos signos y síntomas incluyen:

- Micción frecuente.
- Flujo miccional débil o interrumpido, o necesidad de hacer fuerza para vaciar la vejiga.
- Urgencia de orinar frecuentemente por la noche.
- Sangre en la orina
- Sangre en el líquido seminal.
- Nueva aparición de disfunción eréctil.
- Dolor o ardor al orinar, que es mucho menos frecuente.
- Molestias o dolor al estar sentado, causadas por un aumento del tamaño de la próstata.



A veces, los hombres con cáncer de próstata no manifiestan ninguno de estos cambios. Otras afecciones de la próstata no cancerosas, como la BPH o un aumento del tamaño de la próstata, pueden producir síntomas similares. O bien la causa de estos síntomas puede ser otra afección médica diferente que no sea cáncer. Los síntomas urinarios también pueden ser consecuencia de una infección de la vejiga u otras afecciones.

Si el cáncer se ha diseminado fuera de la glándula prostática, un hombre puede experimentar:

- Dolor en la espalda, las caderas, los muslos, los hombros u otros huesos.
- Hinchazón o acumulación de líquido en las piernas o los pies.
- Pérdida de peso sin razón aparente.
- Fatiga.
- Cambio en los hábitos intestinales.

Si le preocupa algún cambio que ha experimentado, hable con su médico. Su médico le preguntará desde cuándo y con qué frecuencia ha experimentado el (los) síntoma(s), entre otras preguntas. Esto es para ayudar a detectar la causa del problema, lo que se denomina diagnóstico.

Si se diagnostica cáncer, el alivio de los síntomas sigue siendo un aspecto importante de la atención y del tratamiento para el cáncer. Esto también puede denominarse manejo de los síntomas, cuidados paliativos o atención de apoyo. Asegúrese de hablar con su equipo de atención médica sobre los síntomas que experimenta, incluido cualquier síntoma nuevo o cambio en los síntomas.

DIAGNOSTICO MOLECULAR

El tacto rectal, la concentración de antígeno prostático y el ultrasonido transrectal son valiosas herramientas diagnósticas para obtener indicios de cáncer de próstata, pero el diagnóstico definitivo solo se puede realizar con una biopsia⁹. Tacto Rectal: La mayor parte de los tumores prostáticos se encuentran en la zona periférica donde gran parte son detectados por el tacto cuando el diámetro es mayor a 0.2cm⁸. Antígeno Prostático Específico (APE): Es una serinaproteasa relacionada con la calicreína, que se produce en las células epiteliales de la próstata, su función es la licuefacción del coágulo del semen. Su dosificación plasmática es una herramienta

indispensable en el diagnóstico del cáncer, se debe tener precaución en los pacientes con APE entre 4 ng/ml y 10 ng/ml en estos casos se utiliza la medición del APE libre y en complejos para decidir si es necesaria una biopsia; el riesgo de cáncer es menor al 10% cuando la APE es mayor al 25%, pero llega hasta 56% si el APE libre es menor del 10%^{5,8}. No obstante, la elevación del APE no solo se observa en paciente con cáncer, también se eleva con la hiperplasia prostática benigna, en la prostatitis, eyaculación e infarto prostático. Se recomienda un cribado en pacientes mayores de 50 años con una expectativa de vida mayor a 10 años⁸. Biopsia de próstata: La biopsia con aguja gruesa guiada por ultrasonido es la técnica de elección para realizar el diagnóstico, se obtiene de 6 a 12 cilindros de la base, vértice y parte media de ambos lados de la glándula.

TRATAMIENTO

Difiere en función de la estadificación del tumor, además se valora la sobrevida del paciente. Prostatectomía radical: Se realiza en pacientes con esperanza de vida mayor a 10 años, se realiza con intenciones curativas. Es el único que ha demostrado un beneficio en supervivencia específica. Se estima que entre 3-4 semanas las concentraciones séricas de APE deben desaparecer. Radioterapia: La elección es la radioterapia de intensidad modulada donde se administran dosis más homogéneas y se produce menor toxicidad. También se utiliza la braquiterapia transperineal en pacientes con una esperanza de vida menor a los 10 años. Castración: Los testículos sintetizan más del 90% de las hormonas masculinas, el resto se produce en las glándulas suprarrenales.

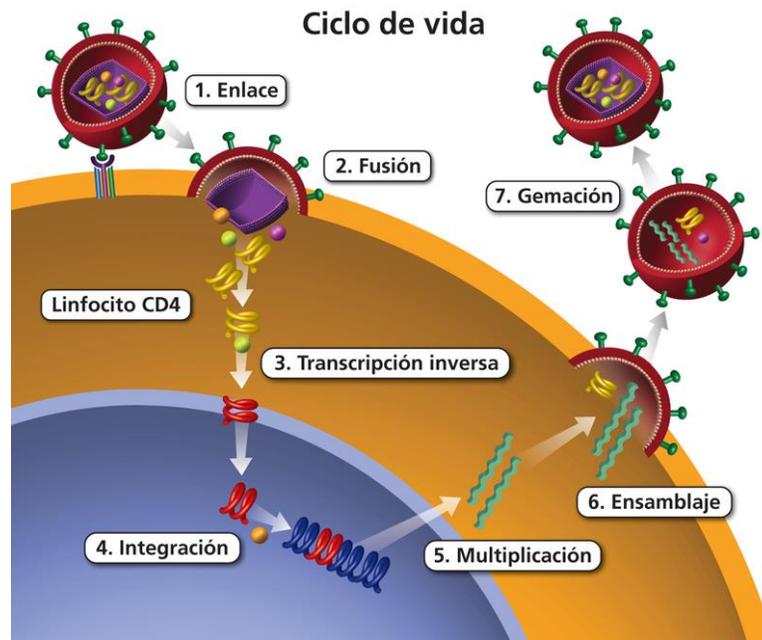
Con la castración se busca disminuir las concentraciones de testosterona, se puede utilizar la cirugía al realizar una orquiectomía bilateral. Otra opción, más aceptada por los pacientes es la castración química, se consigue con agonistas de laLHRH²⁹.

Quimioterapia: Se reserva exclusivamente para pacientes con metástasis, el esquema de primera línea es el docetaxel combinado con Prednisona.

2: BIOLOGIA MOLECULAR DEL HIV

Ciclo vital

El ciclo vital del VIH sigue, en general, las pautas del resto de retrovirus. Después de que el virus alcanza la célula diana y logra penetrar a través de la membrana plasmática, la RT convierte el ARN viral en ADN. El ADN retrotranscrito es transportado al núcleo e integrado al ADN celular, proceso mediado por la enzima IN. Debido a las características de replicación de los retrovirus, el ADN proviral está flanqueado por las regiones LTR (long terminal repeats), con importantes funciones reguladoras.



Después de la integración, el ADN retroviral (provirus) usa la maquinaria celular para expresar el ARN viral. El ARN genómico, junto a las proteínas virales, son ensamblados en la partícula viral, que sale de la célula e infecta nuevas células mediante la unión a receptores celulares específicos.

Penetración del virus.

Comienza cuando la proteína Env del VIH se une al receptor de superficie CD4, un miembro de las inmunoglobulinas. Este receptor se encuentra en los linfocitos T, monocitos, linfocitos B y otras células. Aunque CD4 es el receptor primario, se han descrito receptores alternativos para la penetración del VIH en células CD4(-) como, por ejemplo, el esfingolípido galactósido ceramida. El CD4 es una glicoproteína transmembrana de 58 KiloDalton (KDa), siendo la región comprendida entre los aminoácidos 400-430 la que define el sitio de unión con la proteína viral Env. La interacción de CD4 con Env es de vital importancia para el VIH, permitiendo la infección y disregulación de CD4. Esto afecta la función de las células T y eventualmente permite la depleción de las células T CD4(+) causando inmunodeficiencia en los pacientes infectados.

Los mecanismos post-unión requeridos para la fusión entre VIH y la membrana celular no son bien conocidos. El VIH, como otros retrovirus, infecta a las células de forma pH-independiente, a través de la fusión directa entre las membranas viral y celular. Se piensa que el proceso es conducido inicialmente a través de cambios conformacionales en Env, justo después de la unión a CD4, los cuales hacen exponer dominios de fusión, localizados en la región hidrofóbica N-terminal de la subunidad transmembrana de Env .

En la superficie celular humana existen otras moléculas que, junto a CD4, y actuando como cofactores, son cruciales para la eficaz entrada de VIH; destacan el receptor fusina-CCR5 o el receptor para quimiocinas CXCR4 .

Síntesis del Provirus.

Después de la penetración del virus, la cápside se desestructura y la RT viral es activada. Existen evidencias experimentales que sugieren el posible comienzo de la retrotranscripción del VIH incluso dentro del virión ²⁷⁻²⁸. Un complejo ribonucleoproteico (RNP) conocido como "complejo de preintegración" se estructura en el citoplasma de la célula infectada y es responsable de la transcripción reversa y del transporte al núcleo. El RNP contiene al ARN genómico junto a las proteínas NC y MA así como las enzimas virales RT e IN. Durante la retrotranscripción, las dos moléculas de ARN del virión son convertidas a una doble cadena lineal de ADN.

Transporte nuclear e Integración.

El ADN proviral de doble cadena unido a proteínas es transportado al núcleo de la célula infectada. La cuestión de cómo el complejo de preintegración es transportado desde la membrana plasmática a la membrana nuclear no está del todo claro. Se especula con la posibilidad de que Vif esté implicada en el proceso teniendo en cuenta que la proteína es empaquetada en las partículas virales de VIH asociada al core viral. Por otra parte, Vif tiene la habilidad de asociarse con filamentos intermedios como la vimentina que conecta las membranas nucleares y

plasmáticas. Por ello, parece probable que Vif actúe como puente de unión entre el complejo de preintegración y las moléculas motoras de los microtúbulos celulares para el transporte activo hacia el núcleo.

A diferencia de los oncoretrovirus, VIH puede entrar en el núcleo de células quiescentes como los macrófagos diferenciados. Las tres proteínas virales más importantes en el proceso de translocación nuclear son MA, IN y Vpr. Uno de los primeros pasos en la importación nuclear del complejo es el reconocimiento de señales de localización nuclear (NLS) presentes en el complejo de preintegración. El proceso en cuestión está mediado por un complejo proteico heterodimérico compuesto por Importina-a (Imp-a) e Importina-b (Imp-b). Imp-a une las NLS mientras que Imp-b media la translocación a través del poro nuclear. Tanto MA como IN portan secuencias NLS y se sabe que interactúan con miembros de las Importinas.

El ADN del VIH es integrado en el genoma celular a través de la acción de la IN viral en sitios localizados al azar, aunque se han descrito regiones de alta probabilidad de integración.

Se sabe que el ADN viral lineal es el sustrato directo para la integración siendo inviable la integración de formas circularizadas. El provirus integrado es homólogo al ADN viral excepto que se eliminan algunos nucleótidos de cada extremo además de la presencia, en ellos, de cortas repeticiones procedentes del genoma del huésped. La integración requiere que IN reconozca los extremos del ADN viral (los sitios att). La IN cataliza la eliminación de dos pares de bases de los extremos 3' de cada cadena de ADN viral exponiendo un dinucleótido CA, muy conservado entre todos los retrovirus. Este ADN viral procesado es unido entonces a los extremos 5' del ADN celular, previamente cortados, a través de una reacción de transesterificación. Las enzimas celulares reparan entonces las uniones generando las repeticiones cortas que flanquean las secuencias virales.

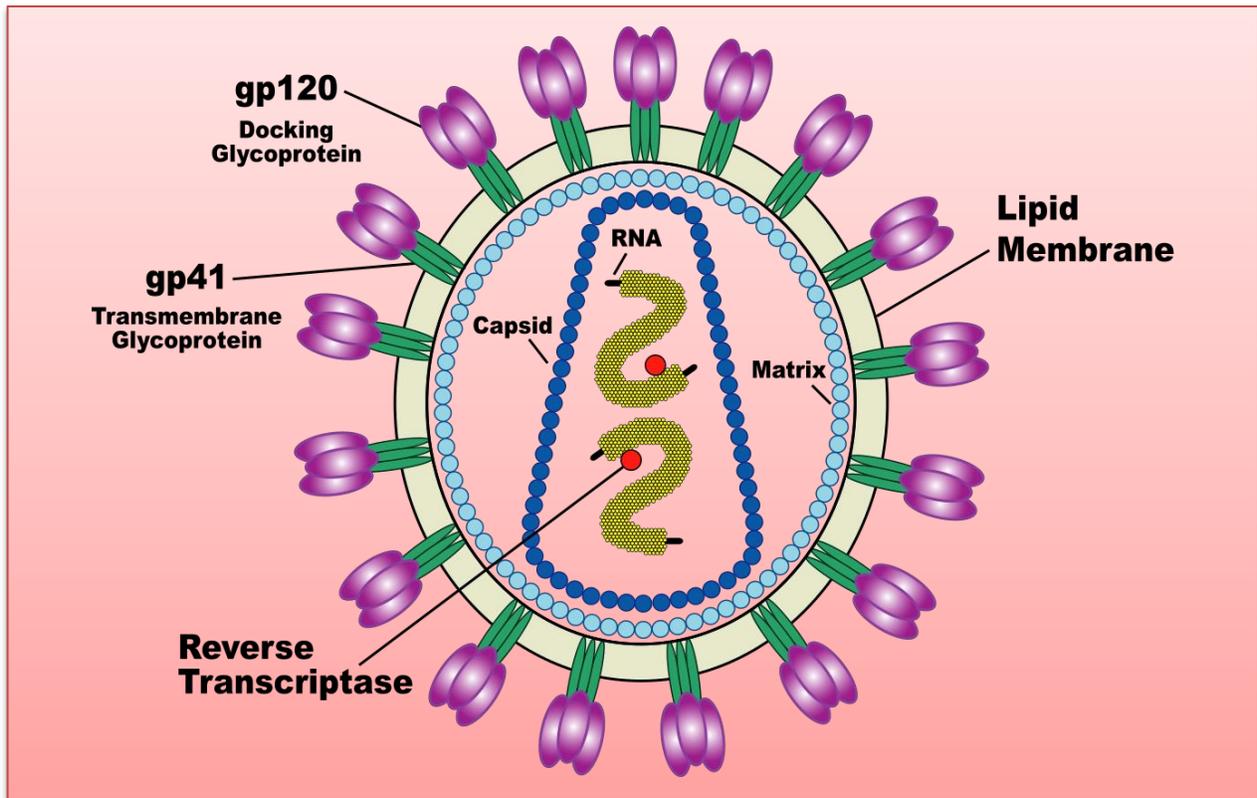
La proteína Nef está implicada en la regulación de la infectividad viral^{49,50}. De hecho, hay similitudes considerables entre los fenotipos derivados de defectos en Vif y en Nef. Para ambas proteínas, los defectos se manifiestan en un paso muy temprano del ciclo viral y se caracterizan por niveles reducidos en la síntesis de ADNc.

Expresión génica.

El provirus integrado y flanqueado por los LTR's se organiza como una unidad transcripcional eucariótica. El LTR 5' contiene un promotor/activador y el LTR 3' contiene un eficiente sitio de poliadenilación. La transcripción del provirus, vía ARNpol II celular, da lugar a un transcrito primario que tiene dos importantes funciones: puede servir como ARN genómico para ser incorporado en el virión, o bien ser procesado para proveer todos los ARN mensajeros (ARNm) que codifican las proteínas virales.

El promotor del VIH es regulado por factores celulares y virales y su actividad varía dependiendo del estado celular. En muchas células de individuos VIH positivos la expresión del virus es indetectable. De este modo, puede existir un estado de latencia en células individuales aunque la infección esté crónicamente activa debido a la expresión continua de VIH en una fracción de las células.

La proteína Tat incrementa en gran medida la expresión del promotor de VIH. Esta proteína es la que permite la alta expresión de ARNm en los primeros momentos posteriores a la infección. Mientras que la activación de Tat conduce básicamente a la obtención de ARNm maduros, la proteína Rev (regulación postranscripcional) regula el balance entre ARNm pre y post splicing. La activación de Rev conduce la última etapa de la expresión viral donde el ARNm que no ha sufrido splicing predomina. La función de Rev dirige el balance de la expresión de las proteínas virales a través de un feedback negativo; la disfunción de esta proteína conduce al estancamiento del virus en un estado en el que domina un patrón ineficaz de la expresión génica.



En la mayoría de las células, la transición desde la primera etapa de la expresión viral (producción de Tat y ARNm maduros) a la última (producción de Tat y Rev con expresión eficiente de todos los ARNm virales) ocurre con rapidez (horas). Aunque pueden detectarse muchas células conteniendo el genoma de VIH pero sin expresión proteica, parece que sólo unas pocas pueden bloquearse en las primeras etapas de la expresión viral.

Ensamblaje del virión.

Las proteínas estructurales traducidas se van acumulando dentro de la membrana plasmática. La proteína Gag interacciona con Env que está embutida en la membrana plasmática. La multimerización del precursor Pr55gag lleva consigo el inicio de la formación de la partícula. Junto a Pr55gag, algunas Pr160gag-pol son también incorporadas al virión. Dos moléculas de ARN genómico son también encapsuladas junto a las moléculas de ARNtLys3. La integración de Pr160gag-pol a la partícula permite la activación de la misma.

El corte ordenado de Pr160gag-pol y Pr55gag dirige la maduración de la partícula y su inmediata liberación. Este es un paso esencial para la producción de viriones infectivos, ya que las partículas virales conteniendo las moléculas precursoras no son infectivas. El proceso descrito permite que se inicie también la maduración y activación de otras enzimas virales. La RT está asociada con el complejo ARNgenómico-ARNt e inicia la retrotranscripción si hay disponibilidad de nucleótidos trifosfato (dNTP). Las proteínas accesorias Vif y Vpr y posiblemente Nefson también incorporadas al virión junto con las proteínas celulares, jugando un papel importante en el proceso de ensamblado. En algunos casos, estas proteínas celulares son muy importantes para la infectividad viral.

Una de las peculiaridades de VIH es el requerimiento de ciclofilina A (CyPA) para la infectividad del virus. CyPA, una chaperona con actividad peptidil isomerasa tiene un papel general en el plegamiento proteico y se cree que interacciona directamente con Gag del VIH. Probablemente sea necesaria para el correcto plegamiento de Gag.

Promotor viral.

El potente promotor del VIH contiene una caja TATA y sitios de unión para factores de transcripción celulares incluyendo sitios para NF-KB y Sp1. Estos factores de transcripción son esenciales para la función del promotor. Hay dos sitios de unión en tandem para NF-KB (posiciones -104 y -90) y tres sitios de unión para Sp1 (-78 a -47). La delección de los sitios Sp1 o de los NF-kB reduce la actividad del promotor mientras que la retención de un solo sitio NF-kB es suficiente para el desarrollo completo de la actividad del promotor. Por ello, la composición del promotor más simple eficaz contiene 1 sitio NF-kB, los sitios Sp1, la caja TATA, el sitio de iniciación de transcripción y el elemento sensible a Tat (TAR).

El promotor de VIH es altamente inducible y responde al estado de activación de la célula infectada. NF-kB es el mayor activador inducible conocido. Se han identificado otros sitios de unión para otros tantos factores como NFAT y AP1 en la región U3. Sin embargo, parece que sólo los sitios para Sp1, NF-kB, Ap2 y HIP-1 afectan a la expresión del promotor de VIH en células humanas. Estas interacciones unen la expresión de VIH a la activación de genes específicos de células T y contribuyen a explicar las propiedades biológicas descritas de este virus. Los

factores celulares que interaccionan con el promotor han sido intensamente estudiados y son motivo de bastantes revisiones.

Está bien establecido que en muchas células del tejido linfóide de individuos infectados se encuentra el VIH latente, aunque la replicación viral en el organismo esté siempre activa. En las células T en reposo la actividad del promotor de VIH es mínima siendo éste uno de los mecanismos más importantes que permiten la quiescencia viral en la mayoría de las células primarias. La activación celular está asociada con la activación viral. Debido a la baja actividad basal de LTR en los linfocitos T en reposo, la transactivación dependiente de NF- κ B es necesaria para la inducción del LTR del VIH y para la propagación viral. Además, el VIH emplea un segundo paso regulatorio esencial en el que interviene la proteína viral Tat. Esta se une al elemento TAR del ARN en el comienzo de la transcripción, incrementándola en gran medida. Por todo lo expuesto, el promotor completo activado del VIH es uno de los más potentes conocidos en células humanas.

Señales regulatorias en el ARN viral.

Se han identificado muchos sitios en el ARN viral del VIH que son esenciales para su propagación. Entre ellos, se incluyen los elementos reguladores positivos TAR y el elemento sensible a Rev (RRE) junto a los negativos, que inhiben la expresión (INS o CRS). Estos elementos negativos regulan la expresión mediante la interferencia en la estabilidad, transporte y traducción de los ARNm. Junto a los descritos, el ARNm también contiene varios sitios necesarios para otros pasos en el ciclo viral como la dimerización del ARN genómico y la encapsidación (sitio psi).

Como otros lentivirus, el VIH contiene muchos sitios de splicing comparado con los oncoretrovirus. El control preciso del splicing es esencial para los retrovirus ya que requieren del ARNm sin procesar para la encapsidación dentro de la partícula viral (ARN genómico). El splicing de VIH no ocurre rápidamente *in vitro* ni *in vivo* permitiendo su precisa regulación.

ARNm virales.

El transcrito primario del VIH generado por la ARNpol II está protegido con una estructura CAP en 5' y una cola de poliAdeninas en el extremo 3'. Una porción de este transcrito es sometido a splicing alternativo, generando más de 30 especies diferentes de proteínas virales. Para propósitos de regulación génica estos ARNm pueden dividirse en dos clases.

La primera clase, incluyendo los ARNm inmaduros y los que han sufrido parcialmente el proceso de splicing dependen de la proteína Rev para una expresión eficaz. Estos ARNm codifican para Gag, Pol, Vif, Vpr, Vpu, Env y Tat-1.

La segunda clase comprende a los ARNm pequeños sometidos a splicing completo. Estos ARNm son expresados eficazmente en ausencia de Rev y codifican para Tat-2, Rev y Nef así como para Vpr y otras como Tev.

Se sabe que la producción de ARNm maduros está gobernada por la interacción de las proteínas virales Tat y Rev con elementos cis-acting sobre los ARNm (TAR y RRE).

Se han descrito tanto ARNm monocistrónicos (gag-pol, tat, tat-1) como bicistrónicos (rev/nef, vpu/env). En general, cada proteína viral es producida por más de un ARNm. Estos ARNm son sometidos a splicing y codifican una de las proteínas como el primer ORF(marco de lectura abierto), resultando una expresión óptima. Las excepciones a esta regla general están en el precursor de Gag/Pol que es producido por el ARNm sin splicing mientras que Env es producida como el segundo ORF por el ARNm bicistrónico vpu/env.

Múltiples estudios corroboran el hecho de que la producción de VIH puede tener lugar dentro de un gran margen de niveles de ARNm. Está bien establecido que los diferentes VIH aislados varían ampliamente en sus características biológicas como tropismo, niveles de expresión y citopaticidad. Debido a la variación en el splicing de los aislados primarios, como se ha descrito, es concebible que algo de la variabilidad en las propiedades biológicas de los diferentes VIH debe poder ser explicado como resultado de diferencias en el splicing.

Proteínas virales.

Los genes del VIH codifican para diversas proteínas que pueden clasificarse, básicamente, en tres clases.

Proteínas estructurales.

* Gag: el gen gag da lugar a una proteína precursora de 55 KDa también llamada p55 que se expresa a partir del ARNm viral sin procesar. La poliproteína Gag es la encargada de reclutar dos copias del ARN genómico viral junto a otras proteínas celulares y virales que permite la expulsión de la partícula viral desde la superficie de una célula infectada. Después de la expulsión, la p55 es fraccionada por proteasas codificadas por el virus (derivadas del gen pol) durante el proceso de maduración. Las cuatro proteínas derivadas de este procesamiento proteolítico son MA (matriz, p17), CA (capside, p24), NC (nucleocapside, p9) y p6.

Las moléculas MA facilitan el transporte nuclear del genoma viral mediante una señal que reconoce la maquinaria nuclear celular. Este fenómeno es el que permite al VIH infectar a células que no están en mitosis (85). La proteína CA o p24 forma el core cónico de las partículas virales (61,62,86). La región NC de Gag es responsable del reconocimiento específico de la llamada señal de empaquetamiento de VIH (87). La región polipeptídica p6 media las interacciones entre p55 y la proteína accesoria Vpr, permitiendo la incorporación de Vpr a los viriones.

* Gag-Pol (precursor): las proteínas PR, IN, ARNasa H y RT son también expresadas dentro del contexto de una fusión proteica Gag-Pol. El precursor Gag-Pol (p160) es generado por un evento de cambio de marco de lectura ribosomal (frame shifting) desencadenado por un elemento cis-acting específico. Cuando los ribosomas encuentran este motivo cambian al marco de lectura de pol (aprox 5% del tiempo) sin interrumpir la traducción. Durante la maduración viral, las proteasas virales separan el polipéptido Pol del Gag y a continuación digieren éste para separar la PR (p10), RT (p50), ARNasa H (p15) y la IN (p31).

La PR del VIH es una aspartil proteasa que actúa como un dímero. La actividad proteasa es importante para la escisión de los precursores durante la maduración del virión. El conocimiento de la estructura tridimensional de esta proteasa ha sido de gran interés farmacológico permitiendo la generación de nuevos fármacos, diseñados para inhibir específicamente esta enzima viral. Es quizá uno de los mejores ejemplos de la utilidad real que la investigación básica presta a la medicina clínica.

La RT es codificada por el gen pol. El ADN viral puede ser completamente sintetizado en 6 horas desde la penetración del virus, aunque puede permanecer sin integrar durante largos períodos de tiempo.

La IN media la inserción del ADN proviral en el ADN genómico de la célula infectada. En el proceso se ven implicadas 3 funciones diferentes de IN. Por una parte la actividad exonucleásica corta dos nucleótidos de cada final 3' del dúplex de ADN viral lineal. A continuación, una endonucleasa de actividad "doble cadena" corta el ADN de la célula huésped en el sitio de integración. Por último, la actividad ligasa genera una unión covalente simple en cada extremo del ADN proviral. Se cree que la zona de integración viene influenciada por la accesibilidad al ADN incluido en la cromatina. Al menos in vitro, los sitios donde el ADN se encuentra retorcido dentro de la cromatina son puntos calientes para la integración. Sin embargo, la integración preferencial en regiones de cromatina abierta, transcripcionalmente activa, facilita la expresión del provirus. Los genes virales no son expresados eficazmente desde el ADN proviral no integrado.

* Env: se trata de una proteína de 160 KDa (gp160) que se expresa a partir de un ARNm sometido a splicing simple. Sintetizada en el retículo endoplásmico, Env emigra a través del complejo de Golgi donde es glicosilada con 25-30 cadenas de carbohidratos en los residuos de asparagina. Esta glicosilación es importante para la infectividad del virus. Una proteasa celular escinde gp160 para generar gp41 y gp120. Mientras que gp41 contiene el dominio transmembrana del Env, la gp120 se localiza en la superficie de la célula infectada y del virión a través de interacciones no covalentes con gp41. Se sabe que Env existe como un trímero en la superficie del virión.

Las interacciones entre el VIH y el receptor del virión, CD4, están mediadas a través de dominios específicos de gp120. La gp120 presenta 9 puentes disulfuro intracadenas muy conservados y 5 regiones hipervariables (V1 a V5) cuyas

secuencias de aminoácidos varían bastante entre los diferentes VIH aislados. Una de ellas, conocida como bucle V3, aunque no está implicada en la unión a CD4, es un importante determinante del tropismo preferencial de VIH por las células Linfoides T o los macrófagos primarios ⁹⁷ Asimismo, este bucle es la principal diana para los anticuerpos neutralizantes que bloquean la infectividad de VIH .

Por otra parte, la gp41 contiene un dominio N-terminal fusogénico que media la fusión de las membranas viral y celular permitiendo el vertido de los componentes virales a la célula infectada.

Proteínas reguladoras.

* Tat: es un transactivador transcripcional esencial para la replicación del VIH. Tat es una proteína que une ARN a diferencia de los factores transcripcionales habituales, que suelen interaccionar con ADN. En concreto, se une a una estructura corta, en forma de bucle, conocida como "elemento de respuesta a la transactivación" (TAR) que está localizado en el extremo 5´ del ARN viral. Esta unión de Tat a TAR activa la transcripción del LTR de VIH en un orden magnitud de al menos 1000 veces. Tat puede activar la expresión de un número considerable de genes celulares incluyendo el gen del factor de necrosis tumoral (TNF) , pudiendo asimismo regular la expresión de otros tantos como el gen bcl-2 y el gen MIP-1a.

* Rev: se trata de una proteína de 13 KDa que une ARN. Producida a partir de ARNm totalmente procesado, Rev induce el tránsito de la expresión génica temprana de VIH a su etapa avanzada. Experimentalmente se ha comprobado que Rev es absolutamente necesaria para la replicación de VIH; así, los provirus que carecen de la función Rev son transcripcionalmente activos pero no expresan genes virales tardíos y, por tanto, no producen viriones.

Proteínas accesorias.

Aparte de los genes y sus correspondientes proteínas descritas anteriormente, VIH contiene otros genes adicionales: nef, vif, vpr, vpu, codificando las llamadas proteínas accesorias.

Las proteínas accesorias no son absolutamente necesarias para la replicación vírica in vitro pero, sin embargo, representan factores de virulencia críticos in vivo. Nef se expresa a partir de un ARNm muy procesado y por tanto, es independiente de Rev. En contraste, Vpr, Vpu y Vif son productos de ARN sometido a splicing incompleto y, por tanto, sólo son expresadas en la fase de replicación tardía Rev-dependiente.

La mayoría de las proteínas accesorias de VIH tienen múltiples funciones tal y como se describe a continuación.

* Nef (negative factor): El gen nef pertenece al grupo de genes de expresión temprana siendo su producto la primera proteína viral que se acumula hasta niveles detectables en la infección por VIH. De entre sus múltiples funciones conocidas, destacan la regulación de la expresión de CD4 en la superficie celular, la perturbación de la activación de las células T y la estimulación de la infectividad del VIH. Nef actúa post-transcripcionalmente para disminuir la expresión en la superficie celular de CD4, incrementa la velocidad de endocitosis de CD4 y su degradación lisosomal.

El dominio citoplasmático de CD4 y, en particular, una secuencia repetida de dileucinas es el sitio de acción de Nef; asimismo, también regula, aunque en menor medida, la expresión celular de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I.

Está demostrado la capacidad de Nef para perturbar la activación de las células T. Diversos estudios demuestran que la expresión de Nef tiene un efecto negativo en la inducción de NF- κ B y en la expresión de IL-2. En cualquier caso, Nef ejerce efectos pleiomórficos en la activación de las células T dependiendo del contexto de expresión. Consistente con este modelo, se ha encontrado que Nef está asociada con diversas quinasas presentes en las células T helper.

Nef también es capaz de estimular la infectividad de los viriones. Las partículas de VIH producidas en presencia de Nef pueden ser 10 veces más infectivas que los viriones producidos en su ausencia.

* Vpr: aproximadamente 100 copias de Vpr están asociadas con cada virión. Juega un papel en la habilidad del VIH para infectar células que no están en mitosis en tanto que facilita la localización nuclear del complejo de preintegración. También puede bloquear la división celular; las células que expresan Vpr arriesgan en la fase G2 del ciclo celular. La expresión de Vpr parece prevenir la activación del complejo p34cdc2/ciclina B, conocido regulador del ciclo celular, importante para la entrada en mitosis (117-119). Asimismo, Vpr interacciona con la proteína uracil-ADN-glicosilasa (UNG) cuyas consecuencias biológicas están aún por determinar.

* Vpu: este polipéptido de 16 KDa es una fosfoproteína integral de membrana que está localizada en las membranas celulares. Vpu es expresada del mismo ARNm que codifica a Env. Vpu es traducida, desde este ARNm, a niveles 10 veces menores que Env ya que el codón de iniciación en la traducción de Vpu no es eficaz.

Las dos funciones de Vpu, la modulación de CD4 y el incremento de la liberación de viriones, están genéticamente separadas.

En las células infectadas por VIH los complejos formados entre CD4 y la proteína de la cubierta viral en el retículo endoplásmico causan el atrapamiento de ambas proteínas dentro de este compartimento. La formación de complejos Env-CD4, por tanto, interfiere con el ensamblaje del virión. Vpu se encarga de liberar la cubierta viral, desencadenando la degradación de las moléculas de CD4 unidas con Env.

Vpu también incrementa la liberación de VIH desde la superficie de una célula infectada. En ausencia de Vpu, puede observarse un número alto de viriones agregados a la superficie de la célula infectada.

* Vif: es un polipéptido de 23 KDa, esencial para la replicación de VIH en los linfocitos de sangre periférica, macrófagos y algunas líneas celulares. En muchas líneas celulares Vif no es imprescindible y, por ello, se denominan como permisivas para VIH-mutantes de Vif. Los viriones producidos en estas condiciones pueden infectar a células no permisivas aunque los virus resultantes no son infectivos. Diversos estudios indican que es posible complementar la infectividad de estos mutantes de Vif mediante su expresión en las células productoras pero no en la diana. Estos resultados indican que Vif debe estar presente durante el ensamblaje del virión siendo incorporada a posteriori. Este fenómeno, sin embargo, no es específico porque Vif es también incorporada a retrovirus heterólogos como los virus de la leucemia murina. Los VIH sin Vif pueden entrar en las células pero no sintetizan eficazmente el ADN proviral. No está claro si el defecto en Vif afecta directamente a la retrotranscripción, a la desestructuración del virus o a la estabilidad del complejo nucleoproteico viral. Los viriones mutantes de Vif tienen cores con nucleoproteínas empaquetadas erróneamente como revelan los análisis de microscopía electrónica ¹²⁵.

Regulación de la expresión génica de VIH.

La regulación de la expresión génica de VIH es llevada a cabo por una combinación de factores celulares y virales. Se produce a niveles tanto pre como post-transcripcionales.

Los genes del VIH se dividen en genes tempranos y genes tardíos. Los genes tempranos (tat, rev, nef) se expresan a través de un proceso Rev-independiente. Los ARNm que codifican para genes tardíos (gag, pol, env, vpr, vpu, vpi) requieren de Rev para ser localizados citoplasmáticamente y poder ser expresados.

* Regulación de la transcripción: como ya se ha comentado, el LTR de VIH contiene sitios de unión a ADN para múltiples factores de transcripción. Los más directamente implicados en la regulación de la transcripción de VIH son aquellos pertenecientes a la familia NF-κB. La proteína NF-κB permite al virus ser el responsable del estado de activación de la célula T infectada. La estimulación del TCR provoca que la forma inactiva de NF-κB (localizada en el citoplasma) sea translocada al núcleo donde induce la expresión de una serie de genes específicos relacionados con la activación de la célula T. La NF-κB y la consiguiente activación de la transcripción del provirus puede también ser inducida por las citocinas TNF-α e IL-1. Este fenómeno podría ser de interés en la patogenia del SIDA. Por una parte, la activación fisiológica de una célula T latente infectada puede ser el modo en el que la latencia finaliza y comienza la producción del virus. Por otra, las múltiples infecciones que sufren los pacientes con SIDA suponen una elevada expresión de TNF pudiendo éste estimular la producción de VIH y la infección de más células.

El LTR de VIH también contiene sitios de unión para los factores de transcripción constitutivos Sp-1, Lef y Ets así como para los factores de transcripción inducibles NF-AT y AP-1. Es sabido que Lef y NF-At son factores específicos de las células T mientras que los sitios de unión para Sp-1 son esenciales para el eficaz funcionamiento del promotor del VIH.

La activación inicial del LTR del VIH es una consecuencia de los factores de transcripción constitutivos e inducibles celulares. La activación del LTR por factores de transcripción conduce a la generación de transcritos cortos. En el proceso interviene un elemento localizado justo después (downstream) del sitio de iniciación de la transcripción conocido como "inductor de transcritos cortos" (IST).

Sin embargo, se generan también algunos transcritos completos que permiten la producción de Tat. La proteína Tat interacciona entonces con TAR para incrementar inmediatamente los niveles de transcripción del ARN viral.

* Splicing del ARNm y localización celular: el transcrito primario de VIH contiene múltiples donadores (5' splice sites) y aceptores (3' splice sites) de splicing que pueden procesarse dando lugar a más de 30 ARNm alternativos. La mayoría de los ARNm son policistrónicos conteniendo ORF de más de una proteína. Estos ARNm expresan generalmente un solo producto génico. La elección de un determinado ORF está gobernado por la eficacia del codón de iniciación y de la proximidad de este codón al extremo 5' del ARNm.

Los ARNm de VIH producidos pueden ser clasificados en tres clases:

1. ARN sin procesar: el transcrito primario no sometido a splicing de 9 Kb puede ser expresado para generar los precursores de Gag y Gag-Pol o bien empaquetado en los viriones sirviendo entonces como ARN genómico.

2. ARN sometido a splicing incompleto: estos ARNm usan el sitio donador de splice cercano al extremo 5' de ARN genómico del VIH en combinación con cualquiera de los aceptores localizados en la región central del virus. Estos ARN pueden expresar en potencia Env, Vif, Vpu, Vpr y Tat (isoforma de un exón). Todos ellos retienen el segundo intrón del VIH.

3. ARN sometido a splicing completo: en ellos se han eliminado los dos intrones de VIH y pueden expresar Rev, Nef y Tat (isoforma de dos exones). Estos ARNm no requieren la expresión de la proteína Rev.

Como norma general, los ARN que contienen intrones deben ser sometidos a splicing completo antes de que puedan salir del núcleo. Esta regulación es esencial ya que previene la traducción de secuencias intrónicas contenidas en los ARNm con splicing parcial. En el caso de VIH, la proteína Rev une al ARN viral y retiene las secuencias intrónicas dirigiendo su exportación desde el núcleo. Esta estrategia permite la salida del núcleo de ARNm parcialmente procesados, portando secuencias intrónicas. Los ARNm totalmente procesados dejan el núcleo a través

de los mecanismos habituales de transporte. En cualquier caso, es necesario la existencia de unos niveles mínimos de Rev para que se produzca la salida nuclear de ARNm con intrones lo que explica el porqué éstos codifican para productos génicos virales tardíos. En contraste, las proteínas codificadas por los ARNm totalmente procesados (Nef, Tat y Rev) pueden producirse inmediatamente y son por ello productos génicos virales precoces.

Variabilidad del VIH.

La secuenciación del genoma de diferentes VIH aislados, procedentes de diversas regiones han demostrado una amplia divergencia. El VIH-1 puede ser dividido al menos en 9 subtipos genéticos (A-J y O). En Europa y USA hay dominancia del subtipo B mientras que en otras partes del mundo predominan otros subtipos solos o en combinación. Se sabe que existen diferencias en cuanto a los diferentes subtipos se refiere; así, los subtipos B parecen transmitirse de forma diferente que los B pudiendo causar epidemias con características diferenciadas. Los subtipos A y E parecen ser más eficaces en la transmisión heterosexual pudiendo causar nuevas y severas epidemias tanto en países del primer mundo como en aquéllos en vías de desarrollo.

El mecanismo de generación de la variabilidad de VIH-1 es similar a la de otros retrovirus. La falta de función correctora en las enzimas virales y celulares implicadas en la replicación viral lleva a tasas altas de error con la continua generación de variantes (aproximadamente 3×10^{-5} por base y por ciclo de replicación). Las mutaciones incorporadas por la RT retroviral incluyen sustituciones de aminoácidos, mutaciones frameshift (cambio pauta de lectura) y deleciones. Junto a ello, parece que la transcripción inversa puede conducir a provirus hipermutados que contienen múltiples sustituciones G--A. Además, es posible variaciones en el genoma viral a través de recombinación entre las dos moléculas de ARN viral ^{138,139} durante la síntesis de ADN.

Se sabe que la variabilidad genética del VIH-1 afecta más a unos genes que a otros. Parece claro que el gen env es el que presenta el mayor número de mutaciones. El análisis bioquímico profundo ha demostrado que no sólo se conservan más los genes como gag o pol sino que los tipos de nucleótidos y aminoácidos de esas regiones son distintos a los encontrados en la envoltura ¹⁴¹. En gag y pol la mayoría de los cambios de las secuencias de nucleótidos se deben a mutaciones puntuales mientras que en la envoltura existen agrupaciones de cambios que afectan a deleciones en tramas, inserciones y duplicaciones. En la envoltura es frecuente encontrar mutaciones de un solo nucleótido que dan lugar a mutaciones no silentes. A pesar de esta extrema variabilidad del gen env del VIH-1, existen regiones muy conservadas que previsiblemente desempeñan importantes funciones biológicas. Las 18 cisteínas localizadas en la región extracelular de la envoltura y la mayoría de las localizadas en la gp41 están conservadas en casi todos los virus. Este hallazgo respalda la teoría de que las cisteínas son necesarias para mantener la envoltura con una configuración estructural tridimensional adecuada.

Existen también otras regiones muy conservadas, identificadas como C-1 a C-4, entremezcladas con regiones de hipervariabilidad (V1-V5) en la región de la envoltura extracelular.

Durante la infección crónica activa, la continua propagación de altos niveles de virus lleva a muchos ciclos de replicación y a la generación de un enorme número de variantes. La selección de variantes antigénicas y de mutantes resistentes a drogas es fácil en estas condiciones.

Existen pruebas suficientes que indican que la variación genotípica del VIH-1 in vivo es rápida y amplia, que numerosas variantes de formas viricas coexisten en el tiempo dentro del mismo enfermo y que los cultivos de VIH-1 consisten realmente en mezclas complejas de virus genotípicamente distintos aunque emparentados. Sin duda la diversidad genómica del VIH-1 es uno de los mayores obstáculos actuales en la obtención de terapias efectivas.

VIH-2.

Antigénicamente, el virus VIH-2 sólo presenta reacciones cruzadas con el VIH-1 en la proteína p24/p25 y de forma ligera con Pol mientras que guarda más semejanzas con el SIV de macaco. Entre el SIV y VIH-2 existe una homología en la secuencia de nucleótidos de alrededor del 75% mientras que entre VIH-2 y VIH-1 sólo es del 40%.

Como sucede con el VIH-1, el VIH-2 es un retrovirus, posee ARN como genoma, está limitado por secuencias LTR terminales redundantes y contiene los genes gag, pol y env. Existen 6 genes más (tat, rev, nef, vif, vpr y vpx) estando todos relacionados con los del VIH-1 salvo el vpx que sustituye al vpu. La mayor similitud entre ambos subtipos es a nivel de las proteínas del core (Gag, Pol) lo que explicaría la reactividad cruzada entre ambos virus.. Tiene un ciclo biológico similar al VIH-1 infectando de la misma forma a células que presenten CD4.

A pesar de todo, ambos tipos causan síndromes clínicos similares. Es interesante señalar la existencia de algunas publicaciones en las que se muestran datos sobre la menor patogenicidad de los grupos de virus VIH-2

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El VIH-2 produce una inmunodeficiencia, pero el periodo existente entre la infección y el estadio de sida es bastante más largo que para el VIH-1, posiblemente debido a una menor carga vírica. La infección por el VIH-2 puede cursar con diarrea crónica, candidiasis, criptosporidiosis, meningitis meningocócica e infecciones bacterianas recurrentes. La muerte se suele producir por septicemia, toxoplasmosis cerebral, meningoencefalitis, etc. Se encuentra menos asociado con la tuberculosis que el VIH-1, y las infecciones focales por el citomegalovirus humano, como la encefalitis o la colangitis, son menos graves. El sarcoma de Kaposi, que es una enfermedad endémica en el centro y este de África, no parece asociarse con la infección por el VIH-2.

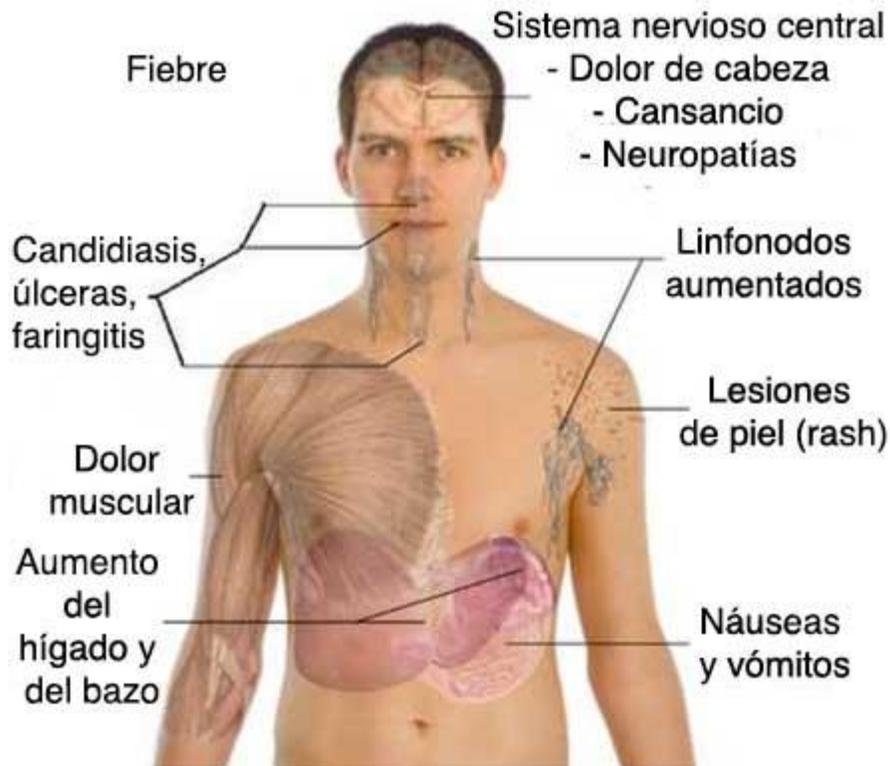
En resumen, podemos decir que aunque puede ocasionar una inmunodeficiencia, presenta una menor patogenicidad, una menor destrucción de CD4, una carga viral más baja y una progresión más lenta hacia etapas avanzadas de sida.

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-2 El reconocimiento de la infección por el VIH-2, sólo puede establecerse de modo definitivo por métodos de laboratorio, ya que las manifestaciones clínicas, aunque sugestivas, no son específicas en ningún estadio de la enfermedad. Para el diagnóstico se utilizan técnicas directas que detectan la presencia de partículas víricas o antígenos del virus, y técnicas indirectas que persiguen demostrar la presencia de anticuerpos específicos frente al VIH-2. Se deben utilizar técnicas que permitan diferenciar infecciones por uno u otro tipo de VIH, e infecciones dobles.

Tabla 2. Clasificación de las técnicas diagnósticas en la infección por VIH-2.

Métodos directos	Métodos indirectos (Detección de anticuerpos específicos)
Cocultivo	Pruebas de cribado: EIA VIH-1+2
Detección de ácidos nucleicos: DNA proviral RNA vírico	Pruebas de confirmación y complementarias: <i>Western blot</i> de VIH-1 + gp36 de VIH-2 <i>Western blot</i> de VIH-2 LIA de VIH1+2

SÍNTOMAS DE LA INFECCIÓN AGUDA POR EL VIH



Diagnostico

Diagnóstico serológico

La investigación de anticuerpos en suero es la metodología habitual para identificar a los sujetos infectados por el VIH-2. Debido a la similitud antigénica entre ambos tipos de virus, en ocasiones puede ser difícil establecer el diagnóstico de infección utilizando exclusivamente pruebas serológicas. Para la detección de anticuerpos se pueden utilizar diferentes pruebas, tanto de cribado como confirmatorias, ya que, al igual que sucede con la infección por el VIH-1, para demostrar la condición de seropositivo se necesita la reactividad repetida mediante técnicas de cribado y pruebas confirmatorias.

a) Pruebas de cribado Se utilizan habitualmente técnicas de enzimo inmunoensayo (EIA), que poseen una buena sensibilidad, son de fácil realización y con grandes posibilidades de automatización. Las técnicas de EIA que se utilizan habitualmente en el diagnóstico de la infección por el VIH-2, desde su aprobación en 1991 por la Federal Drug Administration norteamericana, son pruebas mixtas que utilizan péptidos de 10 a 40 aminoácidos como antígenos, tanto del VIH-1 como del VIH-2, obtenidos por ingeniería química o recombinación genética. En su diseño, y para evitar falsos positivos por reacciones cruzadas de ciertos anticuerpos con la gp36, hay que elegir un epítipo inmunorreactivo específico de la gp36. Las técnicas que se utilizan con más frecuencia son EIA de tipo sandwich (de tercera generación) y EIA indirecto. Las pruebas de tercera generación permiten detectar anticuerpos tanto de clase IgM como de clase IgG, lo cual explica su mayor sensibilidad, fundamentalmente en seroconversiones, aunque no se conoce su sensibilidad respecto a cada una de las variantes del VIH-2. Existe también una prueba de ELISA que detecta exclusivamente anticuerpos frente a un péptido sintético de 11 aminoácidos del epítipo inmunodominante de la glucoproteína de transmembrana (gp36) de la envoltura del VIH-2 y que posee una buena sensibilidad y especificidad.

b) Pruebas de confirmación Todo resultado positivo debe de ser confirmado con técnicas de mayor especificidad, pero de mayor complejidad, como es el western blot (WB), que permite diferenciar que existen anticuerpos en el suero problema frente a los distintos antígenos víricos. Debido a la existencia de un gran número de reacciones cruzadas entre el VIH-1 y el VIH-2, se deben seguir las recomendaciones correctas de interpretación, para evitar falsos positivos frente al VIH-2 en infecciones producidas por el VIH-1, o bien diagnosticar infecciones dobles por el VIH-1 y el VIH-2 por existencia de reacciones cruzadas. Para confirmar la infección por el VIH-2, se puede utilizar dos tipos de WB: uno de ellos detecta anticuerpos específicos frente a todas las proteínas del VIH-1 obtenidas por cultivo viral, y además los anticuerpos elaborados frente a la gp36 o proteína transmembranaria del VIH-2, que se incorporan en un extremo diferenciado de la tira como péptido sintético del VIH-2. La otra alternativa es utilizar un WB que detecte exclusivamente anticuerpos frente al VIH-2, partiendo por tanto de un cultivo infectado por dicho virus. La Organización Mundial de la Salud, debido a la existencia de reacciones cruzadas entre los anticuerpos del VIH-1 y VIH-2 dirigidos frente a las proteínas internas, ha propuesto como criterio de positividad la presencia por lo menos de dos bandas de envoltura con o sin otras bandas de core. Para su correcta interpretación se deben tener en cuenta una serie de consideraciones:

- Puede existir también reactividad cruzada con anticuerpos dirigidos frente a la envoltura de ambos virus, que se puede solucionar con diluciones, o realizando una amplificación específica del VIH-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- La glucoproteína de transmembrana gp36 tiene tendencia a formar oligómeros y, en el WB, puede simular reactividad frente a otras glucoproteínas de envoltura, especialmente gp105.
- Las glucoproteínas de envoltura son las que se fijan de forma más deficiente en el WB, no siendo infrecuente que algunas muestras de sujetos infectados sean informadas como indeterminadas.
- Asimismo, dichas glucoproteínas son las que están sujetas a una mayor variabilidad genética y, por ello, las tiras del WB preparadas con el sobrenadante del cultivo de una determinada variante del VIH-2 pueden no reconocer adecuadamente los anticuerpos dirigidos frente a otra diferente.

c) Pruebas complementarias

Debido a la menor eficiencia del WB para distinguir adecuadamente los anticuerpos frente a ambos tipos de virus, en los últimos años se ha sugerido que podrían utilizarse otro tipo de pruebas complementarias para la confirmación y diferenciación de las infecciones por cada uno de ellos. Estas pruebas diseñadas con péptidos sintéticos y proteínas recombinantes, son menos costosas, más fáciles de interpretar, y tienen una gran sensibilidad y especificidad, lo cual permite considerar su uso como prueba de confirmación. El mayor inconveniente de las pruebas con péptidos sintéticos son los resultados falsos negativos, sobre todo en las infecciones agudas y en las pediátricas. Pueden ser usadas como pruebas confirmatorias en sujetos con prácticas de riesgo y es un método bueno para resolver resultados indeterminados y para reconocer infecciones que pasarían desapercibidas con otros métodos. En la figura 2, se refleja el algoritmo diagnóstico para la infección por el VIH-2.

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR VIH. CDC/OMS, 1987

Grupo I: Infección aguda.

Grupo II: Infección asintomática.

Grupo III: Linfadenopatía generalizada persistente.

Grupo IV: Otras enfermedades:

Subgrupo A: Enfermedad constitucional.

Subgrupo B: Enfermedad neurológica.

Subgrupo C: Enfermedad infecciosa secundaria

Categoría C1: Enfermedad infecciosa especificada en la definición SIDA de los CDC.

Categoría C2: Otras enfermedades infecciosas secundarias.

Subgrupo D: Cánceres secundarios.

Subgrupo E: Otras condiciones.

Diagnóstico por Microbiología Molecular

Para demostrar la infección por el virus que nos ocupa, ya sea aislado o en infecciones duales con el VIH-1, es necesario el aislamiento en cocultivo del VIH-2 o la demostración de DNA proviral en células mononucleares de sangre periférica. El aislamiento en cocultivo es muy difícil, y además la carga proviral en el caso del VIH-2 es sensiblemente inferior a la del VIH-1, quizás porque existe menor número de linfocitos CD4 infectados. Esto explica que, incluso mediante una PCR nested, no se detecte el ácido nucleico en algunos pacientes que realmente están infectados. En la actualidad, mediante técnicas ultrasensibles se detecta entre el 95 y el 98% de los pacientes que están infectados por el VIH-2 aislado. La viremia por este virus, a diferencia de lo que ocurre con el VIH-1, es frecuentemente indetectable, incluso en pacientes con bajos recuentos de CD4 y avanzada progresión de la enfermedad. La realidad es que la confirmación mediante técnicas de biología molecular no se puede asegurar en el 100% de las infecciones por el VIH-2. En la actualidad no disponemos de técnicas aprobadas por la FDA para el diagnóstico molecular de este virus. Esto hace que los trabajos en los que se describen métodos para la detección del genoma (RNA) o del ADN proviral se hayan realizado con métodos muy diversos, a menudo de desarrollo en el propio laboratorio, de escasa reproducibilidad e insuficientemente estandarizados. Si a esto, sumamos el escaso número de pacientes que se incluyen en las series descritas hasta el momento, debemos concluir que los resultados presentados se deben interpretar con mucha precaución.

TRATAMIENTO

El VIH-2 es sensible a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (NRTI) in vivo e in vitro, aunque parece que lo es en menor medida que el tipo1. Se ha comprobado que el uso del tenofovir intravenoso dentro de las primeras 36 h después de la exposición intravaginal al VIH-2 (en un modelo animal) es una medida eficaz de profilaxis post exposición. Sin embargo, este virus no es sensible a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (NNRTi) debido a la presencia de mutaciones específicas localizadas en el bolsillo de unión de estos fármacos con la enzima transcriptasa inversa viral. En un estudio realizado por Rodés (2000) en 12 cepas aisladas de pacientes infectados por el VIH-2 no tratados (naïve) con NNRTi, se observó, al menos, una mutación de las relacionadas con la resistencia a estos fármacos en el VIH-1 y, la mayoría, presentaban dos mutaciones, siendo las V106I, Y181I, Y188L y G190A las más frecuentemente encontradas. Parece que el VIH-2 es sensible a los inhibidores de la proteasa (IP) in vitro. Al igual que ocurre en el VIH-1, el VIH-2 es capaz de desarrollar mutaciones de resistencia a los antirretrovirales bajo la presión farmacológica. Existen una serie de limitaciones para valorar la sensibilidad antiviral del VIH-2. De una parte, como ya se ha citado, hay serios problemas para monitorizar la viremia plasmática por el VIH-2; además, la mayoría de los pacientes infectados por el VIH-2 viven en el oeste de África, en países en los que el tratamiento antiviral no está ni siquiera instaurado para el VIH-1. Todavía no podemos aclarar cuál es el momento en que se debe iniciar el tratamiento, cómo y cuándo se debe monitorizar la respuesta y qué pacientes serán candidatos a la realización del ensayo de resistencias genotípicas; además, para estos aspectos, no se pueden extrapolar los conocimientos adquiridos sobre VIH-1. El tratamiento de las infecciones oportunistas asociadas a la infección por el VIH-2 es similar al que está descrito para los pacientes infectados por el VIH-1, con la diferencia de que en los infectados por el primero el tratamiento parece ser más eficaz. Al igual que en la infección por el VIH-1, la cifra de CD4 va a ser el punto de referencia para la instauración de la correcta profilaxis de las infecciones oportunistas.

3. BIOLOGIA MOLECULAR DE HCV (VIRUS DE HEPATITIS C)

La hepatitis C es una enfermedad causada por el virus de la hepatitis C y es la principal causa de cirrosis y trasplante hepático en el mundo occidental. Se estima que el 3% de la población mundial está infectada por este virus. La mayoría de las infecciones son asintomáticas y cuando se manifiestan aparecen síntomas inespecíficos como fatiga, náusea, mialgias y fiebre, que pueden hacer difícil el diagnóstico inicial. En la progresión de la enfermedad la etapa crónica participan factores relacionados con el virus, el hospedero y también algunos factores externos. El hallazgo de unas pruebas de laboratorio anormales o signos de cirrosis debe hacer pensar en una hepatitis C. Para el diagnóstico se dispone de pruebas serológicas y virológicas; las serológicas detectan anticuerpos contra el virus, en tanto que las virológicas detectan el RNA viral. La gran variedad de cuasiespecies (grupo de virus mutantes) y la variabilidad del virus de la hepatitis C no han permitido hasta ahora la síntesis de una vacuna que brinde protección.

Genes alterados

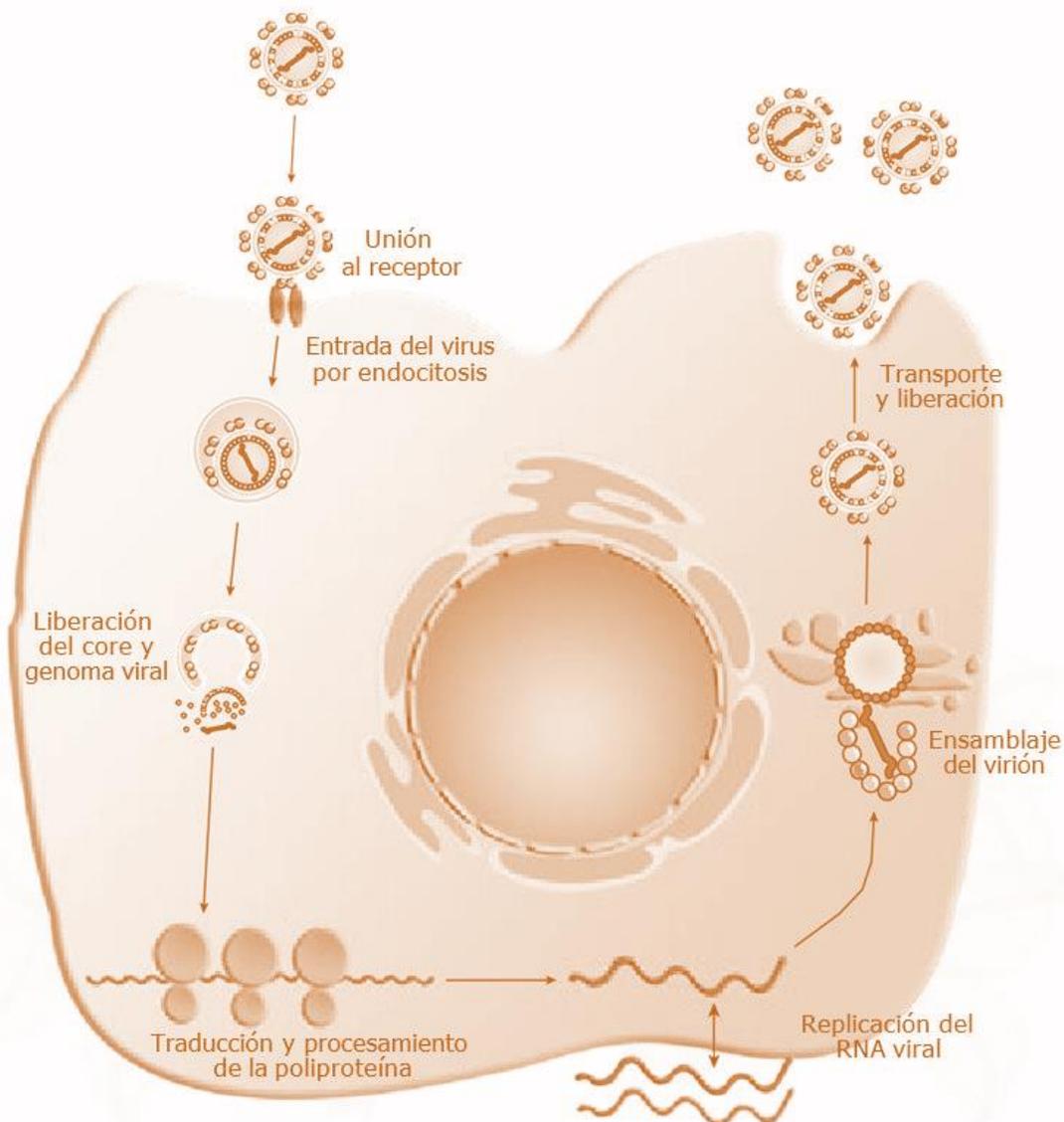
El virus de la hepatitis C es un virus RNA de cadena simple positiva, envuelto, que pertenece a la familia Flaviviridae y al género Hepacivirus. Se conocen seis genotipos que muestran una variación en su secuencia de nucleótidos de 30% a 35%, que se nombran del 1 al 6, y que muestran capacidad diferente de producir infección persistente y causar daño hepático, así como respuesta diferente a los anticuerpos neutralizantes cruzados y a los medicamentos antivirales. Dentro de cada genotipo hay más de 50 subtipos que se denominan a, b, c, d, y así sucesivamente, y dentro de cada individuo infectado se encuentran cuasiespecies, representando la gran heterogeneidad genética de este virus dada por la enzima RNA polimerasa viral que no corrige los errores durante la replicación del genoma viral, y la cual dificulta el desarrollo de una vacuna efectiva.

La partícula viral tiene forma esférica, con un diámetro aproximado de 40 nm a 70 nm. Su genoma está en el interior de una cápside icosaédrica, tiene una longitud de 9.600 pares de bases y codifica para una poliproteína única que se procesa mientras es traducida en al menos 10 proteínas, incluidas las proteínas estructurales (core, E1 y E2) y las no estructurales como la enzima RNA polimerasa viral.

Replicación viral

El virus de la hepatitis C solo infecta en forma natural al hombre. Aunque los hepatocitos son el principal blanco del virus, éste también puede infectar otras células, como los linfocitos B y las células dendríticas, entre otras. Similar a lo que ocurre con el virus de la hepatitis B, el virus no es directamente citopático y es la respuesta inmune del hospedero la responsable de las manifestaciones clínicas.

El ciclo de vida del virus comienza con su adhesión al receptor que les permite la entrada a las células por endocitosis. Luego se fusiona la membrana de la endosoma y se libera el genoma viral al citoplasma celular. Como ocurre con los virus RNA de cadena positiva, el genoma del virus de la hepatitis C actúa como RNA mensajero y comienza la traducción y producción de la poliproteína, que es segmentada por proteasas para generar las proteínas estructurales y no estructurales. Posteriormente se replica el RNA y comienza el ensamblaje de las nuevas partículas virales en el retículo endoplásmico, y finalmente son transportadas y liberadas fuera de la célula por exocitosis.



Características clínicas de infección

Históricamente, la hepatitis C se ha considerado una enfermedad silenciosa y la mayoría de las personas con la infección aguda no presentan manifestaciones clínicas. Sin embargo, los pacientes con una infección crónica establecida pueden ser sintomáticos debido al progreso de la enfermedad hepática.

Tabla 2. Principales manifestaciones extrahepáticas de la hepatitis C [63]	
Órgano o sistema	Manifestaciones
Hematológico	Crioglobulinemia mixta esencial Púrpura trombocitopénica idiopática Linfoma no Hodgkin de células B
Endocrino	Disfunción tiroidea (hipotiroidismo e hipertiroidismo) Diabetes
Renal	Glomerulonefritis
Dermatológico	Porfiria cutánea tarda Liquen rojo plano Eritema nodoso Eritema multiforme Malacoplaquia Síndrome de Behcet Urticaria Vasculitis cutánea necrosante Prurito Psoriasis
Salival	Sialoadenitis
Ocular	Úlcera corneal de Mooren
Diversos	Uveítis Fibrosis pulmonar y vasculitis pulmonar Cardiopatía hipertrófica Poliarteritis nodosa Síndrome antifosfolípido y anticuerpos anticardiolipina

Hepatitis aguda

El período de incubación de la hepatitis C puede variar entre 2 y 26 semanas, con un promedio de 7 semanas, y solo el 20% desarrollan un cuadro clínico de hepatitis aguda con ictericia, dolor en hipocondrio derecho, mialgias, vómito y fiebre, usualmente entre las 2 y 12 semanas posteriores a la infección. Estas manifestaciones clínicas son indistinguibles de las causadas por hepatitis A o B aguda. Algunos estudios han encontrado que el virus de la hepatitis C puede explicar entre el 12% y 16% de las hepatitis agudas en Estados Unidos. Otros estudios han mostrado que la infección aguda se resuelve de manera espontánea en el 15% al 25% de los infectados, quienes usualmente son de raza blanca, con ictericia y bajos niveles de viremia. En cuanto al 75% al 85% restante de los infectados en forma aguda, éstos desarrollan viremia persistente y la mayoría permanecen asintomáticos, aunque una gran parte de ellos empiezan a mostrar cambios bioquímicos e histológicos compatibles con la progresión de la enfermedad. La falla hepática es una presentación inusual; sin embargo, en un estudio realizado en Italia se encontró que la mortalidad por hepatitis C aguda entre 1995 y 2000 fue del 0,1%, comparada con el 0,01% causada por la hepatitis A, pero menor que la causada por hepatitis B, del 0,4%. En nuestro medio ya se han descrito casos de hepatitis aguda por virus de la hepatitis C.

Hepatitis crónica y cirrosis hepática

La mayoría de los pacientes con infección crónica son asintomáticos o solo presentan síntomas leves o inespecíficos. La queja más frecuente es la fatiga; otras manifestaciones menos comunes

incluyen náuseas, anorexia, mialgias, artralgias, debilidad y pérdida de peso. Los síntomas raramente son incapacitantes y pueden ser difíciles de atribuir a enfermedad hepática solamente y no a otras enfermedades como la depresión. Estos síntomas pueden ocasionar una disminución en la calidad de vida. Algunos pacientes infectados pueden desarrollar la enfermedad hepática severa después de pocos años, pero la mayoría la desarrollan luego de varias décadas; sin embargo, prácticamente todos los individuos infectados presentan anomalías histológicas.

Muchos casos de hepatitis C crónica ocurren en personas sin antecedentes de hepatitis C aguda.

Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular es una complicación tardía de la hepatitis C crónica, que usualmente se presenta después de dos o tres décadas de infección persistente y en pacientes con cirrosis

previa. Los síntomas como fatiga, ascitis, ictericia y dolor en hipocondrio derecho aumentan en su severidad, y comienzan a aparecer niveles aumentados de

Los pacientes infectados por el virus de la hepatitis C, especialmente los que tienen cirrosis, presentan un riesgo mayor de desarrollar carcinoma hepatocelular.

alfafetoproteína sérica. La mayor parte de las muertes por carcinoma hepatocelular en Estados Unidos ocurre por carcinoma hepatocelular asociado a hepatitis C crónica. El riesgo parece ser mayor con el genotipo 1b comparado con otros genotipos. En contraste con la infección por virus de la hepatitis B, el carcinoma hepatocelular en pacientes con hepatitis C se produce casi exclusivamente en aquellas personas que han desarrollado cirrosis, sugiriendo que la cirrosis es el principal factor de riesgo. No obstante, hay estudios que reportan que la infección por sí misma, por el virus de la hepatitis C, puede promover el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

DIAGNOSTICO MOLECULAR:

Pruebas de laboratorio

Las pruebas para evaluar la infección por el virus de la hepatitis C pueden hacerse en varias circunstancias:

- 1) para hacer el diagnóstico clínico en un paciente con signos y síntomas o con pruebas alteradas de función hepática;
- 2) para evaluar los pacientes con hepatitis C durante el tratamiento; y,
- 3) para tamizar e identificar personas infectadas con el virus de la hepatitis

C. Para ello se dispone de pruebas serológicas y pruebas virológicas. Como se sabe que hay un número importante de personas infectadas con este virus, pero que son asintomáticas y no han sido diagnosticadas, debe hacerse tamización para los factores de riesgo y hacer las pruebas en los individuos que se consideren con riesgo.

Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas, usualmente por inmunoensayo enzimático o quimioluminiscencia, detectan anticuerpos contra el virus. Se utilizan antígenos recombinantes adheridos a microplatos o micropartículas, dependiendo de la técnica, para capturar los anticuerpos circulantes contra el virus. Se usan para la tamización y diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C. La especificidad de estas pruebas es mayor del 99%, pero en ocasiones pueden arrojar resultados falsos positivos, por lo cual se recomienda siempre hacer una prueba virológica confirmatoria, en particular en los pacientes con niveles normales de ALT

Pruebas virológicas

Las pruebas virológicas que detectan el RNA VHC, pueden ser cualitativas o cuantitativas (que detecten la carga viral en un momento dado). Se basan usualmente en la técnica de PCR en tiempo real y pueden detectar desde 50 UI/mL. Estas pruebas también tienen una alta especificidad, mayor del 98%, y su principal

uso es en el monitoreo de la respuesta al tratamiento antiviral; para esto es importante utilizar siempre la misma técnica y preferiblemente, el mismo laboratorio. La genotipificación por su parte, debe hacerse antes de iniciar el tratamiento, ya que determina su indicación, la duración y dosis del mismo, y el procedimiento para monitorear el tratamiento.

Interpretación de las pruebas serológicas y virológicas

Los anticuerpos no comienzan a hacerse visibles antes de las 8 a 12 semanas y su hallazgo no permite diferenciar entre infección aguda, crónica o resuelta. El periodo de ventana con las pruebas inmunoenzimáticas de segunda y tercera generación se reduce a 70 días y con las pruebas moleculares a 12. Es importante tener en cuenta que, en algunas situaciones, por ejemplo en pacientes inmunosuprimidos, puede haber resultados negativos en la prueba de anticuerpos aunque existan viriones circulantes e infección actual.

El paso que se debe seguir luego de un resultado positivo en la prueba serológica, es definir si existe una infección actual, para lo cual se usa la detección del genoma viral. Un resultado negativo indica que no existe RNA viral circulante y que la infección, probablemente, está resuelta. Para poder diagnosticar con certeza dicha resolución se debe obtener una segunda prueba negativa seis meses después, porque cuando la infección se vuelve crónica puede haber desaparición transitoria del RNA viral durante varias semanas; además, durante el curso de la infección crónica, o sea, aquella en la que persiste el RNA viral por más de seis meses, es posible que éste se detecte solo de manera intermitente. Si por el contrario la prueba es positiva, indica que existe RNA viral circulante y que el paciente está infectado; para diferenciar entre la infección aguda y la crónica, es necesario recurrir a la historia clínica; sin embargo, hay que recordar que el episodio de infección aguda por el virus de la hepatitis C es asintomático en la mayoría de los casos, por lo que no resulta sencillo.

Durante las fases tempranas de la infección, cuando no se han producido aún los anticuerpos, el resultado de las pruebas serológicas será negativo a pesar de existir infección actual y RNA VHC circulante (viremia positiva); por ello, para el diagnóstico de infección aguda por el virus de la hepatitis C es de mayor utilidad la detección del genoma viral, que es posible a partir de la primera a segunda semana después de la infección, esto es, unas seis semanas antes de que sea posible detectar los anticuerpos. Para propósitos diagnósticos se recomienda hacer la detección cualitativa del RNA viral (viremia), por ser más sensible que las pruebas cuantitativas (carga viral).

El estudio de la carga viral y la genotipificación del virus se reservan para el momento de tomar decisiones terapéuticas. La carga viral, que es la cuantificación del RNA VHC circulante, se debe expresar de preferencia en UI/mL, aunque también puede hacerse en número de copias/mL. La técnica más utilizada para esto es la PCR en tiempo real por su alta sensibilidad; se la define como elevada cuando tiene un valor superior a 800.000 UI/mL. Sin embargo, se debe tener presente que la carga viral en un individuo infectado tiene grandes fluctuaciones en un día, lo que la convierte en un marcador poco confiable de progresión y por lo tanto se recomienda solo para el seguimiento durante el tratamiento.

Es también importante llevar a cabo la genotipificación antes de iniciar el tratamiento, porque puede condicionar una respuesta terapéutica diferente: solo el 40% a 50% de las personas infectadas con los genotipos 1 ó 4 tienen una respuesta virológica sostenida (resultado negativo de la carga viral seis meses después de suspenderse el tratamiento antiviral), comparado con el 80% de los pacientes infectados con los genotipos 2 ó 3.

Tabla 3. Interpretación de los resultados de las pruebas serológicas y virológicas para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C [64]

Serológicas	Virológicas	Interpretación
Positiva	Positiva	Infección aguda o crónica
Positiva	Negativa	Infección resuelta
		Infección con nivel indetectable de RNA VHC Falso positivo de la prueba serológica
Negativa	Positiva	Infección aguda temprana
		Infección crónica en pacientes inmunosuprimidos Falso positivo de la prueba virológica
Negativa	Negativa	No hay infección

TRATAMIENTO:

El tratamiento de primera línea de la hepatitis C crónica se basa en el uso de cualquiera de los dos interferones (IFN) pegilados que se encuentran en el mercado, administrados semanalmente, por vía subcutánea, en compañía de ribavirina.

El IFN pegilado alfa 2a se debe utilizar en una dosis de 180 microgramos una vez por semana, mientras que el IFN pegilado alfa 2b debe ser utilizado en una dosis basada en el peso de 1,5 g/kg por semana. La dosis de ribavirina depende del genotipo del virus, de ahí la importancia de genotipificar el virus antes de comenzar el tratamiento.

Los pacientes infectados con los genotipos 1 y 4 deben recibir una dosis de ribavirina basada en el peso: 15 mg/kg de peso corporal día, en tanto que los pacientes infectados con los genotipos 2 y 3 pueden ser tratados con una dosis fija de 800 mg de ribavirina diariamente, pero aquellas personas con un índice de masa corporal (IMC) mayor de 25 kg/m² o que tienen factores que sugieran una baja respuesta (resistencia a la insulina, síndrome metabólico, fibrosis severa o cirrosis, mayor edad) deben recibir una dosis de ribavirina basada en el peso, de manera similar a los genotipos 1 y 4. Un estricto control de la natalidad debe ser aplicado en pacientes tratados con IFN pegilado y ribavirina durante la terapia y en los seis meses siguientes.

Se han logrado importantes avances en el desarrollo de nuevos tratamientos, en particular con nuevos inhibidores específicos de las proteínas no estructurales NS3, NS5A y NS5B polimerasa, con inhibidores de ciclofilina, nuevas formas de interferón, otros medicamentos derivados de ribavirina, y algunas vacunas terapéuticas también están en curso. La mayoría de los estudios están dirigidos a los pacientes infectados con el genotipo 1 del virus de la hepatitis C.

Los resultados finales de los ensayos clínicos con la combinación de IFN pegilado, ribavirina y los inhibidores de proteasas del virus (telaprevir o boceprevir) han dado muy buenos resultados. Estos datos están conduciendo a la aprobación de una terapia triple en pacientes infectados con el genotipo 1 que están sin tratamiento previo o que hayan tenido respuesta a un curso previo de IFN pegilado y ribavirina.

Durante la síntesis de ADN, cada adición de un dNTP (desoxirribonucleósido trifosfato) libera un ión de hidrógeno que disminuye el pH de la solución. La disminución del pH es proporcional a la síntesis del ADN. Para la lectura visual de su RT-LAMP, Baek et al. utilizaron rojo fenol, que cambia el color de rosa (pH 8.8) a amarillo (pH ducto de iones pirofosfato que reaccionan con los 2+ iones Mg para formar el producto insoluble pirofosfato de magnesio. Dado que la concentra²⁺ ción de iones Mg disminuyen a medida que avanza la reacción de LAMP se mide la concentra²⁺ ción de iones de Mg como medida del progreso de la reacción. Para ello se utiliza azul de hidroxinaftol, en donde una reacción positiva se indica mediante un cambio de color de violeta a azul cielo. Algunos de los ensayos moleculares disponibles actualmente para detectar SARS-CoV-2 utilizan tecnología RT-LAMP en tiempo real, como la prueba ID NOW COVID-19 de Abbott. Y los kits de producción nacional ELA CHEMSTRIP COVID 19 y COVID-19 NEOKIT con tecnología RT-LAMP asociado a ensayos de flujo lateral.

Ensayos basados en Repeticiones Palindrómicas Cortas Intercaladas Regularmente Agrupadas (Cluster regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) El término CRISPR es el nombre de secuencias repetitivas presentes en el ADN de las bacterias, que funcionan como autovacunas. Contienen el material genético de los virus que han atacado a las bacterias en el pasado, de esta forma les permite reconocer la infección y así defenderse cortando el ADN de los invasores. En caso de una segunda infección CRISPR se transcribe y se procesa a ARN CRISPR (ARNcr), se acopla con Cas y reconoce el transcrito del patógeno y Cas degrada el ARNm.

Ciertas enzimas en las familias Cas9, Cas12 y Cas13 pueden programarse para atacar y cortar secuencias de ARN virales. Al diseñar y sintetizar un ARN guía, podemos usar la enzima Cas9 para cortar en un lugar específico de un genoma. Esta capacidad es significativa ya que abre la posibilidad de la edición directa del genoma, dentro de una célula. Dos tipos de proteínas Cas, Cas12 y Cas13 son particularmente útiles para desarrollar plataformas simples, portátiles y económicas para detectar de manera confiable los ácidos nucleicos a nivel molecular. Las técnicas CRISPR, que utilizan Cas12 y Cas13, se han incorporado a los enfoques de amplificación isotérmica para la detección de SARS CoV-2. La secuencia de direccionamiento CRISPR debe incluirse al diseñar cebadores para la amplificación de ARN de SARS- CoV 2.

La secuencia de reconocimiento CRISPR está dentro del amplicón amplificado y entre los cebadores. El complejo crRNA-Cas escanea amplicones y se une específicamente a aquellos con la secuencia diana complementaria. Al detectar el target, las proteínas Cas se activan para cortar la cadena de RNA por Cas13 o de DNA por Cas12. Las zonas de reconocimiento para CRISPR, son segmentos de ácidos nucleicos cortos, monocatenarios marcados doblemente con un fluoróforo y

un quencher, que pueden usarse como sustratos. La escisión de esta sonda separa el quencher del fluoróforo y permite detectar fluorescencia que se pueden cuantificar en tiempo real o visualizar bajo luz LED. Alternativamente, las sondas marcadas doblemente con biotina y FAM (Fluorescein amidite) se las usa para la detección en tiras reactivas (ensayo de flujo lateral). Las nanopartículas de oro (AuNP) en la tira de flujo lateral están recubiertas con anticuerpos anti-FAM para capturar FAM. En ausencia del target, la sonda marcada permanece intacta y es capturada por estreptavidina en la línea de control, lo que resulta en una acumulación de AuNP que genera una banda roja, indicando una prueba negativa.

En presencia del target de ARN del SARS-CoV-2, las ampliaciones activan la proteína Cas para escindir los indicadores de señal, lo que permite que se libere FAM y los AuNP adjuntos viajan a la línea de prueba, produciendo otra banda roja que indica una prueba positiva. Las sondas marcadas intactas que están en exceso también son capturadas en la línea de control.

La detección basada en CRISPR verifica las secuencias de los productos a partir de la amplificación isotérmica y solo produce señal cuando existen las secuencias correctas, lo que proporciona una mayor especificidad analítica que el uso de fluoróforos no específicos o indicadores de pH. Por otro lado un ensayo que usa solamente Cas12 o Cas13 no es lo suficientemente sensible como para detectar el ARN viral en las muestras. La amplificación isotérmica logra una amplificación exponencial en un corto período de tiempo, lo que supera esta limitación de la tecnología CRISPR en términos de sensibilidad analítica. Una de las plataformas de diagnóstico CRISPR pioneras, DETECTR, se ha utilizado con LAMP. Broughton y col. publicaron un protocolo usando DETECTR para las pruebas de SARSCoV-2, utilizaron RT-LAMP para amplificar el ARN de SARS-CoV-2 extraído, lo que condujo a la generación de productos de dsDNA. Los productos de dsDNA se detectaron usando la escisión colateral de reporteros por Cas12 y las tiras de flujo lateral se utilizaron para producir señales de lectura. El método fue capaz de detectar 10 copias de ARN de SARS-CoV-2 por microlitro de extracto de ARN. La amplificación y detección se puede lograr en 30 minutos, lo cual es particularmente valioso para las pruebas rápidas.

Ciclo de Replicación de los Coronavirus Los coronavirus entran a la célula blanco por medio del contacto con receptores celulares específicos. La interacción entre la proteína S y un receptor ubicado en la membrana celular dispara el proceso de entrada al citoplasma celular. El receptor para el virus SARS-CoV es la proteína ACE2 (Li et al. 2003).

Esta molécula es una proteína ubicada en la membrana celular con actividad carboxipeptidasa e involucrada en la regulación de la presión sanguínea y la función cardíaca. La ACE2 cliva la angiotensina 1 en angiotensina 2, molécula que produce vasoconstricción y aumento de la presión arterial. La angiotensina 2 estimula en las glándulas suprarrenales la secreción de aldosterona, cuya función es la reabsorción

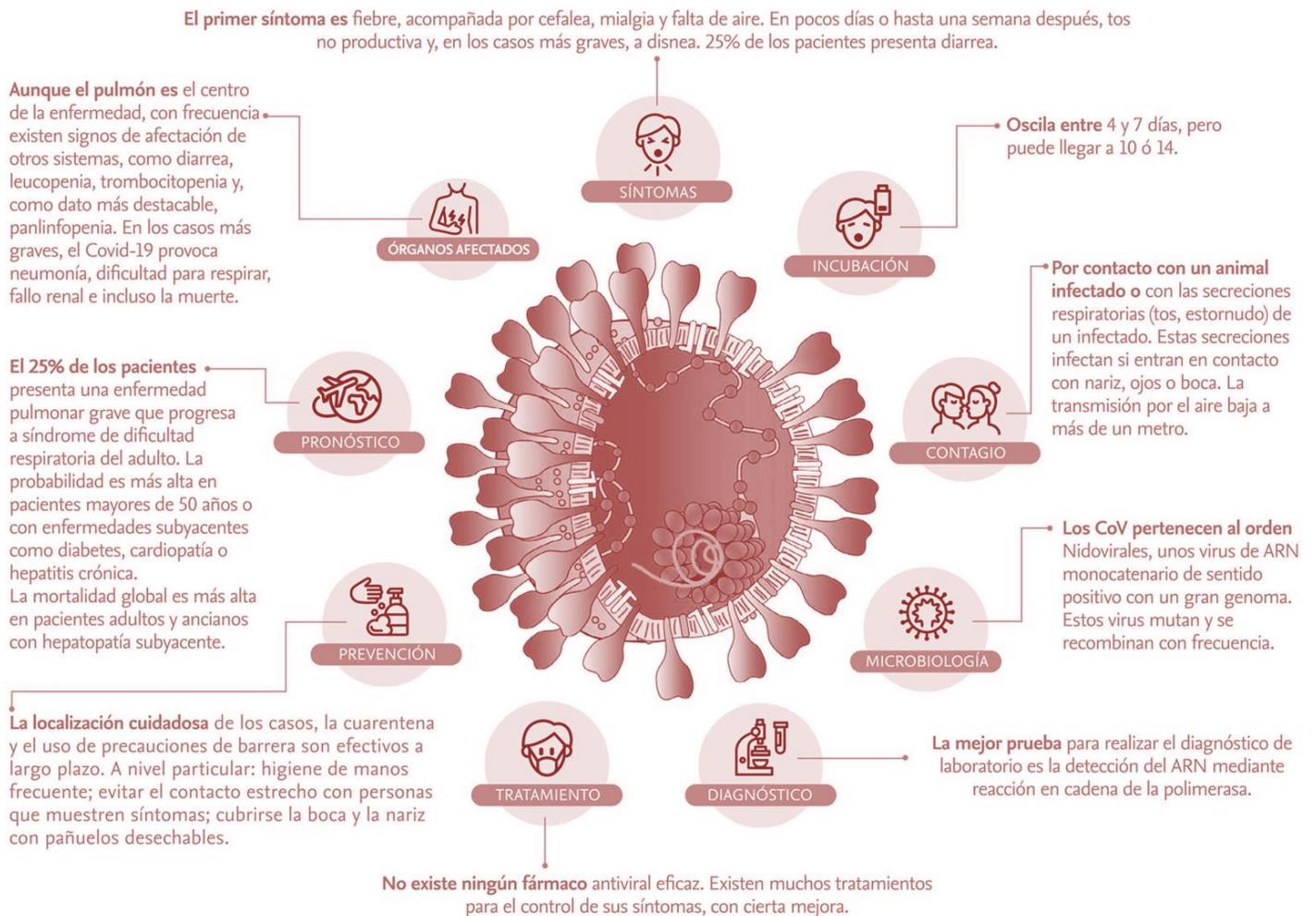
del sodio y el agua y la eliminación del potasio, a nivel renal, produciendo el aumento de la presión arterial. En humanos se expresa en células epiteliales de pulmón e intestino delgado los cuales son los blancos primarios de SARS-CoV. Estudios estructurales han demostrado que la mutación de solo 2 residuos aminoacídicos en una proteína permitió el salto de especie (de la civeta asiática al humano) . Recientemente se ha demostrado que esta proteína también funciona como receptor para el nuevo SARS-CoV-2 (Zhang et. al., 2020). Un estudio publicado por Cao et al. (2020) sugiere que variantes genéticas de la proteína ACE2 en las distintas etnias poblacionales podrían presentar distintos niveles de afinidad y reconocimiento con SARS CoV-2; y así explicar la severidad de la enfermedad en los distintos continentes. Luego del reconocimiento del receptor, los coronavirus ingresan al citoplasma por endocitosis y fusión con vesículas ácidas que permiten la liberación de la nucleocápside. Alternativamente estos virus pueden fusionarse directamente con la membrana plasmática por un mecanismo dependiente de una proteasa celular quien cliva a la proteína S del virus y permite exponer su péptido fusión. Una vez liberada la nucleocápside al citoplasma comienza la traducción y expresión del gen de replicasa viral. Por un mecanismo intrincado de desplazamiento de ribosomas celulares se traducen dos polipéptidos definidos pp1a (440–500 kDa) y pp1ab (740– 810 kDa) de diferente longitud.

A partir de estos, y por un proceso autoproteolítico, se expresan las proteínas no estructurales (designadas nsp1 a nsp16) necesarias para formar el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) y completar un ciclo de infección exitoso. Río abajo del gen de la replicasa se encuentran los genes estructurales S, M, E y N; que serán expresados a partir de mRNA subgenómico una vez que el RTC esté conformado y activo. Las factorías replicativas de los coronavirus provocan remodelamientos estructurales membranosos muy complejos en las células infectadas. Extensivas y morfológicamente diversas redes de vesículas, conectadas con el RE permiten la compartimentalización del proceso de síntesis viral protegiéndolo de ribonucleasas y evitando el reconocimiento de la respuesta inmune innata. Las proteínas estructurales M, S y E son expresadas asociadas al RE desde donde serán transportadas hacia el sitio de ensamblado y junto con las nucleocápsides formarán las nuevas partículas virales. Los coronavirus se ensamblan a través del sistema ERGIC y luego las partículas maduras son exportadas hacia la membrana plasmática en el interior de vesículas son secretadas por exocitosis.

Características clínicas

La mayoría de los coronavirus se propagan a los hospedadores susceptibles por vías respiratoria o fecal-oral de infección, y la replicación ocurre primero en las células epiteliales. Sin embargo, además de la infección local de las vías respiratorias o entéricas, varios coronavirus causan enfermedad respiratoria aguda grave.

Como se mencionó anteriormente el SARS-CoV-2, se une con gran afinidad a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), que es utilizada como receptor de entrada para invadir las células. Este mecanismo permite explicar la eficiente propagación viral en los humanos. La proteína ACE2 se presenta en abundancia en células epiteliales alveolares pulmonares y también en enterocitos del intestino delgado, lo que puede ayudar a comprender mejor las rutas de infección y manifestaciones de la enfermedad (Guo, et al, 2020). Hasta el momento se sabe que el virus puede causar síntomas leves parecidos a la gripe, como fiebre, tos, dificultad para respirar, dolor en los músculos y fatiga. Los casos más graves desarrollan neumonía grave, síndrome de dificultad respiratoria aguda, sepsis y shock séptico que pueden conducir a la muerte.

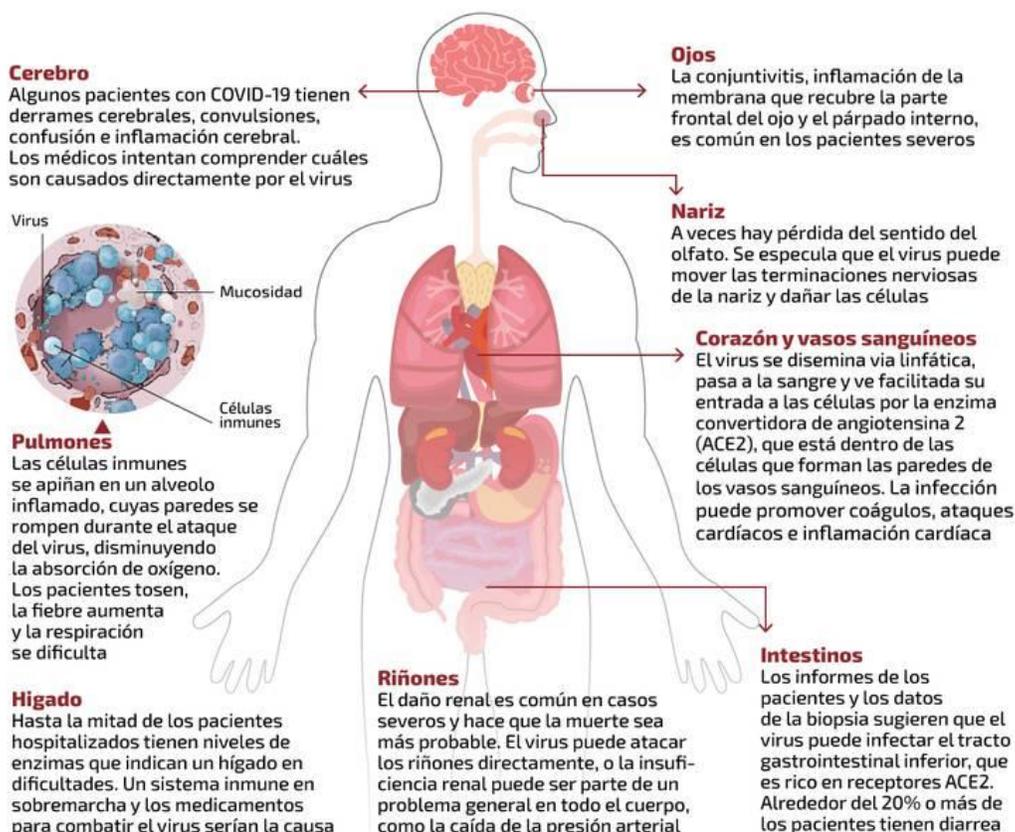


Las personas con afecciones crónicas parecen ser más vulnerables a las formas graves de la enfermedad. Sin embargo, en comparación con el SARS-CoV (10% de mortalidad) y el MERS-CoV (35% de mortalidad), el SARS-CoV-2 parece ser menos virulento en este punto, con la excepción de los ancianos y aquellos con afecciones de salud subyacentes (Guo, et al, 2020). Dado que estamos frente a un virus emergente, hasta el momento es escasa la información que se tiene en forma específica sobre el mecanismo de patogenia que presenta SARS CoV 2, por lo tanto, en su mayoría los datos que existen a nivel mundial se basan en la similitud del mismo con SARS CoV.

Como se mencionó previamente, el SARS-CoV replica principalmente en células epiteliales respiratorias. Las células en la vía aérea superior se infectan inicialmente, lo que resulta en desprendimiento celular, pero relativamente poco daño. Sin embargo, el virus se propaga rápidamente a los alvéolos causando daño alveolar difuso. Esto se caracteriza por descamación de neumocitos, edema alveolar, infiltración celular inflamatoria y formación de membrana hialina. También se detectan virus o productos virales en otros órganos, como el riñón, el hígado, cerebro y el intestino delgado, y en las heces (Knipe et al, Fields Virology, 2013; Zhang C, et al, 2020; Baig, et al, 2020, Peiris, et al 2003).

¿CÓMO ATACA LA COVID-19 AL CUERPO?

FUENTE: REVISTA SCIENCE



Aunque el pulmón es reconocido como el órgano más gravemente afectado por el SARS-CoV, el mecanismo exacto de la lesión pulmonar es controvertido. Las observaciones histopatológicas de las lesiones pulmonares no solo muestran respuestas inflamatorias inespecíficas como edema e infiltrado de células inflamatorias, sino que también una exfoliación severa de las células epiteliales alveolares, ensanchamiento y daño del tabique alveolar, e infiltración del espacio alveolar (Li, et al 2020). Patológicamente, la inflamación incluye degeneración (necrosis), infiltración e hiperplasia. El daño a las paredes arteriolas intersticiales pulmonares indica que la respuesta inflamatoria juega un papel importante a lo largo del curso de la enfermedad. Durante la infección, el huésped desencadena una respuesta inmune contra el virus. La inmunopatogénesis se asocia con una respuesta inmune fuera de control, lo que puede provocar daños en el tejido pulmonar, deterioro funcional y capacidad pulmonar reducida (Li, et al 2020).

Efectivamente, la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa son necesarias para la eliminación viral, pero siempre bajo una regulación muy estricta, de lo contrario puede desencadenarse la inmunopatología asociada. Es de destacar que en pacientes con COVID-19 se observó un ascenso plasmático del nivel de citocinas y quimiocinas, incluidas IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), IP-10, MCP-1, MIP-1 α , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IFN- γ y TNF- α . Esta liberación exacerbada de inmunomoduladores, a su vez, recluta linfocitos, macrófagos y leucocitos al sitio de la infección, pudiendo explicar en parte el daño histológico observado en los pacientes con COVID-19 de condiciones más críticas (Guo, et al, 2020).

La transmisión se produce principalmente de persona a persona a través de las gotas respiratorias entre contactos cercanos. Las transmisiones por aerosoles y por fómites son plausibles.

El COVID-19 puede manifestarse como una infección asintomática, una infección leve del tracto respiratorio superior o una neumonía vírica severa con insuficiencia respiratoria e incluso la muerte.

Los signos y síntomas al inicio de la enfermedad incluyen fiebre, tos, fatiga, anorexia, dificultad para respirar, producción de esputo o mialgias. La edad y varias comorbilidades (diabetes, enfermedades crónicas cardiovasculares o respiratorias) son fuertes factores de riesgo de enfermedad grave, complicaciones y muerte.

Diagnostico:

RT-PCR para detección del SARS-CoV-2 El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario de ~ 30 kb de tamaño del genoma, que pertenece al género Coronavirus y a la familia Coronaviridae. La estructura del SARS-CoV-2 es similar a la del SARS-CoV con un tamaño de virión que varía de 70 a 90 nm. Las proteínas virales de punta, membrana y envoltura del coronavirus están incrustadas en la bicapa lipídica derivada de la membrana del huésped que encapsula la nucleocápside helicoidal que comprende ARN viral.

El genoma comprende 6-11 marcos de lectura abiertos (ORF) con 5' y 3' regiones flanqueadas no traducidas (UTR).¹ El método diagnóstico de la infección, en su fase aguda, se basa en la detección del ARN viral de las muestras clínicas de los pacientes infectados. Para ello se utiliza una técnica de RT-PCR que detecta diferentes regiones genómicas constantes.

Los protocolos autorizados por la OMS para la realización de la RT-PCR para virus SARS-CoV-2 durante la pandemia son: CDC de China, Instituto Pasteur, Paris, Francia, CDC de Estados Unidos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Japón, Alemania Charite, Hong Kong HKU, Instituto Nacional de Salud de Tailandia y las regiones genómicas específicas que amplifican cada uno de estos protocolos. (Cuadro 1) En estas primeras técnicas se lleva a cabo la extracción de ácidos nucleicos en un equipo aparte y, posteriormente, se practica una PCR individual para cada uno de los primeros, esto implica un tiempo de procesamiento de 6 horas.

Cuadro 2. Tipos de muestras, material requerido y temperatura de transporte para la prueba de RT PCR SARS-Cov-2

Tipo de muestra	Material	Temperatura de transporte	Comentarios
Exudado faríngeo y nasofaríngeo	Medio de transporte viral. Hisopos de dacrón o rayón con mango de plástico (exudado faríngeo) Hisopos de dacrón o rayón con mango flexible (exudado nasofaríngeo)	2-8 °C	El exudado faríngeo y nasofaríngeo se deben colocar en el mismo tubo para incrementar la carga viral
Lavado bronquioalveolar	Contenedor estéril con medio de transporte viral	2-8 °C	Puede haber dilución del patógeno, pero aún así vale la pena tomarla. Se requieren como mínimo 2 mL (1 mL de lavado bronquioalveolar más 1 mL de medio de transporte).
Aspirado traqueal, aspirado nasofaríngeo o lavado nasal	Contenedor estéril con medio de transporte viral	2-8 °C	Se requieren, como mínimo, 2 mL (1 mL de aspirado más 1 mL de medio de transporte).
Biopsia de pulmón	Contenedor estéril con medio de transporte viral	2-8 °C	2 cm ³ de la parte visiblemente más afectada.

Envío y embalaje de muestras al laboratorio donde se procesará la muestra Las muestras de COVID-19 deben seguir el Reglamento Modelo de las Naciones Unidas y cualquier otro reglamento aplicable, dependiendo del modo de transporte utilizado. Puede encontrarse información en la Guía de la OMS para regulaciones para el transporte de sustancias infecciosas 2019-2020 (aplicable a partir del 1 de enero de 2019).

Las muestras de pacientes de casos sospechosos o confirmados deben transportarse como UN3373, "Sustancia biológica, Categoría B", cuando son para diagnóstico. Deberá hacerse con triple embalaje:

1. Todas las muestras deberán estar contenidas en un tubo con medio de transporte viral, perfectamente cerrado y etiquetado, que se manejará desde su toma hasta la recepción en el laboratorio a temperatura entre 2 a 8 °C.
2. Las muestras se colocarán en una gradilla dentro de una hielera rígida, que contendrá refrigerantes para mantener la muestra entre 2 a 8 °C.
3. La hielera se colocará en otro contenedor para su transporte hasta el laboratorio donde se procesará.

En el transcurso de estos meses, diversas plataformas moleculares han implementado nuevos equipos para identificación del SARS-CoV-2; por ejemplo: la plataforma Gene Xpert, con la prueba Xpert Xpress SARS-CoV-2 test de la compañía Cepheid, que amplifica los 2 genes: el gen de la proteína E y el gen de la proteína N2.

El equipo Film Array Biofire ha agregado, a su panel de virus respiratorios, el SARS-CoV-2 II con el nombre Panel Respiratorio Biofire 2.1 que emite un reporte cualitativo en 45 minutos; detecta dos regiones genómicas del SARS-CoV-2: el gen de la proteína S y el gen de la proteína M. Esta prueba permite, además de la identificación del virus SARS-CoV-2, la detección de 19 virus respiratorios y la posibilidad de coinfección, que puede suceder en 17-20% de los casos. En la temporada invernal permitirá diferenciar entre infección por Influenza A o B vs enfermedad COVID-19.

Ambas pruebas están autorizadas por la FDA (Federal Drug Administration) y los equipos permiten automatizar completamente la extracción, amplificación y lectura de la PCR. Son equipos pequeños que permiten una implementación sencilla que deberán cumplir los estándares de bioseguridad en el laboratorio de microbiología para el manejo de muestras con probable SARS-Cov-2, que son los mismos que la toma de la muestra.

De las plataformas moleculares destaca un grupo de uso cercano al paciente (point of care) durante esta pandemia: la prueba para SARS-Cov-2 del equipo Abbot ID

no permite el reporte en 5 minutos. Fue aprobada por la FDA aunque el 14 de mayo también publicó una alerta por el reporte de falsos negativos de la prueba.

Por este motivo permanece en análisis para las consideraciones correspondientes; mientras tanto debe tenerse cautela en el diagnóstico con esta prueba.¹⁰ La prueba de RT-PCR puede dar resultados falsos negativos por los siguientes factores:

1. Toma inadecuada de la muestra. Por ejemplo, si se utilizan hisopos inadecuados. Los indicados deben tener base de plástico con punta de rayón o dacrón. Si se usa algodón puede dar un falso negativo o la toma de muestra con pobre calidad; es decir, que contenga poco material. Esto se identificará si la técnica de RT-PCR tiene un control interno que permita detectar ADN humano en la PCR; en estos casos no lo amplificará.
2. Recolección tardía de la muestra o en etapas muy tempranas de la infección.
3. Manipulación y envío inadecuado de la muestra (pérdida de la cadena fría).
4. Razones técnicas de la prueba relacionadas con los protocolos implementados al inicio de la pandemia: son muy manuales y por ello existe un sinnúmero de factores que pueden alterar la sensibilidad de la prueba.
5. Mutaciones virales.
6. Inhibición de la PCR

Detección de IgA, IgM, IgG o anticuerpos totales

Este tipo de pruebas permite detectar si en el plasma o suero de los pacientes ya se formaron anticuerpos IgM e IgG contra el virus SARS-Cov-2. Por las fechas en los que se elevan dichas inmunoglobulinas vale la pena reforzar que este tipo de estudios no sirven para la fase aguda porque se incrementan después del día 10 de la enfermedad. En la actualidad existen dos técnicas para medir anticuerpos:

1. Prueba de ELISA.
2. Pruebas rápidas de inmunocromatográfica.

La importancia de conocerlas es que la sensibilidad y especificidad de ambas son diferentes y deben tomarse algunas consideraciones para la interpretación.

Zhao J y su grupo¹³ describen que la mediana del tiempo de seroconversión para anticuerpos totales (Ab), desde el inicio de los síntomas, es el día 11, para IgM el día 12 y para IgG el día.

La existencia de anticuerpos fue menor de 40% entre los pacientes en la primera semana desde el inicio, y aumentó rápidamente a 100% (Ab), 94.3% (IgM) y 79.8%

(IgG) a partir del día 15 después del inicio de los síntomas. Con base en estos resultados, la detección de IgM sería ligeramente más temprana que la de IgG. Ese estudio se llevó a cabo mediante un método comercializado de ELISA. En el mismo trabajo se determinó la sensibilidad de anticuerpos totales que fue de 38, 89 y 100% en la primera, segunda y tercera semana, respectivamente. Sin embargo, no se dispone de la información para considerar si estos tiempos son válidos con la inmunocromatográfica. Los insertos de las pruebas rápidas mencionan sensibilidades y especificidades muy altas y, hasta ahora, al hacerse la verificación, los resultados son mucho más bajos de los reportados.

Tratamiento

Tabla 1: Indicaciones de tratamiento que dependen de la gravedad del cuadro clínico.

Cuadro clínico	Radiografía tórax/TCAR	Tratamiento	Actitud
Leve: sin hipoxemia dificultad respiratoria ausente o leve	No indicada, salvo en grupos de riesgo	Sintomático	Alta a domicilio salvo grupos de riesgo
Moderado: hipoxemia y/o dificultad respiratoria moderada	Normal Cualquier alteración (opacidades en vidrio despulido o consolidación)	Sintomático Hidroxicloroquina o cloroquina + lopinavir/ritonavir	Ingreso sin tratamiento antiviral Ingreso con tratamiento antiviral
Grave (UTIP): hipoxemia grave, dificultad respiratoria grave, mal estado general	Cualquier alteración (opacidades en vidrio despulido o consolidación)	Hidroxicloroquina o cloroquina + lopinavir/ritonavir	Ingreso con tratamiento antiviral Valorar uso compasivo de remdesivir o tocilizumab

TCAR = tomografía computarizada de alta resolución; UTIP = Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica.
Adaptado de: Calvo Rey C et al.¹

Hidroxicloroquina y cloroquina Son fármacos inmunomoduladores con estructura química muy similar, que han demostrado tener mecanismos antivirales frente a SARS-CoV-2, entre ellos, bloquean la invasión viral al interferir con la glucosilación de los receptores ECA2, reduciendo la unión entre las células huésped y las proteínas de superficie del coronavirus; también inhiben la replicación viral mediante la modificación del pH celular y la interrupción de la interacción con receptores tipo Toll, entre otros.⁵ La hidroxicloroquina se propuso como mejor tratamiento que la cloroquina, debido a que la hidroxicloroquina atenúa la progresión de COVID-19 mediante la inhibición de la tormenta de citoquinas al reducir la expresión de CD154 en las células T; además tiene menos efectos secundarios.⁶ Estos fármacos tenían las mejores expectativas de eficacia contra COVID-19,⁷ sin embargo, hubo ciertas controversias acerca de su uso, a causa de los efectos secundarios o interacciones farmacológicas, particularmente en pacientes que presentan falla multiorgánica, intervalo QT prolongado en electrocardiograma basal, cardiomiopatía o miopatía

documentadas o deficiencia de G6PD. Las dosis recomendadas se muestran en la Tabla 3. En caso de no tener disponible hidroxyclorequina, se había propuesto utilizar cloroquina a dosis que se muestran en la Tabla 4. También se hizo esta recomendación para pacientes menores de 30 kg, considerando que podrían presentar mayores efectos secundarios por la complejidad de la posología.¹ Actualmente la OMS no recomienda el uso de hidroxyclorequina o cloroquina como tratamiento de la COVID-19.

Tratamiento antiinflamatorio.

Tocilizumab Es un agente inmunosupresor del anticuerpo monoclonal inhibidor de la IL-6.^{2,10} Hasta el momento, no hay datos sobre su uso en menores de dos años. Para emplearlo se requiere la determinación de IL-6 predosis y 24 horas después de la última administración se consideran valores elevados > 40 pg/mL. Se recomienda la administración máxima de tres dosis (la segunda 8-12 horas después de la primera y la tercera a las 16-24 horas de la segunda) y evaluar la disminución de la IL-6.

Tabla 2: Dosificación de lopinavir/ritonavir* en pediatría, basada en peso corporal.^{1,3,7}

Peso corporal (kg)	Dosis cada 12 horas (mg/kg)	Días de tratamiento	Efectos adversos
7-15	12/3	7-14	Frecuentes: diarrea, náusea, vómito, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia
15-40	10/2.5	7-14	Infrecuentes: pancreatitis, prolongación del segmento QT del electrocardiograma
> 40	400/100	7-14	
Posología en pacientes de dos semanas a seis meses		16/4	7-14

* No se debe administrar en pacientes prematuros o con edad postnatal < 14 días, a causa del riesgo de toxicidad.^{1,6}
Administrar con alimentos. Se puede administrar por sonda nasogástrica.
De ser posible, consensuar la indicación y elección del tratamiento antiviral con el Servicio de Infectología Pediátrica.

Tabla 3: Pautas de dosificación de hidroxyclorequina.^{1,2,7}

Edad	Dosis cada 12 horas (mg/kg/día)	Efectos adversos	Dosis máxima*	Duración
< 6 años	6.5	Hipoglucemia, toxicidad hematológica, musculoesquelética y ocular. En combinación con otros fármacos puede prolongar el intervalo QT (macrólidos, ondansetrón)	400 mg/día	5-14 días
> 6 años	10		400 mg/día	Después del quinto día disminuya la dosis a la mitad

* 200 mg de sulfato de hidroxyclorequina equivalen a 155 mg de hidroxyclorequina base.

Tabla 4: Pautas de dosificación de cloroquina.⁸

Dosis cada 24 horas (mg/kg/día)	Dosis máxima	Duración
Día 1 y 2: 10 Después: 5	600 mg/día	5-14 días Después del segundo día disminuir la dosis a la mitad

Tabla 5: Pautas de dosificación de remdesivir.^{2,8,9}

Dosis	Duración
Pacientes < 40 kg: Día 1: dosis de carga 5 mg/kg IV Dosis de mantenimiento: 2.5 mg/kg IV cada 24 horas	10 días
Pacientes > 40 kg: Día 1: dosis de carga 200 mg IV Dosis de mantenimiento: 100 mg IV cada 24 horas	

IV = intravenoso.

Tabla 6: Dosis recomendadas de tocilizumab para inhibir el síndrome de liberación de citoquinas.²

Peso	Dosis
Pacientes < 30 kg	12 mg/kg IV (añorar a 50 mL con solución salina y administrar en 1 hora)
Pacientes ≥ 30 kg	8 mg/kg IV (añorar a 100 mL con solución salina y administrar en 1 hora)
Dosis máxima	800 mg (en cada infusión)

IV = intravenoso.

Tabla 7: Dosis recomendada de macrólidos.¹⁰

Azitromicina		
Dosis cada 24 horas (mg/kg/día)	Duración	Dosis máxima
Día 1: 10 Día 2-5: 5	5 días	500 mg cada 24 horas
Claritromicina		
Dosis cada 12 horas (mg/kg/día)		
15	5 días	1 gramo cada 24 horas

Bibliografías y Fuentes de lectura

1: Cáncer de Próstata

1:Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009 27.

Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, et al. Screening and prostate-1. cancer mortality in a randomized European study. N Engl J Med. 2009 26;360(13):1320-8.

3. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. N Engl J Med. 2009 26;360(13):1310-9.

4. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am J Pathol. 1999;155(6):1985-92.

5. Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. Urology. 2000 1;56(5):828-32.

6. Chaib H, Cockrell EK, Rubin MA, Macoska JA. Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis. Neoplasia. 2001;3.

2: VIH

Barre-Sinoussi F, Cherman J, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220:868.

Gallo R, Salahuddin S, Popovic M et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984; 224:500.

Leis J. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. J Virol 1988; 62:1808

Gelderblom H. Fine structure of VIH and SIV. En: Korber B, eds. VIH Molecular Immunology Database 1997. National Institute of Allergy and Infectious Diseases; 1997.

Muesing M, Smith D, Cabradilla C et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. Nature 1985; 313:450-58

Cullen B. Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. J Virol 1991; 65:1053

Myers G, Pavlakis G. Evolutionary potential of complex retroviruses. En: Levy J, eds. The Retroviridae. p1 New York, Plenum Press; 1992.

Dalgleish A, Beverly P, Clapham P et al. The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS virus. Nature (London) 1984; 312:763

McDouglas J, Mawle A, Cort S et al. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. J Immunol 1985; 135:3151.

Maddon P, Dalgleish, McDougal J et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. Cell 1986; 47:333.

3: Virus Hepatitis C

1. Calvo Rey C, García-López Hortelano M, Tomás Ramos J, Baquero Navarro F, Navaro M et al. Documento de manejo clínico del paciente pediátrico con infección por SARS-CoV-2. Extracto del Documento de Manejo Clínico del Ministerio de Sanidad [Internet]. Sociedad Española de Infectología Pediátrica; 2020 [actualizado 18 de agosto 2020]. p. 1-17. Disponible en: https://www.analesdepediatria.org/contenidos/pdf/Recomendaciones_pediaticas_Covid1.pdf

2. Acuña Cordero R, Bejarano Melo MA, Niederbacher Velásquez J, Pulido Fentanes S, Restrepo Gualteros SM, Villamil Osorio M. COVID-19 en niños, Colombia, versión 2 [Internet]. Asociación Colombiana de Neumología Pediátrica. 2020 [actualizado 1 de abril 2020]. pp. 1-18. Disponible en: <https://scp.com.co/wp-content/uploads/2020/04/Coronavirus-Version-2.pdf.pdf>

3. PAHO. Ibuprofeno y COVID-19. 18 de marzo de 2020 [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/ibuprofeno-covid-19-washington-dc-18-marzo-2020>

4. Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, Schäfer A, Won J, Brown AJ et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. Nat Commun [Internet]. 2020; 11 (1): 222. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13940-6.pdf>

5. Ko WC, Rolain JM, Lee NY, Chen PL, Huang CT, Lee PI et al. Arguments in favor of remdesivir for treating SARSCoV-2 infections. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2020; 55 (4): 105933. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7135364/pdf/main.pdf>

4: SARS CoV- 2

1. Calvo Rey C, García-López Hortelano M, Tomás Ramos J, Baquero Navarro F, Navaro M et al. Documento de manejo clínico del paciente pediátrico con infección por SARS-CoV-2. Extracto del Documento de Manejo Clínico del Ministerio de Sanidad [Internet]. Sociedad Española de Infectología Pediátrica; 2020 [actualizado 18 de agosto 2020]. p. 1-17. Disponible en: https://www.analesdepediatria.org/contenidos/pdf/Recomendaciones_pediaticas_Covid1.pdf
2. Acuña Cordero R, Bejarano Melo MA, Niederbacher Velásquez J, Pulido Fentanes S, Restrepo Gualteros SM, Villamil Osorio M. COVID-19 en niños, Colombia, versión 2 [Internet]. Asociación Colombiana de Neumología Pediátrica. 2020 [actualizado 1 de abril 2020]. pp. 1-18. Disponible en: <https://scp.com.co/wp-content/uploads/2020/04/Coronavirus-Version-2.pdf.pdf>
3. PAHO. Ibuprofeno y COVID-19. 18 de marzo de 2020 [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/ibuprofeno-covid-19-washington-dc-18-marzo-2020>
4. Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, Schäfer A, Won J, Brown AJ et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. Nat Commun [Internet]. 2020; 11 (1): 222. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13940-6.pdf>
5. Ko WC, Rolain JM, Lee NY, Chen PL, Huang CT, Lee PI et al. Arguments in favor of remdesivir for treating SARSCoV-2 infections. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2020; 55 (4): 105933. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7135364/pdf/main.pdf>