

can proteínas estructurales. Ello implica la presencia de cambios frecuentes en los fenotipos de VIH-1 que son dependientes de sustituciones de aminoácidos en enzimas víricas.

En una revisión reciente sobre la variabilidad del VIH se llega a la conclusión de que este virus muta cien veces más que una bacteria, y muta mucho más que otros retrovirus afines como el HTLV, que posee genes estructurales y reguladores semejantes, pero que produce neoplasia en forma de leucemia humana, acompañada de transformación celular. La elevada variabilidad del VIH es una consecuencia de su forma de vida, según afirma Wain-Hobson¹. En efecto, el VIH es un lentivirus que está muy expuesto al ataque del huésped, y ello obliga a una dinámica vírica muy activa y a una replicación rápida e independiente de la celular, lo que favorece la formación de subpoblaciones de virus y la selección de las mejor adaptadas.

El trabajo que aquí comento está firmado por especialistas de la variabilidad del VIH y del concepto de subpoblación o cuasiespecie. El trabajo describe una nueva fórmula matemática que permite comparar la tasa global de mutación de los genes RT y *env* a partir de datos de secuenciación de regiones seleccionadas en cada gen. Las mutaciones en el VIH adquieren una dinámica compleja que requiere de modelos matemáticos para ser estudiada. La nueva fórmula establece un «índice evolutivo» y una tasa «global» de mutación para los genes RT y *env*, tanto en aislados víricos independientes como en cuasiespecies. La conclusión principal de que el gen RT muta unas tres veces menos que el gen *env*, se apoya sobre estudios de secuenciación en dos regiones de la RT seleccionadas al azar, y en una región constante seguida de una región variable del gen *env*, la región C2-V3.

Una conclusión personal que saco del trabajo de Quiñones-Mateu et al es la de que cabría igualmente estudiar la tasa de variabilidad de la RT por regiones estructurales o funcionales, y que entonces se encontrarían tasas de mutación diferentes. Es probable que la tasa de mutación de las denominadas «hélices alfa» de la RT sea hasta cinco veces superior que la de las denominadas «láminas beta». Las primeras son regiones de giro mientras que las láminas beta son planas. Cuatro de estas láminas, la B4, la B6 y la B9-B10, forman el sitio activo de la RT. Cabría igualmente calcular por separado la variabilidad de la región V3 del gen *env* que se secuencia en el trabajo, ya que la región V3 forma un bucle que es reconocido tanto por cofactores celulares para la entrada del virus, como por los anticuerpos que neutralizan al virus. Su tasa de mutación elevada tiene una función de «escape» que probablemente no tiene la región constante contigua.

Se desconoce si es posible la recombinación entre regiones con tasa de mutación diferente en una misma enzima cuando coinciden en un individuo dos subtipos o subpoblaciones de virus, y si ello representa un mecanismo de escape o de adaptación. Recientemente se ha descrito un elevado grado de recombinación interna en el subtipo E tailandés del VIH-1, que adquiere así formas no sincitiales para el bucle V3, lo que le permite escapar a la presión del huésped. Esta podría ser la causa de que el subtipo E sea especialmente invasivo en el sudeste asiático.

La variabilidad del bucle V3 del VIH plantea dificultades

en la preparación de vacunas. Es difícil combatir la capacidad adaptativa del virus frente a los ataques inmunes del huésped. También plantea dificultades la variabilidad del gen RT, que produce con facilidad resistencia a los tratamientos con antiviricos habituales. Las mutaciones amplían el margen de soluciones biológicas del virus y están en el origen evolutivo del VIH y de otros retrovirus.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wain-Hobson S. Running the gamut of retroviral variation. Trends Microbiol 1996; 4: 135-138.

L. Medrano Soria

Centro Nacional de Biología Fundamental (CNBF).
Instituto de Salud Carlos III (ISC-III). Majadahonda. Madrid.

Polimorfismos extensos observados en genes de proteasa clase B de VIH-1 empleando ensayos de oligonucleótidos de alta densidad

Kozal MJ, Shah N, Shen N, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clase B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. Nature Medicine 1996; 2: 753-759.

Las mutaciones naturales en los pacientes infectados por VIH-1 tienen implicaciones importantes en el tratamiento y los resultados de estudios clínicos. Sin embargo, se sabe poco sobre la prevalencia de las mutaciones que confieren resistencia a los inhibidores de proteasa de VIH-1 en aislados derivados de pacientes que no han estado expuestos a dichos inhibidores. En la primera aplicación clínica del ensayo de secuenciación de oligonucleótidos de alta densidad, se han determinado las secuencias de 167 muestras víricas de 102 pacientes. Se encontró que la secuencia del ADN de las proteasas clase B de VIH-1 de EE.UU. era muy variable, y que el 47% de las 99 posiciones de los aminoácidos variaban. Dicho nivel de diversidad de aminoácidos es mayor que la conocida previamente en todas las clases mundiales de VIH-1 combinadas (40%). Se sabe que muchos de los cambios de aminoácidos que contribuyen a la resistencia farmacológica se presentaban como polimorfismos naturales en aislados de pacientes que nunca habían recibido inhibidores de las proteasas.

La idea predominante acerca de la variabilidad de la proteasa del VIH-1 es que ésta debería ser muy limitada. Su

DIAGNÓSTICO

pequeño tamaño, junto con las restricciones estructurales que su función le imponía, así como los primeros datos acerca de su variabilidad en el clado B de VIH-1, permitían sospechar que, efectivamente, se trataba de una proteína poco variable. Esto llevó al desarrollo de antiviricos inhibidores de la proteasa con la esperanza de que pudiesen ser de amplia aplicación.

Lamentablemente, este estudio, bastante exhaustivo, ha puesto de manifiesto un inesperado nivel de variabilidad en el gen de la proteasa del VIH-1 del clado B. Concretamente, los niveles de variabilidad medidos fueron del 41% a nivel de nucleótidos y del 49,5% a nivel de aminoácidos. En contraste con el 40% que se había medido cuando se comparaban todas las proteasas conocidas de todos los clados.

Los autores encontraron siete mutaciones que se sabe contribuyen a la resistencia a antiviricos inhibidores de la proteasa en pacientes que nunca habían sido tratados con estos fármacos. Esta observación se da a menudo como un hecho curioso, cuando es de esperar que los mutantes existan en la población previamente al proceso de selección. Ya hace más de un siglo que Darwin postuló las bases de la actual teoría de la evolución como la selección de la variación ya existente en la poblaciones. Dicha variación (las mutaciones) se genera de forma aleatoria y sin ninguna relación con la eficacia que pueda conferir posteriormente a su portador. La idea contraria es un punto de vista lamarkista.

El nivel de polimorfismo de la proteasa sugiere que las mutaciones que confieren resistencia pueden existir a bajos niveles en muchos de los pacientes no tratados con antiviricos contra la proteasa. Esto puede causar varios problemas además de los que afectan al propio paciente como, por ejemplo, afectar en ensayos clínicos a la evaluación de la eficacia de antiviricos.

Además, en este trabajo se ha probado una matriz de oligonucleótidos de alta densidad (Lipshutz y Fodor, 1994), o chip, diseñada para la proteasa. Los resultados obtenidos mediante el chip son equivalentes a los obtenidos mediante un método de secuenciación clásica, como el dideoxy. Este chip consiste en una placa de 1,28 cm x 1,28 cm que contiene 12.224 oligonucleótidos solapantes que cubren el gen de la proteasa y que contemplan las posibles mutaciones existentes en él. Además, el chip es capaz de detectar mutantes en la población de virus. El uso del chip implica una reacción de hibridación después de una transcripción, en un proceso que dura apenas 2 horas y media. Obviamente, es necesario conocer la secuencia del gen que se pretende analizar para diseñar el chip. Los autores muestran que el chip funciona bien y proponen su uso para el control de la progresión de los pacientes tratados con antiviricos. También sugieren que puede servir para definir el genotipo de VIH-1 predominante antes de iniciar una terapia.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Lipshutz RJ, Fodor SPA. Advanced DNA sequencing technologies. Curr Opin Struct Biol 1994; 4: 376-380.

J. Dopazo

TDI, Departamento de I+D. Madrid.

Significado de la variación de aminoácidos en el residuo 210 de la transcriptasa inversa del VIH-1 para la susceptibilidad a zidovudina

Harrigan PR, Kinghorn I, Bloor S, et al. Significance of Amino Acid Variation at Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Residue 210 for Zidovudine Susceptibility. J Virol 1996; 5:930-5.934.

Ocasionalmente se detecta la variación de aminoácidos en el codón 210 (habitualmente Leu-210 a L210W, TTG-TGG) de la transcriptasa inversa (TI) después de la iniciación del tratamiento con azidotimidina (AZT). Se ha establecido el impacto de dicha variación sobre la resistencia a AZT y a la replicación vírica mediante cuatro acercamientos diferentes. Se evaluó la frecuencia y el entorno genético de la mutación L210W in vivo mediante el análisis de suero de personas a las que no se había dado previamente AZT, y de pacientes que habían recibido AZT mediante PCR-TI y secuenciación de ADN. El grado de resistencia a AZT (50% de concentración infectiva [CI₅₀] de virus recombinante construida empleando la TI de 21 muestras clínicas se estratificó por la presencia o ausencia de la mutación 210. Se determinó la CI₅₀ de AZT de virus mutantes (con o sin W-210) construida por mutagénesis autodirigida en un ambiente HXB2 empleando un ensayo de reducción de placa HeLa CD4. Por último, se evaluó el efecto de la mutación 210 sobre la replicación vírica mediante competición de replicación de un virus resistente a AZT, RTMN (L-41/Y215), y RTMN con la mutación 210 en presencia y ausencia de AZT. En pacientes no expuestos previamente a AZT, el triptófano en el residuo 210 de la TI era raro. Después de la exposición a AZT, apareció W-210 en una minoría de dichos pacientes, con mayor frecuencia asociada con L-41 e Y-215. La presencia de W-210 incrementó la CI₅₀ de AZT de dos a cuatro veces, como lo determinó tanto el ensayo de virus recombinante como la mutagénesis dirigida a lugar específico. Se observa una ventaja de replicación significativa en favor del tipo salvaje L-210 sobre W-210, aunque la selección frente al mutante 210 era de dos a tres veces menor cuando los virus crecieron en presencia de 5 µM de AZT. En resumen, la mutación L210W parece tener un significado marginal, confiriendo una sensibilidad de dos a cuatro veces mayor aproximadamente a AZT en comparación con genomas resistentes a AZT similares con L-210. La presión de selección frente a W-210 puede ser responsable de la escasa proporción de pacientes en los que aparece W-210 in vivo.

En el VIH se puede detectar una gran cantidad de variaciones genómicas que producen, bien de forma natural, o como consecuencia de diversas presiones que actuarían sobre la inherente variabilidad del virus.

Las variaciones que confieren resistencia a la zidovudina se producen en los codones 41, 67, 70, 215 y 219 de la transcriptasa inversa. Bajo la presión del fármaco, la 70 sería la primera en aparecer seguida de la 215 y, posterior-

mente, cualquier combinación entre ellas. De forma secundaria pueden aparecer variaciones de aminoácidos que, en algunos casos, se dice que son cambios compensatorios a otras mutaciones que confieren resistencia al fármaco o, por el contrario, incrementan esta resistencia. Los autores de este trabajo estudian la significación que puede tener el cambio en el codón 210 de leucina por triptófano. Comprueban en primer lugar que esta mutación no aparece en los sueros de pacientes no tratados o que llevaban poco tiempo en tratamiento, siendo necesario que llevaran alrededor de dos años de tratamiento para que apareciera de forma significativa. Además, el número de sueros en los que aparece la mutación se incrementa cuando, a los pacientes previamente tratados, se les instaura un tratamiento durante seis meses con AZT sola o combinada con 3TC.

Comprueban, asimismo, que la mutación se presenta en gran parte de los sueros que contenían también variaciones de resistencia en los codones 41 y 215, tanto en el momento del inicio del estudio en el que esta circunstancia se

daba en el 85% de los casos, como tras los seis meses de tratamiento alcanzando el 95% de los casos.

La asociación de las mutaciones en los codones 41 y 215 confiere a las cepas una resistencia a la zidovudina de 370 veces. Los autores pretenden conocer si la asociación de la W-210 incrementa esta resistencia o, por el contrario, no desempeña un papel claro. Comprueban que las cepas son dos veces más resistentes.

Por otro lado, hacen un estudio del crecimiento de estas cepas. Es más lento que en las que sólo se detectan variaciones en los codones 41 y 215. En cocultivos de los dos tipos de cepas, las que presentan la variación W-210 habían sido sustituidas a los pocos pases. Este crecimiento más lento puede explicar el porqué en otros trabajos estas cepas pueden aparecer incluso como menos resistentes al AZT.

G. Contreras Carrasco

Centro Nacional de Biología Fundamental (CNBF).
Instituto de Salud Carlos III (ISC-III). Majadahonda. Madrid.

COMENTARIOS A LA BIBLIOGRAFÍA INTERNACIONAL

CLÍNICA

Causas de fiebre en pacientes infectados por el VIH admitidos en un hospital de la ciudad de Boston

Barat LM, Gunn JE, Steger KA, et al. Causes of Fever in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Who Were Admitted to Boston City Hospital. *Clin Infect Dis* 1996; 23:320-328.

Estudiamos de forma prospectiva las causas de fiebre en pacientes con infección por el VIH que necesitaron admisión en un hospital municipal. Se admitieron un total de 168 personas infectadas por VIH por 220 episodios de fiebre. El 72% eran varones, el 80% no eran blancos, el 65% informó de empleo de drogas por vía parenteral de forma previa, y el 74% presentaba un número basal de linfocitos CD4 < 200/mm³. Las infecciones bacterianas, principalmente la neumonía, fueron responsables de >60% de los episodios. Streptococcus pneumoniae y Staphylococcus aureus fueron los aislados con mayor frecuencia. La neumonía por Pneumocystis carinii (NPC) y la infección diseminada por el complejo Mycobacterium avium (CMA) comprendió el 53% de las fuentes restantes de fiebre. En comparación con episodios de fiebre debida a causas no bacterianas, las asociadas con infecciones bacterianas frecuentes tenían más probabilidades, de forma significativa, de afectar a pacientes con una historia de empleo de drogas por vía parenteral (p=0,02), un número mayor de leucocitos en el momento de la admisión (p=0,004), una duración más corta de la fiebre (p=0,003), estancias hospitalarias más cortas (p=0,0001), y un número de leucocitos CD4 > 100/mm³ (p=0,002). Llegamos a la conclusión de que la infección bacteriana, especialmente la neumonía, es una causa frecuente de fiebre en pacientes infectados por VIH admitidos en nuestro hospital. Los pacientes con infecciones bacterianas tienen más probabilidades de informar respecto de empleo de drogas por vía intravenosa y presentar un número de CD4 > 100/mm³, menor duración de la fiebre, menor duración de la hospitalización y menor mortalidad que los pacientes con fiebre debido a NPC, infección por CMA u otras causas.

La fiebre es un síntoma frecuente en la población VIH positiva, tanto en los pacientes hospitalizados como en los ambulatorios. Las infecciones representan el origen más frecuente de la fiebre; los tumores, la fiebre medicamentosa, y otras causas menos frecuentes, pueden ser igualmente responsables de los procesos febriles.

Los autores exponen su experiencia en una serie de 220 episodios de fiebre en pacientes VIH positivos ingresados en un hospital de Boston. En el 87% de los casos pudieron determinar la causa, y en 22 episodios existían concomitantemente dos procesos causales de la fiebre. El 60% de los epi-

sodios correspondieron a infecciones bacterianas (excluyendo las micobacteriosis), y entre ellas las neumonías, celulitis y endocarditis fueron las causas más frecuentes. Este patrón de distribución es superponible al nuestro, lo que se explica por el gran número de usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) que se incluyen en el trabajo de Barat et al, a diferencia de otras series procedentes de EE.UU. En nuestra experiencia¹, en el 41,16% de los pacientes ingresados se detectan infecciones bacterianas, siendo las más frecuentes las neumonías y las infecciones del tracto respiratorio sin infiltrado parenquimatoso; las endocarditis, bacteriemias y las celulitis e infecciones de los tejidos blandos son las que observamos en segundo lugar. Esta distribución de infecciones bacterianas vista en nuestro centro se superpone a la del trabajo comentado, por el comportamiento de riesgo de los pacientes incluidos. Solamente el 7% de los cuadros febriles corresponden a micobacterias, especialmente *Mycobacterium avium intracelulare* (MAI); este dato sí que difiere claramente de lo observado en nuestro medio, donde los cuadros provocados por *M. tuberculosis* son altamente frecuentes. Por último, merece citarse que el 15% de los casos de fiebre corresponden a neumonías por *P. carinii*, siendo este diagnóstico más frecuente que la enfermedad por citomegalovirus, por MAI, etc. En resumen, el trabajo de Barat et al, confirma la importancia de las infecciones bacterianas entre la población VIH, y el importante papel que desempeña el comportamiento de riesgo y la endemicidad de algunas infecciones; por este motivo, los datos pueden no ser extrapolables a otras áreas, pero determinan la necesidad de conocer los cuadros más frecuentes en cada zona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Polo R, Verdejo J, Martínez ML, et al. Bacterial diseases in 2.718 hospitalized HIV-patients. XI International Conference on AIDS. Vancouver, 1996.

J. Verdejo Ortés

Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva.
Madrid.

Factor de necrosis tumoral-α fecal en individuos con diarrea relacionada con VIH

Sharpstone DR, Rowbottom AW, Nelson MR, et al. Faecal tumour necrosis factor-α in individuals with HIV-related diarrhoea. *AIDS* 1996; 10: 989-994.

Objetivo. *La infección gastrointestinal relacionada con VIH se asocia con diarrea, pérdida de peso, inflamación mucosa*