

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE MEDICINA**

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR i

ANATOMIA PATOLÒGICA

***ESTUDI DE LA RESPOSTA IMMUNE EN  
PACIENTS INFECTATS PEL VIH-1 SOTMESOS  
A TERÀPIES IMMUNOMEDIADES***

Tesi Doctoral presentada per

**Anna López Plana**

Per optar al grau de

**Doctora en Farmàcia per la Universitat de Barcelona**

Directora de la tesi: Doctora Montserrat Plana Prades

Tutor: Doctor Carles Enrich Bastús

Barcelona, Novembre 2008

# **1. INTRODUCCIÓ**



## **1. INTRODUCCIÓ**

La Síndrome de la Immunodeficiència Humana (SIDA) va ser descrita per primera vegada l'any 1981. Dos anys més tard, es va identificar el Virus de la Immunodeficiència Humana tipus 1 (VIH-1) com l'agent causal (Barre-Sinoussi F, Science 1983). L'any 1986 es va aïllar el VIH-2, variant del VIH-1 que també causa la SIDA però la seva transmissió és més difícil i causa la malaltia amb menor freqüència i menor virulència que el VIH-1. Des d'aleshores, la infecció s'ha extès esdevenint la gran epidèmia del segle XX. Ara ja fa més de 25 anys que es va identificar el VIH i, els grans progressos en el coneixement de la patogènia i l'estructura del virus, juntament amb el desenvolupament d'una teràpia antiretroviral eficaç, han permès controlar l'evolució clínica de la infecció pel VIH, i considerar la SIDA actualment com una malaltia crònica, en aquells països amb accés a la medicació.

Malgrat els avenços científics que han conduït a una millora de la supervivència i la qualitat de vida dels pacients que conviuen amb la infecció, les dades epidemiològiques més recents no deixen de ser preocupants. Segons l'informe sobre l'epidèmia mundial de la SIDA emès pel Programa conjunt de l'Organització de les Nacions Unides sobre VIH/SIDA (ONUSIDA), l'estimació mundial a finals del 2007, situava la xifra de persones infectades en 33,2 milions. D'aquest total només a l'Àfrica subsahariana s'ha comptabilitzat una mitjana de 22,5 milions d'individus infectats on les dones representen el percentatge majoritari d'infeccions. El mateix any 2007, el nombre de nous casos d'infeccions per VIH va ser de 2,5 milions, i la xifra de morts causades per la malaltia va superar els 2,1 milions a tot el món. De nou, l'Àfrica subsahariana va ser la zona més castigada per la SIDA.

## 1.1 EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (VIH)

### 1.1.1 Característiques principals i estructura del VIH-1

El VIH és un retrovirus animal, del gènere *lentivirus*, que infecta principalment els limfòcits T CD4+ i macròfags de l'espècie humana amb l'objectiu de replicar-se i completar el seu cicle vital.

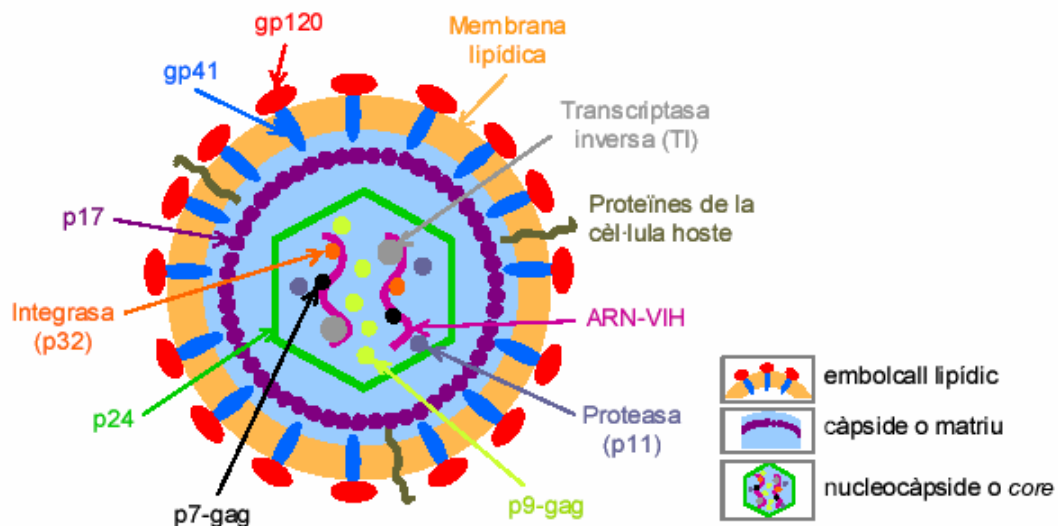
El VIH pot entrar a l'organisme per qualsevol de les tres vies principals de transmissió que es coneixen:

- Transmissió sexual: constitueix la principal forma de contagi, amb una taxa d'incidència de la infecció d'1 per cada 100 casos de contacte sexual amb una persona infectada. La major quantitat de virus es troba a la sang i al fluid seminal.
- Transmissió parenteral: per l'ús compartit d'agulles o xeringues, instruments contaminats, transfusió sanguínia, transplantament d'òrgans, etc.
- Transmissió vertical: de la mare al fetus (durant l'embaràs, el part o la lactància).

El VIH és una partícula esfèrica de 80-100 nm, amb una estructura en 3 capes (veure figura 1):

- Embolcall lipídic: representa l'estructura més externa. Consisteix en una bicapa lipoproteica que deriva de la cèl·lula infectada, i per tant conté diferents proteïnes que provenen de l'hoste, com per exemple els antígens d'histocompatibilitat de classe I i II, i algunes molècules d'adhesió que poden facilitar el contacte amb altres cèl·lules diana. A més a més s'hi integren 72 complexos glicoproteics (gp) virals com gp120 i gp41, que es projecten cap a l'exterior de la partícula vírica.

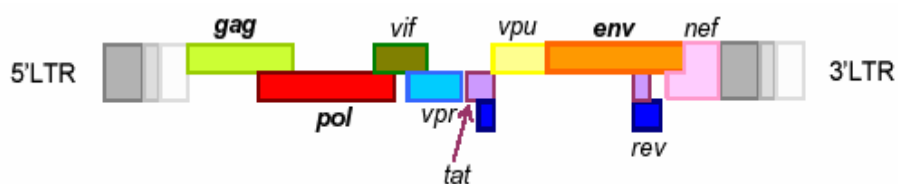
- Càpside o matriu: consisteix en una estructura intermitja en forma circular, associada a la part interna de embolcall lipídic, i constituïda per la proteïna p17.
- Nucleocàpside o *core*: representa l'estructura més interna amb forma d'icosaedre, constituïda per la proteïna p24, a l'interior de la qual s'hi localitza el genoma del virus més les nucleoproteïnes p9 i p7, i la maquinària necessària per a la replicació viral (transcriptasa inversa, integrasa i proteasa).



**Figura 1. Estructura del VIH**

El genoma del virus està format per dues cadenes idèntiques d'ARN monocatenari de polaritat positiva d'aproximadament 9,6 Kb encapsidat al *core*.

El genoma del VIH està constituït per tres gens estructurals: *gag*, *pol* i *env*, característics de tots els retrovirus, que codifiquen components proteics de la partícula vírica; i per sis gens accessoris reguladors: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* i *vpu*, que codifiquen proteïnes que controlen l'expressió vírica i la infectivitat (veure figura 2).



**Figura 2. Organització del genoma del VIH.** El genoma del VIH està format per dues molècules d'ARN idèntiques de 9,6 Kb, que conté 3 gens estructurals (*gag*, *pol* i *env*), comuns a tots als retrovirus, i sis gens reguladors (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* i *nef*). Les regions LTR (long terminal repeat) no codifiquen cap proteïna del virus, i representen els extrems finals del genoma del víric, que s'uneix a l'ADN de la cèl·lula hoste un cop integrat al nucli.

El genoma del VIH es caracteritza per presentar una elevada taxa de mutació, degut als errors que comet la TI (transcriptasa inversa) durant la còpia de l'ARN a ADN i a la capacitat de recombinació que tenen els genomes de dos virus diferents quan co-existeixen en una mateixa cèl·lula. En conseqüència, el VIH exhibeix una extrema variabilitat genètica, que genera una població viral heterogènia, que existeix entre diferents individus i dins d'una mateixa persona. Aquest fet dificulta, d'una banda, el reconeixement i l'eliminació de les partícules víriques per part del sistema immunitari i, d'altra banda, obstaculitza la síntesi d'una vacuna eficaç contra la infecció pel VIH.

### 1.1.2 Cicle biològic del VIH

L'entrada del virus a la cèl·lula representa el primer pas en el seu cicle biològic i és un procés seqüencial que es produeix mitjançant la interacció amb diferents molècules situades a la membrana cel·lular. A la superfície de les cèl·lules dendrítiques (CD) existeixen determinades lectines com DC-SIGN i L-SIGN a les quals s'hi adhereixen, amb elevada afinitat, un gran nombre de virus entre els quals s'hi troba el VIH. Aquest procés concentra els virions a la membrana plasmàtica, fet que facilita la propagació viral, ja que

en aquest context, la transmissió del VIH als limfòcits CD4 té una eficàcia molt superior a la capacitat infectiva de partícules virals solubles no unides a aquestes lectines.

A partir d'aquesta localització a la membrana de les cèl·lules dendrítiques, les partícules virals infecten als limfòcits CD4 mitjançant un procés seqüencial durant el qual es produeix la interacció amb dos tipus de receptors: un receptor específic i comú a totes les variants del VIH, la molècula de CD4 i dos coreceptors (CCR5 i CXCR4) que formen part de la família dels receptors de quimiocines. L'ús d'un o altre coreceptor depèn de la seqüència de l'envolta viral que condiona la seva capacitat d'unir-se amb major o menor afinitat a un o altre o ambdós coreceptors. En funció del coreceptor utilitzat el VIH es classifica en tres tipus de variants: R5 (utilitza exclusivament el receptor CCR5); X4 (utilitza exclusivament el receptor CXCR4), o R5X4 (que pot entrar a la cèl·lula utilitzant qualsevol dels dos coreceptors). Després de la interacció amb CD4, la proteïna de la superfície viral gp120 experimenta un canvi conformacional que li permet la unió als coreceptors virals CCR5 i/o CXCR4. Aquest procés és necessari per induir la fusió de la membrana viral amb la membrana cel·lular i porta a la internalització de la càpside viral i el seu desensamblatge parcial en el citoplasma cel·lular. Aquest procés permet la retrotranscripció del genoma viral constituït per dues cadenes d'ARN monocatenari.

La transcriptasa inversa és l'enzim viral responsable de la retrotranscripció del genoma viral. Aquesta polimerasa converteix l'ARN monocatenari en ADN bicatenari proviral (Peliska, 1992; Whitcomb, 1990). Una vegada sintetitzat, l'ADN proviral s'acobla a una sèrie de factors cel·lulars i virals formant el "complex de preintegració" que és transportat al nucli, on tindrà lloc la integració de l'ADN viral amb el genoma de la cèl·lula hoste (Gaynor, 1992).

A partir de l'estat d'integració, el VIH pot seguir un comportament variable: romandre latent o experimentar una replicació massiva amb el consegüent efecte citopàtic sobre la cèl·lula infectada. L'inici de la transcripció del genoma viral depèn de factors cel·lulars entre els quals destaca la família de factors de transcripció Rel/NF- $\kappa$ B. Aquest factor no existeix en forma activa en els limfòcits CD4 en estat de repòs cel·lular i és induït



únicament en el curs dels processos d'activació immunològica, per la qual cosa la replicació del VIH depèn absolutament de l'activació dels limfòcits infectats (Bermejo M, J Med Virol, 2003). Una vegada iniciada la síntesi de l'ARN viral, l'expressió de la proteïna viral Tat augmenta la taxa de transcripció del genoma del VIH i amb cooperació amb altres factors cel·lulars, permet l'elongació completa de l'ARN missatger (ARNm) del virus. L'ARNm del VIH es sintetitza en forma d'un únic transcrit que ha de ser transportat al citosol i processat en ARN de diferents grandàries. Ambdues etapes, processament i transport, són realitzades fonamentalment per una altra proteïna viral anomenada Rev. Després de la seva síntesi, les proteïnes virals han de ser processades abans d'ensamblar-se per poder formar partícules virals madures. En aquest procés hi participen proteases cel·lulars i la proteasa viral. La proteïna Nef realitza diverses funcions, entre les quals cal destacar la seva contribució a la patogenicitat del virus mitjançant la regulació negativa de l'expressió d'antígens CD4 i antígens d'histocompatibilitat de classe I i II, la qual cosa representa un mecanisme de protecció contra l'atac citotòxic mediat per les cèl·lules T CD8+, i evita el reconeixement pels limfòcits T CD4+. Altres proteïnes virals importants durant les fases finals de la infecció són Vif i Vpu. Vpu augmenta l'alliberació de virions i Vif interacciona i neutralitza l'acció antiviral d'una proteïna cel·lular anomenada APOBEC3G, que forma part de la família d'enzims d'edició de l'ADN. En absència de Vif, APOBEC3G s'incorpora al virió i interfereix el procés de retrotranscripció en la següent cèl·lula infectada al provocar mutacions en l'ADN sintetitzat per la TI, fet que origina virus no viables i frena el procés de propagació del VIH (Marin M, Nat Med, 2003). A la taula 1, s'indiquen de forma resumida els productes gènics del VIH i la funció general que exerceixen.

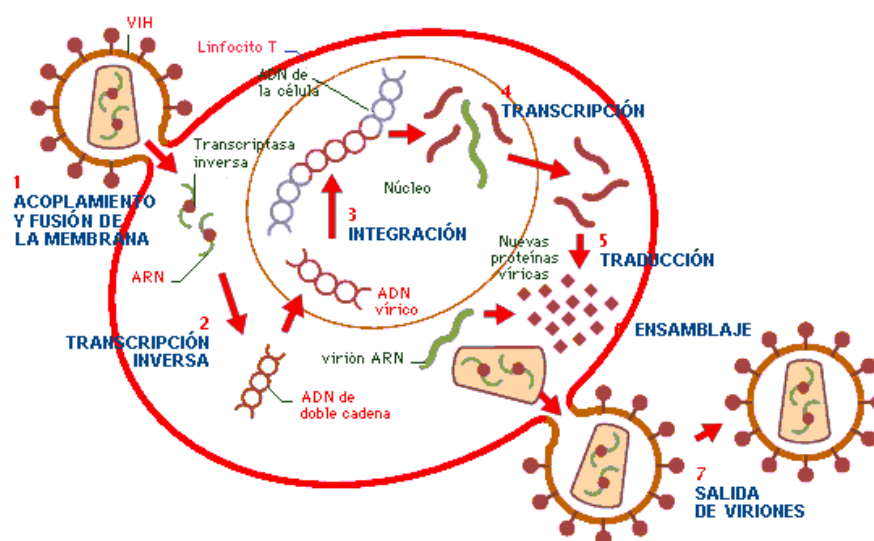


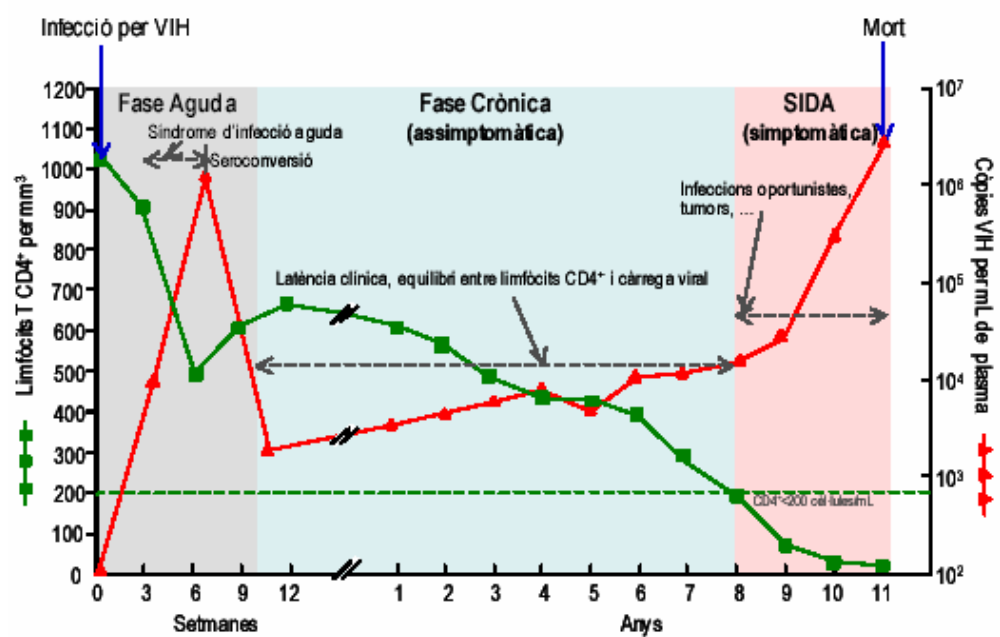
Figura 3. Cicle biològic del VIH-1

Gen	Precursor	Proteïna	Funció
gag	p55	p17	Proteïna estructural de la matriu
		p24	Proteïna estructural principal de la nucleocàpside
	p15	p9	Proteïna estructural de la nucleocàpside
		p7	Proteïna estructural de la nucleocàpside associada a l'ARN viral
pol	p190	p11	Activitat proteasa
		p13	Activitat ARNasa
		p66; p51	Activitat transcriptasa inversa (TI)
		p32	Activitat integrasa
env	gp160	gp120	Proteïna extracel·lular, permet la unió del virus a la cèl·lula
		gp41	Proteïna transmembrana, permet la fusió del virus a la cèl·lula
tat		Tat (p14)	Activador potent de la transcripció viral
rev		Rev (p18)	Regula l'expressió dels gens estructurals
nef		Nef (p17)	Pleiotròpica necessària per a la producció vírica i la progressió de la malaltia
vif		Vif (p23)	Promou la infectivitat del virus extracel·lular
vpr		Vpr (p15)	Activador dèbil de la transcripció viral
vpu		Vpu (p16)	Promou la maduració i l'alliberament de les partícules virals

Taula 1. Descripció dels gens i funció principal de les proteïnes del VIH

### **1.1.3. Història natural de la infecció pel VIH**

El VIH-1 és l'agent causal d'una malaltia de curs més o menys llarg amb una destrucció, pràcticament completa, dels limfòcits T CD4+. L'aplicació de mètodes sensibles, capaços de quantificar la replicació del virus, ha permès conèixer de manera més precisa l'evolució d'aquesta malaltia i ha demostrat l'existència, durant totes les fases de la infecció, d'una replicació viral molt activa. Una vegada té lloc l'entrada del virus a l'organisme, s'inicia una infecció en la qual es poden diferenciar fases o estadis evolutius relativament ben definits (Dardeyn CA, Curr Opin Immunol, 2005), tot i que no sempre identificables clínicament, i amb una duració variable que depèn de diferents factors relacionats tant amb el virus com amb l'hoste. Les diferents fases en les quals es pot dividir la història natural de la infecció són: (i) *fase aguda o primoinfecció* que es caracteritza per quatre fets primordials: una virèmia plasmàtica elevada i una disminució brusca de limfòcits T CD4+ de sang perifèrica (Henrard DR, JAMA, 1995; Clark SJ, N Engl J Med, 1991), l'establiment d'un reservori de cèl·lules infectades (Chun TW, PNAS USA, 1998; Finzi D, Science, 1997), el desenvolupament d'una resposta específica anti-VIH (Koup RA, J Virol, 1994; Pitcher C, Nat Med, 1999), i la desaparició d'aproximadament un 90% de les cèl·lules CD4 memòria del teixit limfàtic associat al tracte gastrointestinal (Veazey RS, Science, 1998). (ii) *fase crònica*, caracteritzada per ser una fase assintomàtica de la infecció, de durada variable, en funció dels factors del virus, de l'hoste infectat i de l'ambient, però que dura de promig uns 10 anys. Durant aquesta fase s'assoleix una disminució de la virèmia plasmàtica explicable pel desenvolupament d'una resposta immunològica, o bé per un esgotament de les cèl·lules diana del VIH, i una recuperació parcial de la xifra de limfòcits T CD4+ circulants. Durant aquest període s'observa una lenta disminució de la xifra de CD4+ i un augment progressiu de la virèmia plasmàtica. (iii) *fase final*, que és la progressió final a SIDA i es caracteritza per un descens ràpid de la xifra de CD4+ fins a un nivell inferior a 200 CD4+ circulants, i un increment dramàtic de la virèmia plasmàtica, amb el desenvolupament de malalties oportunistes i tumors associats a la SIDA (Pantaleo G, J Virol, 2004).



**Figura 4. Història natural de la infecció pel VIH.** El gràfic descriu la progressió natural de la infecció pel VIH en els pacients sense teràpia des del moment de la transmissió fins a la mort al cap de 10-11 anys.

## **1.2 RESPOSTA IMMUNITÀRIA CONTRA EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA TIPUS 1.**

En el pacient infectat pel VIH s'ha descrit una resposta immune intensa, que implica pràcticament tots els sistemes efectors del sistema immunitari, tals com el sistema humoral, el sistema cel·lular inespecífic i específic i factors solubles, tals com el complement, les citocines i les quimiocines. Aquesta resposta es desenvolupa contra nombrosos epítops del virus.

### **1.2.1 Immunitat Innata**

Durant les primeres fases de la infecció, la immunitat innata podria evitar l'extensió del virus des del moment en el qual es produeix l'entrada del virus i per tant la infecció. Des d'aquestes fases primerenques, es poden detectar cèl·lules dendrítiques (CD) activades i cèl·lules natural killer (NK), coincidint amb el moment en el qual la virèmia és fa detectable en plasma (Fonteneau JF, J Virol 2004; Pulendran B, Science, 2001), i els nivells d'IFN- $\alpha$ , crucial en la immunitat antiviral, també poden detectar-se elevats en plasma (Fonteneau JF, J Virol 2004). Tot i així, encara no es coneix del tot quina influència tenen aquests esdeveniments primerencs en l'evolució de la infecció.

#### **1.2.1.1 Cèl·lules Natural Killer (NK)**

Les cèl·lules NK són un component crític de la immunitat innata enfront a virus, paràsits, fongs i bacteries. Quan són activades per mecanismes inespecífics, alliberen citocines i quimiocines que indueixen respostes inflamatòries, modulen l'hematopoesi, controlen el creixement i la funció de granulòcits i monòcits, i tenen la capacitat d'influir en el tipus de respostes adaptatives que seguiran durant aquesta primera fase de la resposta immune. S'ha demostrat que la funció de les NK que es caracteritza per poder actuar sobre la cèl·lula diana sense requerir una sensibilització prèvia, i per no tenir activitat

restringida pel sistema HLA (Barao I, J Immunol, 2004), està ben preservada en el context de la infecció pel VIH-2 (Nuvor SV, J Virol, 2006), però no pel que fa a la infecció per VIH-1, en la qual es produeix una disfunció en el sistema de defensa innat.

### 1.2.1.2 Cèl·lules Dendrítiques (CD)

El CD4, receptor comú per a tots els subtipus de VIH, es troba present a la superfície dels limfòcits col·laboradors, i també a les cèl·lules de la línia mononuclear-fagocítica, entre les quals destaquen les cèl·lules dendrítiques, fet que determina el tropisme del virus per aquestes poblacions cel·lulars. Les cèl·lules dendrítiques mieloides són les cèl·lules processadores i presentadores d'antigen (CPA) professionals més potents, i úniques per la seva capacitat d'induir respostes primàries permetent l'establiment de memòria immunitària. Aquesta resposta immunitària primada i amplificada per les cèl·lules dendrítiques es produeix després de que l'antigen hagi estat captat i processat per la cèl·lula dendrítica, i que aquesta hagi madurat i migrat cap als òrgans limfoides secundaris, on interacciona amb els limfòcits (Banchereau J, Nature 1998; Banchereau J, Annu Rev Immunol 2000; Larsson M Curr Top Microbiol Immunol 2003).

Les cèl·lules dendrítiques es classifiquen en diferents subpoblacions en funció de la seva distribució anatòmica, funció immunològica i marcadors de superfície cel·lular (Wu L, Nat Rev Immunol, 2006). Així doncs, a sang perifèrica hi trobem les anomenades CD mieloides (mDC), que es caracteritzen per la seva capacitat de secretar IL-12 en elevades quantitats (Liu YJ, Cell, 2001), i les plasmocitoides (pDC), que es caracteritzen per la seva capacitat de produir interferons de tipus I (Cella M, Nat Med 1999), i a nivell dels teixits hi trobem les cèl·lules de Langerhans que expressen elevades concentracions de langerina (lectina de tipus C que actua de receptora del VIH) a la seva superfície (Valladeau, Immunol Res 2003).

Els tres subtipus de CD exposats són susceptibles a la infecció pel VIH, doncs totes elles expressen quantitats relativament baixes de receptors CD4 i coreceptors CC i

CXC, receptors del VIH a la superfície limfocitària, així com receptors de manosa i la langerina, propis de les cèl·lules dendrítiques (Turville SG, Nat Immunol, 2002). Per tant no hi ha un únic receptor responsables de la unió al VIH en tots els subtipus de cèl·lules dendrítiques.

#### 1.2.1.2.1 Mètodes de captació de l'antigen

Les cèl·lules dendrítiques poden identificar els diferents patògens a través de receptors anomenats “evolutionary conserved patten recognition receptors (PRR)” (Janeway CA, Cold Spring Harb Sympo Quant Biol, 1989). Els PRR reconeixen molècules derivades de patògens que també estan conservades i que es coneixen amb el nom de “pathogen-associated molecular patterns (PAMP)”. La unió de les PAMP als seus receptors PRR pot conduir a la opsonització, endocitosi, activació de la CD o apoptosi de la mateixa (Janeway CA, annu Rev Immunol, 2002).

Dues de les famílies més importants de PRR són els Toll-like receptors (TLRs) (Akira S, Nat Immunol, 2001) i les lectines de tipus C (Cambi A, Cell Microbiol, 2005).

La unió dels TLRs als PAMPS provoca l'activació de les CDs mitjançant l'activació de la via de senyalització NF- $\kappa$ B (Akira S, Nat Immunol, 2001).

La unió a les lectines de tipus C, en canvi, pot conduir a la internalització i presentació dels antígens (Engering A, J Immunol, 2002). De lectines de tipus C coneixem, per exemple, el receptor de la manosa (CD206), la langerina (CD207), el DEC-205 (CD205) i el DC-SIGN (CD209). Aquest últim receptor reconeix una gran varietat de microorganismes, tals com bacteris, fongs, paràsits i virus, entre els quals hi trobem el VIH (Geijtenbeek TB, Cell, 2000). Tot i que, com ja hem comentat anteriorment, la unió a DC-SIGN va seguida de la internalització i degradació de l'antigen a nivell del lisosoma, i la posterior presentació als limfòcits T (Engering A, J Immunol, 2002), la majoria dels patògens que s'uneixen al DC-SIGN provoquen infeccions cròniques. Aquest fet suggereix que la unió del patògen a aquesta molècula podria induir tolerància o evasió immunitària (Van KY, Nat Rev Immunol, 2003). Les CD immadures són molt eficients en la captació de

l'antigen al lloc de la infecció gràcies a diferents mecanismes tals com: (i) la macropinocitosi; (ii) l'endocitosi mediada per receptors lectina de tipus C (especialment DC-SIGN en els cas de la infecció pel VIH-1) o receptors Fcγ de tipus I i II; (iii) fagocitosi de partícules, fragments cel·lulars apoptòtics o necròtics, virus, bacteris i paràsits intracel·lulars.

#### 1.2.1.2.2 Maduració i migració

El procés de maduració de les cèl·lules dendrítiques que es dona gràcies a la captació antigènica es troba íntimament relacionat amb la migració d'aquestes cèl·lules des dels teixits perifèrics cap als òrgans limfàtics secundaris on es dona la interacció amb els limfòcits. Existeixen nombrosos factors que regulen i indueixen la maduració de les cèl·lules dendrítiques, com per exemple la presència de ARN viral, l'equilibri entre senyals proinflamàtòries i antiinflamàtòries en el microambient, així com les senyals provinents de les cèl·lules T. Durant el procés de maduració les cèl·lules dendrítiques perden els seus receptors endocítics/fagocítics, subregulen les molècules co-estimuladores dels limfòcits, canvien la seva morfologia i experimenten canvis en els compartiments que contenen el complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe II que es transloca a la superfície de la cèl·lula. Durant aquest procés també es supraregula els receptor de quimiocines CCR7 fet que permetrà a aquestes cèl·lules abandonar els teixits perifèrics i entrar a la circulació limfàtica. De la circulació limfàtica arribaran a la zona paracortical dels ganglis, i després de trobar-se amb les cèl·lules T, les CD reben senyals addicionals de maduració que indueixen l'alliberació de quimiocines, tal com la IL-12 que té la capacitat d'atraure més limfòcits (Banchereau J, Annu Rev Immunol 2000).



### 1.2.1.2.3 Processament i presentació de l'antigen: MHC-II i MHC-I

Les molècules de MHC-II són constantment acumulades, per les cèl·lules dendrítiques immadures, en uns compartiments intracel·lulars relacionats amb els lisosomes. Els antígens que es processen per la via del MHC-II són exògens i per tant no han infectat a les CD. Un cop capturats són transferits cap a aquests compartiments, fet que facilita la catàlisi de la regió invariable del MHC-II i la seva substitució pels pèptids d'antigen. La maduració de les CD provoca la translocació de la molècula de MHC-II carregada amb l'antigen cap a la superfície cel·lular. Aquests complexos s'uneixen específicament als receptors dels limfòcits CD4+ fet que provocarà la seva activació.

Les CD per tal de generar limfòcits T citotòxics (CTL), presenten els antígens en molècules MHC-I sintetitzades de novo en el reticle endoplasmàtic. Els antígens que es presenten sobre el MHC-I poden ser (i) antígens endògens, és a dir, provinents de patògens que han infectat la CD i que seran processats per una via endògena (clàssica), o bé (ii) antígens exògens. La capacitat de les cèl·lules dendrítiques de captar, processar i presentar els antígens extracel·lulars sobre les molècules MHC-I a les cèl·lules CD8 s'anomena "presentació creuada", i és el procés fonamental en la creació d'immunitat enfront de tumors i virus que no infecten les cèl·lules dendrítiques.

- (i) Via de processament clàssica (endògena): la degradació de les proteïnes antigèniques es produeix en el citosol, i aleshores són presentades mitjançant la molècula MHC de classe I.
- (ii) Via de processament exògena (presentació creuada): actualment es coneixen diverses rutes per a la presentació creuada d'antígens exògens:
  - Via independent de transportadors transmembrana en la qual els antígens s'hidrolitzen a l'endosoma.
  - Via dependent de transportadors transmembrana en la qual l'antigen passa del fagosoma al citosol.
  - Fagocitosi i processament de cossos cel·lulars apoptòtics o necròtics.

També s'ha demostrat que els complexos immunes captats per receptors de superfície així com els exosomes derivats de cèl·lules tumorals o de cèl·lules dendrítiques pulsades amb pèptids tumorals poden accedir a la presentació creuada. Així mateix, aquesta propietat de les cèl·lules dendrítiques és clau en la creació d'immunitat cel·lular CD8 mitjançant la vacunació contra, per exemple, antígens tumorals i virus. Com que la immunitat cel·lular CD8 és clau en el control de la infecció per VIH, aquesta propietat de les cèl·lules dendrítiques les fa especialment atractives en el disseny de vacunes contra el VIH.

## **1.2.2 Immunitat Adaptativa**

### **1.2.2.1 Resposta Humoral**

La infecció pel VIH-1 provoca una forta resposta per part dels anticossos contra pràcticament totes les proteïnes reguladores i estructurals del VIH. Fins a l'actualitat s'ha descrit la síntesi d'anticossos contra l'embolcall, contra proteïnes de la matriu, de la nucleocàpside viral i contra proteïnes reguladores del virus. Alguns d'aquests anticossos, especialment els dirigits contra gp41 i contra el domini variable 3 (V3) i d'interacció amb CD4 de la proteïna gp120, tenen capacitat neutralitzant *in vitro* i en experiments d'immunoteràpia adoptiva *in vivo* (Nabel GJ, N Eng J Med, 2000). Tot i així, la producció d'anticossos amb capacitat neutralitzant és escassa i, ràpidament, s'observa un escapament viral a aquests (Richman DD, PNAS USA, 2003). Aquest problema, segurament es deu al fet que les parts exposades i més immunogèniques de la proteïna gp160 en la seva forma "compacta" són regions molt variables que poden induir la síntesi d'anticossos contra els quals l'escapament viral és fàcil mitjançant la mutació dels epitops reconeguts. En canvi, els epitops d'interacció amb el receptor, els quals estan molt més conservats i que podrien tenir la capacitat d'induir anticossos neutralitzants d'ampli espectre, tan sols s'exposen quan la proteïna es desplega per la unió a CD4 (Wei X, Nature 2003). Aquesta hipòtesi es confirma pels treballs d'estructura sobre la interacció

gp160-CD4, que demostren que només després del desplegament de la gp160 s'exposa el domini que interactua amb els coreceptors de quimiocines. Aquests estudis en els quals es defineix l'estructura dels anticossos neutralitzants d'ampli espectre, el seu mecanisme d'acció i els epítops de neutralització en el virus, són molt importants per entendre els mecanismes de neutralització i definir les característiques que han de tenir els anticossos per ser eficaços i neutralitzar un ampli espectre de variants virals (Burton DR, Nat Immunol 2004).

### **1.2.2.2 Resposta Cel·lular**

#### **1.2.2.2.1 Resposta CD4**

Pel que fa a les cèl·lules CD4 VIH-1-específiques, cal dir que durant la primoinfecció, de setmanes de duració, es produeix una pèrdua ràpida i massiva de limfòcits T CD4+ memòria que duu a terme el VIH directament. Aquesta pèrdua té lloc principalment en el teixit limfoide associat a mucoses (MALT, *mucosal-associated lymphoid tissue*). Aquest teixit conté la majoria de limfòcits T CD4+ de l'organisme, una gran part dels quals tenen dues característiques que els fan especialment sensibles a la infecció: expressen CCR5 a la seva superfície i tenen un fenotip memòria activat (Vaezey RS, J Ind Dis 2003 ; Brenchley J Exp Med 2004). El VIH provoca, durant 2-3 setmanes una gran depleció d'aquestes cèl·lules.

S'ha demostrat, en models animals i humans, que la presència de les cèl·lules T CD4+ és molt important, tant per la inducció com pel manteniment d'una resposta efectiva per part de les cèl·lules CD8+ (Janssen EM, Nature, 2003). S'ha observat que ni durant la fase aguda, ni la crònica, ni tan sols durant les fases inicials d'aquesta última, existeix resposta per part de les cèl·lules T CD4+ anti-VIH-1. La poca resposta detectada, disminueix progressivament quan s'administra TARGA (tractament antiretroviral de gran activitat), i no s'observa una recuperació significativa després d'un any de supressió vírica efectiva pel tractament (Plana M, Lancet, 1998). A la literatura es troben estudis que diuen

que si bé es pot demostrar l'existència de cèl·lules CD4<sup>+</sup> anti-VIH en la majoria de pacients infectats, aquestes poden ser activades i produeixen IFN- $\gamma$ , però presenten una capacitat proliferativa *in vitro* dèbil i una baixa producció de IL-2 (Iyasere, J Virol, 2003; Younes J Exp Med, 2003). Actualment es coneixen tres tipus de poblacions amb diferències funcionals: cèl·lules secretores d'IL-2, cèl·lules secretores d'IFN- $\gamma$ , i cèl·lules secretores d'ambdues citocines. Així, la manca de resposta limfoproliferativa s'associa a la manca de poblacions de CD4 secretores de IL-2, i s'ha demostrat una correlació directa entre la resposta proliferativa i la producció d'IL-2, però no amb la secreció d'IFN- $\gamma$  (Harari A, Blood, 2004), i entre la producció d'IL-2 i la virèmia (Harari A, Blood, 2004; Norris Jvirol, 2004). La resposta a nivells d'antigen elevats o bé a la persistència antigènica, situació que es dona durant la infecció progressiva pel VIH es caracteritza per la presència exclusiva de cèl·lules secretores d'IFN- $\gamma$ ; en canvi, la resposta a la presència repetitiva de l'antigen o a nivells baixos d'aquest antigen, com és el cas de la infecció pel VIH en no progressors de llarga duració, està caracteritzada per una resposta polimorfa IL-2/IFN- $\gamma$  (Harari A, J Immunol, 2005). Aquest estudi suggereix que l'heterogeneïtat funcional de les cèl·lules T CD4 específiques ve condicionada per la càrrega viral, i no que aquest fet sigui el mecanisme responsable del control d'aquesta càrrega. També s'ha descrit la presència d'una subpoblació de cèl·lules CD4 amb activitat citolítica, que expressen perforina, granzyme A i B i altres proteïnes citolítiques.

D'altra banda, també s'han documentat defectes en les vies de diferenciació i maduració, com per exemple un acúmulo de cèl·lules CD4 amb fenotip intermig durant la fase crònica de la infecció (Harari A, Blood, 2004; Yue FY, Jimmunol, 2004). Es creu que l'heterogeneïtat en els fenotips madurats de les cèl·lules CD4 VIH-específics, així com les característiques funcionals associades, es veuen molt influenciades pel grau de replicació vírica (Palmer BE, Jimmunol 2004).

Un tema molt estudiat actualment és el de les cèl·lules T reguladores (Treg). Les Treg són cèl·lules T CD4<sup>+</sup> que tenen un paper crític en la regulació del sistema immunitari. Aquestes cèl·lules poden ser caracteritzades mitjançant diferents marcadors. S'utilitza per

exemple l'expressió de nivells elevats de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) (Fehervari Z, JclinInvest 2004). Un altre marcador que actualment s'utilitza per caracteritzar fenotípicament les Tregs és l'expressió reduïda del receptor de IL-7 (CD127) (Seddiki N, JexpMed 2006). De totes maneres el factor de transcripció FoxP3 ("Nuclear Protein Forkhead box protein 3") és considerat de moment el marcador més característic d'aquestes cèl·lules (Ramsdell F, Immunity 2003; Fontenot J, Nat Immunol, 2003; Hori, S, Microbes Infect 2004). Tot i així, aquests marcadors, inclòs el FoxP3 es poden expressar de manera transitòria en les cèl·lules T helper recentment activades, complicant la identificació de la subpoblació de Tregs (Walker M, JclinInvest, 2003). L'impacte de les cèl·lules Treg en la infecció pel VIH i en la progressió de la malaltia pot ser altament significativa. Es creu que l'estimulació antigènica persistent, l'estat de virèmia constant, podria induir la generació d'una població de Treg que contribuiria a la disfunció del sistema immunitari.

#### 1.2.2.2.2 Resposta CD8

Estudis realitzats amb murins han demostrat que després d'una infecció viral es produeixen 3 fases ben diferenciades: en primer lloc una fase d'activació i diferenciació, fet que comporta que quan les cèl·lules T CD8 naïve s'activen durant la fase de primoinfecció, pateixin canvis funcionals i fenotípics en base a aquestes funcions i es diferenciïn en el que s'anomenen cèl·lules efectores (Wherry EJ, J Virol 2004). Aquestes cèl·lules efectores seran les que, un cop es posin en contacte amb l'antigen, duran a terme la seva activitat antiviral. Les CTLs poden realitzar aquesta activitat a través de dos mecanismes ben diferenciats. Un dels mecanismes és mitjançant una acció citolítica directa provocada per l'alliberament de perforina i granzimes per part dels grànuls lítics mitjançant un procés calci-depenent. La perforina és una glicoproteïna que s'integra a la membrana plasmàtica, fet que provoca la formació d'un porus, i per tant la mort de la cèl·lula diana a causa d'una lisi osmòtica; l'acció citolítica directa pot ser provocada també mitjançant una via independent de calci i es dona a través de lligands específics tals com

el Fas-Ligand (Fas-L) que provoca l'apoptosi. El Fas (CD95) és un membre de la superfamília del receptor de necrosi tumoral. La unió de Fas amb el seu lligand (Fas-L) que s'expressa a les CTLs activades condueix a la mort per apoptosi de les cèl·lules diana (Sewell AK, Stem Cells, 2000). S'ha demostrat que en la infecció pel VIH existeixen defectes funcionals en la resposta CTL que condicionen la resposta antiviral, amb una reducció de la quantitat de perforines (Appay V, J Exp Med 2000). L'altre mecanisme que utilitzen les CTLs per dur a terme la seva activitat antiviral és mitjançant mecanismes no citolítics, com la producció de citocines tals com l'IFN- $\gamma$  que inhibeix la replicació del VIH i MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i RANTES que suprimeixen la replicació del virus per competició o infraregulació del coreceptor viral CCR5 present a la superfície de les cèl·lules diana (Cocchi F, Science, 1995) i CAF (CD8-T cell antiviral factor) que bloqueja la transcripció del VIH (Levy, Immunol Today, 1996).

Durant la segona fase en el procés de la infecció viral, té lloc la mort per apoptosi de la majoria de cèl·lules CD8 antígen específiques. Aquesta fase rep el nom de fase de contracció. La petita proporció de cèl·lules que no moren per apoptosi seran les cèl·lules memòria madures antígen-específiques i entraran a formar part del *pool* de cèl·lules T memòria durant la tercera fase de la infecció (Wherry EJ, J Virol 2004; Van Lier RA, Nat Rev Immunol, 2003).

En la infecció pel VIH-1 s'ha demostrat que les CTL són essencials per obtenir la supressió de la replicació vírica i també per evitar la progressió de la infecció. De totes maneres és important destacar que durant la infecció crònica pel VIH-1 el sistema immunitari no és capaç d'evitar la replicació del virus, i que per tant la presència continua de l'antigen comporta una activació immune persistent amb conseqüències greus tant per la diferenciació com per la maduració de les cèl·lules T CD8+ (Appay V, J Immunol 2002; Champagne P, Nature 2001).

Després de molts estudis del fenotip diferencial de les cèl·lules CD8 específiques contra el VIH-1, EBV, CMV i HCV, s'ha descrit que si bé les cèl·lules CD8 específiques contra aquests virus mostren unes característiques similars durant la fase aguda de la

infecció, això varia substancialment durant la fase crònica. Durant aquesta, trobem una elevada heterogeneïtat entre els diferents estadis maduratius d'aquestes cèl·lules fet que suggereix que en les diferents infeccions víriques s'estableixen diferents poblacions de cèl·lules T memòria (Van Lier RA, Nat Rev Immunol, 2003; Appay, Nat Med 2002). Si ens centrem en la infecció pel VIH podem dir que les cèl·lules CD8 específiques presenten característiques d'un estat intermig de diferenciació, amb baixos nivells de producció de perforina i capacitat citolítica reduïda. Durant la infecció crònica, existeix un acúmul de cèl·lules CD8+ amb fenotip pre-terminal (CCR7- CD27+ CD28- CD45RA-) amb poca activitat citotòxica i que no acaben d'assolir el fenotip CCR7- CD27- CD28- CD45RA+ perforina+ (Zhang D, Blood 2003; Trabattoni D, AIDS 2004). Els pacients LTNP (per "Long Term Non Progressors") presenten unes cèl·lules CD8 amb una bona capacitat proliferativa, fet que es correlaciona amb una eleva expressió de perforina, i per tant amb una bona funció efectora que s'ha associat a un paper protector de la resposta antiviral de les cèl·lules CD8 (Migueles SA, Nat Immunol, 2002). La pèrdua de la capacitat proliferativa dels pacients en estadis avançats de la infecció es relaciona amb l'expressió de CD57. També es creu que la presència de cèl·lules CD8+ CD27- podria indicar una bona adaptació d'aquestes cèl·lules a la infecció vírica i per tant podria ser un indicador de bon pronòstic (Van Baarle D, TRENDS Immunol 2002).

#### 1.2.2.2.3 Paper de les cèl·lules T CD4 sobre les cèl·lules T CD8

Com ja hem comentat anteriorment, la resposta de les cèl·lules T CD4 (resposta T col·laboradora) és molt important per aconseguir una bona resposta CD8, mantenir la memòria d'aquestes i madurar la seva funció. Una evidència que demostra aquest fet ve donada per estudis en murins que assenyalen que CD40L, expressat en cèl·lules CD4 activades, és crucial per desencadenar la producció de IL-12 per part de les cèl·lules dendrítiques, i per tant per iniciar la resposta de les cèl·lules CD8 (Ridge JP, Nature 1998).

En el manteniment de la memòria de les cèl·lules CD8, s'ha demostrat que les clones CTL VIH-específiques transfoses a pacients seropositius tenen una baixa

supervivència ja que probablement són més IL-12 depenents, a diferència de les clones CD8 activades de manera natural, que podrien tenir la capacitat de sobreviure en absència de resposta col·laboradora (Bevan MJ, PNAS USA).

Estudis recents sobre el paper de les cèl·lules CD4 en el manteniment de la resposta proliferativa CD8 han mostrat resposta proliferativa durant la infecció aguda, però no en la fase crònica si no s'afegia IL-2 exògena o bé cèl·lules CD4 aïllades durant la primoinfecció (Lichterfeld M, JexpMed 2004), fet que sembla indicar que l'esgotament de la resposta col·laboradora durant la fase crònica de la infecció podria explicar parcialment el defecte de la resposta CTL. Un altre estudi, i coincidint amb resultats previs, ha posat de manifest que les cèl·lules CD8 amb capacitat proliferativa estan presents en pacients no progressors, i que aquesta capacitat depèn de la presència d'IL-2, dependent o no de la presència de les cèl·lules CD4 (Zimmerli SC, PNAS USA 2005).

Malgrat tot, la influència dels diferents patrons funcionals de cèl·lules CD4 sobre la funcionalitat de les cèl·lules CD8 no està del tot aclarida, i donat que les diferències observades en el fenotip/funcionalitat de les cèl·lules CD4 en pacients LTNP o pacients progressors no permeten predir la capacitat de control sobre la replicació viral, sembla que aquesta qüestió és important a l'hora de definir les característiques de la resposta T protectora.



### **1.3 PER QUÈ EL SISTEMA IMMUNOLÒGIC NO POT CONTROLAR LA REPLICACIÓ VIRAL?**

La pregunta que se'ns planteja ara és per què fracassen els mecanismes de defensa específics i inespecífics destinats a controlar la infecció pel VIH? Els virus desenvolupen una sèrie de mecanismes d'escapament de la resposta immune per tal d'evitar la seva pròpia eliminació. En el cas del VIH, aquests mecanismes són bàsicament la possibilitat d'entrar en una fase de latència en els reservoris infectats, així com la capacitat de generar una gran variabilitat en les proteïnes estructurals del virus gràcies a la elevada taxa d'error de la transcriptasa inversa en el procés de la retrotranscripció, fet que condueix a una ineficàcia del sistema immune.

#### **1.3.1 Depleció clonal de les respostes CD4**

Alguns autors pensen que durant la infecció aguda es podria produir una depleció clonal de les cèl·lules CD4+ per la qual cosa no tindrien la capacitat de mantenir una resposta CTL eficaç. S'ha observat que existeix una infecció selectiva de les cèl·lules CD4+ específiques del VIH en individus infectats, fet que explicaria perquè aquestes respostes es perden tan aviat en la infecció del VIH (Douek DC, Nature 2002). De fet en la majoria dels pacients infectats pel VIH, les respostes proliferatives de CD4 contra el VIH estan absents (Day C, J Exp Med 2003). Tot i així, com ja hem citat abans, en la majoria de pacients infectats, es poden trobar cèl·lules CD4+ capaces de secretar IFN- $\gamma$  després d'un estímul, fet que suggereix que una depleció clonal no podria explicar el fracàs immunològic que s'observa.

### **1.3.2 Alteració de les cèl·lules CD4**

Les cèl·lules CD4 són les cèl·lules diana del virus (Douek, Nature, 2002), fet que provoca que el desenvolupament de la resposta immune per part d'aquestes cèl·lules es trobi compromesa durant la primoinfecció. També cal tenir en compte que la resposta CD4 és molt important per a la correcta coordinació de la resta de respostes, principalment, de la resposta CD8. Durant la primoinfecció es produeix una depleció important del nombre de cèl·lules T CD4, fet que provoca que la situació durant la fase crònica de la infecció serà força compromesa. Durant la primoinfecció la subpoblació de cèl·lules més perjudicada, és la secretora de IL-2 (Harari, J Immunol, 2005), que són precisament les precursors de les cèl·lules T memòria a llarg termini, per la qual cosa l'èxit en el control immunològic durant la fase crònica de la infecció podria dependre del grau de conservació d'aquesta subpoblació cel·lular.

També s'ha observat que els individus amb infecció crònica pel VIH es caracteritzen per l'absència de cèl·lules memòria central (CCR7+), a favor de les cèl·lules memòria efectores (CCR7-). L'absència de memòria específica a llarg termini podria afavorir el fracàs de la resposta CD4 específica en la infecció progressiva pel VIH.

### **1.3.3 Alteració de les cèl·lules CD8**

La literatura aporta diversos estudis que demostren que les cèl·lules citotòxiques VIH-específiques poden tenir diferents defectes funcionals que podrien afectar al correcte control de la replicació viral. Per exemple, menys del 15% de les cèl·lules citotòxiques específiques contenen perforina, que recordem que és la responsable de l'activitat citotòxica directa d'aquestes cèl·lules (Appay, J Exp Med, 2000); aquest fet es pot relacionar amb l'estat de maduració incomplet de les CTLs en relació a d'altres infeccions virals cròniques, com podria ser el cas de la infecció per CMV. Es pensa que aquesta alteració en el grau de maduració i diferenciació podria estar provocat per una funció col·laboradora alterada.

Actualment s'ha demostrat també la sobreexpressió del receptor PD-1 (receptor inhibidor de la mort programada) en les cèl·lules T CD8+, que es relaciona amb una càrrega viral elevada. Sembla ser que degut a la constant estimulació per part de l'antigen les cèl·lules T CD8+ sobreexpressarien aquest receptor, fet que provocaria una disminució en la producció de citocines antivirals. Cal dir també, que l'expressió d'aquest receptor es troba relacionat tant amb l'estat d'activació com amb el de diferenciació (Goldberg MV, Blood, 2007; Sauce D, AIDS, 2007). Sembla ser que la proteïna Nef del VIH seria la principal causant d'aquesta sobreexpressió. El bloqueig de la via PD-1/PD-L1 podria representar una nova opció terapèutica pel tractament de la infecció del VIH-1 (Zhang, Blood, 2007)

#### **1.3.4 Alteració en la funció presentadora de l'antigen**

Una de les explicacions d'aquests dèficits funcionals de les respostes CD4 i CD8 seria que les funcions presentadores d'antigen de les CD podrien estar deteriorades en aquests pacients. Algunes dades suggereixen que les funcions presentadores d'antigen es troben alterades en pacients infectats pel VIH (Donaghy H, Blood 2003; Chehimi J, J Immunol 2002) i que el virus s'uneix al DC-SIGN fet que augmenta la seva infectivitat a l'infectar-se les cèl·lules T quan es produeix la presentació antigènica (Kwon DS, Immunity, 2002). Aquest fet podria contribuir als defectes funcionals observats en la resposta helper i CTL específiques contra el VIH. A més a més s'ha observat que les CD infectades pel VIH no presenten una bona maduració, fet que podria contribuir a la supressió de les respostes T en els pacients (Granelli-Piperno A, PNAS USA 2004)

### **1.3.5 Hiperactivació i esgotament del sistema immunitari**

La intensa replicació viral induiria un estat de sobrecàrrega antigènica i activació contínua del sistema immunològic que comportaria un augment del nombre de cicles de divisió de limfòcits, particularment dels limfòcits T CD8 (Hazenberg MD, Nat Immunol 2004). Aquesta cinètica incrementada dificultaria l'homeostasi normal del compartiment de limfòcits activats que serien destruïts per programes d'apoptosi després d'un cert nombre de divisions, disminuint alhora la generació d'un compartiment de limfòcits memòria.

### **1.3.6 Escapament viral**

L'escapament de la resposta CTL es deu bàsicament a mutacions puntuals dels epítops virals que interaccionen amb l'HLA. Tant en els pacients primoinfectats com en els models animals s'ha demostrat com la mutació en un residu comporta un escapament viral, pèrdua de la resposta CTL i increment de la virèmia. Tot i així, en la fase crònica no es troba una correlació clara entre l'eliminació d'una determinada variant viral i la presència de cèl·lules CTL contra aquesta. A part de les dades estrictament quantitatives existeixen diferències funcionals entre les CTL de pacients progressors i no progressors com l'expressió de perforines, la producció alterada de citocines i quimiocines i una menor activitat del receptor de l'antigen TCR pel complex HLA/epítop viral. Aquestes dades suggereixen que no tan sols el nombre de CTL sino les característiques qualitatives d'aquestes poden ser importants en el control de la replicació viral (Migueles SA, Nat Immunol 2002).

## 1.4 RESPOSTA AL TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL

El tractament de la infecció pel VIH del qual disposem avui en dia, consisteix en una combinació de tractaments antiretrovirals que constitueixen determinades pautes del que s'anomena tractament antiretroviral de gran activitat (TARGA). Com a fàrmacs més nous trobem aquells que tenen com a diana terapèutica els coreceptors i la integrasa. S'utilitzen fàrmacs antagonistes del CCR5 (Lieberman-Blum SS, Clin Ther, 2008) i fàrmacs que bloquegen l'activitat de l'enzim integrasa (Temesgen Z, Ther Clin Risk Manag, 2008). Tots dos tipus de fàrmacs estan donant molt bons resultats en quan a la disminució de la càrrega viral (CV), però encara es desconeixen els seus efectes sobre el sistema immunitari.

L'administració del TARGA té conseqüències tant a nivell tant del virus, com de les poblacions limfocitàries i les pròpies respostes immunes contra el VIH-1.

### 1.4.1 Efectes sobre la càrrega viral

El TARGA provoca una disminució de la CV plasmàtica que, segons models matemàtics, es produeix en dues fases (Perelson AS, Science 1996): en una primera fase, els nivells d'ARN plasmàtic disminueixen ràpidament (de manera exponencial durant les dues primeres setmanes del tractament) i els limfòcits T CD4+ infectats amb el virus amb replicació activa es moren (Ho DD, Nature 1995; Wei X, Nature 1995). Durant la segona fase, el ritme de descens de la CV és menor, posant de manifest la presència de limfòcits T CD4+ de vida mitja llarga infectats, en repòs, i que contenen virus amb capacitat replicativa tant en forma integrada com no integrada, així com de virus lliure associat a les cèl·lules dendrítiques fol·liculars en el teixit limfàtic (Zhang ZQ PNAS 1998).

El descens d'ADN (integrat o no) i de l'ARNm s'ha documentat que també es produeix en dues fases. Una primera amb un descens important d'ambdós (1.25-1.46 log<sub>10</sub>) durant els primers 500 dies de tractament. I una segona fase durant els següents

200 dies o més de TARGA en els quals s'arriba a una *plateau* en els seus nivells, persistint detectables (Yerly S, AIDS 2000).

El VIH és capaç d'infectar de forma latent les seves cèl·lules diana. D'aquesta manera les cèl·lules escapen tant dels mecanismes de vigilància immunològics, degut a que no expressen a la seva superfície cap producte viral, com també escapen del TARGA.

#### **1.4.2 Efectes sobre els limfòcits. Repoblació cel·lular**

Amb el TARGA es produeix un increment del nombre absolut de limfòcits T CD4+ circulants i una reconstitució immunològica, com a mínim parcial (Autran B, Science 1997). Els mecanismes que regeixen aquesta reconstitució immunològica després del TARGA no estan encara del tot aclarits, tot i que es pensa que no haurien de diferir en excés d'altres situacions de depleció limfocitària T adquirida com són el transplantament de medulla òssia i les citopènies postquimioteràpia.

Aquesta repoblació, bàsicament la dels limfòcits T CD4+, és molt heterogènia entre els diferents pacients, però s'admet que es produeix de forma bifàsica. Una fase inicial, de setmanes o mesos, associada a una redistribució dels ganglis limfàtics i a una expansió perifèrica de les cèl·lules memòria (Autran B, Science 1997; Pakker NG, Nat Med 98). I una fase posterior, després de 6-12 mesos de tractament, d'increment en les cèl·lules CD4+ naïve (aquells limfòcits T CD4+ que no han entrat en contacte amb el seu determinant antigènic) creades *de novo*. Molts estudis demostren que les fases primerenques de la reconstitució immune són probablement timus-independent, en canvi la segona fase de reconstitució seria dependent del timus (Douek DC, Nature 1998; Zhang L, J Exp Med 99).

L'origen dels limfòcits T CD4+ en la repoblació limfocitària és de gran importància. La redistribució o proliferació de les cèl·lules preexistents tan sols augmenta el nombre de cèl·lules dels clons que han sobreviscut, és a dir que el sistema immune millora quantitativament però no qualitativament, i tan sols protegirà contra aquells agents que

encara es reconeixien abans de la recuperació. Al contrari, la producció de noves cèl·lules portaria a recuperar almenys part del repertori d'especificitats (en forma de varietat en els receptors de cèl·lules T (TCR), algunes de les quals s'han perdut durant la infecció. A més, teòricament, la producció de cèl·lules de novo permetrà una major resposta a neoantígens de forma efectiva i reposar el compartiment de cèl·lules T a nivells normals (MacKall CL, Immunol Today 97; MacKall N Engl J Med 95).

Tot i així, la contribució relativa a l'homeostasi cel·lular T de la disfunció tímica, la disminució de la pèrdua accelerada per apoptosi associada a l'activació limfocitària, i l'expansió perifèrica T dependent de citocines està pobrement definida (Grossman Z, Nat Med 2002).

#### **1.4.3 Efectes sobre la resposta immunitària cel·lular contra el VIH**

Tot i que alguns autors han observat un manteniment o inclús un augment de les respostes cel·lulars específiques antivirals dels limfòcits T CD8+ a l'iniciar el TARGA (Altfeld M, J Exp Med 2001; Oxenius A, PNAS 2000), aquestes respostes normalment disminueixen en resposta al tractament. (Ogg GS, Science 1998; Gray CM, J Immunol 99).

Pel que fa a les respostes específiques anti-VIH dels limfòcits T CD4+, iniciar el TARGA de manera precoç (durant la fase aguda de la infecció) pot preservar-les (Oxenius A, PNAS 2000; Rosenberg ES, Nature 2000), mentre que si el tractament s'inicia durant la infecció crònica, rarament s'observen aquestes respostes (Autran B, Science 1997; Plana M, Lancet 1998), tot i que la immunitat cel·lular T contra els patògens oportunistes estigui restaurada consistentment en aquests pacients.

Aquestes observacions ens porten a la teoria de que la immunitat VIH específica disminueix o desapareix durant el TARGA perquè les cèl·lules específiques no s'estimulen de manera òptima amb nivells apropiats d'antigen, fet que té molt a veure amb la recuperació de part d'aquestes respostes, com a mínim de manera transitòria, quan el sistema immunitari es reexposa als antígens del VIH durant les interrupcions del TARGA

(Ortiz GM, J Clin Invest 1999). D'altra banda, alguns estudis han demostrat l'existència d'una correlació negativa entre la viremia d'equilibri que s'aconsegueix amb el TARGA i la resposta immune, fet que suggereix que la resposta immune determina el *set point* viral (nivell d'estabilització). De fet s'ha observat que la relació entre el TARGA, la replicació viral i la resposta immune és complexa i no lineal, presentant una relació positiva quan els nivells de viremia són baixos i negativa quan aquests valors són alts (Deeks SG, J Infect Dis 2004). Aquest model és el que explica el control parcial de la replicació viral de virus resistents. Inicialment la funció immunològica T millora com a conseqüència d'una reducció de la replicació viral gràcies al TARGA. A causa d'un fracàs en el control de la replicació per part del TARGA, apareix una replicació de baix nivell de les variants resistents del virus, aportant l'estímul antigènic necessari per generar un major nombre de limfòcits T CD4+ i CD8+ específics. El control parcial de la replicació per part del TARGA i/o emergència d'un VIH menys virulent prevenen la ràpida depleció de les cèl·lules CD4+ VIH-específiques. D'aquesta manera, s'aconsegueix un nou estat d'equilibri en el qual el virus salvatge és controlat pel TARGA i el resistent ho fa de forma parcial gràcies a la combinació d'una resposta immune efectiva, una menor capacitat replicativa i una pressió farmacològica contínua parcialment efectiva.



## 1.5 TERÀPIES IMMUNOMEDIADES EN EL TRACTAMENT DE LA INFECCIÓ PEL VIH

### 1.5.1 Fonaments

La teràpia antiretroviral de gran activitat ha disminuït significativament la morbiditat i la mortalitat associada a la infecció pel VIH-1, inclús en aquells pacients afectats per patologies definitòries de SIDA. L'ús del TARGA permet, com hem comentat anteriorment, una supressió molt important de la replicació viral, una recuperació de la xifra de limfòcits T CD4+ i de les respostes immunològiques de les cèl·lules T contra les infeccions oportunistes. Tot i aquests beneficis, el TARGA és incapaç d'eliminar la infecció pel VIH-1 i de recuperar les respostes específiques contra el virus (García F, AIDS 1999). De fet, després de la retirada del TARGA es produeix, en tots els casos, un ràpid augment de la CV. Aquestes evidències reforcen la necessitat d'un tractament a llarg plaç i de manera adequada. El desenvolupament de resistències a la medicació, l'aparició d'efectes adversos a mitjà i llarg plaç i l'elevat cost del tractament constitueixen importants limitacions pel correcte compliment d'aquesta teràpia. Davant d'aquesta situació es considera necessari assajar noves estratègies terapèutiques (Letvin NL, Nat Med 2003). Les dues possibilitats que s'estan investigant actualment són la simplificació dels tractaments i la combinació del TARGA amb una immunoteràpia capaç de restaurar i/o potenciar les respostes immunològiques específiques contra el VIH (Autran B, Nat Rev Immunol 2003). Aquestes últimes haurien de permetre retirar el tractament antiretroviral de manera definitiva o, com a mínim, durant períodes variables de temps (García F, AIDS 2001).

### **1.5.2 Bases patogèniques que donen suport a l'ús d'estratègies immunomediades**

Abans de desenvolupar qualsevol tipus d'estratègia immunomediada s'han de resoldre dues qüestions importants, en primer lloc s'hauria de comprovar que existeixen respostes realment eficaces pel control de la replicació viral, i en segon lloc desenvolupar una hipòtesi clara que explicaria perquè el sistema immunològic és incapaç de fer-ho.

#### **1.5.2.1 Existència de respostes eficaces en el control de la replicació viral**

La hipòtesi de que una resposta immunològica adequada és capaç de controlar la replicació viral surgeix de les següents evidències:

- a. Tot i que en la majoria d'individus infectats la replicació del VIH-1 provoca la destrucció progressiva del sistema immunològic i evoluciona cap a la SIDA, hi ha una petita proporció d'individus immunològicament "privilegiats", no progressors de llarga duració, que es caracteritzen per presentar una resposta de cèl·lules Th1 i CTL anti-VIH-1 potent i sostinguda, i anticossos anti-VIH-1 neutralizants, fets que s'associen a un control de la replicació viral i presència de concentracions de virus en plasma, en absència de TARGA, molt baixes o indetectables (Rosenberg ES, Nature 2000).
- b. La resposta citotòxica (CTL) anti-VIH-1 es detecta en tots els casos estudiats durant la fase aguda de la infecció, i es creu que la seva activitat és la causa de la disminució del fort pic de càrrega viral plasmàtica (CVP) que la caracteritza, fins arribar a l'anomenat nivell d'estabilització de la CVP, que s'estableix al final d'aquesta fase aguda de la infecció. Dades sobre el paper crític que juga la resposta CTL en el control de la replicació viral s'han obtingut tant en el model d'infecció en macacos deplecionats de limfòcits T CD8+ (Schmitz J, Science 1999; Metzner J, J Exp Med 2000), com en el model del ratolí immunodeficient (de Quiros JC, J Virol 2000).

- c. Existeix una clara evidència de que una resposta Th específica contra el VIH és fonamental per aconseguir una resposta CTL específica adequada contra el virus, capaç de controlar la replicació viral, tant en humans (Day C, J Exp Med 2003) com en models animals (Hel Z, J Immunol 2002).
- d. Estudis en models de primats i murins mostren que nivells elevats d'anticossos neutralitzants són capaços de bloquejar la infecció, independentment de la via d'exposició del virus (Nishimura Y, PNAS 2003).

### **1.5.3 Tipus de teràpies immunomediades**

Per tant sembla clar que les respostes cel·lulars i humorals, així com la interrelació entre elles, són vitals per un correcte funcionament del sistema immunològic. Les dades anteriors constitueixen el fonament de la necessitat d'intentar mètodes d'immunoteràpia eficients per induir una resposta anti-VIH-1 de cèl·lules Th i CTL com un intent per poder aconseguir un control immune de la replicació viral en absència del TARGA. S'han assajat diferents tipus de teràpies immunomediades, que bàsicament intenten actuar per tres mecanismes diferents. D'una banda estan aquelles que intenten induir les respostes que disfuncionen en la infecció pel VIH com les interrupcions estructurades del tractament o les vacunes terapèutiques. Altres mètodes intenten aportar a l'organisme aquells components en els quals pot ser deficient degut a la infecció pel VIH, com les citocines o les tècniques d'immunoteràpia passiva. Per últim, basant-nos en les dades que indiquen que existeix una infecció selectiva de les cèl·lules CD4+ activades específiques anti-VIH en els individus infectats, i que l'activació contínua del sistema immunològic és un factor predictor de mala evolució, s'ha proposat l'ús d'immunomoduladors. Les diferents estratègies utilitzades es resumeixen a la taula 2:

ESTRATÈGIA	REFERÈNCIA
<b>Vacunes Terapèutiques</b>	
Virus inactivat complert	(Patterson BK, AIDS, 1999)
Canarypox	(Kinloch-de Loes S, JID, 2005)
Vacunes d'ADN	(Amara RR, Sciene, 2001; Liszewicz, Vaccine, 2003)
Vacunes d'adenovirus recombinant	(Buge SL, JVirol, 1999)
Vacunes de cèl·lules dendrítiques	(Lu W, NatMed, 2004; Garcia F, JID, 2005)
<b>Citocines</b>	
IL-2	(Kovacs JA, NEngJMed, 1996)
Dosis baixes de IL2	(Jacobson EL, PNAS USA, 1996)
Factor estimulant de colònies granulocítiques (G-CSF)	(Aladdin H, JID, 2000)
Factor estimulant de colònies granulocítiques i monocítiques (GM-CSF)	(Brites C, JID, 2000)
Interferó-alfa	(Alston B, JAIDS, 1999)
IL-10	(Angel JB, AIDS, 2000)
IL-12	(Jacobson MA, JID, 2000)
IL-15	(Kanai T, Jimmunol, 1996)
IL-16	(Truong MJ, JVirol, 1999)
IL-7	
<b>Immunoteràpia passiva</b>	
Infusió de limfòcits	(Mitsuyasu RT, Blood, 2000)
Infusió de plasma	(Brodie SJ, JCI, 2000; Brodie SJ, NatMed, 1999)
Infusió d'anticossos monoclonals	(Levy J, Blood, 1994; Kuritzkes DR, JID, 2004)
<b>Interrupcions estructurades del tractament (STI)</b>	
Primoinfecció	(Ruiz L, JID, 2003)
Infecció crònica	(Ruiz L, AIDS, 2000; Garcia F, AIDS, 2001)
<b>Immunomoduladors</b>	
Hidroxiurea	(Hellinger JA, JID, 2000; Garcia F, AIDS, 2003)
Corticoides	(Andrieu JM, JID, 1995)
Ciclosporina A	(Rizzardì GP, J Biol Regul Hoemos Agents, 2000)
Àcid micofenòlic	(Garcia F, JAIDS, 2004)
Talidomida	(Jacobson JM, NengJMed, 1997)

**Taula 2.** Estratègies d'immunoteràpia utilitzades en el tractament contra el VIH

### 1.5.3.1 Interrupcions estructurades del tractament (STI)

Conegudes com STI (per “Structured Therapy Interruption”), van ser de les primeres estratègies d'interrupció, que consistien en diversos cicles amb TARGA i sense TARGA dissenyats per augmentar la immunitat VIH específica cel·lular a través del concepte d’“autovacunació”: l'augment en l'exposició a un virus autòleg de manera repetida podria estimular les respostes VIH-específiques i millorar el control de la infecció.

Tot i que s'han demostrat augments de les respostes específiques cel·lulars anti-VIH i que el temps de duplicació de la CV augmenta després de les interrupcions, generalment la CV després del STI es correlaciona amb la CV pretractament (Oxenius A, PNAS 2002), i la magnitud de la resposta CD8+ específica anti-VIH augmenta fins a una quantitat i qualitat comparables a les que es tenien abans del TARGA, suggerint una restauració de la resposta més que un augment de novo. Per això el STI ha fracassat com a teràpia immunomediada i únicament ha permès controls efectius de la replicació viral a llarg-mig termini en un 20% dels pacients que la realitzen. S'ha suggerit que la falta d'eficàcia del STI és deguda a una resposta CD4+ anti-VIH dèbil i transitòria.

#### 1.5.3.1.1 Estratègies d'interrupció

A part de l'ús del STI com a immunoteràpia, des que existeix la disponibilitat del TARGA i amb l'augment dels coneixements dels riscos de progressió de la infecció i la impossibilitat de l'erradicació del reservori del VIH, s'han elaborat diferents estratègies de suspensió programada del TARGA amb la intenció de reduir el temps acumulat de tractament per disminuir les seves repercussions en diferents àmbits: efectes secundaris, cost econòmic, etc. Les metodologies de suspensió i els contextos en els quals s'han utilitzat són diversos.

En pacients multitractats i en fracàs terapèutic amb virus multiresistents es va plantejar la hipòtesi que una suspensió del TARGA provocaria la replicació del virus salvatge per tal de tenir una major capacitat replicativa o fitness viral, desplaçant a les quasiespècies multiresistents. En aquest moment i davant un virus salvatge, la

reintroducció del TARGA podria tornar a ser efectiva i millorar el control de la replicació i la resposta immune. Tot i així s'ha demostrat que aquesta estratègia s'acompanya d'un deteriorament del sistema immunològic que, al donar-se en pacients amb infecció avançada, augmenta molt el risc de malalties oportunistes (Lawrence J, N Engl J Med 2003).

Un altre àmbit molt diferent és el de les interrupcions en pacients que han respòs de manera satisfactòria al TARGA. En aquest context, últimament s'ha introduït el concepte de la interrupció "guiada", en la qual aquests pacients podrien suspendre el TARGA i reiniciar-lo tan sols basant-se en el recompte de limfòcits T CD4+ i/o CV segons les guies actuals. Els candidats potencials serien aquells que van iniciar el TARGA seguint les guies més agressives i aquells que hàgin experimentat una reconstitució immune després del TARGA. Tot i així els resultats preliminars derivats d'assajos importants en els quals es valoren aquestes estratègies i que han estat presentats recentment demostren que la metodologia utilitzada fins ara, no ha estat eficaç. Així, l'estudi més gran en el qual s'estudia la interrupció guiada per recompte limfocitari T CD4+, l'SMART (El-Sadr, New England, 2006), es van randomitzar un total de 5472 pacients amb TARGA i més de 350 limfòcits T CD4+/mm<sup>3</sup> a seguir amb el mateix tractament de manera convencional o a seguir una estratègia conservadora de fàrmacs guiada pel recompte de limfòcits T CD4+, en la qual el TARGA es suspenia fins que els limfòcits T CD4+ disminuïssin per sota de 250 cèl·lules/mm<sup>3</sup>, moment en el qual es reiniciava el TARGA fins que el recompte tornés a ser superior a 350 cèl·lules /mm<sup>3</sup>, tornant aleshores a suspendres. El reclutament en l'estudi es va parar a l'observar que la branca conservadora de fàrmacs guiada per limfòcits T CD4+ tenia un risc més elevat de progressió de la malaltia o de mort. Resultats similars es van observar en un altre estudi amb un nombre menor de pacients a l'Àfrica subsahariana i amb valors idèntics de recompte limfocitari T CD4+ per l'inici i la suspensió del tractament, el Trivacan (Danel C, Lancet, 2006). Un altre estudi en el qual el nivell de limfòcits T CD4+ necessari per reiniciar el TARGA va ser superior (350 limfòcits CD4+/mm<sup>3</sup>) va mostrar també majors manifestacions relacionades amb la infecció pel VIH

però de tipus més lleu. A l'espera de nous resultats, el que sembla clar és que les estratègies de suspensió del TARGA guiades per limfòcits T CD4+ no haurien de mantenir-se fins a nivells tan baixos de limfòcits T CD4+ (250 cèl·lules/mm<sup>3</sup>) per l'elevat risc que representa i s'haurien d'explorar estratègies amb dintells superiors.

### 1.5.3.2 Vacunes terapèutiques

En general, la capacitat de les vacunes utilitzades per augmentar la resposta específica CD8+ anti-VIH ha estat molt limitada, sense un clar impacte en la CV (MacGregor RR, AIDS 2002). Una de les més estudiades ha estat el *Remune*, una vacuna d'un virus complet inactivat al qual se li ha retirat la proteïna de l'envolta. Aquesta vacuna deriva d'un virus originalment obtingut al Zaire i conté una envolta tipus A i un gag tipus G. S'ha administrat a més de 3000 persones que tenien el virus controlat amb tractament antiretroviral. Els resultats van mostrar que era capaç d'induir respostes CD4+ específiques contra gag a vegades molt potents, però sense capacitat de control immunològic de la replicació viral (Robbins GK, AIDS 2003).

Una altra estratègia és la que utilitza vectors virals recombinants vius que transporten informació genètica del VIH. Com exemples tenim els vectors canarypox (ALVAC), o virus vaccinia-Ankara modificat (McConkey SJ, Nat Med 2003; Kinloch-de Loes, J Infect Dis 2005) amb resultats en general pobres excepte en algú cas (Liszewicz J, Vaccine 2003).

Els estudis que millor demostren la capacitat d'una vacuna terapèutica d'augmentar la immunitat específica de manera eficaç pel control de la replicació viral han estat les que han utilitzat vacunes basades en cèl·lules dendrítiques com adjuvant cel·lular. Les cèl·lules dendrítiques mieloides, com ja hem comentat anteriorment, són les cèl·lules processadores i presentadores d'antigen professionals més potents, i úniques per la seva capacitat d'induir respostes primàries i secundàries dels limfòcits T CD4+ i CD8+ *in vitro* i *in vivo* (Banchereau J, Nature 1998; Banchereau J, Annu Rev Immunol 2000; Larsson M

Curr Top Microbiol Immunol 2003). Actualment l'estudi de les CD mieloides humanes i el seu ús potencial en clínica s'ha vist facilitat per la capacitat de generar-les a partir de monòcits, mitjançant un simple cultiu de 7-8 dies en presència de IL-4 i factor estimulant de colònies granulocítiques i monocítiques (GM-CSF) (Sallusto F, J Exp Med 1995 ; Cella J Exp Med 1996; Salusto F, J Exp Med 1994). Fins al moment s'han publicat diversos estudis en clínica humana utilitzant CD autòlogues pulsades ex vivo amb proteïnes antigèniques tumorals solubles o pèptids d'antígens tumorals en pacients amb limfoma, mieloma, melanoma, càncer de pròstata, carcinoma renal, demostrant l'absència de toxicitat, tot i que en algú d'aquests casos van ser injectades per via endovenosa, en un altre directament als ganglis limfàtics i en una altra per via subcutània (Berard F, J Exp Med 2000; Nestle FO, Nat Med 1998; Dallal RM, Curr Opin Immunol 2000; Geiger J, Lancet 2000; Brossart P, Blood 2000; Shadendorf D, Recent Results Cancer Res 2001)

En models animals s'han publicat els resultats de l'ús d'una vacuna de CD amb infecció per SIV (SIVmac251) ("Simian immunodeficiency virus"). Es van realitzar 4 immunitzacions amb CD pulsades amb el mateix virus durant un període de 8 setmanes a raó de cada 15 dies. En la majoria dels animals inoculats es va produir una disminució significativa de la CVP a partir de la tercera immunització i de manera sostinguda, és a dir, durant les 34 setmanes que va durar l'estudi de l'estudi. Es va produir una disminució aproximada de 50 i 1000 vegades, en la càrrega de DNA SIV i RNA SIV en sang perifèrica, respectivament. L'anàlisi del teixit limfàtic va mostrar una correlació entre la disminució dels nivells de DNA i RNA SIV i l'increment de la resposta cel·lular T-SIV específica. El descens de la CV i en conseqüència l'augment de cèl·lules CD4+ va anar acompanyat d'un augment en els nivells d'anticossos circulants (Lu W, AIDS 2003). Resultats molt semblants s'han obtingut amb una vacuna preventiva en un model de ratolins per part de dos grups independents (Lapenta C, J Exp Med 2003; Yoshida A, J Virol 2003)

Recentment, s'han publicat els resultats d'un estudi en 18 pacients crònics infectats pel VIH sense tractament antiretroviral vacunats amb CD autòlogues pulsades amb virus autòleg, en les quals s'obtenia una disminució de la CV d'aproximadament 0.7



logaritmes durant les 12 primeres setmanes després de la vacunació (Lu W, Nat Med 2004) però es va observar una durada elevada de la resposta en un 60% dels pacients mantenint una disminució de la CV significativa després d'un any de la vacuna (que en un 50% dels casos va ser d'un logaritme). Aquesta eficàcia virològica es va correlacionar de manera significativa amb un increment de la resposta cel·lular específica, que com a mínim la de CD4 es va mantenir durant un any.

### 1.5.3.3 Citocines

Tot i que s'han realitzat molts treballs i assajos clínics utilitzant diverses citocines, els millors candidats a ser utilitzats en clínica humana son la IL-2, IL-12, IL-15, la hormona del creixement i el factor estimulant de colònies granulocítiques i monocítiques.

La infusió de IL-2 mitjançant diferents estratègies, dosis i vies d'administració s'associa a un increment clar en la xifra de limfòcits CD4+ (Arno A, J Infect Dis 1999), i és el fàrmac utilitzat com immunoteràpia que més s'ha estudiat i més ha avançat en el seu desenvolupament clínic. Tot i així, després de diversos anys d'investigació, encara no està clar si aquest increment afecta de manera positiva a la progressió clínic de la malaltia. A part de l'augment en la xifra total de limfòcits CD4+, s'han atribuït a la IL-2 encara que de forma discutible, unes altres tres propietats.

Per una banda, la capacitat de restaurar el repertori cel·lular T, tot i que en general l'anàlisi dels TCR han demostrat que els defectes en el repertori no es corregeixen per l'administració de IL-2. En segon lloc, la capacitat de restaurar la disfuncionalitat de la resposta cel·lular CD4+, tot i que en diversos assajos clínics pilot no s'ha demostrat aquesta utilitat (Levy Y, AIDS 2005). Per últim, la capacitat d'estimular les cèl·lules infectades latents i conseqüentment augmentar l'aclariment del reservori del VIH, tot i que diferents estudis han mostrat resultats controvertits al respecte (Chun TW, Nat Med 1999)

La IL-2 i la IL-15 han demostrat provocar un augment de la resposta CD8+ citotòxica específica anti-VIH *in vitro*, en l'activitat lítica per part de les cèl·lules NK i en les respostes proliferatives CD4+ específiques anti-VIH.

L'ús d'hormona de creixement en humans s'ha vist associat a un augment en la massa tímica, en el núm de cèl·lules T CD4+ *naïve*, en la resposta CD4+ y CD8+ específica contra el VIH i una inducció en la diferenciació de les cèl·lules T a cèl·lules efectores memòria funcionals (Napolitano LA, AIDS 2002).

Per últim, s'ha intentat utilitzar el GM-CSF juntament amb les interrupcions del tractament i s'ha observat una lleugera milloria en el control virològic i una menor caiguda de limfòcits T CD4+ després de la interrupció definitiva del tractament. Tot i així, s'associa a una elevada toxicitat local i sistèmica.

La IL-7 és actualment una de les immunoteràpies més prometedores gràcies al seu paper central en l'homeostasi de les cèl·lules T. El perquè del seu ús es basa en un doble objectiu. En primer lloc, per tal d'augmentar la producció limfocitària T a través de l'estimulació de la timopoyesi i de l'expansió perifèrica. En segon lloc com activador de limfòcits T CD4+ infectats latents, ajudant a l'aclariment del reservori viral (Kulkosky J, J Infect Dis 2002).

#### **1.5.3.4 Immunoteràpia passiva**

S'han investigat dos tipus d'immunoteràpia passiva en pacients infectats pel VIH. El primer es basa en la infusió de cèl·lules, tant CD4+ com CD8+, i el segon en la infusió de plasma o anticossos neutralitzants.

En el primer cas, s'han realitzat diversos estudis basats en la infusió de cèl·lules CD8+ citotòxiques específiques contra el VIH, amb resultats fins ara poc prometedors i molt experimentals (Tan R, Blood 1999, Levine BL, Nat Med 2002).

Pel que fa a la infusió passiva de plasma i anticossos neutralitzants, és una idea que va néixer durant la primera meitat de la dècada dels 90, amb estudis en els quals

s'infundia plasma de pacients infectats pel VIH, que eren asimptomàtics, a pacients avançats amb SIDA, observant-se una negativització de l'antigenèmia p24 (i posteriorment de la CV) i un augment de l'activitat neutralitzant del sèrum dels pacients receptors, i sense efectes adversos. Es va originar la hipòtesi que els pacients asimptomàtics tenien en el seu sèrum elevats títols d'activitat neutralitzant del virus que desapareixia a mesura que la infecció progressava, i diferents assajos clínics van confirmar que aquesta era una teràpia segura i clínicament útil per tal de "frenar" la progressió de la malaltia (Levy J, Blood 1994). Tot i així l'aparició dels agents antiretrovirals va fer desaparèixer l'interès per aquesta terapèutica.

Recentment, ha resurgit l'interès de la immunoteràpia passiva, però amb anticossos monoclonals específics, basats en estudis en el model de macacos, que demostren que la transferència passiva d'anticossos prevé la infecció per inoculació del virus per via oral, vaginal o endovenosa (Parren PW J Virol 2001). És per això que s'han iniciat assajos de fase I en pacients infectats per tal d'avaluar la farmacocinètica i seguretat de dos anticossos monoclonals humans (denominats 2F5 i 2G12), derivats de dos pacients no progressors, amb capacitat d'inhibir in vitro la infecció tant per soques R5 com per soques X4.

#### **1.5.3.5 Immunomoduladors**

Paral·lelament a la disminució en el recompte de limfòcits T CD4+, la infecció pel VIH es caracteritza per un estat d'activació immune intens i sostingut que es manifesta per un elevat recanvi de limfòcits T, B i cèl·lules NK, així com per una elevada alliberació de citokines pro-inflamatòries tals com IL-7 i TNF- $\alpha$  (Letvin NL, Nat Med 2003). Un element constant d'aquest procés és l'elevat recompte de clons de limfòcits T CD8+ activats que expressen receptors de superfície HLADR+/CD38+, fenomen considerat avui en dia com un marcador de progressió de la malaltia (Chun TW, PNAS 2004). Aquest procés sostingut d'activació pot conduir a un esgotament del sistema immune, al igual que a un augment de

la infectivitat cel·lular, fet que permet la seva disseminació. És per aquest motiu que es planteja la possibilitat d'utilitzar fàrmacs immunomoduladors (corticoides, hidroxiurea, micofenolat mofetil, talidomida i ciclosporina A) com adjuvants a la teràpia antiretroviral.

Estudis en animals amb combinació d'hidroxiurea i interrupció del tractament van mostrar una major capacitat de control de la viremia (Lori F, Science 2000). Estudis en humans van mostrar que l'ús d'aquest fàrmac va augmentar significativament la proporció de pacients que van aconseguir controlar la replicació viral (García F, AIDS 2003).

Diversos estudis han mostrat que els pacients infectats pel VIH tractats amb àcid micofenòlic presenten una reducció en el compartiment de limfòcits T CD4+ i CD8+ en divisió activa (Ki67+), així com la capacitat d'aïllar virus del total de la població de limfòcits T CD4+ i un descens de la CV d'equilibri després de la interrupció del TARGA (García F, J Acquir Immune Defic Syndr 2004).

Assajos amb ciclosporina A han demostrat una restauració del recompte de limfòcits T CD4+, tant en percentatge com en nombres absoluts (Rizzardì GP, J Clin Invest 2002). Tot i que la ciclosporina A interfereix en la síntesi de les proteïnes virals gag, el seu principal efecte el té a través de la inhibició de la proliferació i diferenciació de cèl·lules T. s'ha suggerit que el seu ús durant la primoinfecció podria disminuir el nombre de limfòcits T CD4+ actius que permeten la massiva replicació viral, i prevenir el segrest clonal dels limfòcits en el teixit limfàtic on es perpetua la infecció. Tanmateix es desconeix el benefici clínic a llarg termini.

Tot i així existeixen molts dubtes sobre l'ús dels immunomoduladors com a teràpia immunomediada en la infecció pel VIH. El coneixement dels candidats adequats, el fàrmac a utilitzar, la duració i el moment òptim per iniciar la teràpia en el curs de la infecció, són interrogants que han de ser contestats a través d'estudis clínics que incloguin un major nombre de pacients i amb seguiment prolongat. A més existeixen interrogants sobre la seva seguretat a llarg plaç, com la influència en el desenvolupament de malalties oportunistes o limfoproliferatives. Tot i així segueixen sent atractives les estratègies farmacològiques que interfereixen en el cicle vital del VIH actuant en les cèl·lules diana del

virus, més que a través de la inhibició d'enzims virals, fet que ofereix l'avantatge d'evitar el desenvolupament de mutacions en el genoma viral davant fàrmacs antiretrovirals.