

**Universidad de Barcelona**

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS VIROLÓGICOS Y DE  
INMUNIDAD CELULAR EN TEJIDO AMIGDALAR  
TRAS TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL EN  
PACIENTES INFECTADOS POR HIV EN ESTADO  
TEMPRANO DE LA INFECCIÓN**

Tesis doctoral presentada por

**Pilar Navarrete Durán**

para optar al grado de

Doctor en Medicina y Cirugía

**Barcelona, febrero de 2006**



Universidad de Barcelona  
División de Ciencias de la Salud  
Departamento de Medicina  
Programa de Biopatología en Medicina  
Bienio 1999-2001

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS VIROLÓGICOS Y DE  
INMUNIDAD CELULAR EN TEJIDO AMIGDALAR  
TRAS TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL EN  
PACIENTES INFECTADOS POR HIV EN ESTADO  
TEMPRANO DE LA INFECCIÓN**

Memoria presentada por **Pilar Navarrete Durán**  
Para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Directores de Tesis Doctoral:     Dr. Felipe Garcia Alcaide  
   Dra. Lúcia Alòs Hernández

Tutor del Departament: Dr. Josep M<sup>a</sup> Gatell García

Servicios de Enfermedades Infecciosas y Anatomía Patológica  
Barcelona, diciembre de 2006



**A MIS PADRES, BERNARDO Y MATILDE**



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimientos

---

## Agradecimientos

---

A los directores de esta tesis, los doctores Felipe García y Lúcia Alòs por su apoyo y su ayuda inestimable sin la cual no podría haberse realizado este trabajo.

Al mi tutor, el Dr. Josep M<sup>o</sup> Gatell, por sus consejos para realizar el proyecto doctoral.

A todo el personal de los servicios de Enfermedades Infecciosas, Inmunología, Microbiología y Anatomía Patológica que haya aportado su granito de arena con el trato de los pacientes o el análisis de sus muestras.

A todos los pacientes que han participado en este estudio y que aguantaron estoicamente las pruebas a las que les sometimos.

A mi familia que me ha cuidado y respaldado en todo momento para que pudiera afrontar la dificultad que un proyecto como este conlleva.

Y por último, a mi marido, por su paciencia y su ayuda en la elaboración de esta tesis.



# ÍNDICE



---

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>29</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>31</b>
<b>2. FUNDAMENTOS VIROLÓGICOS</b>	<b>35</b>
2.1. HISTORIA	35
2.2. RETROVIRUS	37
2.2.1. Clasificación de los retrovirus VIH	37
2.2.2. Origen del VIH-1 y del VIH-2	38
2.3. CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS DEL VIH-1	39
2.3.1. Morfología y estructura	39
2.3.2. Genoma vírico	40
2.4. TROPISMO DEL VIRUS VIH	44
2.4.1. Co-receptores	44
2.5. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS VIH	45
2.5.1. Adsorción, fusión e internalización del virión	46
2.5.2. Transcripción inversa para la síntesis de ADN	47
2.5.3. Integración	48
2.5.4. Transcripción	48
2.5.5. Traducción	50
2.5.6. Acoplamiento	51
2.5.7. Salida de la célula y maduración	52

<b>3. FUNDAMENTOS INMUNOLÓGICOS E INMUNOPATOGENICOS</b>	<b>54</b>
3.1. INTRODUCCIÓN	54
3.1.1. Moléculas de superficie y clasificación de los linfocitos T	54
3.2. INMUNOSUPRESIÓN PRODUCIDA POR EL VIRUS VIH	56
3.2.1. Propiedades inmunosupresoras de los productos víricos	56
3.2.2. Alteraciones de los linfocitos T	57
3.2.2.1. Alteraciones de los linfocitos T CD4+	57
3.2.2.2. Alteraciones de los linfocitos T CD8+	59
3.2.3. Alteraciones de los linfocitos B	60
3.2.4. Alteraciones de los monocitos/macrófagos	61
3.2.5. Otras alteraciones	62
3.2.6. Cambios inmunológicos en sangre periférica con TARGA	62
3.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE AL VIH	65
3.3.1. Anticuerpos neutralizantes	65
3.3.2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	67
3.3.3. Linfocitos T citotóxicos	67
3.3.4. Respuesta celular proliferativa	68
<b>4. FUNDAMENTOS CLÍNICOS</b>	<b>70</b>
4.1. HISTORIA NATURAL Y CLASIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1	70
4.1.1. Fase precoz o aguda	70
4.1.2. Fase intermedia o crónica	71
4.1.3. Fase final o de crisis	72
4.1.4. Clasificación de la infección por el VIH-1	72
4.2. EPIDEMIOLOGIA	75
4.2.1. Mecanismos de transmisión	75

---

4.2.2. Grupos de riesgo	76
4.2.3. Distribución geográfica	76
4.3. DIAGNOSTICO	77
4.3.1. Criterios de SIDA	77
4.3.2. Diagnostico de la infección por VIH	77
4.3.2.1. Pruebas serológicas para detección de anticuerpos	77
4.4. TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL DE LA INFECCIÓN POR VIH EN ADULTOS	79
4.4.1. Introducción	79
4.4.2. Principios y fundamentos	79
4.4.3. Indicaciones	80
4.4.4. Medicamentos	81
4.4.4.1. Nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (ITIAN)	81
4.4.4.2. Inhibidores de la proteasa (IP)	84
4.4.4.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINAN)	86
4.4.4.4. Inhibidores de la fusión (IF)	87
4.4.5. Pauta de elección	87
4.4.5. Modificaciones en el tratamiento	89
4.5. MARCADORES DE PROGRESIÓN CLÍNICA Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO	91
4.5.1. Marcadores clínicos	91
4.5.2. Marcadores inmunológicos	92
4.5.2.1. Linfocitos CD4+	92
4.5.2.2. CD8/CD38+	93
4.5.2.3. $\beta$ 2-microglobulina:	94
4.5.2.4. Neopterin	95
4.5.2.5. Receptores de la interleucina 2 (sIR-2R)	95
4.5.2.6. Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )	95

4.5.2.7. Anticuerpos contra las proteínas del core	96
4.5.2.8. Inmunoglobulina A (IgA)	96
4.5.3. Marcadores virológicos	97
4.5.3.1. Antígeno p24	97
4.5.3.2. Fenotipo vírico	98
4.5.3.3. Carga viral	98
4.6. CARGA VIRAL	99
4.6.1. Métodos para valorar la carga viral	99
4.6.1.1. Cultivo vírico de células mononucleadas de sangre periférica	100
4.6.1.2. ADN provírico en cultivo vírico de células mononucleadas de sangre periférica	100
4.6.1.3. mARN del VIH-1 en cultivo vírico de células mononucleadas de sangre periférica	101
4.6.1.4. Cultivo vírico en plasma	101
4.6.1.5. Carga viral en órganos linfáticos	102
4.6.1.6. Cuantificación del ARN del VIH-1 en plasma o suero	104
4.6.2. Técnicas moleculares para la cuantificación del VIH-1	105
4.6.2.1. Método del ADN ramificado (bDNA)	105
4.6.2.2. Técnica de retrotranscripción y amplificación (rt-PCR) (Amplicro VIH-Monitor)	106
4.6.2.3. Amplificación secuencial de ácidos nucleicos (NASBA)	107
4.6.2.4. Técnicas ultrasensibles	108
4.6.3. Carga viral en tejido linfático y su relación con el plasma	109
4.6.4. La carga viral como marcador de progresión	110
4.6.5. La carga viral como marcador de eficacia del tratamiento antiretroviral	111

4.6.5.1. En plasma	111
4.6.5.2. En tejido linfático	112
4.6.6. La carga viral como marcador de inicio del tratamiento antiretroviral	113
4.6.7. La carga viral como marcador de cambio del tratamiento antiretroviral	114
<b>5. FUNDAMENTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DEL TEJIDO</b>	
<b>LINFÁTICO</b>	<b>116</b>
5.1. INTRODUCCIÓN	116
5.2. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO LINFÁTICO	118
5.2.1. Folículos linfoides	120
5.2.1.1. Células dendríticas	123
5.2.1.2. Células linfoides	124
5.2.1.3. Macrófagos	124
5.2.2. Cordones medulares	125
5.2.2.1. Células linfoides	125
5.2.2.2. Macrófagos	126
5.2.2.3. Otros tipos celulares, incluyendo mastocitos	126
5.2.3. Paracortex	126
5.2.3.1. Vénulas epitelioides	126
5.2.3.2. Células interdigitadas	127
5.2.3.3. Linfocitos T	127
5.2.4. Senos linfáticos	128
5.3. HISTOFISIOLOGÍA DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS	128
5.3.1. Respuesta inmune humoral	131
5.3.2. Respuesta inmune celular	132
5.4. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO AMIGDALAR	133
5.5. HISTOPATOLOGÍA DEL TEJIDO LINFÁTICO INFECTADO POR VIH	134
5.5.1. Cambios en la arquitectura y celularidad del tejido	

linfático en pacientes infectados por VIH-1	134
5.5.2. Clasificación histopatológica del tejido linfático infectado por el VIH	135
5.5.1.1. Estadio I: Hiperplasia folicular	136
5.5.1.2. Estadio II: Involución folicular	137
5.5.1.3. Estadio III: Depleción linfoide	138
<b>6. DINÁMICA Y DISTRIBUCIÓN VÍRICA Y LINFOCITARIA EN LOS TEJIDOS LINFOIDES</b>	<b>140</b>
6.1. LOS TEJIDOS LINFÁTICOS EN LAS FASES INICIALES DE LA INFECCIÓN	141
6.2. DETERMINANTES INICIALES DE LA PERSISTENCIA VIRAL Y LA CARGA VIRAL PERMANENTE	143
6.3. PRODUCCIÓN VIRAL Y ALMACENAJE EN EL TEJIDO LINFÁTICO	144
6.3.1. Dinámica y distribución del VIH-1 en el tejido linfático	144
6.3.2. El pool en las células dendríticas	146
6.3.3. Producción de células infectadas	147
6.3.4. Producción total de virus en el tejido linfático	147
6.3.5. El tejido linfático como reservorio y la infección productiva de las células huésped	148
6.3.6. Relación entre las células y el virus en los tejidos linfáticos	149
6.4. DEMOGRAFÍA Y DINÁMICA DE LAS CÉLULAS INFECTADAS Y SUS INTERACCIONES CON LOS VIRUS EN EL TEJIDO LINFÁTICO	150
6.4.1. Linfocitos CD4+ y CD8+ y su relación con la carga viral	150
6.4.2. Demografía de los linfocitos T CD4+ en la infección por el VIH-1	152
6.4.2.1. Infección de las células CD4+ en los	

---

estadios iniciales	154
6.4.2.2. Redistribución de los linfocitos T CD4+ en la infección crónica por VIH-1	156
6.4.2.3. Proliferación, apoptosis e infección activa	157
6.4.3. Demografía y dinámica de los linfocitos T vírgenes y memoria y su relación con la carga viral en tejido amigdalario y plasma	159
6.4.3.1. Importancia de las subpoblaciones vírgenes y memoria	159
6.4.3.2. Distribución de los linfocitos vírgenes y memoria	161
6.4.3.3. Influencia del tratamiento en los niveles de linfocitos vírgenes y memoria	162
6.4.3.4. Aumento de la razón virgen/memoria con el tratamiento	164
6.4.4. Subpoblaciones de los linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH-1	166
6.4.4.1. Linfocitos CD8+CD38+	166
6.4.4.2. Linfocitos CD8+ CD28+	167
6.4.4.3. Linfocitos citotóxicos en tejido linfático	168
6.5. EFECTO DEL TARGA SOBRE EL VIRUS Y LAS POBLACIONES CELULARES INFECTADAS EN TEJIDO LINFÁTICO	169
6.5.1. Impacto del tratamiento en los tejidos linfáticos	169
6.5.2. Cambios de la carga viral en tejido linfático y en plasma después de la terapia antirretroviral	171
6.5.3. Recambio linfocitario en los tejidos linfáticos secundario al TARGA	173
6.5.3.1. ¿Por qué la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD45RA+ se afecta desproporcionadamente por la infección por el VIH-1 y su tratamiento?	174

6.5.3.2. Dos poblaciones de células infectadas son eliminadas a diferente velocidad por el TARGA	175
6.5.4. Efecto del TARGA sobre el pool en las células dendríticas foliculares	176
6.5.5. Recuperación de los cambios histopatológicos	177
6.5.5.1. Arquitectura de los ganglios linfáticos en pacientes con niveles de linfocitos T CD4+ conservados	177
6.5.5.2. Proliferación de los linfocitos T CD4+ en tejido linfático	179
6.5.5.3. Persistencia de las anomalías en tejido linfático a pesar de tratamiento exitoso	179
6.5.6. Influencia de los tipos de regímenes terapéuticos	182
6.5.7. El TARGA controla pero no erradica la infección	186
6.5.7.1. Replicación viral residual	188
6.5.7.2. Células infectadas crónicamente y latentes	189
6.5.7.3. La red de células dendríticas	190
<b>7. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	<b>192</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>197</b>
<b>MATERIAL, MÉTODOS, Y RESULTADOS</b>	<b>201</b>
ARTÍCULO 1	203
Predictores de la carga viral del VIH-1 en tejido linfático antes y después de un año de terapia antirretroviral.	
ARTÍCULO 2	211
Inmunoarquitectura del tejido linfático infectado por el VIH durante el tratamiento antiretroviral y su correlación con la persistencia viral.	

---

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>225</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>227</b>
<b>2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL LINFÁTICO. BIOPSIAS AMIGDALARES</b>	<b>230</b>
<b>3. RELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL Y LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T Y ENTRE EL PLASMA Y EL TEJIDO LINFÁTICO AMIGDALAR</b>	<b>232</b>
3.1. RELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL EN TEJIDO LINFÁTICO AMIGDALAR Y PLASMA	233
3.1.1. Antes del tratamiento antiretroviral	233
3.1.2. Cambios después de la terapia antirretroviral	234
3.1.3. Cambios dependiendo del tipo de terapia antiretroviral. Predictores de respuesta	236
3.2. RELACIÓN ENTRE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN TEJIDO LINFÁTICO AMIGDALAR Y PLASMA	239
3.2.1. Comparación de los niveles de linfocitos CD4+ y CD8+ en tejido linfático y sangre	240
3.2.2. Comparación de los niveles de linfocitos vírgenes y memoria en tejido linfático y sangre	242
3.2.3. Comparación de los niveles de otros subtipos de linfocitos	245
3.2.4. Estudio de los niveles de linfocitos citotóxicos en las áreas interfoliculares	245
3.3. RELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL EN TEJIDO AMIGDALAR Y PLASMA CON LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS	247
3.3.1. Linfocitos CD4+ y CD8+	248
3.3.2. Linfocitos CD8+CD38+	248

3.3.3. Linfocitos CD8+CD28+	249
3.3.3. Linfocitos vírgenes/memoria	250
<b>4. INMUNOARQUITECTURA DEL TEJIDO LINFÁTICO EN LA INFECCIÓN DEL HIV-1</b>	<b>255</b>
4.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES	255
4.1.1. Antes del tratamiento	256
4.1.2. Después del tratamiento	257
4.2. MORFOLOGÍA DEL TEJIDO LINFÁTICO INFECTADO POR EL VIH-1	258
4.2.1. Antes del tratamiento	259
4.2.2. Después del tratamiento	260
<b>Conclusiones</b>	<b>263</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>269</b>

## **ABREVIATURAS**



ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADVP	Adictos a drogas por vía parenteral
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
CD4+	Linfocitos CD4+
CD8+	Linfocitos CD8+
CD4+/CD8+	Cociente linfocitosT CD4+/CD8+
CDF	Células dendríticas foliculares
CMSP	Células mononucleadas de sangre periférica
CMV	Citomegalovirus
CV	Carga viral
CVP	Carga viral en plasma
CVTL	Carga viral en tejido linfático
CRS	Complejo relacionado con el SIDA
ddC	Zalcitabina
ddl	Didanosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GESIDA	Grupo de estudio del SIDA
TARGA	Terapias antiretrovíticas de alta eficacia
IDV	Indinavir
IgA	Inmunoglobulina A
IN	Integrasa
INH	Isoniacida
IL-2	Interleucina 2
INRT	Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa
INNRT	Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa
LTVL (CVTL)	Lymphoid tissue virus load (Carga viral en tejido linfoide)
LTR	Secuencias repetitivas de terminación larga

## Abreviaturas

---

NFV	Nelfinavir
NVP	Nevirapina
PVL (CVP)	Plasma virus load (Carga viral en plasma)
RNA	Ácido ribonucleico
RTV	Ritonavir
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
3TC	Lamivudina
TR	Transcriptasa inversa
VEB	Virus de Epstein Barr
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2





# INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la primera descripción del Síndrome de la Inmunodeficiencia humana Adquirida (SIDA) en 1981 (1-3), se han buscado parámetros objetivos que sirvieran para constatar el control clínico y realizar el seguimiento y el pronóstico de los sujetos infectados por el VIH. Los más utilizados han sido los marcadores de replicación del virus y los marcadores inmunológicos (sobre todo el nivel de linfocitos CD4+). Estos han permitido monitorizar la historia natural de la infección por el VIH-1, predecir la evolución clínica y evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos antirretrovirales. Sin embargo, la mayoría de los marcadores utilizados inicialmente tenían poca sensibilidad, reproducibilidad y especificidad. Desde hace pocos años la aplicación de técnicas de biología molecular, concretamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha hecho posible la detección de secuencias específicas del VIH-1 lo que ha permitido el desarrollo de técnicas para cuantificar el virus.

**Eliminado:** dentro de las secuencias de la célula huésped

Actualmente los principales marcadores para el estudio de la replicación viral o de la inmunodeficiencia en pacientes infectados por el VIH-1 sin tratamiento previo o para valorar la eficacia o la reconstitución inmunológica después de tratamientos antirretrovirales son la carga viral plasmática y los niveles de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica. El linfocito T CD4+ es la célula diana de la infección por el VIH. Es un buen marcador ya que refleja el estadio de la infección. Los niveles de CD4, su porcentaje y el cociente CD4/CD8 son los marcadores más utilizados, no solamente porque son los que mejor indican la progresión de la infección, sino porque también indican el inicio del tratamiento antirretroviral de la profilaxis primaria de las enfermedades oportunistas. El porcentaje de linfocitos CD4 es menos variable que los niveles

absolutos, habiéndose podido constatar como marcador de riesgo de progresión o de respuesta al tratamiento (4).

La cuantificación del virus VIH-1 se denomina carga viral (CV) y su aplicación clínica a partir del año 1996 (en el que fue incluida dentro de la rutina en el control de la evolución de la enfermedad) ha permitido establecer el nivel de actividad replicativa del VIH-1 a lo largo de toda la historia natural de la infección y nos ha proporcionado una herramienta muy importante para la monitorización de la eficacia del tratamiento antirretroviral. Su aplicación se limitó en un principio exclusivamente a la detección en sangre periférica, considerándose límites de detección alrededor de 200-500 copias/ml, y que posteriormente con el empleo de terapias de alta potencia (TARGA) fue necesario mayor precisión, la cual fue posible gracias a los sistemas de detección ultrasensible por los que se pudo bajar el umbral hasta 20-50 copias/ml, siendo considerados indetectables niveles inferiores a este rango.

Tanto los niveles de linfocitos en sangre periférica como la carga viral periférica han demostrado su efectividad como predictores de la evolución en pacientes con o sin tratamiento (5-7). Pero la evidencia de que niveles indetectables del virus no suponían un control total de la enfermedad, llevó a plantear la posibilidad de que diferentes tejidos constituyesen reservorios virales. La persistencia de reservorios latentes del VIH-1 representa una gran barrera en la erradicación del virus, constituyendo una fuente de producción de virus en situaciones en que el tratamiento antirretroviral se interrumpe o disminuye de intensidad. Estudios recientes han demostrado la persistencia de replicación vírica en pacientes con niveles indetectables de ARN vírico en plasma (8;9). Así, se iniciaron estudios donde se analizaban líquido cefalorraquídeo (LCR) y diferentes ubicaciones de tejido linfático, tales como la mucosa rectal y el tejido linfático amigdalario. En el sistema nervioso central (SNC), estudios anatomopatológicos sugieren que las células de la microglía son dianas

para la replicación del VIH-1, por lo que se ha propuesto que el SNC sea un lugar de replicación (10).

En cuanto al tejido linfático, se descubrieron contradicciones entre los cambios obtenidos en la replicación viral (11-16) y los niveles de linfocitos (17-19) al compararlos con los observados en sangre periférica de pacientes antes y después del tratamiento. Incluso se ha descrito la presencia de carga viral en tejido amigdalario con carga viral plasmática indetectable (14;20). Estos pacientes tenían una menor duración de la supresión viral en plasma que los pacientes con carga viral indetectable en tejido amigdalario (15). Nokta y cols. (19) observaron que el porcentaje medio de células T CD4+ es mayor en los nódulos linfáticos que en sangre periférica. No obstante, el porcentaje medio de células T CD8+ fue mayor en sangre periférica que en los nódulos linfáticos y, por tanto, el ratio CD4:CD8 fue mayor en los nódulos linfáticos. A pesar de estas discrepancias encontraron una fuerte correlación entre las células vírgenes (naive) y las células memoria (tanto CD4+ como CD8+) entre los nódulos linfáticos y la sangre periférica (19).

Todos estos datos contradictorios entre los nódulos linfáticos y la sangre periférica implica que el estudio del tejido linfático, a pesar de que puede no ser importante para la práctica clínica rutinaria, es crucial para los estudios de la reconstitución inmunológica con terapias basadas en la inmunología (vacunas terapéuticas) o de la valoración de la contribución de los nódulos linfáticos en la replicación viral residual después de la supresión de la viremia durante largos periodos de tiempo (13). Sin embargo, la obtención del tejido linfático para realizar estos estudios plantea una serie de problemas.

Las biopsias de los nódulos linfáticos fueron realizadas en edades tempranas de la epidemia de SIDA, para determinar linfomas no Hodgkin, sarcomas de Kaposi o infecciones oportunistas. Se obtuvieron resultados variables en los recuentos celulares en el nódulo linfático y diferentes patrones histopatológicos. Como consecuencia, fueron propuestas

diversas clasificaciones que se relacionaron con el pronóstico de la enfermedad. No obstante, la biopsia de nódulos linfáticos es una técnica invasiva y difícil de repetir muchas veces por lo que se han buscado otras técnicas para obtener tejido linfático. Bart y cols. (17) realizaron punciones con aspiración con aguja fina guiadas por ecografía, aunque tienen el inconveniente de que se necesita un técnico experimentado para realizarla y no se puede obtener información sobre la arquitectura del nódulo. Estos problemas se han podido resolver mediante la obtención de tejido linfático por biopsia amigdalar. Esta técnica es poco invasiva y se puede reproducir un número moderado de ocasiones. Mediante el estudio de las biopsias amigdales se han realizado algunos de los más relevantes avances en este campo (21).

En este trabajo hemos estudiado la aportación del análisis del tejido amigdalar para predecir la evolución clínica y evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos antirretrovirales. Para ello analizamos la relación entre la carga viral y los niveles de linfocitos T en tejido amigdalar y en plasma, así como las respuestas linfoproliferativas y los cambios anatomopatológicos en pacientes infectados por el VIH-1 sin tratamiento y si los cambios que se producen en ambos compartimentos después de la terapia antirretroviral son similares.

## **2. FUNDAMENTOS VIROLÓGICOS**

### **2.1. HISTORIA**

Las primeras descripciones del SIDA se realizaron a finales de 1981 a partir de la observación de una alta incidencia de enfermedades como el sarcoma de Kaposi y la neumonía por *Pneumocistis carinii* en pacientes homosexuales de San Francisco. Estos pacientes jóvenes y previamente sanos sufrían una serie de enfermedades similar a la observada en pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores. El curso de la enfermedad se caracterizaba por una inmunosupresión de instauración rápida que provocaba la muerte del paciente en pocos meses (1-3).

Posteriormente se describió también en adictos a drogas por vía parenteral (22) y hemofílicos (23;24). La aparición de la enfermedad en estas tres poblaciones hizo sospechar que un agente infeccioso la transmitía a partir de la sangre y hemoderivados.

En 1983, el grupo de Luc Montagnier, del Instituto Pasteur de Paris, aisló un retrovirus a partir de linfocitos de sangre periférica de un paciente con el síndrome de linfadenopatía generalizada persistente. Este virus presentaba linfotropismo por las células T y lo denominaron virus asociado a linfadenopatía (LAV)(25). De forma paralela, el grupo de Gallo y cols.(26), del National Health Institute de EEUU, y Jay Levy (27), de la Universidad de California, aislaron varias cepas de retrovirus en pacientes con SIDA y las denominaron virus linfotrópico de células T humanas tipo III (HTLV-III) y virus asociado a SIDA (ARV), respectivamente. Posteriormente un Comité Internacional de Taxonomía acuñó la denominación virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y, por homología genética, lo clasificó en la subfamilia *Lentiviridae* de la familia *Retroviridae*.

La asociación etiológica entre el virus y la enfermedad quedó demostrada por seroepidemiología al detectar la presencia de anticuerpos específica en el 90% de los pacientes con SIDA y sólo en el 0,2% de los casos control. A finales de 1984 se desarrollaron los primeros tests de detección de anticuerpos anti HTLV-III mediante técnica de ELISA (28;29).

En 1986 se detectó un segundo retrovirus en pacientes con SIDA en el África Central que se denominó VIH-2 (30).

El SIDA constituye la manifestación más grave del amplio espectro clínico que comporta la infección por VIH. En 1986, la OMS y los Centros Disease Control (CDC) aportaron la definición de SIDA en los siguientes términos: entidad caracterizada por enfermedades oportunistas indicativas de inmunodeficiencia celular, en ausencia de otras causas conocidas de inmunodeficiencia distintas a la infección por el VIH. Durante los años 80, la incidencia de SIDA creció de forma progresiva hasta convertirse en una pandemia. Considerando, además, que el SIDA representa únicamente la “punta del iceberg” de la infección por el VIH, el número de individuos infectados se estima, en la actualidad, en más de 40 millones de personas infectadas por el VIH en el mundo, si bien teniendo en cuenta la carencia de infraestructura sanitaria en zonas subdesarrolladas esta cifra podría ser superior.

## 2.2. RETROVIRUS

### 2.2.1. Clasificación de los retrovirus VIH

Se pueden clasificar en virus oncogénicos, lentivirus y espumavirus, o también por su aspecto al microscopio electrónico o por sus efectos biológicos (tabla I).

<b>RETROVIRUS</b>	<b>ONCOVIRUS</b>	<b>LENTIVIRUS</b>	<b>ESPUMAVIRUS</b>
<b>Huésped</b>	Hombre. HTLV-I, HTLV-II. Aves y mamíferos	Hombre. VIH-1, VIH-2. Mamíferos superiores.	Prácticamente en todas las especies
<b>Propiedades biológicas</b>	Oncogénesis	Efecto citopático. Latencia	Efecto citopático
<b>Efecto patógeno</b>	Transformación tumoral: leucemias, cáncer	Inmunodeficiencia. Cuadros neurológicos. Trastornos autoinmunes	Desconocido

**Tabla I. Clasificación y principales propiedades de los retrovirus**

Los espumavirus se caracterizan por su capacidad para producir un efecto citopático esponjoso muy similar en los cultivos de tejidos, pero es dudosa su existencia y su papel biológico en seres humanos. Los lentivirus acompañan únicamente, hasta ahora, a entidades que no son malignas, sobre todo a procesos neurológicos, a enfermedades por inmunocomplejos y encefalitis y artritis. Son de activación lenta sólo al compararlos con virus causantes de infecciones agudas, como los virus gripales, pero no si se comparan con otros retrovirus.

Los retrovirus asociados a procesos malignos son los oncovirus: HTLV-I y HTLV-II, algunos virus muy afines del mono, el virus de la leucemia felina, el virus de la leucemia bovina, el virus de la leucemia del

gibón y muchos virus murinos y aviarios. Estos virus pueden también causar enfermedades benignas.

Los retrovirus humanos pueden considerarse como una categoría exclusiva de retrovirus. Se hallan clasificados dentro del grupo de los *lentivirus*.

### **2.2.2. Origen del VIH-1 y VIH-2**

Es posible que el VIH-1 se haya diseminado a partir de alguna región del África central, donde la infección es endémica y cuya prevalencia en la población general, sobre todo en algunas áreas urbanas, es muy alta. Un nuevo retrovirus animal, denominado SIV, cuya homología genética con VIH-1 es del 20-60%, se ha identificado en primates en cautividad en EEUU y en primates salvajes en el África ecuatorial. Finalmente, el último retrovirus humano identificado se ha denominado VIH-2, es endémico en algunos países del África del oeste y guarda un mayor parecido con el SIV que con el VIH-1. Es también capaz de producir en el hombre un cuadro clínico similar al del SIDA, pero parece menos agresivo que el VIH-1.

## 2.3. CARACTERÍSTICAS VIROLÓGICAS DEL VIH-1

### 2.3.1. Morfología y estructura

El VIH-1 es un virus ARN monocatenario formado por una estructura esférica de 80 a 100 nm, con una disposición en tres capas:

1ª. Interna o nucleoide que contiene el ARN genómico, una ADN polimerasa ARN dependiente y una ribonucleasa H; estos dos enzimas forman el complejo enzimático conocido por transcriptasa inversa.

2ª. Una cápside proteica de simetría icosaédrica, formada por las denominadas proteínas del *core* del virus codificadas por el gen *gag*. El conjunto del ácido nucleico y la cápside se denomina nucleocápside.

3ª. Un envoltorio constituido por una bicapa lipídica derivada de la célula huésped donde se insertan las glucoproteínas, en 72 proyecciones externas, codificadas por el gen *env* y antígenos de histocompatibilidad de clases I y II que derivan de la célula huésped (31;32).

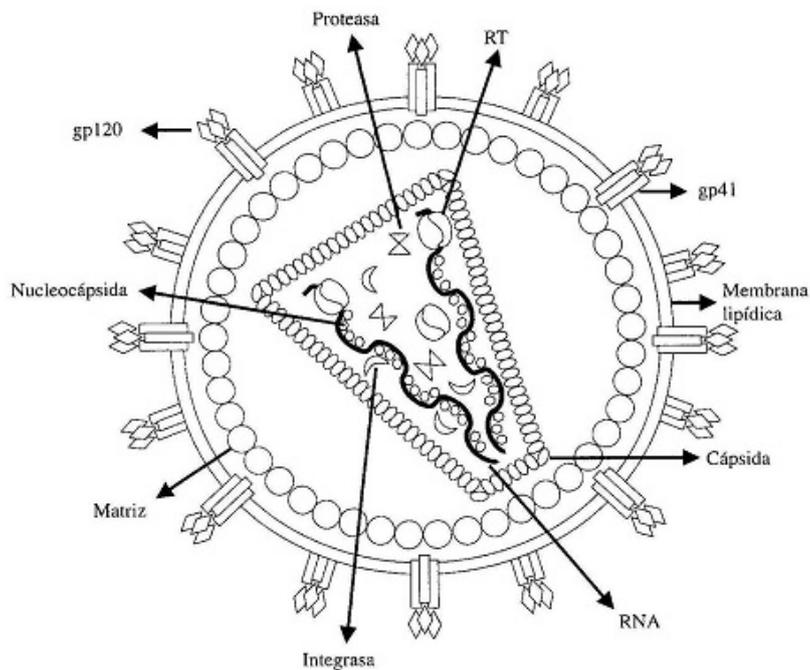


Figura 2. Estructura de la partícula de VIH.

### 2.3.2. Genoma vírico

El genoma vírico lo constituye un ARN monocatenario de polaridad positiva, que presenta dos copias unidas por el extremo 5'. Como virus retroide, se encapsida la fase ARN, que se replica mediante la acción de la transcriptasa inversa, una enzima contenida en el virión, que cataliza la formación de provirus en forma de doble cadena de ADN, que se integra en el genoma de la célula huésped.

Los virus VIH poseen una gran riqueza de genes y proteínas reguladoras, que condicionarán la interacción virus-célula y por consiguiente la patogenia de la enfermedad.

Principalmente el ARN está formado por tres genes estructurales: gag, pol y env. Además presenta dos genes reguladores necesarios para

Eliminado: dos

la replicación vírica, *tat*, *rev* y cuatro genes que codifican proteínas accesorias: *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* (33) (tabla II).

Genes	Nombre	Producto (precursor)	Proteína vírica	Función
<b>Estructurales</b>	<i>Gag</i>	p55	p17	Proteína miristilada de la matriz vírica.
			p24	Proteína principal de la cápside vírica.
			p7	Proteína de la nucleocápside. Empaquetamiento del ARN vírico.
			p6	Proteína de la nucleocápside. Unión a Vpr. Encapsidación vírica.
	<i>Pol</i>	p160	p10	Proteasa: procesamiento postraduccional de las poliproteínas Gag y Gag-Pol.
			p50	Transcriptasa inversa: transformación del ARN vírico en ADN provírico.
			p15	RNasa H: eliminación del molde de ARN una vez transcurrida la transcripción inversa.
			p31	Integrasa: inserción del ADN provírico en el cromosoma de la célula infectada.
	<i>Env</i>	gp160	gp120 (gp125 en VIH-2)	Glucoproteína de envoltura (superficie). Interacción vírica con receptor CD4 y correceptores celulares.
		gp41 (gp36 en VIH-2)	Glucoproteína de envoltura (transmembrana). Anclaje de gp120 y fusión de membranas vírica y celular.	
<b>Reguladores</b>	<i>tat</i>		Tat (p14)	Activador de la transcripción: síntesis de ARNm.
	<i>rev</i>		Rev (p19)	Exportación (transporte) de ARN vírico del núcleo al citoplasma.
<b>Accesorios</b>	<i>nef</i>		Nef (p27)	Regulación negativa de la presencia de CD4 y MHC-I en la membrana celular. Interferencia en la activación de linfocitos T. Estimulación de la infectividad de viriones.
	<i>vpr</i>		Vpr (p15)	Transporte del Complejo de Preintegración al núcleo. Bloqueo del ciclo celular.
	<i>vpu</i> (en VIH-1)		Vpu (p16)	Bloqueo del CD4 en el retículo endoplásmico celular, evitando la interacción con gp120 de nueva síntesis. Incrementa la liberación de viriones de la célula infectada.
	<i>vif</i>		Vif (p23)	Infeciosidad de viriones extracelulares.

Tabla II. Relación de los genes del VIH: proteínas codificadas y funciones.

En la forma de provirus, el genoma vírico está flanqueado por unas secuencias repetitivas de terminación larga (LTR) que permiten la integración del virus dentro del genoma de la célula huésped. En ellas es donde se localizan los elementos que inician, dirigen y regulan la expresión del genoma vírico (34-36).

#### **2.3.2.1. Genes estructurales.**

Con formato

Estos son *gag*, que codifica las proteínas del core (p17, p24 y p15); *pol* que codifica la transcriptasa inversa (TI) y otras endonucleasas, como la RNasa H y la integrasa (IN), y las dos secuencias repetidas de terminación larga (LTR) comunes a todos los retrovirus; y *env*, que codifican las glicoproteínas de la membrana (gp120 y gp41).

#### **2.3.2.2. Genes reguladores.**

Con formato

El gen *tat* codifica las proteínas que activan la expresión de los genes virales y de algunos genes celulares y el gen *rev* codifica las proteínas que favorecen la formación del ARNm viral no ensamblado o de ensamblaje único; en su ausencia sólo se forman pequeños ARNm doblemente ensamblados. La proteína *rev* se localiza en el núcleo y, al parecer, aumenta el transporte de ARNm mayores que codifican proteínas estructurales para el citoplasma. Por el contrario, dicha proteína disminuye la disponibilidad del ARNm para el propio *rev* y para otras proteínas reguladoras. Estas proteínas son estructuralmente distintas en cada virus, pero poseen funciones similares.

#### **2.3.2.3. Genes accesorios.**

Con formato

El gen *nef* codifica una proteína de 27kD que se encuentra en el citoplasma (a pesar de que también se asocia en parte a la membrana celular) y se expresa abundantemente en fase precoz de la replicación vírica. Estudios recientes han demostrado que juega un papel importante en la replicación del VIH y en su patogénesis. Se ha descrito que

**Eliminado:** En cuanto a los genes que codifican proteínas accesorias, e

disminuye la expresión del receptor CD4 y del HLA de clase I en la superficie celular protegiendo las células infectadas de los fenómenos de superinfección y de su reconocimiento por los linfocitos citotóxicos (37). También aumenta la infectividad al mejorar la eficacia de la transcripción inversa (38).

El gen *vif* codifica una proteína de 23 kD predominante en el citoplasma, aunque también se puede encontrar asociada a membranas. Su delección implica una importante disminución de la infectividad del VIH, por este motivo se hace la hipótesis que tendría un papel en la maduración de las partículas víricas (39). Recientemente, se ha descubierto que la función de *vif* es la inactivación de la molécula APOBEC3G. Esta molécula implica una defensa natural frente a retrovirus.

El gen *vpr*, situado entre *vif* y *tat*, sintetiza una proteína de 15 kD. Han sido descritas dos funciones: trasladar el complejo de preintegración vírico al núcleo de las células en fase de ausencia de división (40) y detener las células en división en la fase G2 del ciclo celular (41). La entrada del complejo de preintegración dentro del núcleo es un paso esencial en la replicación de los retrovirus y es necesario para la integración posterior del provirus dentro de la célula huésped. Se ha descrito recientemente que los cultivos celulares parados en fase G2 producen significativamente más viriones que aquellos en fase G1 (42).

El gen *vpu* codifica una proteína de 16KD asociada con las membranas internas de las células infectadas por el VIH-1. *Vpu* presenta dos funciones: aumenta la liberación del virión a partir de las células infectadas (43) y está relacionado con la degradación selectiva del CD4+ en el retículo endoplasmático (44).

El gen *vpx* codifica una proteína de 113 aminoácidos, homóloga de *vpr* en VIH-2 y VIS. Ayuda al complejo de preintegración a entrar al núcleo.

Con formato

Con formato

Con formato

Con formato

## **2.4. TROPISMO DEL VIRUS VIH**

El tropismo celular del VIH-1 se basa en la interacción específica de la glucoproteína más externa de la superficie vírica, gp120, y la molécula CD4 de la superficie celular. La principal diana son los linfocitos T que expresan en su superficie la molécula CD4 (31;45-47). Esta molécula también se encuentra, en menor proporción, en los monocitos, macrófagos, linfocitos B (48-50) y células dendríticas de los ganglios linfáticos (51). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> sostienen la infección productiva, mientras que los monocitos/macrófagos no se afectan por el efecto citopático del VIH y se cree que constituyen una fuente de infección crónica (52). Por su parte, las células dendríticas y las células epiteliales genitales actúan como transmisoras del virus a los linfocitos T mediante un contacto intercelular.

### **2.4.1. Co-receptores**

La sola expresión de la molécula CD4 en la superficie celular no es suficiente para producir la entrada del VIH (53). Los receptores de quimiocinas que pertenecen a la familia de las proteínas G de unión (CXCR4, CCR5, CCR1, CCR2 a/b, CCR3) actúan como correceptores y son indispensables para la fusión del VIH con la célula. Los dos receptores principales para la infección in vivo son CCR5 y CXCR4. Las cepas de VIH que usan el correceptor CCR5 (variantes R5) tienen tropismo macrófagico, no infectan las líneas celulares de células T no activadas y son variantes menos virulentas no productoras de sincitios (54;55). Las cepas que usan el correceptor CXCR4 (variantes X4) tienen tropismo por las células de la línea linfocítica, son variantes inductoras de sincitios y aparecen en estadios más avanzados de la enfermedad (56;57). Existen virus que pueden unirse a ambos tipos de receptores

(variantes R5X4)(58;59). En las fases iniciales de la enfermedad se observa un predominio de las variantes R5. Esto podría explicarse por la presencia de la quimiocina factor-1 derivado del estroma (SDF-1), que regula negativamente el receptor CXCR4 en los linfocitos de la lámina propia y de las células dendríticas (60), los cuales expresan altas concentraciones de CCR5, confiriendo a las variantes R5 una importante ventaja selectiva para su transmisión. El paso del predominio de las variantes R5 al predominio de las variantes X4 supone un aumento de la virulencia que causa una aceleración en la destrucción del sistema inmunológico.

Las alteraciones de estos receptores de quimiocinas pueden determinar la resistencia a la infección por el VIH o una progresión más lenta de la infección lo que sugiere nuevas perspectivas terapéuticas en la lucha contra esta infección (61).

Otras moléculas de la superficie celular intervienen en la adhesión del virus a sus dianas. Aunque no pueden sustituir a la asociación receptor-correceptor para la entrada del virus en la célula, colaboran de forma significativa, sobre todo en aquellos casos en que se observa un descenso en la expresión de los receptores para el VIH y son cruciales para la captación del VIH por parte de las células dendríticas y los macrófagos. Estas moléculas son LFA-1, que se une al ICAM-1 expresado por el virus, DC-SIGN y un tipo de proteoglicano conocido como sindecano que fija las partículas víricas del VIH en la superficie de las células endoteliales (62).

## **2.5. CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS VIH**

Con formato

La persistencia y progresión de la infección por el VIH tiene lugar por la replicación del virus dentro de las células infectadas. El ciclo de replicación de los VIH se subdivide en etapas según el orden cronológico

como ocurre la infección. Tras una primera etapa de *adsorción*, fusión e internalización del virión que ocurre en la membrana celular, el virus realiza la *transcripción inversa* para la síntesis de ADN en el citoplasma. Posteriormente, el complejo de replicación es transportado al núcleo donde el ADN se *integra* en los cromosomas. El ciclo prosigue con la síntesis y procesamiento del ARN (*transcripción*) y activa *traducción* de las proteínas virales y termina con la *morfogénesis y salida* de nuevos viriones.

En estos diferentes pasos intervienen una serie de enzimas clave, como la transcriptasa inversa (TI) y la proteasa, que constituyen las dianas de los fármacos antirretrovirales, y otras como la integrasa, que podrán serlo en un futuro cercano. Bloquear la entrada del virus en la célula es otro de los puntos clave para el tratamiento de la infección por el VIH. En este momento, disponemos de los inhibidores de la fusión y están en estudio los antagonistas de los receptores de quimiocinas.

### **2.5.1. Adsorción, fusión e internalización del virión**

El ciclo de replicación del VIH-1 comienza con la entrada del virus en la célula se realiza en cuatro pasos: la adherencia del virus a la superficie celular, la unión al receptor CD4, la interacción del complejo CD4-glucoproteína de la cubierta del virus con el correceptor y, finalmente, la fusión del virus con la membrana celular.

Al ponerse en contacto el virus con su receptor de alta afinidad, la molécula de CD4 (47;63;64), en la superficie de las células susceptibles, primariamente los linfocitos y monocitos/macrófagos. En esta fase se produce la unión de la gp120, el receptor CD4 y los co-receptores CC o CXC, teniendo lugar unos cambios estructurales que originan la fusión del dominio transmembranoso de la gp41 y la membrana de la célula huésped. La fusión de la envoltura del virus y la membrana citoplasmática

- Con formato
- Con formato
- Con formato
- Con formato

celular permitirá el paso de la nucleocápside, complejo formado por las proteínas gag y pol y el genoma vírico.

En el intervalo que va desde la exposición de la preestructura hasta que se completa la formación de la estructura de fusión, el virus es vulnerable a las moléculas (inhibidores de la fusión) que actúan sobre los intermediarios estructurales (65).

### 2.5.2. Transcripción inversa para la síntesis de ADN

Con formato

Con formato

Con formato

Después de la fusión de la cubierta vírica con la membrana de la célula, se produce la internalización de la nucleocápside viral dentro del citoplasma y la desencapsidación del genoma viral.

El ARN genómico se transcribe de forma inversa para generar una copia de ADN por el complejo enzimático de la transcriptasa inversa que posee tres actividades diferentes: ADN-polimerasa dependiente de ARN, ADN-polimerasa dependiente de ADN y ribonucleasa H. La ADN-polimerasa dependiente de ARN sintetiza una copia de ADN de cadena sencilla a partir del ARN, la ribonucleasa destruye el ARN original y la segunda polimerasa sintetiza una segunda cadena de ADN usando como plantilla la primera cadena. La copia de ADN se transporta al núcleo y, posteriormente, se integra en el genoma celular para seguir el proceso de replicación.

La transcriptasa inversa es incapaz de corregir las incorporaciones incorrectas de nucleótidos durante la síntesis de ADN, lo cual provoca la aparición de errores de transcripción con tasas de error estimadas de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  incorporaciones incorrectas por nucleótido copiado. Esto le confiere al VIH una de sus características más determinantes, su elevada variabilidad genética.

### 2.5.3. Integración

Con formato  
Con formato  
Con formato

Una vez sintetizado el ADN proviral, se acopla a una serie de factores víricos y celulares, formando el complejo preintegración, que se transporta hasta la cubierta celular y se traslada al interior del nucleoplasma, donde la doble cadena de ADN proviral se integra dentro del genoma de la célula huésped. El transporte se realiza a través de un mecanismo que implica al gen Vif; este último tiene la capacidad de asociarse a la vimentina, que forma parte de unos filamentos intermediarios que unen las membranas celular y nuclear (66). Por tanto, Vif actúa como conectivo entre el complejo preintegración y las moléculas motoras del microtúbulo para el transporte activo hacia el núcleo. Vpr facilita la captación nuclear del complejo de preintegración y provoca la detención de la mitosis celular en la fase G2/M para favorecer la máxima expresión y replicación del virus.

La reacción de integración mediada por la integrasa) (35) comienza con el ensamblaje de un complejo estable con secuencias de ADN concretas en los extremos de las LTR. El ADN no integrado se degrada por parte de las ADNasas celulares en un período de 5 a 15 días y constituyen un reservorio potencial de VIH (67;68).

### 2.5.4. Transcripción

Con formato  
Con formato  
Con formato

Después de la integración, el genoma puede estar latente o bien ser fuente de producción continua de virus, dependiendo de la presencia de factores celulares o víricos necesarios para la activación del iniciador vírico. La activación de los linfocitos o la diferenciación de los monocitos para una gran variedad de antígenos, mitógenos, citocinas y virus puede resultar en la activación de la replicación y la producción de virus.

El ADN integrado, denominado provirus, es la forma replicativa del VIH. La replicación comienza mediante la transcripción del genoma viral.

En esta fase, el provirus integrado mimetiza un gen celular y depende por completo de los mecanismos celulares para su expresión.

En la LTR del provirus se encuentran una serie de puntos de unión para los factores celulares de transcripción, los cuales regirán la puesta en marcha desde el provirus integrado y su desarrollo según el tipo celular (35).

Entre los diferentes factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras situadas en el LTR, el factor nuclear kappa B (NF-kB) es el principal elemento regulador de la transcripción del VIH en linfocitos CD4+ a partir del estado de latencia (69-71). El NF-kB no se encuentra en forma activa en los linfocitos CD4 en estado de reposo y se genera únicamente en los procesos de activación inmunológica. Esto explica que la replicación del VIH dependa de forma absoluta de la activación de los linfocitos infectados (72;73)

La síntesis de un ARN mensajero maduro y funcionante del VIH se realiza mediante la ARN polimerasa II (ARNPII). La transcripción del provirus genera un ARN de longitud completa que funciona como ARN mensajero y como ARN genómico. La transcripción completa del genoma vírico requiere la participación de la proteína tat que actúa aumentando la tasa de transcripción del genoma del VIH y permite la síntesis de la totalidad del ARN vírico. Tat actúa como un transactivador directo en cooperación con otros factores celulares, en especial el NF-kB, y permite la elongación completa del ARN mensajero del virus (73). En ausencia de tata no hay transcripción del ARN vírico completo.

Además de Tat, intervienen otras proteínas víricas, Rev, Nef y Vpr. La proteína Rev, de localización preferentemente nuclear, interviene en el transporte del ARN sintetizado al citoplasma y en su procesamiento en ARN de distintos tamaños. Rev se une de manera específica a una estructura de ARN llamada elemento de respuesta a Rev (ERR), localizado en el gen Env. Nef contiene una región de localización nuclear y una secuencia rica en leucina que actúa como señal de exportación

nuclear, la cual permite que Rev se asocie a los mecanismos de exportación del núcleo. La unión Rev/ERR incrementa, asimismo, la producción de ARN mensajero de tamaño completo o con un único sitio de unión. Estos ARN sirven para codificar las proteínas estructurales y los de tamaño completo sirven, además, como genoma viral. La Vpr activa la transcripción.

### 2.5.5. Traducción

Con formato

Con formato

Con formato

Después de su síntesis, las proteínas víricas deben ser procesadas antes de ensamblarse en lo que serán las partículas víricas maduras. En este proceso participan diversas proteínas y proteasas víricas, así como una proteasa celular que interviene en la traducción del Env.

Las proteínas del Env gp120 y gp41 se sintetizan como una poliproteína precursora (gp160) a partir de un ARN subgenómico del que se han eliminado las secuencias codificadoras de Gag, Pro y Pol. La ruptura del precursor gp160 en las dos subunidades individuales, gp120 y gp41 tiene lugar en el aparato de Golgi por la acción de una proteasa celular.

En el momento en que se ha completado la oligomerización, la poliproteína ya es competente para la interacción con el receptor CD4. Esta interacción puede inhibir el transporte del complejo a la membrana celular para la fase de ensamblaje. El VIH posee una proteína accesoria, Vpu, que se traduce junto con las proteínas de la cubierta desde un ARN mensajero común y que produce la degradación de la molécula CD4 y, posiblemente, de otras proteínas transmembrana desde el retículo endoplasmático. Aunque el Env no está directamente implicado en la degradación, actúa reteniendo la molécula CD4 en el retículo endoplasmático. La degradación se inicia por la interacción de la proteína Vpu con la molécula CD4. Vpu recluta una proteína que se une a una

proteína celular, SKp1, que es componente de un complejo ligasa que tiene como objetivo la molécula CD4 y pone en marcha la señal para su degradación por parte de las proteasomas del citoplasma.

Las proteínas estructurales y las enzimas que componen el core se traducen a partir de dos poliproteínas precursoras, Gag y Gag-Pol, sintetizadas en el retículo endoplasmático a partir del ARN genómico. Gag codifica las proteínas estructurales asociadas al core viral: la proteína matriz que reviste la cara interna de la membrana viral, la proteína de la cápside que construye la partícula del core en forma de cono, la proteína de la nucleocápside que interactúa con la cadena simple de ARN genómico viral y la p6, una proteína que interviene en la incorporación de la proteína Vpr y en las fases finales de la liberación del virión naciente de la membrana celular. El gen Pol codifica varias enzimas víricas, entre ellas la TI, la integrasa y la proteasa (74). Estos precursores se trasladan en ribosomas libres por el citoplasma hacia la membrana, donde se unen unos con otros e interactúan con la glucoproteínas del Env a través de una serie de procesos de ensamblaje y maduración que dan como resultado una partícula vírica infecciosa.

### **2.5.6. Acoplamiento**

Con formato

Con formato

La formación de partículas VIH infecciosas y su liberación de las células infectadas es un proceso complejo que requiere no sólo el procesamiento y la expresión coordinada de las proteínas precursoras de Gag, Pol y Env, sino que también depende de la actividad de varias proteínas accesorias del VIH como Vif, Nef y Vpu. La partícula vírica que emerge de este proceso mide unos 80-100 nm de diámetro, contiene dos copias idénticas de ARN genómico viral, varias moléculas de ARNt, la proteína de la nucleocápside, TI, integrasa, proteasa y las proteínas accesorias del VIH en una estructura densa en forma de cono

denominada core. El VIH surge de la superficie celular en un proceso en el que participa parte de la membrana celular para recubrir la partícula vírica madura. Asociadas a la membrana se encuentran las proteínas de la cubierta vírica gp41 y gp120 (74). La proteína accesoria Vif se ha asociado a un aumento de la cantidad de Env que se incorpora a los viriones.

Los determinantes del acoplamiento de la cápside están contenidos en los precursores Gag y Gag-Pol, que en ausencia de otras proteínas pueden formar partículas cuasivíricas. El acoplamiento a partir del precursor Gag se desarrolla en varias fases: la interacción del precursor con la membrana celular, la interacción de los precursores entre sí y la emergencia del virión en la superficie celular.

### 2.5.7. Salida de la célula y maduración

Con formato

La liberación de la partícula vírica desde la célula huésped requiere la fisión de la membrana, la cual no parece ligada a ninguna proteína vírica, por lo que debe estar implicado un componente celular.

La molécula CD4 de la superficie celular puede unirse al virus recién liberado y hacer que se reinfecte de forma no productiva la misma célula. Para evitar que esto suceda, después de la activación de la célula tiene lugar un proceso de endocitosis del receptor CD4. La proteína Nef aumenta el índice de endocitosis de CD4, regulando negativamente la cantidad de CD4 localizado en la superficie celular y el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Con ello protege a la célula de la lisis mediada por los leucocitos T citotóxicos y aumenta la infectividad del virus, que está relacionada con la capacidad del virus de disminuir la expresión de su propio receptor.

La partícula vírica liberada necesita madurar para la formación de virus infeccioso. Para ello, las proteínas de Gag y Gag-Pol acopladas

dentro de la partícula vírica en formación son procesadas por la proteasa, que fragmenta las poliproteínas precursoras para producir las proteínas del virus maduro. Mínimas inhibiciones de la proteasa producen intensos déficit en la infectividad del virus. La proteasa es sólo parcialmente activa en la forma precursora; su activación prematura dentro de la célula huésped provocaría la liberación temprana de los componentes de los precursores, lo cual impediría su correcto acoplamiento. El mecanismo de control de la actividad autocatalítica de la proteasa que impide su activación temprana no se conoce por completo.

### 3. FUNDAMENTOS INMUNOLÓGICOS E INMUNOPATOLÓGICOS

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Con formato

Para analizar la inmunopatología del SIDA es necesario situar la relación entre el virus y el huésped en un doble contexto: por una parte se ha de considerar la interacción entre un virus y una célula; en este “microcosmos” es importante analizar y comprender los mecanismos de adaptación del virus a su célula diana. Existe sin embargo un segundo nivel de complejidad, en el que se enfrentan poblaciones virales formadas por miles de millones de partículas y un sistema inmunitario dotado de numerosos mecanismos de defensa y de amplios repertorios de respuesta antimicrobianas. En este “macrocosmos”, el VIH debe ser capaz de adaptarse mediante mecanismos de escape que permiten eludir la respuesta inmunológica (75).

El estudio de la inmunopatogenia de la infección por el VIH no sólo es trascendente para el conocimiento de los mecanismos de esta enfermedad, sino que puede ofrecer alternativas terapéuticas inmunológicas o llevar al desarrollo de una vacuna eficaz (76).

#### **3.1.1. Moléculas de superficie y clasificación de los linfocitos T**

Los linfocitos T detectan la presencia de sustancias extrañas gracias a proteínas de superficie que se denominan receptores de célula T. Además, los linfocitos funcionales y maduros expresan varias proteínas características de superficie, además de los que son las que permiten detectar. Muchas de estas proteínas se conocen con las iniciales CD (del inglés "clúster of differentiation") seguidas de un número de identificación particular. Estas proteínas son muy útiles para distinguir los distintos tipos

de células, y a menudo participan de modo directo en funciones celulares inmunitarias.

Por ejemplo, los receptores de superficie de la célula T siempre se expresan junto con otros cinco polipéptidos de superficie transmembrana que se conocen en conjunto como complejo CD3. Como estas proteínas son casi exclusivas de la línea T y son más fáciles de detectar sirven para identificar linfocitos T en tejidos extratímicos. Otras dos proteínas, llamadas CD2 y CD7 son también exclusivas de los linfocitos T y aparecen en una etapa más temprana del desarrollo de la célula T en el timo.

Casi todos los linfocitos maduros que se encuentran en la sangre periférica y en órganos linfoides secundarios son CD2+CD3+CD7+. No obstante, dentro de este grupo hay poblaciones con funciones inmunitarias diferentes y que expresan sus propios marcadores de superficie distintivos. Estas subpoblaciones se conocen con frecuencia como subgrupos de células T. Los dos subgrupos más importantes pueden distinguirse por dos proteínas adicionales conocidas como CD4 y CD8. La mayoría de los linfocitos T que expresan proteína CD8 se superficie tienen actividad citotóxica. Los linfocitos T citotóxicos tienen una importancia extrema en la defensa contra las infecciones virales. En contraste, los linfocitos T que expresan proteína CD4 casi nunca son citotóxicos sino más bien funcionan como células T cooperadoras y promueven la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares.

Los linfocitos T vírgenes y de memoria permanecen de ordinario en estado de reposo, y en dicho estado no exhiben una actividad cooperadora o citotóxica significativa. No obstante, cuando son activadas pueden realizar varios ciclos de división mitótica para producir múltiples células hijas pasando unas a estado de reposo y otras se convierten en células con actividad cooperadora o citotóxica. Estas células efectoras muestran varios tipos de proteínas de superficie (como CD25, CD29,

receptores de transferencia y un grupo de proteína CMH conocido como proteínas CMH clase II) que no se encuentran en las células en reposo, y también pueden expresar cantidades aumentadas de algunos marcadores constitutivos de la célula T (como CD2).

### 3.2. INMUNOSUPRESIÓN PRODUCIDA POR EL VIRUS VIH

Con formato

La característica paradigmática de la infección por el VIH es la depleción progresiva de la subpoblación de linfocitos CD4 colaboradores-inductores. Dado que estas células desempeñan un papel central en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, las manifestaciones clínicas de la enfermedad se producen por la inmunosupresión producida. Las alteraciones inmunológicas que se asocian con la infección por el VIH son muy amplias y afectan a diversos brazos efectores interdependientes del sistema inmunológico, incluidos elementos de la inmunidad humoral y celular.

#### 3.2.1. Propiedades inmunosupresoras de los productos víricos

Algunas proteínas de los retrovirus poseen un efecto directo inmunosupresor independientemente de la infección vírica. Así, un péptido de una región altamente conservada de la glucoproteína transmembrana de la envoltura del VIH gp41 puede inhibir in vitro la respuesta proliferativa de los linfocitos a estímulos antigénicos y a mitógenos, debido a la inducción de apoptosis (77). No se sabe con certeza si este fenómeno contribuye a la inmunosupresión global que se observa en la infección por el VIH, pero la posibilidad de que las proteínas retrovirales tengan capacidad inmunosupresora siembra la duda de si

hubiese que incluir secuencias de tales proteínas como inmunógenos en futuras vacunas.

### **3.2.2. Alteraciones de los linfocitos T**

La infección por el VIH-1 tiene dos efectos dramáticos sobre el sistema inmune: una pérdida progresiva de linfocitos T CD4+, que provoca un deterioro importante de la inmunidad celular, y una activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (78). Se cree que ambos efectos tienen un papel relevante en el desarrollo del SIDA (79;80). La replicación de VIH es el principal responsable de este proceso, y junto con el recuento de linfocitos T CD4+, son los marcadores pronósticos más importantes para valorar la progresión de la enfermedad (7). El estudio de otras subpoblaciones de linfocitos para el seguimiento y tratamiento de los pacientes infectados con VIH-1 no ha sido establecido definitivamente (78).

#### **3.2.2.1. Alteraciones de los linfocitos CD4+**

Las alteraciones que se observan en los linfocitos T durante la infección por el VIH son tanto cualitativas como cuantitativas. Las alteraciones cualitativas se hacen aparentes tras la primoinfección y antes de que el descenso de linfocitos T sea evidente. Existe un trastorno en el reconocimiento de antígenos solubles, aunque aún responden a mitógenos.

La alteración central se produce en la función de las células colaboradoras y no se debe a una hiperfunción de las células supresoras. Otras anomalías observadas en la infección por el VIH consisten en el descenso de la producción de linfocinas, la disminución en la expresión

de los receptores de interleucina 2 (IL-2), la disminución de la alorreactividad y la reducción de la capacidad para estimular los linfocitos B.

Las alteraciones cuantitativas son el resultado de la depleción progresiva de la subpoblación de linfocitos T colaboradores CD4+. Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica se encuentran infectados en una proporción pequeña mientras que en los ganglios linfáticos existe una alta proporción de células infectadas, aunque sólo una parte mínima replica activamente el genoma proviral que contiene. Esa pequeña proporción de CD4 infectados daría lugar a la producción diaria de  $10^{10}$  viriones que ocasionaría la destrucción de  $10^8$  CD4 cada 36 horas por un efecto citopático directo y la infección de un número similar de células, especialmente linfocitos destinados a restituir los linfocitos destruidos.

Dentro de la pérdida progresiva de linfocitos T CD4+, se infectan preferentemente las que tienen fenotipo memoria y son las primeras en afectarse. Aunque después ocurre una disminución progresiva de los niveles absolutos tanto de las células vírgenes como de las memoria, existe una reducción mayor en la proporción de las células vírgenes a medida de que la enfermedad progresa (81). Esta depleción no puede atribuirse exclusivamente al efecto citotóxico directo del virus, pues sólo una minoría de estas células se encuentran infectadas incluso en fases avanzadas de la infección. Otros factores que pueden contribuir a la depleción de linfocitos CD4 son los siguientes: a) la formación de sincitios, en que una célula infectada se fusiona por medio de sus glucoproteínas de superficie gp120 con moléculas CD4 de células no infectadas, formando células gigantes multinucleadas; b) como células CD4+ no infectadas espectadoras que han fijado en sus receptores gp120 libres, volviéndolas vulnerables al ataque inmunitario; c) descenso de la producción por infección por el VIH de las células pluripotenciales medulares o depleción tímica producida por el VIH; d) mecanismos autoinmunes, en virtud de los cuales anticuerpos con reactividad cruzada

o la respuesta inmunitaria celular contra el virus producen la destrucción de células no infectadas; e) efecto de superantígeno, en que ciertas proteínas víricas producirían la estimulación, y depleción última, de linfocitos T con receptores específicos; f) apoptosis, en que el virus (o sus productos) provocaría la muerte celular programada (79).

Dentro de la pérdida progresiva de linfocitos T CD4+, las células con fenotipo memoria se infectan preferentemente y son las primeras afectadas; a pesar de que después existe una disminución progresiva tanto de los linfocitos vírgenes y memoria, a medida que progresa la enfermedad ocurre una reducción preferencial de las células vírgenes (81).

Por último, los linfocitos también representan un importante reservorio para la infección persistente. En una persona infectada, se estima que aproximadamente  $10^6$  linfocitos CD4 contienen provirus integrado en el genoma de forma latente, susceptible de replicación completa si la célula se activa (82). Puesto que estas células no expresan proteínas víricas hasta que se activan, el provirus permanece "escondido" para el sistema inmunológico y no será sensible a los fármacos que inhiben la replicación viral, lo cual representa un obstáculo insalvable para la erradicación del virus. Varios modelos han definido que los linfocitos CD4+ presentan un recambio (turnover) muy elevado desde el inicio de la infección que va a condicionar paulatinamente su descenso en sangre periférica. Estos modelos son la base para el inicio precoz del tratamiento antirretroviral (83).

### **3.2.2.2. Alteraciones de los linfocitos CD8+**

Las alteraciones de los linfocitos T CD8+ ocurren de forma temprana después de la infección y recuentos altos caracterizan la fase asintomática, mientras la homeostasis de las células CD3+ está

preservada y los niveles de linfocitos T CD4+ permanecen estables por encima de  $500 \times 10^6$  células/l (84;85). Estos linfocitos T CD8+, que expresan altos niveles de antígenos de activación, tales como HLA-DR y CD38, son predictores de la tasa de disminución de los linfocitos T CD4+ y se correlacionan con la persistencia de la replicación viral in vivo (86;87). Además, los linfocitos T CD8+ pertenecientes a individuos infectados por el VIH-1, los cuales presentan una importante reducción de su potencial proliferativo, presentan una clara expansión de la subpoblación con pérdida de expresión de la molécula CD28; este aumento se correlaciona negativamente con los niveles de linfocitos T CD4+ (88).

### **3.2.3. Alteraciones de los linfocitos B**

Las alteraciones que se producen en los linfocitos B son también cualitativas y cuantitativas. En las fases precoces de la infección, la alteración más característica consiste en la activación policlonal de los linfocitos B, que clínicamente se traduce en concentraciones elevadas de IgG e IgA, en la presencia de inmunocomplejos circulantes y en un número elevado de linfocitos B en la sangre periférica que segregan inmunoglobulinas espontáneamente. Estas alteraciones no parecen deberse al efecto directo del virus. Aunque las células B pueden expresar escasamente el receptor CD4 y han sido infectadas in vitro, no existen datos concluyentes de que estas células se infecten in vivo. Por tanto, el virus (o sus productos) deben interactuar con los linfocitos B no infectados para estimularlos. Otros factores que pueden contribuir a esta estimulación policlonal pueden ser la infección concomitante por otros virus, tales como el citomegalovirus o el virus de Epstein-Barr.

Las alteraciones funcionales de los linfocitos B consisten principalmente en la afectación de la producción de anticuerpos ante

estímulos antigénicos, que puede estar mediada por la hipofunción de los linfocitos T colaboradores. La vulnerabilidad de los enfermos infectados a padecer infecciones piógenas y la falta de respuesta a la inmunización que muestran estos individuos puede deberse a la alteración de la inmunidad humoral (89).

#### **3.2.4. Alteraciones de los monocitos/macrófagos**

El VIH infecta células de linaje monocito/macrófago que expresan el receptor CD4 y la molécula correceptora CCR5. Sin embargo, sólo una minoría de estas células muestra infección productiva in vivo, por lo que la hipofunción de los linfocitos T colaboradores puede contribuir también a las alteraciones observadas en los macrófagos. Asimismo, el VIH infecta (y se replica) en células progenitoras medulares de la estirpe monocito/macrófago, fenómeno que puede contribuir a la pancitopenia que se observa en muchos de los pacientes seropositivos.

Los macrófagos, al contrario que los linfocitos CD4+, son relativamente resistentes al efecto citopático del virus y pueden constituir un reservorio para la persistencia de la infección. Los macrófagos, por otro lado, pueden diseminar la infección por el VIH al sistema nervioso central, atravesando la barrera hematoencefálica (90).

La capacidad de los macrófagos como célula presentadora de antígenos se ve afectada, en particular, en las fases avanzadas de la enfermedad. Esta alteración puede traducirse en una incapacidad para establecer una respuesta inmunitaria adecuada tanto frente al VIH como a otros patógenos. Estas anomalías parecen deberse a la activación crónica in vivo de los macrófagos, ya sea por viriones completos, proteínas víricas o linfocinas. Por este motivo, puede observarse en pacientes con sida una expresión aumentada del receptor de IL-2 e IL-1 (91).

### **3.2.5. Otras alteraciones**

Las células natural killer (NK) constituyen un componente esencial en la vigilancia inmunológica contra las células infectadas por virus, las células alogénicas y las células tumorales. Las células NK son linfocitos granulares grandes que reconocen antígenos en las células, con la posterior lisis de estas células. Estas células NK son normales en número y desde el punto de vista fenotípico, pero defectivas desde el punto de vista funcional, por lo que no destruyen las células diana (92).

La aparición de fenómenos autoinmunes forma parte de la alteración inmunológica que se produce en los enfermos infectados por el VIH. En la mayoría de los pacientes seropositivos pueden detectarse inmunocomplejos circulantes. Algunas de las manifestaciones clínicas que aparecen en estos enfermos pueden deberse a estos fenómenos (93).

### **3.2.6. Cambios inmunológicos en sangre periférica después de TARGA**

Una supresión estable de la replicación del VIH después del TARGA se asocia con unos beneficios clínicos e inmunológicos en la mayoría de los pacientes, a pesar de que el grado de reconstitución inmune es sólo parcial, sobre todo una vez que el sistema inmune ha sido gravemente dañado, lo que ocurre en pacientes con infección avanzada por el VIH-1 (94-100). Si la supresión de la replicación de VIH-1 se inicia y se mantiene durante los estadios iniciales de la infección asintomática, cuando la homeostasis de los linfocitos T CD3+ todavía está preservada y los niveles de linfocitos T CD4+ se mantienen estables con  $> 500 \times 10^6$  células/l, se acepta que se puede conseguir una normalización completa de las subpoblaciones y la función de los linfocitos T (78).

La supresión de la replicación del VIH-1 durante 12 meses en las fases iniciales de la infección crónica por el VIH-1 resulta en un sustancial aumento en el número de linfocitos T CD4+ y una disminución del número de linfocitos T CD8+. Sin embargo, los niveles no llegan a igualarse a los de los controles no infectados. El descenso de los linfocitos T CD8+ ocurre principalmente como resultado por la reducción de las subpoblaciones activada (CD38) y memoria (CD45RA-CD45RO+). Para conseguir resultados más importantes es mejor la terapia triple que incluso logra disminuir el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD38). La efectividad de la terapia triple en reducir la activación de los linfocitos T es consistente con su mayor eficacia en la supresión de la replicación del VIH-1, reduciendo los niveles de ARN plasmáticos a niveles indetectables en el 91% de los pacientes (78). Los niveles de linfocitos T CD8+CD38+ y el ARN plasmático de VIH-1 se correlacionan tanto antes como después de 1 año de terapia y tanto en pacientes en fases iniciales (78;86) como avanzadas (95) de la infección.

Incluso en las fases iniciales de la infección crónica existe un descenso de los linfocitos T CD8+CD28+ y, por lo tanto, una expansión de los linfocitos T CD8+ que no expresan CD28, lo que indica una alteración de la función inmune (88). Este incremento también se ha observado en otras situaciones con hiperactivación tales como las infecciones virales crónicas, las enfermedades autoinmunes y el cáncer; e incluso en personas mayores (101). Se cree que la ausencia del antígeno de superficie CD28 y la falta de una respuesta proliferativa en condiciones de cultivo reflejan un estadio de maduración más tardío de las células como resultado de una estimulación antigénica repetida u un aumento del número de ciclos de divisiones celulares (102). También se ha descrito un aumento de la expresión de CD57 acompañando al descenso de expresión de CD28 en los linfocitos T CD8+. Se cree que el fenotipo caracterizado por CD57+CD28- podría representar un estadio terminal diferenciado no proliferante de linfocitos T (103). El tratamiento

antirretroviral iniciado en etapas iniciales induce un aumento significativo en la expresión de CD28 en los linfocitos T CD8+ sin afectar el porcentaje de células CD8+CD28-CD57+. El aumento de linfocitos T CD8+CD28+ observados en pacientes tratados indica probablemente la presencia de nuevos linfocitos T CD8+ que expresan la molécula CD28 de novo más que una reducción en el pool de linfocitos T CD8+ viejos (78).

En contraste con lo observado en pacientes con enfermedad avanzada (94-100), los pacientes con infección temprana por el VIH-1 muestran pocas alteraciones en el compartimento de células vírgenes/memoria (78). Antes del tratamiento, el porcentaje de linfocitos T CD4+ con fenotipos virgen o memoria, así como el número total de linfocitos T CD4+ vírgenes es similar a los pacientes sin infección; sin embargo el número total de linfocitos T CD4+ está reducido. La triple terapia aumento el número absoluto de linfocitos T CD4+ vírgenes y memoria, siendo al año de tratamiento similar a la de las personas sin infección. El número aumentado de linfocitos T CD4+ vírgenes puede deberse a un aumento de la producción tímica, a una expansión periférica de los linfocitos vírgenes sin cambio fenotípico o a una disminución del recambio celular. La mayor eficacia de la triple terapia para aumentar los linfocitos T CD4+ memoria puede ser un reflejo de la mayor eficacia para suprimir la replicación del VIH-1 en los tejidos linfoides. De hecho, la reducción de la carga de VIH en los tejidos linfoides periféricos después de TARGA en pacientes con infección avanzada permite la redistribución de los linfocitos T CD4+ memoria hacia la sangre, lo que provoca un rápido aumento de linfocitos T CD4+ en estos pacientes tras tratamiento (95-100). Sin embargo en pacientes con estadios iniciales de la infección tratados con TARGA durante 3 meses hay una proliferación de los linfocitos T CD4+ memoria intrafoliculares, a pesar de que el ARN del VIH es indetectable (104). Por lo tanto, tanto la redistribución y la regeneración en periferia de los linfocitos T CD4+ memoria influyen en el aumento de las células memoria circulantes observados en los pacientes con infección

reciente y tratados con TARGA. El aumento de los linfocitos T CD8+ memoria y vírgenes refleja un estado de activación del sistema inmune. Se ha sugerido que un aumento del porcentaje de CD8+CD38+ podría usarse como un predictor temprano de la pérdida de los linfocitos T CD4+ (105). Después de 12 meses de tratamiento, las células memoria CD8+ alcanzan valores casi normales. No obstante, el porcentaje de CD8+ con fenotipo virgen estaba reducido a pesar de que el número absoluto estaba aumentado. Después de 12 meses de terapia, los valores de esta subpoblación todavía permanece más alto que en pacientes no infectados (78).

### **3.3. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE AL VIH**

La fase inicial de la infección por el VIH se caracteriza por cifras altas de viremia plasmática que pueden alcanzar  $10^7$  viriones por mililitro. La viremia se asocia a concentraciones elevadas de proteína p24 del core viral en el suero. Sin embargo, tras la infección inicial, las cifras de viremia y antigenemia descienden con rapidez, y sobreviene un largo período de infección asintomática (106). Esto sugiere que la respuesta inmunitaria específica frente al virus desempeña un papel en el control de la replicación viral y, por tanto, en la progresión de la enfermedad. En consecuencia, un tema central consiste en determinar los componentes protectores específicos de la respuesta inmunitaria humana frente al VIH.

#### **3.3.1. Anticuerpos neutralizantes**

El VIH induce la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B frente a las proteínas víricas, y algunos de estos anticuerpos tienen capacidad neutralizante del virus. La respuesta de anticuerpos se

observa típicamente entre el mes y los tres meses posteriores a la primoinfección, aunque en circunstancias excepcionales puede tardar más tiempo en desarrollarse (107).

Los anticuerpos "neutralizan" directamente el virus libre antes de que penetre en la célula y pierda su envoltura. La diana primaria es una estructura en asa dentro de una región relativamente hipervariable de la glucoproteína gp120 denominada "dominio principal de neutralización" (V3 loop), así como frente a epítopos de la región implicada en la fijación al receptor CD4 (108).

Los anticuerpos neutralizantes se encuentran presentes durante toda la infección por el VIH y, aunque los títulos son generalmente más bajos en las fases avanzadas de la infección, no ha podido demostrarse una correlación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, estudios detallados de la primoinfección han puesto de manifiesto que los anticuerpos capaces de neutralizar cepas infectivas del virus aparecen con posterioridad al aclaramiento de la viremia, sugiriendo que otros mecanismos inmunológicos deben ser operativos para el control inicial del virus (109). Se desconoce si la inducción aislada de anticuerpos neutralizantes puede conferir protección frente a la infección natural por el VIH, pero indudablemente puede ser un tema trascendente para el futuro desarrollo de vacunas (110). La capacidad de los anticuerpos neutralizantes para conferir protección frente a la infección por el VIH puede verse afectada, en parte, por el alto grado de variación antigénica que muestra este virus.

La primera línea defensiva en las mucosas está representada por anticuerpos de la clase IgA secretora. Tales anticuerpos secretores se han encontrado en la sangre, saliva y otros líquidos corporales de los sujetos infectados con el VIH, pero queda por determinar su posible papel protector en la respuesta inmunitaria contra esta infección.

### **3.3.2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos**

Otro mecanismo inmunológico para controlar la diseminación de la infección puede ser la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Se trata de un proceso mediante el cual los anticuerpos específicos contra el virus se fijan directamente en proteínas víricas de la superficie de células infectadas, sensibilizando a estas células para ser lisadas por células que se fijan a la porción Fc expuesta del anticuerpo. Las células responsables de esta respuesta son las células NK, que expresan el receptor CD16 para la porción Fc de la IgG. En la mayoría de los enfermos infectados por el VIH se han identificado anticuerpos que pueden mediar esta respuesta. Estos anticuerpos aparecen tras la seroconversión y se mantienen a lo largo del curso de la enfermedad. Se ha postulado que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos puede limitar la diseminación del virus de célula a célula mediante este mecanismo citotóxico. Sin embargo, la contribución de este proceso inmunológico en la progresión de la enfermedad no está definida (111).

### **3.3.3. Linfocitos T citotóxicos**

Los linfocitos T citotóxicos (LTC) representan un mecanismo protector generado por el individuo frente a diversas infecciones víricas. Los LTC pueden destruir las células infectadas, al reconocer péptidos de 8-9 aa de las proteínas víricas presentados en la superficie celular por las moléculas HLA de clase I (A, B y C). El reconocimiento de este complejo (péptido más HLA de clase I) por parte de los LTC lleva a la lisis y a la eliminación de la célula infectada (112).

Aunque lo definitorio de la infección por el VIH es la aparición progresiva de un estado de inmunosupresión profunda, se ha detectado una respuesta vigorosa específica mediada por LTC en la sangre

periférica de pacientes seropositivos. Estas respuestas no están sólo dirigidas contra las proteínas estructurales del virus, sino también frente a la transcriptasa inversa y las proteínas reguladoras como vif y nef. Esta respuesta está mediada fundamentalmente por los linfocitos CD8+, que pueden reconocer péptidos del VIH en la superficie de células infectadas junto con moléculas HLA de clase I (A, B y C) (113).

En numerosos modelos experimentales de infección viral se ha demostrado un papel protector de los LTC, y existen algunos datos que indican un efecto antiviral de los LTC en la infección por el VIH. En la infección aguda por el VIH, pueden detectarse concentraciones altas de LTC específicos del virus, y su aparición se correlaciona con el control de la viremia (114). Algunos datos indirectos sugieren que la respuesta de LTC puede retrasar la progresión de la enfermedad.

A medida que progresa la enfermedad se observa un descenso de LTC, lo que puede contribuir al aumento de la viremia en fases avanzadas de la infección. Más recientemente, la aplicación de la citometría de flujo para el estudio de los LTC ha demostrado una correlación inversa entre la respuesta de LTC y la carga viral. Por último, en pacientes infectados "progresores lentos" puede detectarse una vigorosa respuesta de LTC, lo que respalda el papel protector de este mecanismo defensivo (115).

### **3.3.4. Respuesta celular proliferativa**

La inmunidad de células T contra los patógenos víricos no sólo consiste en la aparición de LTC, sino también en la proliferación de linfocitos T colaboradores y la producción de citocinas como respuesta específica frente a los antígenos víricos. La respuesta proliferativa de células CD4+ se produce, generalmente, por el reconocimiento de péptidos víricos asociados a moléculas HLA de clase II (HLA-DR) en la superficie de la célula presentadora de antígenos. Se ha demostrado una

correlación inversa entre la carga viral y la respuesta de células T colaboradoras frente a las proteínas del Gag (proteínas estructurales del core), lo cual demuestra el protagonismo de los linfocitos T colaboradores en el control de la viremia. La intensidad de la respuesta de las células colaboradoras se asocia a una respuesta paralela de los LTC y es probable que el efecto antivírico de las células T colaboradoras esté mediado por el incremento en la respuesta de los LTC.

En la mayoría de personas infectadas, la respuesta de las células T colaboradoras no es muy intensa; en cambio, todos los pacientes con primoinfección tratados antes de la seroconversión con fármacos antirretrovirales de alta eficacia desarrollan una respuesta potente de células T colaboradoras específica para Gag (116). Esta observación ha llevado a la hipótesis de que una proporción significativa de células T colaboradoras específicas para el VIH se pierden en las fases precoces de la infección debido al tropismo del VIH de infectar células CD4 activadas (117).

Con formato

## **4. FUNDAMENTOS CLÍNICOS**

### **4.1. HISTORIA NATURAL Y CLASIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1**

La infección por el VIH provoca una respuesta del sistema inmunitario que limita la expansión de la infección, pero sin lograr erradicarla. Tras un período de tiempo siempre largo, pero muy variable, la infección, que afecta a las células CD4, acaba desarbolando el sistema inmune y ocasionando una inmunodeficiencia, el SIDA.

El VIH, desde que entra en el cuerpo humano, establece una latencia clínica pero no una latencia vírica. Datos recientes apoyan la hipótesis de que el VIH-1 prolifera en forma continua (83;118) desde el momento en que infecta a un paciente, aunque a velocidades diferentes según el estadio evolutivo de la infección (119-123).

Se distinguen tres fases en la historia natural de la infección por el VIH:

- 1) fase precoz o aguda de pocas semanas de duración,
- 2) fase intermedia o crónica, con replicación vírica activa, de varios años de duración, y
- 3) fase final o de crisis, que corresponde al complejo relacionado con el SIDA y posteriormente con el SIDA.

Aunque, existen pacientes que presentan una evolución diferente y son los supervivientes de larga duración.

#### **4.1.1. Fase precoz o aguda**

La infección aguda por el VIH puede ser asintomática (en ocasiones se manifiesta como un síndrome mononucleósico que puede reconocerse hasta en el 30-60% de los casos). A partir de ese momento

el paciente puede persistir asintomático o presentar una gran variedad de manifestaciones clínicas, que comprenden desde la presencia de linfadenopatías generalizadas hasta infecciones oportunistas graves o neoplasias.

En la infección inicial, antes de que se produzca la respuesta inmune, se produce durante unas semanas una rápida expansión del virus con una carga viral elevada y una disminución transitoria de linfocitos CD4+. Durante esta fase la carga viral presenta unos títulos muy elevados en plasma calculándose una proporción de linfocitos CD4+ infectados de hasta uno de cada 10-100 linfocitos. Paulatinamente aparecerá antígeno p24 circulante y luego los diferentes tipos de anticuerpos (2-6 semanas), lo que coincidirá con la desaparición del antígeno p24. Durante este periodo puede darse una situación de inmunodeficiencia transitoria, capaz de facilitar la aparición o la reactivación de determinadas infecciones oportunistas.

#### **4.1.2. Fase intermedia o crónica**

Pronto la respuesta inmune, sobre todo celular, hace desaparecer estas manifestaciones, pero no el virus, que permanece en las células, y se pasa a un período asintomático. Durante esta fase la actividad replicativa viral persiste, aunque a un nivel más bajo. Aproximadamente uno de cada 10.000 linfocitos CD4+ circulantes estarían infectados, pero sólo en el 10% de los mismos existe actividad replicativa medida por la presencia de ARN viral (124).

Este periodo dura 2-14 años con una mediana de 10 años durante la cual la persona es portadora del virus y, por tanto, capaz de infectar a otras por los mecanismos de transmisión establecidos. El mantenimiento de la respuesta inmune contra la infección, tanto con anticuerpos neutralizantes como con una respuesta de células citotóxicas, es lo que

hace permanecer al individuo asintomático durante un dilatado período de tiempo. A medida que avanza el curso de la infección aparecen signos y síntomas característicos de la enfermedad por el VIH, los cuales dependen del grado de inmunosupresión y de los efectos directos del VIH, sobre todo los que aparecen como consecuencia de su afinidad por el sistema nervioso central.

### **4.1.3. Fase final o de crisis**

Llega un punto en que la velocidad de replicación viral y de destrucción de los linfocitos CD4+ sobrepasa la capacidad del sistema inmune para controlarlos y para regenerar la población CD4+ iniciándose una fase de deterioro más rápido con disminución progresiva de las células CD4 y resurgimiento de antigenemia. El incremento de la actividad replicativa del virus es enorme durante esta fase calculándose que uno de cada 10 linfocitos CD4 circulantes puede estar infectado. La infección avanzada del VIH o SIDA es el estadio final de la enfermedad. Se caracteriza por la aparición de una intensa alteración del estado general (*wasting síndrome*), de infecciones oportunistas y neoplasias que amenazan la vida del enfermo.

### **4.1.4. Clasificación de la infección por el VIH-1**

En un principio la clasificación de los Centers Disease Control (CDC) constituía la guía para la clasificación de la infección por el VIH-1, pero en 1993 quedó sustituida. La clasificación actual se basa en el número de CD4+ y la existencia de distintas situaciones clínicas que se intuyen en dos categorías B y C (tabla III) (125).

Cifra de linfocitos CD4	Categoría clínica		
	A	B	C
≥500/μl(≥29%)	A1	B1	C1
200-499/μl(14-28%)	A2	B2	C2
<199/μl(SIDA)(<14%)	A3	B3	C3

**Tabla III. Clasificación de la infección por VIH y criterios de definición de SIDA para adultos y adolescentes (>13 años)**

La categoría clínica A se aplica a la infección primaria y a los pacientes asintomáticos con linfadenopatías generalizadas persistentes o sin ellas.

La categoría clínica B se aplica a pacientes que presenten o hayan presentado síntomas debidos a enfermedades no pertenecientes a la categoría C, pero relacionadas con la infección por VIH o cuyo manejo y tratamiento puedan verse complicados debido a la presencia de la infección por VIH.

La categoría clínica C se aplica a pacientes que presenten o haya presentado alguna de las 26 complicaciones que se reflejan en la tabla III.

1. Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar.
2. Candidiasis esofágica.
3. Carcinoma de cervix invasivo
4. Coccidioidomicosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares)
5. Criptococosis extrapulmonar
6. Criptosporidiasis, con diarrea de más de un mes
7. Infección por citomegalovirus, de un órgano diferente del hígado, bazo o ganglios linfáticos, en un paciente de edad superior a 1 mes
8. Retinitis por citomegalovirus
9. Encefalopatía por VIH
10. Infección por virus del herpes simple que cause una úlcera mucocutánea de más de un mes de evolución, o bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración, que afecten a un paciente de más de 1 mes de edad
11. Histoplasmosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares)
12. Isosporidiasis crónica(>1mes)
13. Sarcoma de Kaposi
14. Linfoma de Burkitt o equivalente
15. Linfoma inmunoblástico o equivalente
16. Linfoma cerebral primario
17. Infección por *Mycobacterium avium-intracellulare* o *M. Kansasii* diseminada o extrapulmonar
18. TBC pulmonar
19. TBC extrapulmonar o diseminada
20. Infección por otras micobacterias, diseminada o extrapulmonar
21. Neumonía por *Pneumocystis carinii*
22. Neumonía recurrente
23. Leucoencefalopatía multifocal progresiva
24. Sepsis recurrente por especies de *Salmonella* diferentes de *S. typhi*
25. Toxoplasmosis cerebral en un paciente de más de 1 mes de edad
26. *Wasting syndrome*

**Tabla III. Situaciones clínicas diagnósticas de SIDA**

## **4.2. EPIDEMIOLOGIA**

### **4.2.1. Mecanismos de transmisión**

El VIH no se transmite por el contacto casual ni incluso con el contacto estrecho, no sexual, que se produce normalmente en la vida diaria. La transmisión a otra persona requiere la transmisión de sustancias corporales infectadas, como sangre, plasma o leche materna. Especialmente, cabe esperar que el VIH esté presente en cualquier líquido o exudado que contenga linfocitos; por ejemplo, se ha encontrado en el semen, las lágrimas y las secreciones vaginales. Sin embargo, no se ha descrito la transmisión por lágrimas, saliva, fómites, o aire.

Las células infectadas pueden alcanzar las células diana en un nuevo huésped directamente (transfusiones sanguíneas, inyecciones) o después de la exposición de una membrana mucosa, es decir, por contacto directo, estrecho, que rompe las barreras normales del cuerpo. Probablemente esta transmisión por la mucosa sea más fácil en presencia de tejidos inflamados o traumatizados (lesiones anorectales, vaginales). La transmisión heterosexual se ha documentado con mayor frecuencia del hombre a la mujer, aunque las descripciones de casos de mujer a hombre van aumentando. Aunque se han documentado transmisiones del VIH por punción accidental con una aguja en el ámbito sanitario, este medio es mucho más difícil y mucho menos frecuente que con otros virus como el de la hepatitis B.

También se han descrito recién nacidos y niños con SIDA, la mayoría de ellos hijos de madres con SIDA o con riesgo de contraerlo, que recibieron múltiples transfusiones sanguíneas o que eran hemofílicos que recibían componentes sanguíneos. El VIH puede transmitirse vía transplacentaria o perinatalmente. Otra vía de contagio es la lactancia.

#### **4.2.2. Grupos de riesgo**

La mayor proporción de infectados los encontramos en la franja de edad de 20-49 años, la mayoría son varones, homosexuales o consumidores de drogas vía parenteral. Otros grupos de riesgo, por orden de frecuencia de la infección, son: heterosexuales y receptores de sangre o de componentes sanguíneos transfundidos no controlados.

#### **4.2.3. Distribución geográfica**

La distribución geográfica se ha modificado considerablemente en los 20 años que han transcurrido desde el inicio de la epidemia; a pesar de estabilizarse el SIDA en determinadas zonas geográficas no lo ha hecho la infección por VIH (o al menos no la prevalencia de infección), por lo que debe seguir considerándose como una importante enfermedad emergente en muchas regiones, especialmente en los países de la antigua Unión Soviética, China y países del sureste asiático como India o Vietnam.

En África, las pautas de incidencia son muy diferentes de las de EEUU o de Europa. Mientras en Europa Occidental la incidencia ha disminuido en los últimos años, en la Europa del Este ha aumentado. En la mayoría de los países subsaharianos, la tasa de adultos y niños que están contrayendo la infección es más elevada que antes, produciéndose un efecto aceleración característico de las epidemias prolongadas. A excepción de Australia, casi no se han identificado casos en la región del Pacífico occidental, incluso en ciudades conocidas por su turismo sexual.

### **4.3. DIAGNOSTICO**

#### **4.3.1. Criterios de SIDA**

En 1993 los CDC de EEUU publicaron la última revisión de la definición de SIDA (125;126) (tabla II). En esta nueva definición se considera afectos de SIDA a los pacientes infectados por el VIH que presentan alguna de las 26 complicaciones que se relacionan en la tabla III o que tienen menos de 200 linfocitos CD4/ $\mu$ L.

#### **4.3.2. Diagnostico de la infección por VIH**

El diagnóstico de la infección por VIH-1 sólo puede establecerse de modo definitivo por métodos de laboratorio, ya que las manifestaciones clínicas, aunque sugerentes, son inespecíficas en cualquier estadio de la enfermedad. Las pruebas de laboratorio pueden clasificarse en directas si pretenden aislar el virus o identificar alguno de sus componentes (proteínas, RNA o DNA), e indirectas si persiguen demostrar la respuesta inmunitaria humoral o celular por parte del huésped. La investigación de anticuerpos en suero es la metodología más frecuentemente utilizada para la identificación de los individuos infectados por VIH-1.

##### ***4.3.2.1. Pruebas serológicas para detección de anticuerpos***

Para detectar los anticuerpos frente al VIH-1 se utiliza primero una prueba muy sensible de enzimoimmunoanálisis (ELISA) seguida de un test de confirmación más específico (Western-blot). La gran variabilidad del virus limita en parte la sensibilidad de las técnicas.

El ELISA detecta la existencia en suero de anticuerpos frente al VIH-1 y VIH-2. En los últimos años se han desarrollado otras técnicas de ELISA, que son más sensibles y específicas que las iniciales. Utilizan como antígenos proteínas recombinantes o péptidos sintéticos específicos del VIH-1. Pueden detectar todas las subclases de anticuerpos y no sólo la IgG. Esto explica su mayor sensibilidad para reconocer la primoinfección por VIH-1, cuando la IgM es el primer marcador de la seroconversión, y para el diagnóstico de la infección pediátrica, que cursa con IgM e IgA sólo si el niño está infectado. En la actualidad existen más de 130 pruebas comercializadas y en general gozan de excelente sensibilidad, superior al 99% (127).

El Western Blot detecta anticuerpos frente a varias proteínas específicas del virus. Es el método más empleado para la confirmación de resultados obtenidos con pruebas de screening. Se considera positivo cuando contiene al menos dos de las tres bandas de los genes estructurales que codifican las proteínas p24, gp41 y gp120/160. El resto de los patrones se consideran indeterminados. Un test indeterminado puede ser debido a infección por VIH-2 o un subtipo especial de VIH-1 o ser realmente un falso positivo.

Se debe pedir autorización al paciente para la realización e la prueba. Actualmente debe considerarse la investigación de la posible infección por VIH en cualquier paciente con factores de riesgo que lo solicite, en pacientes con enfermedades de transmisión sexual, en cualquier enfermo que presente alguna patología característica de la evolución del SIDA o ante enfermedades con evolución atípica: neumonías de repetición o con mala respuesta al tratamiento adecuado, lesiones cerebrales múltiples, diarrea crónica, síndrome mieloproliferativo, demencia en pacientes jóvenes y candidiasis oral entre otras.

## **4.4. TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE LA INFECCIÓN POR VIH EN ADULTOS**

### **4.4.1. Introducción**

El descubrimiento de la terapia antirretroviral, que se comenzó en 1986 con la zidovudina o AZT (nucleósido análogo de la timidina que inhibe la transcriptasa inversa) ha sido, hasta ahora, el principal avance en el tratamiento del SIDA (128). Aunque no cura esta enfermedad, su administración prolonga la supervivencia de los pacientes y disminuye la frecuencia y la gravedad de las diferentes complicaciones que presentan. Si a ello se le añaden los avances logrados en el tratamiento y la prevención de las complicaciones, es fácil comprender que la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes con SIDA haya mejorado.

La comercialización en 1996 de los inhibidores de la proteasa y el cambio en la estrategia de tratamiento, de combinar siempre tres o más fármacos con la posibilidad de monitorizar la respuesta terapéutica mediante la medición de la carga viral plasmática y la cifra de linfocitos CD4, supuso una revolución en el tratamiento antirretroviral que llevó a una importante reducción de las complicaciones clínicas (infecciones oportunistas, neoplasias) y un aumento muy importante de la supervivencia (con una reducción de la mortalidad en un 95%) (129). Sin embargo, estos medicamentos tienen un gran número de efectos adversos y no consiguen la erradicación completa del virus (127).

### **4.4.2. Principios y fundamentos**

En la actualidad, el principio primordial del tratamiento antirretroviral es conseguir la supresión de la replicación del VIH-1,

reduciendo la carga viral al máximo (20-50 copias de ARN del VIH-1/ml de plasma), con la finalidad de permitir que el sistema inmune no siga deteriorándose y llegue a recuperarse espontáneamente para poder responder frente a infecciones oportunistas. Con esto se consigue evitar la progresión clínica de la enfermedad y aumentar la supervivencia. El TARGA no consigue mejorar la respuesta inmunitaria frente al VIH, esto hace que una de las principales líneas de investigación en la actualidad sean la terapia inmunomediada y la vacuna terapéutica.

Además, se debe mejorar el tratamiento de las distintas complicaciones infecciosas y neoplásicas que presentan los pacientes con SIDA.

### 4.4.3. Indicaciones

El momento cuando se debe iniciar el TARGA no se conoce con exactitud. Existen múltiples recomendaciones sobre las indicaciones del tratamiento que se resumen a continuación:

Deben recibir tratamiento antirretroviral (130):

- todos los pacientes con SIDA o con síntomas severos de infección por VIH independientemente del nivel de linfocitos CD4+;
- los pacientes asintomáticos con linfocitos T CD4+  $<200/\text{mm}^3$ ;
- a los pacientes asintomáticos con linfocitos T CD4+ entre 201 y  $350/\text{mm}^3$  se les ofrece tratamiento;
- los pacientes asintomáticos con linfocitos T CD4+  $>350/\text{mm}^3$  y  $>100.000$  copias de ARN viral por ml (aunque algunos médicos difieren el tratamiento en estos casos);

#### 4.4.4. Medicamentos

Los fármacos disponibles actualmente bloquean la replicación del VIH-1 inhibiendo la transcriptasa inversa (TI) o la proteasa vírica. Los inhibidores de la TI son, desde un punto de vista químico y estructural, análogos de los nucleósidos (ITIAN) o una estructura diferente muy variable de un compuesto a otro, englobados en un grupo denominado inhibidores de la TI no análogos de nucleósidos (ITINAN). Los IP que disponemos son todos ellos compuestos peptidomiméticos análogos o miméticos del sustrato que es la poliproteína sintetizada por el VIH-1 al replicarse.

##### **4.4.4.1. Nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa (ITIAN)**

Los principales son: Zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), abacavir (ABC) y tenofovir disoproxil fumarato (TDF).

Una combinación de 2 ITIAN, generalmente zidovudina o el tenofovir más otro ITIAN constituyen el eje central de todas las triples combinaciones. Las únicas limitaciones de las combinaciones con ITIAN son no asociar AZT con d4T, d4T con ddI, tenofovir con ddI, ddC con ddI o d4T debido a su toxicidad acusada. El 3TC sólo debe utilizarse en combinaciones supresivas, ya que presenta una baja barrera genética (basta sólo una mutación para presentar resistencias de alto nivel). Las combinaciones de 3 ITIAN utilizadas de inicio han demostrado tener una mayor tasa de fracasos virológicos que combinaciones de dos ITIAN con IP o ITINAN.

**Zidovudina (AZT):** Fue el primer antirretroviral autorizado para su uso clínico. La posología recomendada es de 500 mg/día, divididos en

dos dosis. Presenta una penetración en líquido cefalorraquídeo (LCR) del 50-85%. En caso de producirse toxicidad hematológica (anemia, neutropenia) se debe sustituir por otro fármaco. Debe realizarse un hemograma cada 1-2 meses. Otras reacciones adversas frecuentes, tales como náuseas, astenia, malestar general, cefalea, mialgias e insomnio, aparecen precozmente y suelen tener carácter autolimitado sin suspender el tratamiento. Existe una forma tardía de toxicidad, que puede presentarse a partir de los 6 meses de tratamiento (sobre todo después de 2 años) que es miopatía grave proximal, que cursa con aumento de CK y mialgias intensas, y puede obligar a suspender el tratamiento. La aparición de fiebre medicamentosa o rash cutáneo son hallazgos infrecuentes. Contraindicada la asociación a d4T.

**Didanosina (ddl).** La posología recomendada en < 60 Kg es de 250 mg en dosis única; y en > de 60 Kg 400 mg una vez al día. Presenta una menor penetración en LCR. Destaca también su distinto perfil de toxicidad (pancreatitis, hiperuricemia, neuropatía periférica, diarrea, náuseas, lipodistrofia, acidosis láctica con esteatosis hepática). Debe ingerirse con el estómago vacío (al menos media hora antes de desayunar y de la cena) La absorción de otros fármacos como ketoconazol o dapsona puede alterarse, por lo que se recomienda administrarlos 2 horas antes o después. Se encuentra contraindicada la asociación con ddC y ribavirina, y se recomienda no asociarlo a d4T por el incremento del riesgo de lipoatrofia periférica y acidosis láctica; ni con tenofovir por el mayor riesgo de fracaso virológico.

**Zalcitabina (ddC).** Se administra en dosis de 0.75 mg/8h. Es conveniente espaciar la toma 2 horas con antiácidos e isoniacida. Puede crear toxicidad en forma de neuropatía periférica, estomatitis, elevación de las transaminasas, lipodistrofia y acidosis láctica con esteatosis hepática. No se debe asociar con ddl ni d4T, por la posibilidad de potenciar el riesgo de neuropatía.

**Estavudina (d4T)** Su posología se realiza en dos dosis. En < 60 Kg: 30 mg/12h y en >60 Kg de 40 mg/12h. Presenta un 40% de penetración en LCR. Sus efectos adversos fundamentales son: neuropatía periférica (17-20%), náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, pancreatitis, alteraciones del sueño y erupciones. Un 10% de pacientes presentan aumento de transaminasas y neutropenia. Se debe intentar evitar la asociación con AZT por su antagonismo *in vitro* y con ddI por incremento del riesgo de lipoatrofia periférica.

**Lamivudina (3TC).** Administración en monodosis de 300 mg o 150 mg dos veces al día. Presenta mínima toxicidad. No debe usarse en regímenes que no sean plenamente supresivos, pues genera rápidamente resistencias. La asociación con AZT o tenofovir parece especialmente útil por el posible efecto supresor de algunas resistencias a estos fármacos. Es un fármaco muy bien tolerado.

**Abacavir (ABC):** Se administra en dos dosis de 300 mg/12 horas o 600mg/24h. Su metabolización es por medio de la glucuronidación hepática con una excreción renal inalterada del 2% y 81% por metabolitos. Puede generar clínica de hipersensibilidad en un 3% y en estos casos no debe volver a utilizarse. No se han descrito por el momento asociaciones contraindicadas con otros antirretrovirales.

**Tenofovir disoproxil fumarato (TDF).** Posología en monodosis de 300 mg/día. Es importante la administración junto a alimentos para mejorar su absorción y su tolerancia digestiva. Presenta un metabolismo sistémico escaso. Es rápidamente hidrolizado de tenofovir disoproxil fumarato profarmaco (TDF) a tenofovir, por esterasas plasmáticas. Como efectos adversos puede presentar cefalea, fatiga, dolor abdominal, proteinuria y raramente se han descrito acidosis tubular renal. Está contraindicada su utilización con ddI por riesgo elevado de fracaso virológico y disminución de la cifra de linfocitos CD4+.

#### **4.4.4.2. Inhibidores de la proteasa (IP)**

Los principales son: *saquinavir (SQV)*, *indinavir (IDV)*, *ritonavir (RTV)*, *nelfinavir (NFV)*, *amprenavir (APV)*, *lopinavir (LPV)* y *atazanavir (ATV)*.

Actualmente sólo deben considerarse en la práctica como potenciales componentes de las combinaciones triples iniciales: indinavir (asociado a ritonavir), nelfinavir y lopinavir. El indinavir debe administrarse cada 8 horas mientras que el nelfinavir puede ser administrado cada 12 horas junto con la comida. La biodisponibilidad del saquinavir es relativamente baja y por tanto hay que combinarlo siempre con ritonavir. Su asociación presenta amplia experiencia. Cuanto menor es la dosis del ritonavir mejor es la tolerancia de la combinación. El lopinavir está ya comercializado como una asociación a dosis fija con ritonavir, constituyendo la asociación fija más potente y en varios ensayos clínicos ha demostrado ser superior al nelfinavir. En la actualidad puede utilizarse el atazanavir en toma única y origina con menor frecuencia lipodistrofia o alteraciones lipídicas, aunque interfiere en el metabolismo de la bilirrubina y puede originar hiperbilirrubinemia. Todos los IP deben darse potenciados con ritonavir en la actualidad, excepto el nelfinavir.

**Saquinavir.** Es un fármaco muy bien tolerado. El principal problema es su baja biodisponibilidad, que ha sido mejorada con la introducción de una nueva formulación en “gel-blando”. La administración simultánea con ritonavir aumenta mucho sus niveles plasmáticos, por lo que se debe reducir la dosis de saquinavir (400 mg/12h). La única indicación de la formulación en “gel-duro” es la asociación con otros IP (ritonavir, nelfinavir). No se debe asociar a rifampicina o rifabutina.

**Ritonavir** Muy eficaz, pero con múltiples interacciones y efectos secundarios, la dosis inicial debe escalonarse para mejorar la tolerancia. 300 mg/12 h durante 2-3 días; 400 mg/12 h, 2-4 días; 500 mg/12h, 2-4 días; y luego 600 mg/12 h. se debe tomar con las comidas. El 25% de los pacientes tratados han de suspender la medicación por efectos

secundarios. Es un importante inductor enzimático, por lo que presenta numerosas interacciones medicamentosas que han de ser tenidas en cuenta. En enfermos en fase avanzada que han recibido diversos tratamientos antirretrovirales, la asociación de ritonavir prolonga la vida y reduce los eventos clínicos a corto plazo.

**Indinavir.** Se debe administrar con el estómago vacío (una hora antes o dos después de las comidas), ingesta abundante de líquidos no carbónicos y espaciarlo 1 hora de la didanosina y omeprazol. Los principales efectos adversos son hiperbilirrubinemia asintomática y nefrolitiasis, que puede prevenirse aumentando la ingesta de líquidos. Presenta resistencia cruzada con ritonavir.

**Nelfinavir.** Es un inhibidor de proteasa bien tolerado. Se recomiendan dosis de 750 mg tres veces al día o de 1250 cada 12 horas. Su principal efecto secundario es la diarrea. Otros efectos adversos son hiperglicemia, dislipemia, lipodistrofia y posible aumento de sangrado en hemofílicos. Debe tomarse con las comidas. Su asociación con saquinavir aumenta cuatro veces los niveles plasmáticos de éste.

**Amprenavir:** Se recomienda en dosis de 1200 mg dos veces al día o en monodosis más 200 mg de ritonavir. Es importante espaciarlo 1 hora de la toma de didanosina y antiácidos y evitar comidas con alto contenido en grasa, ya que presenta como efectos adversos intolerancia gastrointestinal en forma de diarreas. Otros efectos secundarios que pueden aparecer son cefalea, rash cutáneo, hiperglicemia, dislipemia, lipodistrofia y una alteración de la coagulación en forma de sangrados en hemofílicos. Tiene la vida media mayor de todos los inhibidores de las proteasas, alrededor de 9 horas. Al igual que el resto de inhibidores de las proteasas presentan numerosas asociaciones contraindicadas.

**Lopinavir/ritonavir:** se efectúa la asociación con ritonavir en dosis de 400/100 mg dos veces al día y asociados a la ingesta, para evitar así su efecto indeseable más frecuente como son los vómitos y las diarreas. Además, otros efectos adversos son la presencia de cefalea, astenia,

hiperglicemia, dislipemia, lipodistrofia y el aumento de sangrado en hemofílicos.

**Atazanavir:** Se recomienda la administración en monodosis de 400 mg y asociado a la comida o de 300 mg asociado a 100 mg de ritonavir. Como efectos adversos se han podido observar hiperbilirrubinemia, intolerancia gastrointestinal en forma de diarrea, cefalea. No se han observado alteraciones lipídicas relevantes en los estudios disponibles a las 48 semanas de tratamiento.

#### **4.4.4.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINAN)**

Los principales son: nevirapina y efavirenz.

Respecto a las posibles combinaciones, efavirenz y AZT y 3TC o con d4T y 3TC o con tenofovir y 3TC han presentado buenos resultados en comparación a la combinación: AZT + 3TC + indinavir. La combinación de tenofovir, 3TC y efavirenz originan menos lipodistrofia que la combinación de d4T, 3TC y efavirenz.

La nevirapina se ha combinado con AZT y ddl, con d4T y ddl o con AZT y 3TC con no peores resultados que el efavirenz, aunque la mayoría de pacientes incluidos en los estudios estaban en fases evolutivas más precoces y/o tenían una carga vírica basal más baja.

Ambos, la nevirapina y el efavirenz se pueden administrar una vez al día y alcanzan niveles terapéuticos en LCR y con un perfil toxicológico lo suficientemente diferenciado.

**Nevirapina.** Es un inhibidor de la transcriptasa inversa (TI) no nucleósido. Disminuye significativamente la carga viral cuando se usa en combinación triple con otros inhibidores de TI. Se administra en monodosis de 200 mg durante 14 días, seguidas de dosis de 200 mg/12 horas. Presenta una biodisponibilidad elevada, superior al 90%. La

aparición de rash cutáneo es el principal efecto secundario; el cuadro puede llegar a ser mortal, por lo que se debe suspender el fármaco en los pacientes que desarrollan rash grave o acompañado de sintomatología general. Otros efectos adversos pueden ser la elevación de las transaminasas y crisis de hepatitis aguda.

**Efavirenz:** Se administra en monodosis de 600 mg. Puede presentar como complicaciones la aparición de rash, síntomas neuropsiquiátricos, aumento de las transaminasas. Se ha descrito casos de teratogenicidad por lo que no está recomendado en mujeres embarazadas.

#### **4.4.4.4. Inhibidores de la fusión (IF)**

Tenemos el enfuvirtide (T-20).

Se utiliza combinándolo con otros fármacos antirretrovirales en pacientes con múltiples fracasos. Se administra dos veces al día por vía subcutánea y se ha demostrado su eficacia en terapia de rescate.

**Enfuvirtide (T-20).** Se administra en dosis de 90 mg/12 horas vía subcutánea. Se han descrito reacciones locales leve-moderadas en el punto de inyección, cefalea y fiebre. Escaso riesgo de interacción metabólica

#### **4.4.5. Pauta de elección**

Se debe utilizar la combinación de fármacos de los diferentes grupos a fin de conseguir una carga viral plasmática a niveles indetectables. Con ello se consigue disminuir la probabilidad de aparición de resistencias y de progresión clínica.

Actualmente el régimen de elección es (tabla IV):

- una triple combinación de 2 fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIAN) más un inhibidor de las proteasas (IP), o
- dos ITIAN con un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleósidos (ITINAN).

<b>Basados en:</b>	<b>Regímenes</b>
ITINAN	Efavirenz + (lamivudina or emtricitabina) + (zidovudina or tenofovir DF) (excepto durante el primer trimestre o en mujeres con alto potencial de embarazo)
IP	lopinavir/ritonavir (co-formulación) + (lamivudina o emtricitabina) + zidovudina

Tabla IV. Combinaciones terapéuticas de elección.

El incumplimiento del tratamiento favorece la aparición de resistencias, por lo que debe evitarse en lo posible su suspensión o el seguimiento incorrecto. En enfermos con mala adherencia al tratamiento y alto riesgo de progresión, puede ser una buena alternativa el tratamiento con 3 ITIAN.

Las ventajas e inconvenientes de los tres diferentes regímenes terapéuticos se pueden observar en la tabla V.

Combinaciones de antirretrovirales	Ventajas	Inconvenientes
<b>2 ITIAN +1/2IP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Combinación con mayor tiempo de experiencia</li> <li>• Restauración inmunológica</li> <li>• Beneficios clínicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posología compleja</li> <li>• Interacciones farmacológicas</li> <li>• Dificulta futuros tratamientos con IP</li> <li>• Toxicidad a largo plazo</li> </ul>
<b>2 ITIAN + 1 ITINAN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posología sencilla</li> <li>• Menor lipoatrofia y dislipemia que los basados en IP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Datos clínicos a largo plazo limitados</li> <li>• Interacciones farmacocinéticas</li> <li>• Invalida futuros tratamientos con ITINAN</li> </ul>
<b>3 ITIAN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite diferir IP e ITINAN</li> <li>• Posología sencilla</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor tasa de fracasos virológicos independientes de la CVP basal</li> <li>• Invalida futuros tratamientos con ITIAN</li> <li>• Utilizar sólo en ocasiones muy seleccionadas</li> </ul>

Tabla V. Ventajas e inconvenientes de las posibles combinaciones de tratamientos antirretrovirales recomendados

#### 4.4.6. Modificaciones en el tratamiento

Existen tres razones fundamentales para cambiar el tratamiento antirretroviral:

1) *Tratamiento subóptimo*. Todos los pacientes en monoterapia o biterapia deben ser cambiados a tratamiento combinado.

2) *Fracaso del tratamiento*. Se considera fracaso cuando existe una caída de linfocitos CD4 (25%); ausencia de descenso de la carga viral a niveles indetectables; progresión clínica. La principal causa de fracaso es el mal cumplimiento del tratamiento, por lo que se debe insistir al paciente en la necesidad de no olvidar dosis, ya que esto favorece la aparición de resistencias.

3) *Toxicidad, intolerancia o falta de cumplimiento*. Se debe utilizar otro fármaco con distinto perfil de toxicidad o facilitar en lo posible la posología. Si no hay datos de fracaso del tratamiento, puede cambiarse sólo el fármaco responsable del efecto adverso.

#### **4.5. MARCADORES DE PROGRESIÓN CLÍNICA Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

Existe una gran variabilidad individual en la progresión de la infección por el VIH a estadios más avanzados. Esto hace que sea de gran importancia la identificación de un marcador que tenga la capacidad de predecir la progresión clínica y por tanto pueda ser utilizado independientemente de la clínica en la valoración de la progresión de la enfermedad. Este tipo de marcadores se llama indirectos.

##### **4.5.1. Marcadores clínicos**

Los pacientes con primoinfección sintomática progresan más rápidamente a SIDA (131;132). Si el paciente está asintomático los marcadores clínicos de progresión de la infección del VIH a SIDA son: el muguet oral, la leucoplasia vellosa y los síntomas constitucionales (fiebre, sudoración nocturna, astenia crónica, diarrea crónica y pérdida de peso de un 10%) (133;134).

La linfadenopatía persistente (LPG), que al principio fue considerada como un predictor clínico, actualmente no lo es, ya que las tasas de progresión con o sin LPG son similares. El herpes zoster es un marcador precoz, pero con escaso poder predictivo, la tasa de progresión a SIDA a los dos años es baja (25%). El muguet y la leucoplasia vellosa aparecen más tarde que el herpes zoster y la tasa de progresión a SIDA a los dos años es del 40% (133;134). Los síntomas constitucionales son las manifestaciones más tardías e indican una inminente progresión a SIDA, inferior a los dos años.

## **4.5.2. Marcadores inmunológicos**

### **4.5.2.1. Linfocitos CD4+**

Es la célula diana de la infección del VIH. Es un buen marcador ya que refleja el estadio de la infección. El nivel de linfocitos T CD4, el porcentaje y el cociente CD4/CD8, son de los marcadores más utilizados, no sólo porque son los que mejor indican la progresión de la infección, sino porque también indican el momento de inicio del tratamiento antirretroviral y de la profilaxis primaria de las infecciones oportunistas. El nivel de linfocitos T CD4 es muy variable, estando sometido a una variación diurna así como a cambios debidos a enfermedades intercurrentes. El porcentaje de los linfocitos T CD4 es menos variable habiéndose observado que su valor como marcador de riesgo de progresión o de respuesta al tratamiento es comparable al del nivel absoluto de linfocitos T CD4 (4).

En la mayoría de pacientes un periodo asintomático más o menos prolongado sigue a la resolución de la infección primaria. En general, en este periodo hay una pérdida de entre 30 a 60 CD4+/mm<sup>3</sup> por año, aunque en muchos pacientes el número total de CD4+ puede estar estable durante varios años seguidos de un rápido descenso (4;135). La progresión a SIDA en 1 ó 2 años después de la infección primaria pasa en aproximadamente un 5% de los pacientes, asociándose la mayor parte de las ocasiones a infección primaria grave y a la transmisión de variantes SI del VIH-1 (136-138).

Numerosos estudios sobre la historia natural de la infección por el VIH-1 y estudios clínicos han demostrado que el nivel de linfocitos T CD4+ es un marcador independiente del riesgo de progresión a SIDA y muerte. Los niveles de linfocitos T CD4+ proporciona una información inestimable sobre el estatus inmunológico del paciente y es un marcador excelente del riesgo inmediato de infecciones oportunistas, así

enfermedades como la neumonía por el *Pneumocisti carinii*, Citomegalovirus y la infección pulmonar por *Criptococo neoformans* raramente se observan en pacientes con un número de linfocitos T CD4+ > 250/mm<sup>3</sup> o con un porcentaje de linfocitos T CD4+ > 20-25% (139). En cambio, estudios recientes han demostrado que el nivel de linfocitos T CD4+ no es un marcador potente del riesgo de progresión clínica en estadios iniciales de la enfermedad y menos poderoso que los niveles de ARN del VIH-1 en plasma, como predictor de riesgo de la progresión de la enfermedad (5). Sin embargo, la combinación de ambos marcadores (linfocitos CD4+ y CV) predice de forma más adecuada el riesgo de progresión que cualquiera de ellos de forma independiente.

Los niveles de linfocitos T CD4+ aumentan rápidamente en respuesta al tratamiento antirretroviral, estando relacionado este incremento con la intensidad de la supresión vírica conseguida. Algunas evidencias sugieren que el rápido aumento inicial que sigue al inicio de los tratamientos es debido a la redistribución de las células CD4 memoria (CD45RO+). La inicial redistribución de las células memoria está seguida por un lento pero sostenido aumento de las CD4 vírgenes (CD45RA+62L+), el cual se cree que es debido a la producción de nuevas células CD4 (95). Pero, aunque hay una evidencia de reconstitución inmune frente a ciertos antígenos (CMV, candidas, etc) (78), la restitución de la respuesta proliferativa específica frente al VIH-1 no se ha observado hasta ahora (95;98;140).

#### **4.5.2.2. CD8/CD38+**

La infección por VIH-1 tiene dos importantes efectos en el sistema inmune: una pérdida progresiva de los linfocitos T CD4+ y una marcada activación del sistema inmune (87;141;142). La estimulación inmune se refleja por una hiperglobulinemia (143), expansión de los macrófagos

(144) y un incremento en el porcentaje y el número absoluto de linfocitos CD8 activados (87). En fases iniciales de la infección, el pool de linfocitos CD8 aumenta, en particular, los que expresan CD38 y HLA-DR que son marcadores de activación de los linfocitos T. Estos linfocitos CD8 que expresan altos niveles de antígenos de activación como son los CD38 y HLA-DR, son predictivos de la tasa de disminución de linfocitos CD4 y se correlacionan con la persistencia de replicación *in vivo* (86;87) y son un marcador independiente de progresión de la enfermedad.

### **4.5.2.3. $\beta_2$ -microglobulina**

Es una proteína de bajo peso molecular, que forma la cadena ligera del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I. Está presente en la mayoría de las células nucleadas incluyendo macrófagos y linfocitos (145).

La  $\beta_2$ -microglobulina del suero refleja el grado de activación del sistema inmune, así como el *turnover* de linfocitos. Se halla aumentada en diferentes patologías, como linfomas y síndromes linfoproliferativos, y en enfermedades víricas, como infecciones por Citomegalovirus (146), por lo que no es un marcador específico de infección por VIH. En homosexuales infectados por el VIH se ha observado una progresión de la infección cuando los niveles plasmáticos son  $>5\mu\text{l/ml}$  (147;148). Los resultados en drogodependientes son contradictorios.

El uso de la  $\beta_2$ -microglobulina como marcador de progresión se ha estudiado en diferentes fluidos corporales y en diferentes grupos de riesgo. Así la relación de la  $\beta_2$ -microglobulina en LCR/ $\beta_2$ -microglobulina en suero puede ser utilizada como marcador de aparición de complicaciones neurológicas mejor que la  $\beta_2$ -microglobulina en LCR. Se ha observado una relación con el complejo demencia-SIDA (149;150).

#### **4.5.2.4. Neopterina**

La neopterina es un factor soluble producido por células de la serie monocitos-macrófagos cuando son estimulados por interferón gamma producido por los linfocitos T activados (151;152). Químicamente es un derivado del triptófano de guanosina. La neopterina se encuentra elevada en deficiencias congénitas, como la fenilcetonuria, en enfermedades inflamatorias, infecciosas y en fases avanzadas de neoplasias (153;154).

También puede detectarse en orina, siendo la correlación similar con los niveles en suero. Los niveles de neopterina en LCR están aumentados en pacientes con complicaciones neurológicas asociadas a VIH, que quizás reflejen la activación de los macrófagos del SNC (153;154). El significado biológico de su aumento es similar al de la  $\beta_2$ -microglobulina y al igual que este marcador ha demostrado tener un valor predictivo en enfermos no tratados (151;155).

#### **4.5.2.5. Receptores de la interleucina 2 (sIR-2R)**

La activación linfocitaria induce la expresión en la membrana celular del receptor de la IL-2 y IL-2R $\beta$ , con liberación del sIR-2R, que constituye la molécula de progresión de la infección del VIH a SIDA, aunque el valor predictivo de este marcador es inferior al de la neopterina y  $\beta_2$ -microglobulina.

#### **4.5.2.6. Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )**

El factor TNF- $\alpha$  forma parte de la compleja red de citocinas implicadas en la disregulación del sistema inmune (156). TNF- $\alpha$  es

producido por macrófagos y monocitos, encontrándose niveles elevados en pacientes con SIDA, aunque puede ser debido también a infecciones secundarias y no a la propia infección por VIH, por el cual su valor como marcador de progresión es discutido. El TNF- $\alpha$  puede ser responsable de la afectación de la mielina que aparece en la encefalopatía asociada a SIDA (157), pudiendo ser un marcador indirecto para la monitorización de las manifestaciones neurológicas de la enfermedad.

### **4.5.2.7. Anticuerpos contra las proteínas del core**

Los anticuerpos IgG anti core y anti proteínas de la cápsula son detectables en suero entre 2-6 semanas después de la primoinfección (158;159) pudiendo desaparecer en fases avanzadas. Niveles bajos de anticuerpos anti p24 pueden ser debidos a la circulación en forma de complejos con el Ag p24 o a una reducción de su producción por parte de los linfocitos B (160). Un título que vaya disminuyendo o su desaparición es un marcador biológico de progresión.

Existe una estrecha relación entre la disminución o títulos bajos de anticuerpos anti-core y la aparición o presencia del Ag p24 en suero. La disminución de la reactividad antip24 es un marcador más precoz de progresión de la enfermedad que el Ag p24, aunque éste tiene un valor predictivo más alto de pronóstico a corto plazo (133;161).

### **4.5.2.8. Inmunoglobulina A (IgA)**

Los niveles séricos de IgA son un reflejo del grado de activación de las células B. Aunque se eleven en el SIDA, no hay una elevación precoz en la infección por VIH. Niveles elevados pueden significar una respuesta inmune a enfermedades oportunistas o una pérdida del control de la

producción de IgA. Estudios realizados en pacientes homosexuales, ADVP y hemofílicos, demuestran una asociación entre la progresión de la enfermedad y los niveles elevados de IgA (162).

#### **4.5.3. Marcadores virológicos**

##### **4.5.3.1. Antígeno p24**

La antigenemia p24 puede ser detectada antes de la aparición de anticuerpos frente del VIH. Después de la aparición de los anticuerpos, generalmente se hace indetectable, aunque ocasionalmente puede persistir o reaparecer en fases finales de la enfermedad (163) En pacientes con niveles de CD4+ entre 200-500 cel /mm<sup>3</sup>, el porcentaje de pacientes Ag p24 positivo es aproximadamente de un 20% (164) Pacientes con niveles de CD4+<200 cel / mm<sup>3</sup> o con SIDA tienen más posibilidades de presentar Ag p24+ (37-95%) (165) La detección del Ag p24 es un buen marcador de progresión a SIDA tanto en adultos como en niños, siendo la incidencia de SIDA en estos pacientes entre 4 y 20 veces mayor (166)).

El antígeno p24 puede circular libremente en sangre periférica, puede estar asociado a partículas víricas o puede circular formando inmunocomplejos con anticuerpos anti p24. El antígeno p24 puede ser liberado de la partícula vírica añadiendo al plasma o al suero detergentes. Los inmunocomplejos Ag-Ac pueden ser rotos con un tratamiento ácido del suero o plasma haciendo que muestras con Ag p24 detectable después de este tratamiento ácido presenten niveles más elevados y muestras con Ag p24 negativo se hagan positivas (166;167).

#### **4.5.3.2. Fenotipo vírico**

Los virus VIH-1 que están en circulación en un enfermo en un momento dado no son fenotípicamente ni genotípicamente homogéneos. Los primeros VIH-1 descubiertos presentaban la habilidad de crecer en líneas celulares T-linfoblásticas produciendo un efecto citopático con células gigantes multinucleadas (sincitio) y la posterior muerte celular. Este efecto citopático también se ha observado en órganos diana para la infección del VIH en humanos, sugiriendo la posibilidad de un papel patogénico de este fenómeno (25;45;168). Los virus no formadores de sincitio (NSI) pueden aislarse en células mononucleadas de sangre periférica (CSMP) y no presentan el anterior efecto citopático, se han aislado en líneas celulares monocito-macrófagos. Las cepas NSI suelen detectarse en fases finales de la enfermedad y en un 50-60% de los casos preceden la fase de SIDA (169;170). En enfermos asintomáticos la conversión de fenotipos NSI a SI se ha asociado a una marcada aceleración en la disminución del CD4+ y la aparición de SIDA en un periodo corto de tiempo (170-172).

#### **4.5.3.3. Carga viral**

La carga viral ha llegado a ser el marcador más preciso de riesgo de progresión a SIDA (5;7;173). Su importancia ha hecho que dediquemos el siguiente subcapítulo a su estudio.

#### **4.6. CARGA VIRAL**

Desde el inicio de la epidemia del SIDA se han utilizado diferentes marcadores de laboratorio para hacer el seguimiento de la evolución de los enfermos infectados por el VIH, pero era evidente una falta de correlación entre estos marcadores (recuento de linfocitos T CD4+, Ag p24,  $\beta_2$ -microglobulina y neopterina) con la progresión de la enfermedad, hecho que es debido a la escasa sensibilidad, reproducibilidad y especificidad que presentaban estos métodos.

El desarrollo de métodos cuantitativos para el VIH ha permitido establecer el nivel de actividad replicativa a lo largo de la historia natural de la infección, así como definir mejor los aspectos de la dinámica vírica en la patogénesis del SIDA y disponer de un criterio objetivo a la hora de valorar la eficacia del tratamiento antirretroviral. Por lo tanto, la posibilidad de disponer de métodos cuantitativos ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la historia natural de la infección por el VIH y un mejor manejo terapéutico de los enfermos infectados.

##### **4.6.1. Métodos para valorar la carga viral**

Hay diferentes métodos para valorar la carga viral: cultivo vírico en CMSP, cultivo vírico en plasma, carga viral en órganos linfáticos mediante técnicas de hibridación in situ, cuantificación del ADN provírico en CMSP, cuantificación del ARN y ADN en CMSP y cuantificación del ARN en plasma o suero.

#### **4.6.1.1. Cultivo vírico de células mononucleadas de sangre periférica**

El cultivo *cuantitativo en células mononucleadas de sangre periférica (CMSP)* se utiliza para determinar el número de partículas víricas infecciosas en las células de sangre periférica. La fase de infección primaria se acompaña de altos niveles de virus en CMSP, seguida de una disminución paralela a la aparición de los anticuerpos anti VIH-1 (174;175). Estudios longitudinales han demostrado que la infectividad vírica en CMSP aumenta significativamente a lo largo del tiempo (176;177).

#### **4.6.1.2. ADN provírico en células mononucleadas de sangre periférica**

La detección cuantitativa del ADN del VIH-1 es utilizada para determinar el número de células infectadas circulantes, pero no da información sobre la proporción de células que están replicándose activamente. El principal reservorio en sangre periférica son los linfocitos T CD4+ (178;179). Hay datos contradictorios entre el aumento de la carga viral en CMSP y la progresión. Mientras que unos autores ven una relación entre los dos parámetros (180;181), otros, en estudios longitudinales, encuentran que el nivel de ADN proviral en CMSP no cambia significativamente durante la progresión de la enfermedad, pero el valor total de ADN del VIH-1 aparece más alto en los pacientes que desarrollan SIDA que en los que permanecen asintomáticos (182). Lee y cols. (177) sugirió que el nivel de CMSP infectadas se establece en fases iniciales de la enfermedad y se mantiene relativamente estable durante su curso. El nivel inicial de ADN vírico parece relacionado significativamente con el curso de la enfermedad. Enfermos con niveles bajos de ADN

después de la infección parecen tener periodos asintomáticos más largos que aquellos con niveles más altos (177;183).

Algunos autores han estudiado de que forma se encuentra el ADN en el reservorio periférico (184-186). En enfermos asintomáticos se encuentra preferentemente ADN no integrado, siendo la fuente de este extracromosomal ADN los linfocitos T quiescentes. Este ADN puede integrarse después de la activación linfocitaria. En enfermos con SIDA hay un incremento de la forma integrada *versus* la no integrada. Estudios recientes han descrito la persistencia de la replicación en linfocitos T CD4+ memoria incluso en pacientes con viremia plasmática indetectable por un largo periodo de tiempo (8;9;67;68).

#### **4.6.1.3. *mARN del VIH-1 en CMSP***

La expresión significativa de ARN del VIH-1 genómico y subgenómico se han encontrado en todos los estadios de la infección (187;188). La presencia de ARNm del VIH-1 es indicativa de una infección vírica activa y la cantidad detectada parece relacionarse con su progresión (8;189). En estudios recientemente publicados han demostrado su presencia en enfermos con inhibición de la replicación plasmática por TARGA (8;190).

#### **4.6.1.4. *Cultivo vírico en plasma***

El cultivo cuantitativo en plasma mide la cantidad de virus libre. Durante la fase aguda de la infección se pueden detectar altos niveles de virus y el pico viral coincide con la aparición de la fase aguda de la enfermedad (174;175). Después de la seroconversión, los títulos pueden disminuir hasta niveles indetectables. La viremia plasmática puede ser no

detectable en enfermos con CD4+ >500 cel/mm<sup>3</sup> (191;192). En fases finales de la enfermedad pueden aumentar (82).

### **4.6.1.5. Carga viral en órganos linfáticos**

Además de la detección del VIH-1 en CMSP, se ha visto que los órganos linfáticos constituyen el primer lugar para la reserva y propagación de la infección del VIH a lo largo del tiempo (193;194) lo que refuerza el interés de su estudio.

Sin embargo, existen una serie de problemas que aparecen cuando se estudia la carga viral en compartimentos extraplasmáticos. Entre ellos están la falta de consenso sobre el lugar de anatómico donde debe ser investigado, el procedimiento ideal para realizar la biopsia, qué método utilizar para la medida de la carga viral y la unidad en que debe ser medida (células, miligramos,...).

Los sitios más comunes par medir la carga viral en el tejido linfático son la mucosa rectal, las amígdalas y los ganglios linfáticos. Hay pocos estudios que investiguen las diferencias de carga viral entre estos tres territorios. Perrin y cols. (195) no encontraron diferencias en tres pacientes con primoinfección por el VIH-1 entre las amígdalas, los adenoides y los ganglios linfáticos. En el Hospital Clínic hemos encontrado que la media de carga viral en biopsias de amígdala es mucho mayor que en las biopsias de mucosa rectal.

Es necesario encontrar un método reproducible y poco invasivo, para obtener muestras repetidas de tejido linfático, con el fin de evaluar tras la terapia antirretroviral. Las biopsias amigdalares se realizan, generalmente, con una pinza triangular utilizada frecuentemente en Otorrinolaringología, y con la que se pueden obtener hasta 80 mg de tejido. Cada muestra es partida en dos partes, una mitad es incluida en parafina y examinada por un patólogo para confirmar la presencia de

tejido linfático. La otra mitad se congela rápidamente y se almacena en nitrógeno líquido. Esta técnica permite obtener muestras repetidas con una buena reproducibilidad. Más aún, se pueden obtener muestras para realizar estudios virológicos, inmunológicos e histológicos.

Por otra parte, la biopsia de ganglio linfáticos es un método invasivo, que no es posible realizar con mucha frecuencia. Ya que el ganglio linfático es uno de los mejores lugares para realizar todos estos estudios (68;196), algunos autores han buscado otras formas de obtener muestras de tejido linfático. En resumen consisten en una aspiración con aguja fina, a ciegas (197-199). Esto tiene el problema de que sólo se obtienen material analizable en un 50% de los casos, aunque puede mejorarse con control ecográfico, para realizar estudios de carga viral longitudinales, cuantificación de linfocitos CD4+ y estudios de proliferación en subpoblaciones de linfocitos T mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales frente al antígeno Ki67+). Sin embargo, con esta técnica no hay posibilidad de tener información anatómica del ganglio.

No hay consenso acerca del método que debería ser utilizado para la mediada de la carga viral en tejido linfático. Tanto el tejido analizado como el método utilizado para la extracción, podrían afectar dramáticamente la cuantificación de VIH-1 (200;201). El método de Roche RT-PCR es más sensible que el de NASBA, pero el primero está también mas sujeto a inhibición por componentes de los tejidos (200). La hibridación in situ es un método caro, su realización lleva mucho tiempo y tiene dificultades para realizarse en la mayoría de los laboratorios, aunque es el mejor para estudiar los virus asociados a células tanto dendríticas como mononucleares.

El último problema a tener en cuenta es el denominador en el que la carga viral en tejido debe ser medida. Es posible separar las células mononucleares inmediatamente después de la biopsia y congelarlas. De esta forma es posible estudiar los virus asociados a estas células. La

ventaja de este método es que el denominador es las células mononucleares del tejido linfático y su número puede ser comparado con el de la sangre (14;195;202-204). Su principal problema sería que no mide los cambios de la carga viral en la célula dendrítica. Otro denominador podría ser los miligramos de tejido. Su ventaja es que cuantifica todos los virus presentes en tejido linfático (199;205). Dependiendo de la información que queramos obtener habría que utilizar un método u otro.

### **4.6.1.6. Cuantificación del ARN del VIH-1 en plasma o suero**

El ARN del VIH-1 tiene una gran importancia ya que, junto con el nivel de linfocitos CD4+, es el único que se utiliza en la práctica clínica diaria para valorar la progresión de la enfermedad y controlar la eficacia del tratamiento.

Puede ser detectado en plasma o suero de los enfermos infectados por el VIH-1 y refleja el número total de partículas víricas circulantes incluyendo virus infectivos y no infectivos, considerándose que refleja la carga viral total, ya que la producción de virus de todos los centros de replicación (tejido linfático) puede acceder fácilmente a plasma.

Durante la fase aguda de la infección por el VIH-1 el virus se replica a altos niveles detectándose cargas virales elevadas. Posteriormente, la aparición de la respuesta inmune específica frente al VIH-1 hace que aquella caiga indicando la eliminación del virus por parte del sistema inmune (174;206). Durante la fase asintomática los niveles de carga viral encontrados pueden ser muy variables, permitiéndose establecer diferentes patrones de progresión rápidos progresores, progresores intermedios y progresores lentos que se establecerán inmediatamente después de la seroconversión (184).

#### **4.6.2. Técnicas moleculares para la cuantificación del VIH-1**

Los avances producidos en el campo de la biología molecular han sido aplicados a la creación de métodos para la cuantificación del VIH-1 en plasma de los pacientes infectados. Actualmente se dispone de 3 métodos comerciales que miden el ARN vírico genómico en plasma. Estos métodos son:

1. La técnica del ADN ramificado (bDNA)
2. La técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción y amplificación (rt-PCR)
3. La técnica basada en la amplificación secuencial de ácidos nucleicos (NASBA).

##### **4.6.2.1. Método del ADN ramificado (bDNA)**

Esta técnica se basa en una serie de hibridaciones tipo “sándwich”. El primer paso consiste en la concentración de los viriones a partir de 1 ml de plasma mediante una centrifugación a 23500 g durante 1 hora. El precipitado vírico se resuspende en un tampón que contiene proteinasa K, sulfato de litio y oligonucleótidos complementarios al gen *pol* del VIH-1 incubando posteriormente a 53°C durante 20 minutos. A continuación, la resuspensión se centrifuga a 23.500 g durante 15 minutos y se transfiere el producto a una microplaca de 96 pocillos que contiene las sondas de captura. El complejo sonda-muestra se incuba durante 24 horas y durante este periodo se unirá a una segunda sonda de captura que esta incorporada a los pocillos. Posteriormente, a la muestra ya inmovilizada se le unirán un gran número de sondas también marcadas con fosfatasa alcalina y incubadas posteriormente con un sustrato quimioluminiscente (dioxietano). Finalmente, la luz que emite se mide con un luminómetro y los resultados se comparan con los datos obtenidos de una curva de

estándares externos que se incorporan a cada reacción y de los cuales se conocen el número de copias. El rango de detección es de 500 a 1.000.000 copias/ml.

### **4.6.2.2. Técnica de retrotranscripción y amplificación (rt-PCR) (Amplicor VIH-Monitor)**

Es un sistema basado en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que combina una retrotranscripción y posterior amplificación. A un volumen de la muestra a analizar, que puede ser suero o plasma, se le añaden un estándar interno con un número conocido de copias de ARN del VIH-1. Esta mezcla se tratará con un agente caotrópico, tiocianato de guanidina, que romperá la partícula vírica dejando libre el material genómico del VIH-1. Posteriormente se realiza la retrotranscripción que consiste en pasar el ARN a ADNc, para este paso se utiliza el enzima rTth ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* que presenta actividad transcriptasa inversa y ADN polimerasa. Este sistema comercial incorpora uracilo-N-glicosilasa que evitará la contaminación por material amplificado previamente. El producto obtenido tiene una medida de 142 pares de bases del gen *gag* de VIH-1. Los iniciadores utilizados para la amplificación están biotinilados en uno de los extremos. Una vez se acaba la amplificación, el producto amplificado será detectado con una técnica de ELISA. Un volumen conocido del producto amplificado se añade a los pocillos de una microplaca que tienen incorporados una sonda de captura complementaria, hecho que permitirá la unión específica del producto amplificado al fondo de la placa. Esta microplaca presenta también pocillos que hibridarán específicamente con el estándar interno y que son independientes de los de la muestra. Un conjugado de avidina proporcionará el color que se leerá con un densitómetro. La relación entre las densidades ópticas (OD) de la muestra y del control

interno se utiliza para calcular el número de copias de ARN que contiene la muestra. El rango de detección es de 200 a 750.000 copias/ml.

#### **4.6.2.3. Amplificación secuencial de ácidos nucleicos (NASBA)**

Este método intenta reproducir *in vitro* la replicación vírica *in vivo*, y para conseguirlo incorpora tres enzimas que realizan la amplificación exponencial. Estas enzimas son una transcriptasa inversa, una RNasa H y una RNA polimerasa DNA dependiente y el resultado final de la reacción es la acumulación de copias de ADN y ARN a partir de la muestra problema. El ensayo comienza con el aislamiento del ARN mediante la lisis y la unión a partículas de sílice, con una amplificación posterior isotérmica del ARN. La reacción se inicia con la hibridación de uno de los cebadores, que contiene un promotor T7, a la secuencia diana de la muestra problema y continúa con la elongación mediante la actividad enzimática de la transcriptasa inversa formando una cadena de cADN. La molécula híbrida formada por el ARN-cADN se degrada por la actividad de la RNasa H. A continuación, se forma una segunda cadena de ADN mediante la actividad de la polimerasa ADN de la transcriptasa inversa. La molécula de ADN de doble cadena incluye una secuencia promotora T7 ARN polimerasa. La polimerasa T7 del ARN puede producir entre 100 y 1.000 copias de ARN a partir de una molécula de ADN de cadena doble. Cada molécula de ARN sintetizada sirve como molde para la síntesis de una copia de ADN y la síntesis de ARN en un segundo ciclo de multiplicación. La posibilidad de cuantificar el número de copias de ARN se hace para la incorporación de tres calibradores con una cantidad conocida de copias a la muestra desde el inicio del procesamiento de la misma. El sistema de detección se realiza mediante una hibridación en tubo con sondas específicas para cada uno de los cuatro ARN presentes en la muestra y la lectura es por quimioluminiscencia. El rango de

detección es de 400 a 10.000.000 copias/ml. El sistema de NASBA presenta la ventaja importante enfrente de los otros dos métodos de permitir la cuantificación de la carga viral de otros tipos de muestra como pueden ser biopsias, LCR, secreciones vaginales y tejidos.

#### **4.6.2.4. Técnicas ultrasensibles**

La aparición de las terapias antirretrovirales de alta potencia (TARGA) ha conseguido que una gran cantidad de enfermos presenten cargas virales por debajo del límite de detección con los sistemas convencionales. Este hecho condujo a la estandarización de técnicas ultrasensibles basadas en el perfeccionamiento de las técnicas estándar previamente descritas, permitiendo una mejor optimización del manejo clínico del enfermo.

Las técnicas ultrasensibles se basan, principalmente, en un aumento del volumen inicial de muestra, una ultracentrifugación previa para concentrar el virus y un ajuste de la concentración del estándar interno, consiguiendo un límite de detección entre 20-50 copias.

El sistema Chiron dDNA Quantiplex ultrasensible tiene el límite de detección de 50 copias/ml con un rango entre 50-500.000 copias/ml. El sistema Amplicor de Roche tiene el límite de detección de 20 copias/ml con un rango entre 20-500.000 copias/ml, aunque existe una modificación que nos permite aumentar el límite de detección hasta 5 copias/ml. Los sistemas Nuclisens de Organon Técnica tienen el límite de detección en 40 copias/ml con un rango de 40-500.000 copias/ml.

#### 4.6.3. Carga viral en tejido linfático y su relación con el plasma

Además de la detección del VIH-1 en CMSP, se ha visto que los órganos linfáticos constituyen el primer lugar para la reserva y propagación de la infección del VIH a lo largo del tiempo (193;194). La habilidad del VIH-1 de replicarse en las células diana es dependiente de su activación y teniendo en cuenta que en órganos linfáticos el número de linfocitos T activados es elevado hace del tejido linfático un reservorio muy importante para la replicación del VIH-1 durante las fases iniciales de la enfermedad (193;206).

Estudios recientes han demostrado que la replicación viral es, aproximadamente, dos órdenes de magnitud más intensa en tejido linfático que en células sanguíneas (122;194). En enfermos asintomáticos se detectó una carga viral más elevada en tejido linfático que en CMSP. El número de células conteniendo el ADN del VIH-1 fue  $0.5 \log_{10}$  más alta en nódulos linfáticos que en CMSP (204). La media  $\pm$  SE del  $\log_{10}$  de la carga viral de tejido amigdalario, realizado con NASBA, de 37 pacientes biopsiados en el Hospital Clínic de Barcelona en estadios tempranos de la infección (linfocitos CD4+ mayor de  $500 \times 10^6/L$  y carga viral plasmática mayor de 5.000 copias/ml) fue  $5,93 \pm 0,12$  (mediana 6,1, rango 4,3 a 7,34). No hubo correlación significativa entre la carga viral en plasma y en tejido amigdalario, como otros autores ya han descrito previamente (199). Otros autores han encontrado una fuerte correlación y similar sensibilidad entre el ADN del VIH-1 intracelular en plasma y la carga viral en tejido linfático, e incluso han sugerido que si estos datos se confirman se podrían evitar muchas biopsias en tejido linfático (Luc Perrin, comunicación personal).

#### **4.6.4. La carga viral como marcador de progresión**

Numerosos estudios han demostrado la existencia de una correlación entre los niveles de ARN del VIH-1 en plasma con el estadio de la enfermedad. Pacientes con SIDA o con infección por el VIH-1 sintomática tienen niveles significativamente más altos de carga viral que aquellos con infección asintomática, aunque no existe una correlación entre niveles de ARN del VIH-1 y niveles de linfocitos T CD4.

La carga viral en plasma es un marcador poderoso de progresión y muerte en todos los estadios de la enfermedad. Una serie de estudios del AIDS Clinical Trials Group que incluyen pacientes con CD4+ entre 0-500 cel/mm<sup>3</sup> han demostrado que el aumento del riesgo de progresión asociado al aumento de los niveles de ARN del VIH es independiente de los linfocitos T CD4+ y de los fenotipos SI.

En el estudio MACS (Multicenter AIDS Cohort Study) se encuentra que los pacientes con niveles de carga vírica en plasma >100.000 copias/ml a los 6 meses de la seroconversión tienen a los cinco años 10 veces más riesgo de progresar a SIDA que aquellos con niveles más bajos (7).

En otro estudio, el riesgo de progresión de 181 pacientes seropositivos infectados incluidos en el estudio MACS fue determinado después de estratificarlos según la carga viral basal (7). Para los pacientes que estaban en el percentil más alto (CV>36.270 copias/ml) la media de tiempo de evolución a SIDA fue de 3.5 años y la media de la supervivencia 5.3 años. Menos de la mitad de los pacientes en el percentil más bajo (<4.500 copias/ml) progresaron a SIDA o murieron después de 10 años, con una supervivencia media de más de 10 años. Al contrario, no se encontraron diferencias cuando fueron estratificados según el nivel de linfocitos T CD4+. Más importante fue el efecto de los niveles de carga viral en la tasa de progresión en enfermos con >500 CD4+, en estos más del 70% de aquellos con CV>10.200 copias/ml progresaron a SIDA o

murieron a los 10 años, comparado con menos del 30% de los que tienen CV <10.200 copias/ml. La incorporación de los dos marcadores, carga viral del VIH-1 en plasma y linfocitos T CD4+, da una mejor información sobre el riesgo de progresión que los dos por separado (5).

#### **4.6.5. La carga viral como marcador de eficacia del tratamiento antirretroviral**

##### **4.6.5.1. La carga viral en plasma como marcador de eficacia del TARGA**

La carga viral en plasma es un buen indicador de la eficacia de una terapia antirretroviral, una disminución mantenida confiere un beneficio clínico al paciente. La relación entre cambios en la carga viral y beneficio del tratamiento ha sido analizado en al menos seis estudios aleatorizados (ACTG 116, 116B/117 y 175, VACS298, Upjohn 017 y 021 y Delta 1). Estos estudios han revelado que una disminución de la carga viral en plasma implica una reducción significativa del riesgo de progresión de la infección, que la reducción en el riesgo de muerte o progresión de la enfermedad es independiente de la carga viral del VIH-1 en plasma basal y de los niveles de linfocitos T CD4 y que la reducción del riesgo de muerte o progresión de la enfermedad es independiente del incremento de los linfocitos T CD4 secundario al tratamiento. La magnitud del beneficio es similar de un estudio al otro. La reducción de la carga viral del VIH-1 en plasma de 2 veces ( $0.3 \log_{10}$ ) disminuye el riesgo de muerte o progresión aproximadamente un 30% (207;208), una disminución de 4 veces ( $0.6 \log_{10}$ ) disminuye el riesgo en un 55% (6) y una disminución de 10 veces ( $1 \log_{10}$ ) disminuye el riesgo en un 65% (191).

Un análisis que combina datos de varios estudios de los ACTG nos da más información sobre los beneficios clínicos del tratamiento

antirretroviral (209). Este análisis muestra una relación lineal entre el cambio del logaritmo de la carga viral obtenido desde el basal a la semana 24 y de las veces en que se reduce el riesgo de progresión. Además, la magnitud del beneficio para una reducción concreta de la carga viral fue similar a pesar del nivel basal, sugiriendo que el beneficio se deriva de la interrupción en la replicación viral más que del estadio de la enfermedad o de la carga viral en plasma al inicio del tratamiento.

Estudios adicionales sugieren que el grado de descenso de la carga viral por debajo de los límites de detección es predictiva de la respuesta virológica a largo plazo (126;210).

#### **4.6.5.2. La carga viral en tejido linfático como marcador de eficacia del TARGA**

La disminución de la carga viral en tejido linfático en pacientes con regímenes que contienen un inhibidor de la proteasa se ha comunicado de forma repetida (104;205;211), con inhibidores de transcriptasa inversa no ha sido tan claramente demostrada (212). Se ha descrito que los pacientes con carga viral en plasma entre 20 y 400 copias/ml tienen una carga viral en ganglios linfáticos más alta que aquellos pacientes con un viremia ARN plasmática por debajo de las 20 copias/ml (13).

En nuestro grupo hemos encontrado que los pacientes tratados exclusivamente con dos ITI presentan una disminución de la carga viral en tejido linfático de aproximadamente 1 log, y que, incluso pacientes con una carga viral plasmática por debajo de 20 copias/ml en terapia, con dos ITI tenían altos niveles de viremia ARN de VIH-1 en tejido amigdalario. Por el contrario, todos los pacientes con tratamientos que contenían un IP tenían una carga viral indetectable en tejido linfático, con una disminución de la carga viral de 4 log. Nuestros datos sugieren que únicamente con triple terapia (2 ITI + 1 IP) es posible obtener una supresión completa de

la replicación viral en tejido linfático y, de esta forma, entender la durabilidad de la eficacia antirretroviral (11).

A pesar de esta aparente buena respuesta de la carga viral plasmática a la terapia antirretroviral, se ha demostrado que es posible recuperar VIH-1 competentes para replicación hasta 30 meses después de supresión de la carga viral con TARGA (68;196). Estos hallazgos son tan importantes que han cambiado las ideas previas, demasiado optimistas, sobre la erradicación de VIH-1, y han reforzado el concepto de terapias inmunomediadas como complementarias a la terapia con TARGA (213).

#### **4.6.6. La carga viral como marcador de inicio del tratamiento antirretroviral**

Hasta el año 1996 se recomendaba iniciar el tratamiento cuando el paciente presentaba un recuento linfocitario inferior a 500 linfocitos T CD4. Con la introducción de las nuevas técnicas de cuantificación del ARN del VIH en plasma, se cuestionaron dichas recomendaciones. A partir de los resultados de Mellors y cols.(5) que observaron que pacientes con  $CD4+ > 500$  cel /mm<sup>3</sup> tenían niveles elevados de carga viral, se planteó iniciar el tratamiento según los niveles de la carga viral y no según los niveles de linfocitos T CD4+. Como consecuencia de los primeros estudios sobre el valor de la carga viral como marcador pronóstico y de respuesta al tratamiento, en el año 1996 se publicaron las primeras recomendaciones para el inicio del tratamiento (214). En ellas, se recomendaba iniciar el tratamiento con CV > 30.000-50.000 copias/ml independientemente del número de linfocitos T CD4+. Aunque algunos autores pensaban que era mejor iniciarlo con CV más bajas, 10.00 copias/ml, con tal de conseguir más fácilmente niveles indetectables. En el año 1997 se recomendaba iniciar tratamiento con TARGA en todos los

pacientes con niveles de carga viral entre 5.000-10.000 copias/ml independientemente de los niveles de linfocitos T CD4+ (215) y considerar su inicio en todos los enfermos con carga viral detectable. Las nuevas guías de tratamiento publicadas recientemente por GESIDA/Plan Nacional sobre el SIDA (216) y por la NIH (79) han vuelto a parámetros más conservadores, teniendo los niveles de linfocitos T CD4+, otra vez, un papel más protagonista que el que habían tenido en las guías del año 1997. Tanto una guía como la otra recomiendan iniciar el tratamiento en todos los pacientes sintomáticos y en aquellos asintomáticos con niveles de linfocitos T CD4+ <200 cel/mm<sup>3</sup>. Entre 201-350 cel/mm<sup>3</sup> dependerá de una valoración personalizada de los pros y los contras en cada caso. Para pacientes asintomáticos con >350 cel/mm<sup>3</sup> existe poca evidencia de beneficio con la terapia, aunque algunos autores la recomiendan cuando la CV > 100.000 copias/ml. Este cambio ha sido propiciado por diferentes hechos como son la imposibilidad de la erradicación del virus con los fármacos actuales, los importantes efectos secundarios que estos presentan, la dificultad de cumplimiento de los tratamientos y la recuperación inmunológica con TARGA incluso con enfermos avanzados. Es importante tener en cuenta que a una reducción más grande de la CV, menor es el riesgo de progresión y más grande el beneficio clínico, por tanto se ha de intentar de alcanzar un nivel de CV indetectable por las técnicas de cuantificación de que disponemos.

#### **4.6.7. La carga viral como marcador de cambio del tratamiento antirretroviral**

Las variaciones de la carga viral en plasma son el marcador para valorar la eficacia o no de una determinada combinación terapéutica. En líneas generales, en aquellos pacientes que consiguen niveles indetectables (<500 ó 200 copias/ml), cualquier incremento en la misma

aconsejaría un cambio de tratamiento. De todas maneras esta premisa se ha de tomar con cautela, ya que se han descrito variaciones de la carga viral frente de estímulos antigénicos como pueden ser la vacunación por el Neumococo e infecciones agudas (217;218) (219).

Se tendrían que realizar dos determinaciones de carga viral, una basal y otra a las 4-6 semanas, para iniciar, añadir un nuevo fármaco o cambiar el tratamiento. Una vez se ha iniciado el tratamiento, la carga viral se debería repetir a las 8 semanas para comprobar la efectividad del tratamiento. Debido a la variabilidad inter-intra ensayo, es necesario un aumento  $>0.5 \log_{10}$  para constatar un fracaso terapéutico, siendo conveniente una determinación posterior para confirmarlo.

Es importante recordar que niveles indetectables realmente significa que la carga viral está por debajo del límite de detección de las técnicas que tenemos actualmente a nuestro alcance ( $<500-200$  copias/ml). A pesar de esto, todos estos sistemas presentan variaciones que nos permiten aumentar su límite de sensibilidad a  $<50-20$  copias/ml, se debe tener en cuenta que la variabilidad a estos niveles aumenta significativamente. No obstante, resultados obtenidos de diferentes estudios sugieren la probabilidad de que tener una respuesta virológica más larga se relaciona con el nadir conseguido (126;210) Estos datos aconsejarían el uso de las técnicas ultrasensibles en la práctica diaria para poder mejorar la respuesta al tratamiento.

## **5. FUNDAMENTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DEL TEJIDO LINFÁTICO**

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

Una vigilancia inmunológica eficiente sobre el organismo es sólo posible si los linfocitos, cada uno dotado de la propiedad de responder a un antígeno único, son capaces de moverse libremente por el cuerpo, aumentando así la posibilidad de encontrarse con su antígeno apropiado.

Aunque la carga viral plasmática es inestimable para monitorizar la infección por VIH, los sucesos clave patogénicos y la mayoría de la replicación suceden en los tejidos linfáticos. Así, pueden observarse descensos en la carga viral plasmática, gracias a diversas terapias antirretrovirales, aunque sean evidentes signos de infección latente y la consecuente replicación viral.

Persisten muchas cuestiones sin respuesta sobre los mecanismos del almacenaje de VIH en tejidos. El rápido establecimiento de la infección latente en los tejidos linfoides, sugiere que solamente la temprana intervención podría alterar sustancialmente la historia natural de la infección por VIH. Cuando el tratamiento es iniciado antes de la seroconversión, en algunos individuos se observa una potente respuesta inmune celular VIH-específica que es sugestiva de una progresión retardada.

En la infección por VIH, la replicación viral y el almacenaje se produce en los tejidos linfoides. La infección genera un gran número de viriones, la mayoría de los cuales son almacenados en inmunocomplejos asociados a células dendríticas foliculares (21;104;220;221). Estas células tienen un importante rol en la transmisión del VIH a las células representando un reservorio mayor para el VIH, facilitando la infección de linfocitos T CD4+ y produciendo una diseminación sistémica (221). En consecuencia se produce un deterioro de las células T CD4+

colaboradoras, debido a diferentes mecanismos tales como una activación inmune persistente con un incremento de la proliferación y muerte de las células T (222-225) y a un descenso de la producción de células debido a la insuficiente madurez de los precursores linfoides (226;227). Los linfocitos T CD4+ se hallan involucrados directa o indirectamente en la mayoría de las funciones inmunológicas del cuerpo y su destrucción provoca un deterioro progresivo de la respuesta inmune característico del SIDA.

Por otra parte, la infección por VIH-1 induce una activación de la reacción citotóxica específica anti VIH-1, de la cual son responsables las células T citotóxicas CD8+. Estas células son atraídas al centro germinal del tejido linfático por una acción quimiotáctica del virus, aunque en muchos casos esta acción es insuficiente para frenar la replicación vírica. Como consecuencia de esto las células dendríticas foliculares son destruidas produciendo una alteración de la arquitectura reticular del centro germinal. Estos cambios en las subpoblaciones de linfocitos T inducidos por el virus llevan a una alteración progresiva en la arquitectura del tejido linfático, que se correlaciona con la evolución de la enfermedad (228;229).

La introducción del tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA) ha cambiado el pronóstico de esta enfermedad debido a la disminución de la replicación viral y a la recuperación de los linfocitos CD4+. En los pacientes tratados con TARGA, la recuperación de las células CD4+ viene determinado por el descenso en su destrucción (223;224;230) y por el aumento de la producción tímica (231;232). Estos sucesos están asociados a la supresión de la carga viral y el incremento de las células CD4+ en sangre periférica. Sin embargo, después de suspender el TARGA se produce una elevación de la carga viral plasmática. Este hecho ocurre incluso cuando se ha obtenido medidas de carga viral plasmática indetectable y se atribuye a la persistencia de un reservorio viral en tejido linfático (15;233). Por otro lado, estos pacientes

presentan una restauración inmunológica incompleta medida de parámetros fenotípicos y funcionales, incluso cuando los niveles de linfocitos T en plasma se recuperan (234). Estudios previos de tejido linfático de pacientes con infección por VIH con TARGA habían demostrado una recuperación parcial de la arquitectura del tejido linfático después de 12 meses de tratamiento, pero hasta ahora no existían estudios con un seguimiento más largo (235;236).

Para la comprensión anatomopatológica es fundamental conocer la arquitectura en el tejido linfático normal y la descrita en los diferentes estadios de la enfermedad.

### 5.2. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO LINFÁTICO

Los linfocitos aparecen como células sueltas en la sangre, la linfa y por los tejidos conjuntivos y epiteliales del cuerpo. Sin embargo, en la mayoría de los órganos, pero especialmente en la lámina propia de las vías digestivas y respiratorias, se reúnen con células plasmáticas y macrófagos y forman masas densas en el tejido conjuntivo laxo. Los ganglios linfáticos y las amígdalas están formados fundamentalmente por linfocitos. El término “tejido linfático” se refiere a aquellas regiones del cuerpo en el que los linfocitos representan el componente celular principal, independientemente de su función.

El tipo más frecuente de tejido linfático lo constituye la masa de los ganglios linfáticos, la pulpa blanca del bazo, las amígdalas y masas más o menos circunscritas diseminadas por los tejidos conjuntivos del cuerpo. El tejido linfático puede presentarse en dos variedades: la “difusa” y la “nodular”.

El tejido linfático difuso se encuentra de modo típico en las regiones internodular, cortical y medular de los ganglios linfáticos; en las vainas linfoides periarteriales del bazo y en las regiones internodulares de

las amígdalas y de las placas de Peyer. Está constituido por un estroma esponjoso con linfocitos entre sus mallas. El estroma, a su vez, está constituido por fibras reticulares y células reticulares de origen mesenquimal. Las células libres del tejido linfático difuso son linfocitos de tamaño diferente, macrófagos y un número variable de células plasmáticas.

El tejido linfoide nodular está constituido por los folículos, agrupaciones circunscritas y compactas de células dentro del tejido linfático difuso. Se encuentra en la corteza de los ganglios linfáticos, en la periferia de la pulpa blanca del bazo y en la lámina propia de las vías digestivas y respiratorias. Son numerosos en las amígdalas, en las placas de Peyer y en el apéndice vermiforme.

El ganglio linfático está constituido básicamente por una masa parenquimatosa de tejido linfático, atravesada por vasos linfáticos especializados o senos. Su armazón colagénico está formado por una cápsula, que reviste al órgano entero. Desde la cápsula se extienden hacia la sustancia del ganglio un número variable de trabéculas ramificadas de tejido conjuntivo. El parénquima linfoide situado entre las trabéculas está apoyado por una red tridimensional de fibras reticulares con sus correspondientes células reticulares acompañantes. Las mallas de esta red están repletas de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Los senos linfáticos son canales irregulares convertidos en un laberinto de cámaras intercomunicadas gracias a una red laxa de cordones de tejido que atraviesan su luz.

El examen de una sección de un ganglio linfático a pequeño aumento nos revela cuatro compartimentos con patrones de reacción inmunológica diferenciados: folículos o centros germinales, el área paracortical, la región medular y los senos linfáticos. Cada uno de estas reacciones y compartimentos es reconocible por una estructura o composición celular típica.

1. Los folículos son las estructuras más evidentes, con forma redonda y rodeados por una corona oscura. Normalmente, se encuentran cerca de la cápsula (el área del córtex) pero también pueden encontrarse más profundamente. En esta zona se forman los precursores de las células productoras de anticuerpos y las células B memoria.

2. El área paracortical es una zona peor definida y densamente teñida que se encuentra entre los folículos y extendiéndose hacia las capas profundas. Aquí se produce la respuesta celular específica que genera células T antígeno específicas y probablemente células T memoria.

3. En la región medular, más pálida, se encuentran los cordones medulares que son agregaciones de tejido linfático organizados en torno a vasos sanguíneos pequeños. Estos cordones están formados por una rica red de fibras reticulares y de células reticulares, que encierran linfocitos pequeños, células plasmáticas maduras y macrófagos. En esta zona se produce la reacción de las células plasmáticas que originan las células B secretoras de anticuerpos.

4. En los senos linfáticos, los macrófagos probablemente están involucrados en el procesamiento de los antígenos al limpiar la linfa y facilitar la entrada de los antígenos a los nódulos linfoides.

### **5.2.1. Folículos linfoides**

Se debe distinguir entre folículos primarios y secundarios. El nódulo linfático primario lo forma una acumulación redondeada de linfocitos pequeños densamente apretados. El nódulo linfático secundario o centro germinal lo forman estructuras ovoides constituidas por un acúmulo esférico de células más grandes, pálidamente teñidas y cubiertas por un casquete de linfocitos pequeños. No existen evidencias de que el nódulo secundario se forme a partir de la transformación del nódulo primario

preexistente, por lo que más correctamente debería nombrarse como centro germinal.

Los centros germinales son un componente ampliamente distribuido y altamente organizado de tejido linfático que falta sólo en el timo normal. En su forma totalmente desarrollada aparecen como una masa esférica con un polo oscuro, o densamente poblado, y un polo claro o menos densamente poblado. Está rodeado de una envoltura de células alargadas, que a su vez están revestidas parcialmente por un casquete en forma de media luna de linfocitos pequeños. Los centros germinales presentan una polaridad morfológica muy definida, pues el casquete linfocitario es especialmente grueso encima de la región clara y se adelgaza gradualmente hacia el polo oscuro.

Además, muestra una orientación constante con respecto a estructuras vecinas. En los ganglios linfáticos, la región clara y el casquete linfocitario de los centros germinales se dirigen hacia el seno marginal. En las vías digestivas y respiratorias, están orientados hacia la superficie epitelial más próxima.

Cuando el plano de un corte histológico pasa a través de un centro germinal en una dirección perpendicular a su eje de simetría, no se observa esta polaridad; se observa como una envoltura circular de grosor uniforme que rodea al centro germinal, siendo por esto descrito frecuentemente como *manto* o corona.

En la región más oscura del centro germinal la tinción más intensa proviene de los núcleos y del citoplasma basófilo de muchos elementos densamente apretados de la estirpe linfoide, linfoblastos, linfocitos grandes y medianos y células en transición hacia la línea plasmocelular. Todas estas células están proliferando activamente y contienen anticuerpo dentro del espacio perinuclear y en algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso. En la zona oscura, también se encuentran constantemente macrófagos, cargados con residuos de linfocitos fagocitados. Las células libres están contenidas en las mallas de un

retículo celular compuesto por elementos estrellados que muestran poca especialización citoplasmática, se tiñen con métodos de plata y se les llamaron células dendríticas en razón de sus numerosas expansiones radiadas.

La transición entre la región clara y la oscura en el ecuador del centro germinal es gradual; las grandes células basófilas de la línea linfoide van cediendo su puesto poco a poco a los linfocitos pequeños, desaparecen las figuras mitóticas y aumentan en número los macrófagos. Las células dendríticas adquieren un citoplasma eosinófilo abundante y emiten una infinidad de prolongaciones periféricas interdigitadas.

La cápsula del centro germinal está constituida por unas pocas capas de células reticulares aplanadas. Esta envoltura está desorganizada a nivel del polo claro, debido a la presencia de muchos linfocitos pequeños muy deformados, fijados, al parecer, en el curso de su migración hacia, o desde, el casquete de pequeños linfocitos suprayacentes. Son escasas las células plasmáticas maduras en los centros germinales, excepto en los de las amígdalas. Las fibras reticulares son escasas dentro del centro, pero forman una envoltura concéntrica en torno a su periferia.

Los centros germinales parecen originarse a partir de pequeños nidos de linfocitos grandes o linfoblastos, que progresivamente van ganando tamaño y complejidad para formar agregados de hasta 1 mm de diámetro. En los de mayor tamaño se da una intensa fagocitosis de linfocitos, por ello adquieren un aspecto característico al microscopio óptico, porque los macrófagos, cargados con cuerpos residuales, aparecen como puntos claros sobre un fondo de núcleos densamente apretados (cielo estrellado).

La función de los centros germinales es la producción activa de linfocitos. Los estudios autorradiográficos de las amígdalas después de inyectar <sup>3</sup>H-timidina parecen indicar que los linfocitos se originan en el centro germinal, se mueven hacia fuera y entran en el casquete de

linfocitos pequeños, para emigrar finalmente a través del epitelio suprayacente. En la función del folículo cooperan las células dendríticas, las células linfoides y los macrófagos.

La composición de un centro germinal depende de su fase de desarrollo. Inicialmente, hasta 4 días después del contacto con el antígeno, sólo se encuentran células centrofoliculares grandes no hendidas. Entonces aparecen macrófagos, produciendo el patrón en cielo estrellado. A continuación aparecen centrocitos y un gran número de células dendríticas. En esta fase se observa una división en zonas del folículo: una zona oscura (conteniendo las células centrofoliculares grandes no hendidas) y una zona clara (conteniendo las células centrofoliculares pequeñas hendidas y las células dendríticas).

#### **5.2.1.1. Células dendríticas**

La función de las células dendríticas podría ser la captación de antígeno en presencia de anticuerpo para presentárselo a las células B (237). Estas células retienen el antígeno en su superficie lo que permitiría retener el complejo antígeno-anticuerpo durante mucho tiempo y proporcionando una reacción a largo plazo contra ese antígeno, lo que podría ser importante para la memoria inmunológica (238). Las células dendríticas tienen un núcleo de tamaño medio a grande, a menudo elongado, con discretos nucleolos. En el estudio inmunohistoquímico, se observan muchas protusiones citoplasmáticas alargadas. Estas se unen a las protusiones de otras células dendríticas citoplasmáticas mediante desmosomas, con las que forman una red, y son responsables de la típica estructura del folículo. Las células dendríticas se tiñen con anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellas, como el CD21 (239) así como con anticuerpos contra receptores para los componentes del complemento

C3b (CD35) (240) y C3d. Las células dendríticas son 5'-nucleotidasa positivas.

#### **5.2.1.2. Células linfoides**

Las células linfoides de los folículos primarios y de la zona del manto tienen núcleos pequeños y redondos con cromatina condensada y escaso citoplasma. Estas células reaccionan con anticuerpos monoclonales contra células B (CD20, CD22, CD24). Expresan IgM e IgD en su superficie (240-244).

La inmunohistología muestra al folículo como un área de células B. En el centro germinal se pueden encontrar diferentes células B: células centrofoliculares grandes (no hendidas) o centroblastos, células centrofoliculares grandes y pequeñas hendidas, células centrofoliculares pequeñas no hendidas y ocasionalmente células plasmáticas e inmunoblastos.

Las células centrofoliculares no hendidas reaccionan contra anticuerpos específicos contra linfocitos B e inmunoglobulinas en su superficie.

#### **5.2.1.3. Macrófagos**

Estos macrófagos son células grandes con abundante citoplasma conteniendo sustancias fagocitadas. Debido a que su citoplasma es claro en la mayoría de las tinciones histológicas, su presencia causa un moteado blanco en el tejido por lo que se llama patrón en cielo estrellado.

Los macrófagos de esta zona tienen las características generales de los macrófagos/histiocitos: 1-antitripsina, fosfatasa ácida y esterasa no

específica (245) y con reactividad con anticuerpos monoclonales como CD11b y CD35 (241).

## **5.2.2. Cordones medulares**

En los cordones medulares se forman las células plasmáticas, directamente o por la transformación de células memorias o centrofoliculares. Por lo tanto, en esta zona donde se forman la mayoría de la producción de anticuerpos. La composición celular se describe a continuación

### **5.2.2.1. Células linfoides**

La mayoría de las células son linfocitos. Algunos son linfocitos T y presentan poco citoplasma y núcleos irregulares. Estos linfocitos son necesarios para modular el proceso de formación de anticuerpos. Hay otros linfocitos con mayor cantidad de citoplasma que se asemejan a células plasmáticas y son llamados linfocitos plasmocitoides. Los inmunoblastos son raros, con un gran y redondo núcleo con un nucleolo grande central y citoplasma basófilo. Las células plasmáticas se encuentran en número variable. Estas presentan la típica cromatina en rueda de carro, con abundante citoplasma.

Inmunohistoquímicamente, los cordones medulares son un área de células B. Sin embargo, hay algunos linfocitos T presentes, la mayoría del fenotipo colaboradores/inductores (246). Células plasmáticas, plasmablastos, inmunoblastos y linfocitos plasmocitoides muestran inmunoglobulinas intracitoplasmáticas de varias clases (244).

### **5.2.2.2. Macrófagos**

Los macrófagos son raros, con un núcleo grande e irregular y abundante citoplasma. No presentan una actividad tan fagocitadora como los del centro germinal, probablemente porque su función está más dirigida a la presentación del antígeno que a la fagocitosis.

### **5.2.2.3. Otros tipos celulares, incluyendo mastocitos**

Los mastocitos, dentro del ganglio linfático, se encuentra en mayor proporción en la región medular. Son células de tamaño moderado bien visualizadas con tinciones como Giemsa o azul de toluidina.

Ocasionalmente se pueden observar granulocitos eosinófilicos o neutrofilicos.

### **5.2.3. Paracortex**

Es una estructura fácilmente reconocible por su localización y por sus elementos estructurales: las vénulas epitelioides y las células interdigitadas. Aquí se produce la respuesta celular específica, es decir, la generación de linfocitos T inmunocompetentes (247), la formación de linfocitos T memoria y la producción de citocinas.

#### **5.2.3.1. Vénulas epitelioides**

Sólo se encuentran en el paracortex. Están formados por células cuboidales con un núcleo oval con pequeños nucleolos y una cantidad moderada de citoplasma. Funcionan como puerta de entrada para

linfocitos desde la sangre periférica al parénquima del nódulo linfático (242;248). Por lo tanto, juegan un papel crucial en la recirculación, distribución y almacenaje de los linfocitos en los diferentes órganos linfoides.

### **5.2.3.2. Células interdigitadas**

Las células interdigitadas presentan los antígenos a los linfocitos T del mismo modo que las células dendríticas lo hacen con las células B foliculares. Las células interdigitadas son células grandes con abundante citoplasma claro y con un núcleo grande e irregular con nucleolos discretos. Probablemente presentan inicialmente los antígenos a las células linfoides, desarrollando un papel crucial al iniciar la respuesta inmune (249).

Las células interdigitadas pueden ser reconocidas con anticuerpos S-100 en secciones parafinadas (250), con anticuerpos monoclonales como HLA-DR y CD24 (240;251) y con anticuerpos específicos contra las células interdigitadas (252). También presentan una actividad ATPasa.

### **5.2.3.3. Linfocitos T**

La mayoría de las células paracorticales son linfocitos T pequeños. Tienen un pequeño e irregular núcleo con cromatina oscura condensada y escaso citoplasma. Ocasionalmente, se observan células inmunoblásticas B y T.

Inmunohistológicamente, predominan los linfocitos T con mayoría de linfocitos T colaboradores/inductores (241;243;244;251). También se encuentran algunas células B. Casi todas las células T son HLA-DR negativas.

#### **5.2.4. Senos linfáticos**

Los senos linfáticos son estructuras que llevan la linfa desde los vasos linfáticos aferentes hasta los eferentes a través del nódulo linfático. Los senos subcapsulares están rodeados parcialmente por endotelio y a medida que se aproxima al hilio disminuyen las células endoteliales y aumentan los macrófagos. Estos tienen una importante función fagocítica ya que son las primeras células que se ponen en contacto con los antígenos, e incluso pueden tener una función presentadora del antígeno.

Estos macrófagos son similares a los de otros sitios: una razón entre el núcleo y el citoplasma baja, núcleo irregular y signos de fagocitosis. La inmunohistoquímica revela los marcadores histiocíticos: lisozima,  $\alpha_1$ -antitripsina, fosfatasa ácida, etc.

### **5.3. HISTOFISIOLOGÍA DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS**

Los ganglios linfáticos, interpuestos en el camino que recorre la linfa, impiden la entrada en el torrente sanguíneo de macromoléculas potencialmente peligrosas, de material en partículas y de bacterias transportadas por la linfa, y ejercen una vigilancia inmunológica sobre sus determinantes antigénicos. La capacidad de filtración de los ganglios linfáticos se basa tanto en mecanismos mecánicos como biológicos. La configuración laberíntica de los senos favorece la detención de las partículas suspendidas en la linfa y los macrófagos de las paredes de los senos las eliminan por fagocitosis. Los ganglios linfáticos, sin embargo, representan una barrera mucho menos eficiente para las células transportadas por la linfa e incluso pueden facilitar la diseminación de algunos virus. Algunos virus que son capaces de proliferar dentro de las

células del ganglio linfático se diseminan rápidamente por el organismo, transportados probablemente por los linfocitos recirculantes.

La función de los ganglios linfáticos en la defensa inmunológica del cuerpo es una propiedad de las poblaciones linfocitaria y plasmocelular, con la ayuda de los macrófagos, tanto en la fase preliminar de reconocimiento antigénico como en la fase terminal de eliminación de los antígenos. Para iniciar una respuesta inmune primaria, deben estar presentes en el ganglio linfático en reposo linfocitos no comprometidos T y B, mientras que, para la respuesta secundaria, son necesarias células memoria. Al reaccionar con los antígenos que provocan una respuesta humoral, se activan los linfocitos y experimentan la proliferación y diferenciación antígeno-dependientes. Como consecuencia, aparecen células plasmáticas en el ganglio y se sintetiza anticuerpo que es liberado a la linfa eferente, junto con células linfoides que propagan la respuesta por todo el cuerpo. En las respuestas inmunes mediadas por células, la activación y diferenciación de los linfocitos llevan a un desarrollo y diseminación sistémica de linfocitos productores de linfocinas y citolíticos.

En los ganglios linfáticos periféricos quiescentes, la linfa aferente contiene muy pocas células. Entre ellas hay linfocitos, macrófagos y granulocitos ocasionales. La linfa eferente contiene 20 a 75 veces más células que la linfa aferente y las células son predominantemente linfocitos pequeños. De estos sólo una pequeña parte se originan por proliferación de precursores en el ganglio, siendo la inmensa mayoría procedente de los linfocitos de la sangre. Estos linfocitos pertenecen al contingente recirculante y entran en el ganglio a través del endotelio cuboideo de las vénulas poscapilares de la corteza profunda. Los linfocitos pequeños transportados por la sangre son aceptados selectivamente por estos vasos, mientras que los granulocitos y los monocitos son excluidos específicamente. La mayoría de los linfocitos recirculantes son timo-dependientes y, al entrar en el ganglio, se localizan en la corteza profunda. Poco más tarde emigran a la linfa de los

senos y abandonan el órgano por los vasos linfáticos eferentes. Las células B recirculan a una velocidad más lenta que las células T y cruzan el endotelio de las vénulas poscapilares y se localizan inicialmente en la corteza profunda. Más tarde, sin embargo, se aposentan en la corteza externa y en los cordones medulares. En la corteza externa, toman residencia en los nódulos primarios y en el casquete linfocitario de los centros germinales.

El aposentamiento selectivo de los linfocitos tímicos y de los del conducto torácico ha dado origen al concepto de que el parénquima de los ganglios linfáticos está constituido por un área timo-dependiente, la corteza profunda, y un área bursa-dependiente, que incluye los cordones medulares y la corteza externa con sus centros germinales.

La actividad linfocitopoyética de un ganglio linfático quiescente parece ser pequeña. Los únicos lugares de proliferación linfocitaria mantenida en los ganglios linfáticos son los centros germinales. Las células plasmáticas localizadas en la médula, son elementos residentes o terminales, que se originan localmente como consecuencia de una estimulación antigénica anterior o se diferencian a partir de precursores sembrados por todos el cuerpo desde un foco de actividad inmune. Los macrófagos del ganglio linfático son probablemente de origen monocitario. Las células reticulares son una clase heterogénea de células que incluyen, probablemente, a fibroblastos responsables de la síntesis de las fibras reticulares, a macrófagos de los tejidos y a células dendríticas. El término "célula dendrítica" abarca una población heterogénea de componentes del ganglio linfático entre las que se cuentan las "células dendríticas foliculares" de los centros germinales, las células interdigitadas de la corteza profunda y las células veladas de la linfa aferente y de los senos linfáticos. Las células dendríticas de los centros germinales tienen la propiedad de retener por largos periodos de tiempo los complejos antígeno-anticuerpo entre las fisuras que limitan sus prolongaciones superficiales. Las células interdigitadas no presentan

receptores para las moléculas de anticuerpo pero poseen moléculas de histocompatibilidad (Ia) en su superficie.

### **5.3.1. Respuesta inmune humoral**

Después del contacto del ganglio con un antígeno que provoca la producción de anticuerpos se produce la reacción primaria que se caracteriza, durante el primer día, por un aumento del número de granulocitos tanto en el parénquima como en los senos linfáticos. Aparecen en la corteza profunda células mononucleares basófilas de tamaño medio. El antígeno puede demostrarse en vacuolas fagocitarias de los macrófagos que revisten los senos de la médula, pero también está retenido en las fisuras intercelulares de la corteza externa. En los días segundo y tercero, desaparecen los granulocitos, mientras proliferan y crecen en número las células basófilas grandes o células pironinófilas. El ganglio linfático se agranda y la corteza profunda parece extenderse, invadiendo todo el órgano. Desaparecen los centros germinales preexistentes y los cordones medulares se reducen grandemente en longitud. La población neoformada de células basófilas parece comprender a linfoblastos y a formas transicionales entre las líneas linfocitaria y plasmocitaria.

Más tarde, se hacen cada vez más numerosos los elementos inmaduros de la familia de las células plasmáticas. En ese estadio sintetizan activamente anticuerpos, que aparecen en la linfa eferente y en la sangre. Además, nidos bien circunscritos de linfocitos pequeños y grandes aparecen cerca de la superficie del ganglio. Probablemente, representan las fases de desarrollo inicial de nuevos centros germinales. Hacia el final de la primera semana después del contacto con el antígeno, el ganglio linfático comienza a recuperar su arquitectura normal. Han aparecido numerosos centros germinales neoformados en la corteza; los

cordones de la médula, prominentes de nuevo cerca del hilio, contienen numerosas células plasmáticas maduras e inmaduras.

Durante la segunda semana después del estímulo antigénico, comienza disminuir el número de células plasmáticas que quedan casi exclusivamente confinadas a los cordones medulares. Todavía hay antígeno en el ganglio, situado en los cuerpos residuales de los macrófagos medulares y en los espacios intercelulares que quedan entre las células dendríticas de los centros germinales.

Durante la respuesta secundaria, el ganglio linfático experimenta cambios que se parecen a los que siguen a la exposición primaria del antígeno, pero se manifiestan más temprano y son mucho más intensos.

### **5.3.2. Respuesta inmune celular**

Cuando un ganglio participa en una respuesta inmune celular, sufre cambios morfológicos que no son llamativamente distintos de los típicos de la respuesta humoral. Cuando el antígeno llega al ganglio, este se agranda y la corteza profunda se hiperplasia. Aparecen en la corteza profunda linfoblastos de núcleo pálido, nucléolos prominentes y abundante citoplasma basófilo (células pironinófilas grandes). Son células que se dividen activamente; su número en la corteza profunda aumenta de prisa, alcanzando un máximo hacia el final de la primera semana. Al comienzo de la segunda semana, el número de linfoblastos cae rápidamente y se manifiesta una segunda fase de la respuesta: aparecen centros germinales neoformados en la corteza externa y se localizan en los cordones medulares células plasmáticas maduras e inmaduras. Al mismo tiempo, se detecta anticuerpo circulante en la sangre.

El mecanismo de esta respuesta celular no está bien comprendido. Los antígenos pueden alcanzar el ganglio regional a través de la linfa aferente. Los linfocitos pequeños de la corteza profunda pueden

reaccionar con los antígenos y diferenciarse a linfoblastos proliferantes; éstos a su vez producen linfocitos de tamaño cada vez más pequeño, que emigran del ganglio regional, circulan en la sangre y van a diseminarse por todo el sistema inmune.

#### **5.4. HISTOLOGÍA DEL TEJIDO AMIGDALAR**

Nuestro estudio se realizó a partir de la obtención de tejido linfático amigdalal. Las amígdalas son grandes masas de tejido linfático que se encuentran en las fosas creadas por los músculos palatogloso y palatofaríngeo a cada lado de la orofaringe.

La superficie libre de las amígdalas está cubierta por epitelio escamoso estratificado que se invagina en la profundidad de la amígdala, formando criptas ciegas. El epitelio plano estratificado de la superficie libre se apoya en una delgada capa de tejido conjuntivo. Las criptas llegan hasta la cápsula de tejido conjuntivo y son de forma sencilla o ramificada.

Las criptas están tapizadas por tejido linfático que contiene folículos linfoides con centros germinales similares a los hallados en los ganglios linfáticos. Las criptas, con sus vainas linfoides, están separadas unas de otras por delgados tabiques de tejido conjuntivo laxo que, desde la cápsula, se extiende por el interior. En este tejido conjuntivo hay siempre numerosos linfocitos de tamaño diferente, células cebadas y células plasmáticas.

Los linfocitos, macrófagos y células plasmáticas pasan hacia la luz de la cripta a través de estrechos pasos entre las células epiteliales de revestimiento, presumiblemente en el proceso de contacto antigénico. Los estudios isotópicos han demostrado que la sustancia particulada que entra en las criptas se traslada a los folículos, proceso que parece incluir su fagocitosis debido a las células epiteliales del revestimiento de las criptas.

La captación del antígeno se produce de forma similar en las amígdalas linguales y adenoides, estando esta última cubierta de epitelio de tipo respiratorio en vez de epitelio escamoso estratificado.

## **5.5. HISTOPATOLOGÍA DEL TEJIDO LINFÁTICO INFECTADO POR VIH**

### **5.5.1. Cambios en la arquitectura y celularidad del tejido linfático en pacientes infectados por VIH-1**

Tras la infección por VIH-1, se inician importantes cambios en la arquitectura y la celularidad del tejido linfático amigdalario y de los ganglios linfáticos. Estas alteraciones histopatológicas se correlacionan perfectamente con el estadio evolutivo de la infección, durante el curso prolongado de la enfermedad. La expansión del tejido linfático en pacientes en fases tempranas de la infección ocasiona linfadenopatías generalizadas, hiperplasia del tejido amigdalario y esplenomegalia. Esta hiperplasia linfoide tiene lugar preferentemente en los centros germinales de los folículos linfoides, donde el virus es atrapado. En una fase posterior, suceden cambios de lisis folicular, seguidos de involución folicular y, finalmente, depleción linfoide (228) lo que comporta una alteración importante de la arquitectura del tejido linfático. El estudio inmunofenotípico del tejido linfático revela cambios importantes de las poblaciones linfoides durante esta progresión. En los pacientes portadores del VIH existe un descenso de la relación CD4:CD8, con aumento de células linfoides T CD8+ citotóxicas. Se observa, además, disminución de las células CD4, fundamentalmente por un proceso de apoptosis inducida por el virus, que afecta no sólo las células infectadas, sino también las no infectadas (253;254).

Los linfocitos circulantes en sangre representan aproximadamente un 2 % del contenido total de estas células en el organismo. En condiciones normales existe un tránsito de células linfoides entre los diferentes compartimentos del organismo. Este tránsito está modulado por las denominadas moléculas inflamatorias de adhesión, que se localizan en la superficie de los leucocitos, determinando los fenómenos de adhesión y trans migración de estas células. A medida que progresa la infección por VIH-1, estas moléculas están sobreexpresadas en el tejido linfático y, de forma paralela, disminuye la proporción de células linfoides en sangre periférica (255).

### **5.5.2. Clasificación histopatológica del tejido linfático en pacientes infectados por el VIH**

Diferentes autores han utilizado distintas clasificaciones en el estudio anatomopatológico del tejido linfático basándose en diversos parámetros (por ejemplo cambios morfológicos en la estructura del nódulo linfático), y a menudo sin tener en cuenta la relevancia clínica o el valor pronóstico. Posteriormente algunos investigadores relacionaron ciertos patrones histopatológicos con la ratio CD4/CD8 en sangre periférica y el estadio de la infección por VIH (228;229).

Así, pacientes en los que se observaban ciertos cambios histológicos en sus nódulos linfáticos, tal como una hiperplasia folicular florida, presentaban un curso con clínica estable; otros con una histología de involución folicular y depleción linfocítica, rápidamente desarrollaban algunas de las enfermedades diagnósticas de SIDA.

Tras ser examinadas de forma secuencial diferentes biopsias de tejido linfático de individuos infectados por VIH, se llegó a la conclusión de que la histología del nódulo linfático sufre cambios según el estadio clínico de la infección por VIH y tiene correlación con el recuento celular

de CD4 en sangre periférica, la carga viral en sangre periférica, el desarrollo de infecciones oportunistas y el pronóstico de la enfermedad (228).

Hasta la actualidad se han descrito diferentes clasificaciones histopatológicas. Inicialmente Biberfeld y cols.(256) en 1987, describieron 3 estadios:

- 1) Hiperplasia folicular-involución folicular con fragmentación
- 2) Involución folicular con atrofia
- 3) Depleción folicular

Posteriormente, Chadburn y cols. (228), en 1989, describieron 4 estadios:

- 1) Hiperplasia folicular explosiva
- 2) Mezcla de hiperplasia folicular -involución folicular
- 3) Involución folicular
- 4) Depleción folicular

Actualmente, nosotros empleamos una adaptación de esta clasificación pero dividida en tres estadios:

- 1) Hiperplasia linfoide folicular
- 2) Involución folicular del tejido linfático
- 3) Depleción folicular

### **5.5.2.1. Estadio I: Hiperplasia folicular**

La mayoría de los ganglios linfáticos aparecen moderadamente agrandados (2-4 cm) sin existir evidencias de necrosis o hemorragias. Histológicamente se hallan compuestos de folículos agrandados hiperplásicos, en ocasiones con los bordes dentellados (serrados). Los folículos pueden fusionarse, apareciendo muy agrandados y dibujando formas muy diversas, de aquí el término de *folículos geográficos*. Estos folículos hiperplásicos pueden hallarse tanto en el córtex como en la

región medular e incluso extenderse fuera de la cápsula. Los folículos linfoides suelen ocupar más de 2/3 del área del nódulo.

Los folículos contienen diversos tipos de células linfoides. Se evidencian macrófagos y abundantes figuras mitóticas dándole un aspecto de cielo estrellado. El manto presenta a menudo alteraciones focales, atenuación o total borramiento, por esto los centros germinales se hallan pobremente definidos y aparecen fusionados con el área interfolicular que la rodea. En aproximadamente el 50% de los folículos se puede encontrar la llamada lisis folicular, también conocida como fragmentación folicular, donde podemos hallar linfocitos de pequeño tamaño con o sin eritrocitos, debido a la fragmentación de vasos sanguíneos intrafoliculares. Pueden verse diversos tipos de células monocitoides alrededor de los vasos trabeculares entre los centros germinales hiperplásicos. Poseen un núcleo ovalado, anodino. Los estudios inmunofenotípicos nos muestran que estas células son linfocitos B policlonales, generalmente asociados con neutrófilos.

Las áreas interfoliculares presentan numerosos vasos sanguíneos pequeños, con pequeños linfocitos, inmunoblastos, células plasmáticas, histiocitos, neutrófilos y en ocasiones eosinófilos.

En resumen, los principales hallazgos que definen este estadio son: folículos hiperplásicos agrandados con formas geográficas, zonas del manto atenuadas y con disrupciones. Células gigantes multinucleadas, células B monocitoides, y un pequeño número de neutrófilos.

En este estadio incluimos el segundo estadio de Chadburn, que incluirían aquellos casos transicionales hacia la involución folicular y en que, a grandes rasgos, los nódulos linfoides aparecen agrandados, conteniendo diferentes áreas de hiperplasia folicular con grandes centros germinales irregulares que suponen menos de 2/3 del área del nódulo linfoide, y áreas de involución folicular con folículos hialinizados y pequeños.

### **5.5.2.2. Estadio II: Involución folicular**

Al contrario que en la hiperplasia folicular, los centros germinales de los ganglios linfáticos que presentan involución folicular se presentan pequeños, atrofiados y con hipocelularidad. Se suelen encontrar hialinizados o epitelizados, con capas de células dendríticas foliculares y células foliculares del centro germinal. Se observan vasos pequeños, hialinizados que penetran en los centros germinales atróficos. Algunos de estos folículos tienen un borde de linfocitos de las zonas pequeñas del manto, y otros se presentan “vacíos”. Se puede observar material eosinofílico hialinizado extracelular ocasionalmente asociados con los folículos atróficos.

La red de las células dendríticas foliculares se encuentra desorganizada, siendo estas células las principales constituyentes de los folículos.

Las áreas interfoliculares se expanden a lo largo de todo el área y se muestran con bajo número de linfocitos. Los linfocitos son pequeños, escasos y asociados a histiocitos o células plasmáticas. Existe una proliferación vascular con hiperplasia de células endoteliales, que le dan un aspecto fibroso, grueso a las paredes vasculares.

Se hallan presentes histiocitos, neutrófilos, un número importante de material eosinófilo, el cual representa restos necróticos. Puede observarse fibrosis de la región medular y capsular.

### **5.5.2.3. Estadio III: Depleción linfoide**

A grandes rasgos, los ganglios linfáticos son pequeños, no excediendo 1 cm de diámetro.

Histológicamente los ganglios linfáticos están caracterizados por una depleción de linfocitos severa y una ausencia total de centros germinales. Existe fibrosis subcapsular y sinusoidal con depósitos hialinos en lugar de los folículos degenerados.

La celularidad se basa principalmente en la existencia de histiocitos, células plasmáticas (agrandadas y atípicas) e inmunoblastos dispersos. En un 90% se observa fagocitosis de células sanguíneas incluyendo eritrocitos, neutrófilos y linfocitos. Los vasos sanguíneos son pequeños, estrechos. Los linfocitos son pequeños y poco abundantes.

## **6. DINÁMICA Y DISTRIBUCIÓN VÍRICA Y LINFOCITARIA EN LOS TEJIDOS LINFÁTICOS**

El VIH-1 entra habitualmente en el huésped humano a través de las superficies mucosas y, consecuentemente, se disemina a través de los tejidos linfáticos. Estos se convierten en los reservorios donde el virus se replica y almacena a lo largo de la infección (21;121;193;194;221). En las primeras semanas de la infección, el virus y los antígenos virales a menudo llegan a niveles altos en la corriente sanguínea (174;175;257;258). El primer estadio de la infección del VIH-1 generalmente se resuelve, el virus y los antígenos virales caen a niveles bajos coincidiendo con la respuesta inmune celular (259).

Durante el curso de la infección, los niveles de linfocitos CD4+ en sangre van disminuyendo lentamente, y se define como SIDA cuando llega a 200 células/mm<sup>3</sup> (213). Las tasas de progresión a SIDA y a la muerte del paciente se correlacionan con los niveles de ARN viral en la sangre periférica (7), los cuales reflejan, en parte, la producción viral en los tejidos linfáticos (21) mediante el mecanismo de replicación viral, diseminación e infección de nuevas células (83;118).

La historia natural de la infección y su sombría evolución ha sido drásticamente alterada recientemente por el tratamiento mediante combinaciones de medicamentos antirretrovirales que han roto la cadena de nuevas infecciones requeridas para mantener la producción viral. Bajo circunstancias óptimas en pacientes sin tratamiento previo, el TARGA puede suprimir la replicación del VIH-1 a niveles indetectables en la sangre periférica y los reservorios de tejido linfático (220). A pesar de que el TARGA no elimina la infección latente en algunas células (196;211;260), el control de la infección activa del VIH-1 se traduce en un aumento de linfocitos CD4+ en sangre y tejido linfático (95;255), una

restauración parcial de la función inmune (95;99;196;261) y una disminución de las infecciones oportunistas y de las muertes debidas a SIDA (129).

Este capítulo resume la mayoría de los conocimientos que tenemos sobre la historia natural de la infección y de los resultados con el TARGA. Tendremos una especial atención sobre el tejido linfático y los linfocitos T CD4+ porque estas células desempeñan un papel primordial en el sistema inmune y porque el tejido linfático es el principal lugar donde se replica y persiste el VIH-1. Este capítulo aclarará, desde una perspectiva demográfica, el tamaño, crecimiento, distribución y migración de las poblaciones linfocitarias y las tasas de replicación y muerte viral.

## 6.1. LOS TEJIDOS LINFÁTICOS EN LAS FASES INICIALES DE LA INFECCIÓN

Comentario [mcb1]: Página:  
139  
[kilby]

Los cambios histopatológicos que sufren los tejidos linfáticos tras la infección por VIH-1 y que hemos descrito parcialmente en el apartado 5.7 se deben principalmente a la proliferación linfocitaria y a la hiperplasia folicular, aunque no se descarta que también influya el reclutamiento de células inflamatorias desde la circulación (262). El VIH-1 llega a los tejidos linfáticos regionales en sólo unas horas después de la infección. En estudios experimentales en simios se ha observado replicación viral en pocos días (263) y presencia de numerosas células infectadas en menos de 2 semanas (264). La viremia es detectable en humanos entre la primera y segunda semana de la infección única por vía genital (174;175).

El principal receptor del VIH-1 en las células humanas es la molécula CD4, que es expresada principalmente por los linfocitos T colaboradores. Además de esta molécula, el VIH necesita un co-receptor, de dos posibles, para introducirse en el interior de las células CD4+: las moléculas CCR5 o CXCR4, que son receptores de las quimiocinas, unas

citocinas especializadas en dirigir la activación y migración leucocitaria (265;266). El co-receptor utilizado por el VIH-1 difiere según la cepa del virus: las cepas del virus no inductoras de sincitios o R5 utilizan la molécula CCR-5; las cepas inductoras de sincitios o X4, la molécula CXCR4 (106).

Después de la exposición mucosa, el VIH contacta primero con la célula de estirpe monocitaria (263). Tiene un papel particular la célula de Langerhans, célula dendrítica interdigitante con potente capacidad de activación de linfocitos T (221). Las amígdalas y el tejido adenoide contienen células dendríticas que son capaces de transferir la infección de VIH a las células CD4+, en el tejido linfático (267) lo que explica la transmisión después de un contacto sexual vía oral mediante un mecanismo análogo a la vía genital (262). Estas células de Langerhans portadoras de partículas de VIH pueden ser transportadas a los tejidos linfáticos vía los vasos linfáticos aferentes. Allí se convierten en potentes células presentadoras de antígeno (268;269). Los linfocitos T colaboradores pueden entonces facilitar la respuesta inmune humoral y celular contra el patógeno invasor. Sin embargo, una vez activados los linfocitos T son más susceptibles a la infección por el VIH (213).

Aparte de esta vía, también se ha descrito la infección directa de linfocitos T colaboradores debido a que en las superficies mucosas con patología inflamatoria, ej. con úlceras, también se identifican linfocitos CCR5+ (269). Una vez infectados los linfocitos T directamente pueden pasar al torrente sanguíneo. En las primeras fases de la infección, la mayoría de las células infectadas en los tejidos linfáticos son linfocitos (75;264), pero los monocitos/macrófagos en estos tejidos pueden abrigar el virus cuando la viremia plasmática es relativamente baja (194), y entonces ser los responsables del aumento de la producción viral durante las infecciones oportunistas (270).

Aunque muchos de los estudios se centren en la sangre y en los ganglios linfáticos, la mayoría de los linfocitos T se encuentran en los

tejidos linfáticos asociados a la mucosa intestinal y por tanto puede ser la mayor diana durante la infección aguda (262). En estos tejidos se ha observado la disminución de la razón de los linfocitos T CD4+/linfocitos T totales antes que en los ganglios linfáticos y periféricos y el bazo en simios (271) y se supone que ocurre lo mismo en humanos (272). Una hipótesis reciente presentada por Brenchley y cols. (273) defiende que la infección destruye rápidamente la mayoría de los linfocitos T CD4+ en las superficies mucosas y genera una gran inmunodeficiencia después de la fase aguda, en particular la capacidad para controlar los patógenos potenciales en la superficie de las mucosas y provoca una gran entrada de bacterias desde el lumen intestinal. Las bacterias y sus componentes estimulan el sistema inmune de forma continuada. La persistente activación y muerte fisiológica drenaría lentamente los pools de linfocitos T memoria y vírgenes (274).

## **6.2. DETERMINANTES INICIALES DE LA PERSISTENCIA VIRAL Y LA CARGA VIRAL PERMANENTE**

Las biopsias de tejidos linfáticos obtenidas de modelos animales y de humanos con infección aguda revelan linfocitos T CD4+ infectados activados y otros en estado de reposo (264). Estos últimos podrían haberse infectado cuando estaban activados y después volver al estado de reposo. Los linfocitos T CD4+ en reposo son un reto para conseguir una terapia curativa debido a que los inhibidores de las enzimas virales, tanto de la proteasa como de la transcriptasa inversa, no tienen efecto sobre las células con el material genético viral quiescente. Está descrito el establecimiento de un pool de linfocitos T latentes que persiste largo tiempo después del inicio de terapia antirretroviral (67;196;211).

Se estima que los linfocitos T en la circulación sanguínea representa solo del 1 al 2% del pool total del cuerpo, mientras que la gran

mayoría de las células diana potenciales del VIH se localizan en los tejidos linfáticos y por tanto, aparentemente, la replicación allí es la contribuyente predominante a la carga viral total del cuerpo (75;275).

### **6.3. PRODUCCIÓN VIRAL Y ALMACENAJE EN EL TEJIDO LINFÁTICO**

#### **6.3.1. Dinámica y distribución del VIH-1 en el tejido linfático**

Como ya hemos comentado, en pacientes infectados por el VIH-1, la mayoría de la replicación y el reservorio viral se produce en el tejido linfático (262). La dinámica y distribución del VIH-1 en el tejido linfático han sido estudiadas mediante técnicas de hibridación "in situ" y el análisis de imagen computerizado (21). Los resultados de los mismos han demostrado que en las primeras fases de la infección el virus se localiza preferentemente en el espacio extracelular y en la superficie de las células dendríticas foliculares (CDF) del centro germinal (21;276), en comparación con un relativo número pequeño de células con señal del virus en su interior. También se puede demostrar la presencia vírica en el tejido linfático realizamos técnicas de PCR e inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal que reconoce el antígeno p24 del core del VIH (277). Algunos trabajos han concluido que las determinaciones del ARN viral mediante hibridación in situ dan resultados paralelos a la localización del antígeno viral p24 mediante la reacción inmunohistoquímica (278). Mediante esta última técnica se puede demostrar que en los casos con estructuras foliculares, es decir, aquellos pacientes que tienen estadios I o II, el antígeno p24 del VIH sigue principalmente la distribución de las células dendríticas foliculares, superponiéndose su inmunoespresión a la de CD21 (un marcador de las células dendríticas foliculares) (104).

La técnica de inmunohistoquímica presenta algunas ventajas y desventajas con respecto a la medición de la carga viral. La CV informa

de forma cuantitativa del virus que se encuentra en todo el tejido linfático, mientras que el estudio inmunohistoquímico es de carácter cualitativo pero permite mostrarnos la relación del virus con la estructura del tejido linfático.

En fases más avanzadas, la presencia viral se localiza predominantemente en células linfáticas de las áreas interfoliculares del tejido linfático. El aumento de la replicación viral en los tejidos linfáticos de pacientes no tratados se refleja en plasma como un aumento de la detección viral.

En líneas generales, la mayoría de los autores defienden que existe una correlación positiva entre los niveles de carga viral en tejido linfático y sangre periférica en pacientes sin tratamiento previo (80;279;280). Sin embargo, se ha demostrado que después de TARGA existen discrepancias persistiendo en muchos casos CVTL detectables a pesar de no poder detectarse CVP (11;14;16;281).

La viremia basal se ha demostrado como el mejor predictor de la progresión de la enfermedad (5;7)\_y, como demostró Rizzardi y cols. (282), también como un buen predictor del tiempo de respuesta al tratamiento antirretroviral. Además, en el mismo estudio encontraron que la CVTL y la CVP iniciales tenían una capacidad predictora del tiempo para conseguir que la viremia bajase a niveles indetectables con TARGA similares.

Sin embargo, todavía quedan muchas dudas sobre qué ocurre en el tejido linfático, en especial sobre la respuesta del tejido linfático después del TARGA y sobre todo si puede explicar las diferentes respuestas que se observan en sangre periférica.

### 6.3.2. El pool en las células dendríticas

La medición del pool viral en las células dendríticas foliculares en el tejido linfático en los estadios presintomáticos de la infección revelan su extraordinario tamaño con alrededor de  $10^{11}$  copias de ARN viral (21), correspondiente a  $5 \times 10^{10}$  viriones y  $5 \times 10^{14}$  copias de p24, la principal proteína de la cápsida viral de los viriones, sin contar el antígeno viral libre unido a las células dendríticas. Por lo tanto, la cantidad de VIH-1 en las células dendríticas foliculares es el antígeno dominante en el sistema inmune. Tanto el ARN aislado como en viriones asociado a las células dendríticas es mayor que los niveles plasmáticos, lo que confirma la conclusión de que los niveles plasmáticos infraestiman la carga viral y que el tejido linfático es un reservorio principal donde el VIH-1 se almacena. Además, el rápido establecimiento de este pool viral en el tejido linfático durante la infección aguda (276) y su rápido descenso con la terapia (220) sugiere que estas partículas virales se encuentran en un alto flujo de equilibrio, similar al de la carga viral plasmática, más que ser un reservorio relativamente estático como habían defendido algunos autores (75).

Este gran pool de CDF asociadas al virus parece que se establece extremadamente temprano, dentro de las primeras semanas de la infección, y no como resultado de un desarrollo gradual (283). La rapidez con que se establece el pool de las células dendríticas foliculares y el de las células latentes infectadas en los estadios iniciales de la infección por VIH-1 (284) indican la dificultad en eliminar el VIH-1 incluso si el TARGA se inicia en el estadio más inicial de la infección. Estas afirmaciones fueron demostradas por el grupo de Paul Racz en varios estudios experimentales en modelo animal (264;285). En el primero se aplicó el Virus de Inmunodeficiencia Símica (VIS) en las amígdalas de macacos y se comprobó que primariamente se afectaban los linfocitos T CD4+ y que en pocos días se expandía por diversos órganos (285). El segundo estudio demostró que la infección era principalmente en los linfocitos T

CD4+ ya en el portal de entrada pero que no solo lo hacía en los linfocitos activados y proliferantes sino que también se infectaban, sorprendentemente, los linfocitos T en reposo. La mayoría de estas células en reposo persistían con la infección después del tratamiento antirretroviral (264).

Tenner-Racz y cols. (104), en un estudio sobre pacientes con una sustancial historia de infección (de 1 a 6 años), encontraron una ausencia de pérdida de células dendríticas foliculares a pesar de la presencia de ARN de VIH-1 y proteína p24 por lo que sugirieron que la infección por VIH-1 per se no daña las células dendríticas foliculares. Ellos propusieron que posiblemente la pérdida de linfocitos T CD4+ era la responsable de la alteración funcional de las células dendríticas foliculares.

### **6.3.3. Producción de células infectadas**

La frecuencia de producción de células infectadas varía entre  $10^7$  y  $10^8$  células con una media de acerca 50-100 copias de ARN viral por célula.

### **6.3.4. Producción total de virus en el tejido linfático**

A pesar de los niveles bajos de ARN viral en las células infectadas in vivo, el virus que producen estas células en el tejido linfático es suficiente para explicar la producción del total del virus en el cuerpo. La producción total del cuerpo se estimó primero entre  $10^9$  y  $10^{10}$  viriones a partir del clearance diario del virus en la sangre periférica, y extrapolarse al total de fluidos extracelulares (83;286). Una estimación similar de la producción total diaria de virus se obtuvo de la medición directa de la población de células infectadas en el tejido linfático y la estimación de

virus por célula (21;220), apoyando la conclusión que el tejido linfático es el principal lugar de producción de virus.

### **6.3.5. El tejido linfático como reservorio y la infección productiva de las células huésped**

Durante el curso de la infección, desde el estado latente hasta el SIDA, el tejido linfático es un reservorio importante del virus y de las células infectadas por el VIH-1. Tras la inoculación, el virus se disemina rápidamente por el tejido linfático (271;275). Durante la primera y segunda semana de la infección existe un aumento explosivo de linfocitos T CD4+ en el bazo y los nódulos linfáticos. En las teorías más recientes, los adultos infectados con VIH-1 perderían la mayoría de los linfocitos T CD4+ alrededor de tercera semana de la infección y ocurriría en sólo unos pocos días. La acción directa del virus sobre los linfocitos T CD4+, la apoptosis inducida por el mismo (287) y la muerte celular de los linfocitos activados en los primeros días de la infección provocan una depleción importante en las mucosas como lo han demostrado estudios recientes en animales (288;289). La persona infectada se encuentra profundamente linfopénica pero selectivamente; el grupo que más se afecta es el de los linfocitos T CD4+ memoria (271;287-290). Este hecho no se refleja en los recuentos de linfocitos T CD4+ en sangre periférica.

En los estadios tardíos, el tejido linfático es todavía un reservorio principal, con una correlación entre el tamaño de la población de células infectadas y el SIDA (275). En los periodos preterminales de la infección en los que los linfocitos T CD4+ han sido gravemente deplecionados, los macrófagos pueden convertirse en una importante fuente de VIH-1 (270), y también puede replicarse en los sincitios de células dendríticas e incluso en las células linfocitales de amígdalas y adenoides (267;291). No obstante, la frecuencia de células dendríticas infectadas en bazo (292) y

otros tejidos linfáticos es de 10 a 100 veces menos que la infección de linfocitos T CD4+.

El ADN del VIH-1 también se ha detectado en los linfocitos T CD8+ en la circulación en los últimos estadios de la infección. Los linfocitos T CD8+ pueden ser los progenitores de los linfocitos T CD4+/CD8+ infectados en el timo (293), o linfocitos T CD8+ activados que son infectados cuando regulan la expresión de CD4+ (294;295). No se conoce totalmente la contribución de estas otras células huésped a la producción de virus. Lo que sí conocemos es que la infección de linfocitos T CD4+ predomina sobre la mayor parte de la infección y que el reservorio en los tejidos linfáticos se desarrolla rápidamente y permanece el lugar principal donde el virus se replica y almacena (75).

### **6.3.6. Relación entre las células y el virus en los tejidos linfáticos**

La producción de virus puede atribuirse, en su mayor parte, por la infección de una pequeña población de linfocitos T CD4+ con menores contribuciones por parte de macrófagos infectados. Estas poblaciones se encuentran en la región paracortical, pero células infectadas también se encuentran frecuentemente en los centros germinales (21).

Las células dendríticas foliculares actúan como almacén para el VIH-1. En ellas el antígeno puede almacenarse y procesarse para inducir y mantener la memoria inmunológica y la producción de anticuerpos específicos (296;297). El virus con complemento o inmunocomplejos con anticuerpo y complemento se unen a la membrana de las células dendríticas foliculares al interaccionar con el receptor para la fracción C3 del complemento (298;299). Estudios recientes apoyan que el VIH-1 no se replica en estas células (194;300) pero, sin embargo, tienen la remarcable habilidad de restaurar la infectividad al VIH unido a anticuerpo neutralizante (301). Por lo tanto, el pool de virus almacenados en las

células dendríticas foliculares son otra vía por la que el virus puede evitar las defensas inmunes y suponen otro obstáculo para su erradicación porque el TARGA no afecta a los virus producidos antes de que se inicie el tratamiento (75).

#### **6.4. DEMOGRAFÍA Y DINÁMICA DE LAS CÉLULAS INFECTADAS Y SUS INTERACCIONES CON LOS VIRUS EN EL TEJIDO LINFÁTICO**

A pesar de que los valores en sangre periférica son un reflejo de lo sucedido en el tejido linfático, puede haber discrepancias entre ambos compartimentos debido a que las células T en la circulación sanguínea sólo representan el 1-2% de la cantidad total del cuerpo.

Las población de células con mayor interés para estudiar en la infección por el VIH-1, tanto en tejido linfático como en sangre periférica, son los linfocitos CD4+, pero también es importante el conocimiento de la dinámica de otras subpoblaciones como son los linfocitos CD8+, linfocitos memoria (CD45RO+), vírgenes (CD45RA+), vírgenes proliferantes (CD45RA+ Ki67+), linfocitos B (CD20+) y los citotóxicos (CD8+ granzima B+).

##### **6.4.1. Linfocitos CD4+ y CD8+ y su relación con la carga viral**

En las fases iniciales de la infección se evidencian unos niveles bajos de linfocitos T CD4+ y altos de CD8+, y consecuentemente una disminución de la razón entre CD4+ y CD8+ tanto en sangre como en las áreas interfoliculares del tejido linfático. Esto refleja la gran reducción de los linfocitos T en tejido linfáticos debido a la destrucción inducida por el virus o a una maduración alterada de linfocitos T CD4+ por el timo (302;303).

Algunos autores han correlacionado de forma negativa la CVP con los linfocitos T CD4+ y de forma positiva con los linfocitos T CD8+ en sangre (80;279;280). Los pacientes que tienen niveles indetectables de CVP versus aquellos con CVP detectable después del tratamiento presentan un patrón de recuperación del sistema inmune en sangre periférica diferente (11;78). Queda pendiente de estudiar si ocurre lo mismo entre los pacientes con niveles indetectables de CVTL frente a los pacientes con niveles detectables de CVTL, aunque algunos autores han defendido que existe una dinámica y redistribución de las subpoblaciones de linfocitos diferente entre la sangre periférica y el tejido linfático (18).

Nokta y cols. (19) encontraron en un estudio comparativo entre sangre y ganglios linfáticos que la carga viral celular fue mayor en los tejidos linfáticos que en sangre periférica, lo que coincide con otros estudios previos (18;121;213). También observaron que el porcentaje de linfocitos T CD4+ era mayor en tejido linfático que en sangre periférica. Esto podría explicar la mayor carga viral observada en los ganglios linfáticos versus en sangre periférica (18;121;213).

En líneas generales, la supresión de la replicación del VIH-1 después de un año de TARGA en las fases iniciales de la infección crónica por el VIH-1 resulta en un sustancial aumento en el número de linfocitos T CD4+ y una disminución del número de linfocitos T CD8+ tanto en tejido linfático como en sangre periférica (78).

Los cambios que se producen con TARGA provocan un aumento significativo de la razón CD4+/CD8+. Esta ratio CD4+/CD8+ resulta mayor en tejido linfático que en sangre periférica, como ya se había descrito mediante citometría de flujo en ganglios linfoides (19;304) y en tejido amigdalario (19). Nokta y cols. (19) demostraron que existe una correlación positiva entre la ratio CD4+/CD8+ entre la sangre y el tejido linfático. Estos resultados sugieren que la distribución de linfocitos T CD4+ y CD8+ en tejido linfático y sangre periférica está en un equilibrio constante. Esto implica que las alteraciones en la composición de las subpoblaciones de

linfocitos T, debidas a apoptosis o regeneración, probablemente afecta la homeostasis de las otras subpoblaciones sistemáticamente. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que profundicen sobre esta relación, tanto antes como después del tratamiento, para comprobar si dicha relación indica que los perfiles de linfocitos T y sus subpoblaciones en tejido linfático pueden ser deducidas a partir de las distribuciones en sangre periférica como defienden Nokta y cols. (19).

### **6.4.2. Demografía de los linfocitos T CD4+ en la infección por el VIH-1**

Como ya hemos comentado en el punto anterior, el estudio de la dinámica de los linfocitos T CD4+ es uno de los puntos más importante para conocer la inmunopatogénesis de la infección por el VIH-1.

La dinámica celular asociada al VIH-1 se puede estudiar evaluando los diferentes efectos conocidos del virus sobre los linfocitos T CD4+ y cuantificar la contribución real de cada mecanismo en la inmunopatogénesis en diferentes estadios clínicos o intentar estudiarla mediante métodos reproducibles que estimen las tasas de recambio linfocitario en pacientes infectados por el VIH-1 y compararlas con las tasas en pacientes controles no infectados.

Es difícil conocer si el descenso gradual de linfocitos T CD4+ observado en estos pacientes está relacionado con el aumento de la destrucción (ej. por citopatocidad directa o apoptosis espontánea) o por el descenso de la producción de los linfocitos (262). El establecimiento del pool de linfocitos T se inicia con la migración de los precursores linfocitarios pluripotenciales desde la médula ósea fetal hasta el timo para su maduración y la adquisición de la habilidad para reconocer antígenos específicos antes de migrar a los órganos linfáticos secundarios. Las noxas que sufre el timo podrían influir en la formación de los linfocitos. El bazo también tiene un papel en la inmunopatogénesis del

VIH aunque no está totalmente aclarado. Después de una esplenectomía se ha observado un aumento brusco del número de linfocitos T CD4+ circulantes que se encontraban secuestrados en el bazo (305) e incluso se había especulado con que podría mejorar el curso de la enfermedad por VIH (306).

Una hipótesis de la patogénesis del VIH deriva de la suposición que las pérdidas de linfocitos T CD4+ en el prolongado curso de la infección se equilibra casi con la producción diaria de nuevos linfocitos T CD4+ no infectados (83). El efecto citopático se concentra en los linfocitos T CD4+ maduros activados por lo que adquiere mayor importancia conocer como se mantiene un número de linfocitos T CD4+ en la circulación en un ambiente de continuo recambio (262). Si la fuente de aportación fuese sólo la proliferación desde los pools de linfocitos T periféricos no sería capaz de desarrollar respuestas inmunes eficientes a nuevos patógenos ni de reemplazar los linfocitos específicos del VIH que aparentemente se pierden durante la infección inicial (262).

Los linfocitos T son células de vida media larga que no son constantemente recambiadas como otras células sanguíneas (307-310). Con la edad el timo y su capacidad para la proliferación de linfocitos T vírgenes disminuyen, lo que apoya la hipótesis de que la mayoría de los linfocitos T en el adulto representan células originales del timo fetal o células derivadas de ellas (262). Aunque en algunos pacientes se observa una hipertrofia del timo en el curso de la infección (311), en las autopsias de pacientes adultos con SIDA no se ha demostrado una timopoyesis significativa (312).

En cuanto a la activación y proliferación de los linfocitos T CD4+ hay datos contradictorios. La mayoría del aumento de los pools de los linfocitos T es en las poblaciones de CD4+ y, especialmente CD8+ (313). Este recambio puede reflejar la proliferación clonal de linfocitos T preexistentes más que la producción de nuevos linfocitos como respuesta homeostática a la depleción (262).

#### **6.4.2.1. Infección de las células CD4+ en los estadios iniciales**

Hay múltiples factores que actúan conjuntamente para contribuir a la patogénesis de la infección por el VIH-1 y que provoca un profundo inmunocompromiso. La creencia actual es que el VIH-1 atraviesa la barrera mucosa gracias a la infección de las células dendríticas o los macrófagos (263). Estas células transmiten la infección al tejido linfático donde se infectan los linfocitos T CD4+. Al principio parecía simple explicar cómo el VIH-1 producía la enfermedad al encontrarse concentraciones altas del virus en plasma y en linfocitos T CD4+ de los ganglios linfáticos y encontrar además que el número de linfocitos T CD4+ descendía. En la fase aguda de la infección ocurre un pequeño descenso de los linfocitos T CD4+, mientras que la gran disminución ocurre en la fase crónica de la infección. Por lo tanto, parecería sensato atribuir gran parte de la inmunosupresión a la infección directa y posterior muerte de estas células. Pero, en la realidad, existe controversia sobre los tipos de células en las que el virus se replica inicialmente y en el tiempo de la infección de los linfocitos CD4+. Algunos estudios recientes creen que la infección productiva de los linfocitos T CD4+ desde muy al principio juega un papel primordial en favorecer la infección y dirige el proceso patológico que resulta en la depleción inmune (75;273). Una hipótesis reciente presentada por Branchley y cols. (273) defiende que la infección destruye rápidamente la mayoría de los linfocitos T CD4+ en las superficies mucosas y genera una gran inmunodeficiencia después de la fase aguda, en particular la capacidad para controlar los patógenos potenciales en la superficie de las mucosas y provoca una gran entrada de bacterias desde el lumen intestinal. Las bacterias y sus componentes estimulan el sistema inmune de forma continuada. La persistente activación y muerte fisiológica drenaría lentamente los pools de linfocitos T memoria y vírgenes (274). Irónicamente, la misma activación inmune es la que

mantiene la competencia inmune proporcionando nuevos linfocitos al disminuido pool de linfocitos T CD4+ memoria, es decir la destrucción inicial de linfocitos T CD4+ en las mucosas no se refleja en sangre periférica.

Por otra parte, la activación inmune provoca la estimulación y la expansión de los linfocitos T CD4+ y CD8+, lo que crea más dianas para la infección directa de los linfocitos T CD4+ y provocando mayor fibrosis en los ganglios. El proceso fibrótico lleva a un daño arquitectural que limita la capacidad de los ganglios linfáticos para contribuir en la homeostasis normal de los linfocitos. Este fenómeno, junto con la retención de los linfocitos T en los ganglios linfáticos, limita la capacidad regenerativa y la liberación de los linfocitos T CD4+ hacia las superficies mucosas. Los linfocitos T CD4+ que migran a la mucosas o proliferan allí se convierten en dianas para la infección directa en cualquiera de los estadios de la enfermedad e iniciando el ciclo de nuevo. Esta teoría ha sido comprobada en estudios con infección aguda por VIS en macacos rhesus en los que se observó que la estimulación crónica puede provocar una inmunodeficiencia (271).

Esta teoría que resalta la importancia de la rápida depleción de linfocitos T CD4+ especialmente en las mucosas permitiría explicar porque es tan difícil identificar correlaciones inmunes coherentes de la progresión de la enfermedad en estudios que examinan los linfocitos en sangre periférica y por tanto incrementa la importancia del estudio en profundidad del tejido linfático desde las primeras fases de la infección.(314).

#### **6.4.2.2. Redistribución de los linfocitos T CD4+ en la infección crónica por VIH-1**

El estado crónico de activación inmune durante la infección por el VIH-1 se acompaña de un aumento en las tasas de proliferación (315) y apoptosis de los linfocitos T CD4+ en sangre (316-319) y tejidos linfáticos (320). Como ya hemos comentado estos procesos colaboran en la caída de los niveles de linfocitos T CD4+ a lo largo de la infección. En los últimos estadios de la infección por el VIH-1 (niveles < 200 linfocitos T CD4+/mm<sup>3</sup>) hay pocos linfocitos T CD4+ en sangre versus el tejido linfático (1%/99%) a diferencia con los controles seronegativos (2%/98%); y el número total de linfocitos T CD4+ en tejido linfático es relativamente mayor de lo que debería ser por la gran reducción proporcional que hay en sangre en la infección por el VIH-1 (255). Esto sugiere un tráfico alterado de linfocitos T CD4+ en los estados crónicamente asociados a la infección que explicaría los bajos niveles en sangre, además de explicar los efectos inmediatos del tratamiento en los niveles de linfocitos T CD4+ en sangre (100). Después del TARGA, los niveles de linfocitos T CD4+ aumentan a una tasa alrededor de 10<sup>9</sup> células/día tanto en sangre como tejido linfático (100;255) comparable con la estimación del recambio de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica (83;118). La mayoría son del subgrupo memoria RO+ (95;100;255) aunque pronto llegan a un límite y entonces se incrementa significativamente el subgrupo virgen RA+ en sangre (100;321) y tejido linfático (255). En tejido linfático, alrededor del 70% del aumento total de linfocitos T CD4+ desde 10<sup>11</sup> a 1,2 x 10<sup>11</sup> después de 6 meses de tratamiento se debe al aumento de subgrupo de CD4+RA+ (255). Estos hallazgos apoyan un modelo de repoblación en el que los linfocitos T CD4+ maduros en los estadios iniciales después del tratamiento se redistribuyen rápidamente, puede que desde el intestino, pulmón u otros compartimentos tisulares, y serían la causa

del aumento de los niveles de linfocitos T CD4+ en sangre y tejido linfático (75;100).

Los aumentos de la subpoblación de CD45RA+ de los linfocitos T CD4+ después de 6 meses de tratamiento es similar a la que tienen adultos jóvenes después de quimioterapia intensiva por cáncer (322) y ello es consistente con la conclusión que, incluso en estadios relativamente tardíos de la infección, el sistema inmune mantiene la capacidad de renovar esta subpoblación. Estos mecanismos de renovación de esta subpoblación son, en su mayoría, especulativos por ahora debido a que estos estudios tienen la limitación de que son sólo posibles en pequeñas muestras de tejidos (255).

#### **6.4.2.3. Proliferación, apoptosis e infección activa**

**Proliferación.** El aumento inicial de linfocitos T CD4+ en tejido linfático o sangre no se debe a un cambio en el balance entre la división celular y la muerte de las células ya que las células proliferantes disminuyen. Mediciones recientes de los linfocitos T CD4+ proliferantes en el tejido linfático (255) estiman que en un adulto normal del 0,4% al 0,5% de los linfocitos T CD4+ son Ki67+ (marcador de proliferación). En los estadios iniciales de la infección por VIH-1, la población de linfocitos T CD4+ Ki67+ antes del tratamiento es equivalente a la de los controles seronegativos pero aumenta después de seis meses de tratamiento. En los estadios finales de la infección, encontramos un incremento de tres veces los valores de linfocitos T CD4+ Ki67+ antes del tratamiento, y estos niveles disminuyen hasta la normalidad después de 6 meses de TARGA (255;255). Es muy difícil predecir la proporción real de linfocitos T CD4+ proliferantes en los tejidos linfáticos a partir de la proporción en sangre debido a la alteración de la migración de linfocitos en el estado de activación crónica inducida por la infección, aunque algunos estudios

(255) han demostrado que existe un aumento de linfocitos T CD4+ proliferantes tres veces mayor en amígdalas y en ganglios linfáticos en pacientes con infección por el VIH-1 en comparación con individuos controles no infectados y que están de acuerdo con determinaciones previas en sangre de aumentos de la proliferación de tres veces (315).

**Apoptosis.** La apoptosis también aumenta como han demostrado tanto nuestro grupo (16) como otros autores (255). Según Zhang y cols. (255) existe un goteo lento debido a pequeñas diferencias crónicas entre la proliferación y la apoptosis, más que una depleción inmune por agotamiento de la capacidad proliferativa como defienden otros autores (83). Además la proporción de linfocitos T CD4+ en los estadios tardíos de la apoptosis (TUNEL+) en tejido linfático es dos veces mayor en individuos infectados por el VIH-1 que en controles normales (255). El aumento de la apoptosis en los pools de linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos B en tejido linfático infectado por el VIH-1 es proporcional al grado de activación (320). Parte del aumento de la apoptosis en la población de linfocitos T CD4+ se debe a la unión de CD4+ con gp120 liberadas por células infectadas (323;324). Este mecanismo se une a las pérdidas debidas a la infección activa. El tamaño exacto de la población de estas células apoptóticas que son eliminadas es desconocida porque muchas células son fagocitadas en las primeras fases de la muerte celular y por tanto no pueden ser reconocidas como linfocitos T CD4+ TUNEL+ (75). Después de 6 meses de tratamiento, la fracción de linfocitos T CD4+ proliferantes cae a niveles normales en paralelo con la reducción de viriones en tejido linfáticos del 99.9% (255). La elevación continua de la proporción de linfocitos T CD4+ TUNEL+ en el contexto de una proliferación disminuida y un aumento de linfocitos T CD4+ es controvertida pero según Zhang y cols. (255) es compatible con una disminución en la tasa de eliminación de las células en estadios tempranos de apoptosis.

### **6.4.3. Demografía y dinámica de los linfocitos T vírgenes y memoria y su relación con la carga viral en tejido amigdalal y plasma**

El conocimiento de la relación de la dinámica de las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y memoria y su relación con la carga viral del tejido linfático y de la sangre antes y después del tratamiento es de suma importancia para conocer la fisiopatología de la infección por el VIH.

La afectación central de la enfermedad provocada por el VIH-1 es la infección y depleción continua de los linfocitos T CD4+. Inicialmente, el VIH-1 afecta preferentemente los linfocitos T CD4+ memoria, lo que compromete la respuesta inmune (19). Estos individuos inmunocomprometidos experimentan una pérdida importante del número absoluto de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ y por tanto también de linfocitos vírgenes (85), una restricción del repertorio de linfocitos T y una pérdida de la función memoria o efectora (325).

#### **6.4.3.1. Importancia de las subpoblaciones vírgenes y memoria**

Cuando los linfocitos T CD4+ y los CD8+ están fisiológicamente maduros emigran desde el timo y expresan un isotipo específico de la familia CD45, el antígeno CD45RA (326). Estas células son inicialmente inmunológicamente vírgenes. Después del contacto con un antígeno en la periferia se convierten en un fenotipo CD45RO+ característico de los linfocitos T memoria (327). La proporción de células vírgenes en el recién nacido sano es de >90% y decrece con la edad hasta el 40-50% en adultos (328;329). Los linfocitos T CD4+ vírgenes se caracterizan más funcionalmente por la coexpresión de la isoforma CD45RA más la L-selectina (CD62L). La última facilita la entrada en los ganglios linfáticos a

través de las vénulas endoteliales (330;331). Estas células no expresan CD45RO y sólo pobremente el CD11a (332;333).

Las células vírgenes y memoria producen citocinas inmunoreguladoras que están muy influenciadas por las condiciones microambientales (19). La interleucina-2 es generalmente hecha por las células vírgenes (334), las cuales, con la presentación del antígeno adecuado, pueden desarrollarse en células T memoria/efectoras que producen interferón- $\gamma$  o interleucina-4 (335-337). Las células que producen el interferón- $\gamma$  alteran la capacidad de producir interleucina-2. Por lo tanto, el balance entre los linfocitos T vírgenes y memoria es crucial para mantener una respuesta inmune eficiente (19).

En contraste con lo observado en pacientes con enfermedad avanzada (94-100), los pacientes con infección temprana por el VIH-1 muestran pocas alteraciones en el compartimiento de células vírgenes/memoria (78). Antes del tratamiento, el porcentaje de linfocitos T CD4+ con fenotipos virgen o memoria, así como el número total de linfocitos T CD4+ vírgenes es similar a los pacientes sin infección; sin embargo el número total de linfocitos T CD4+ está reducido. Cuando avanza la infección por el VIH-1, los niveles de linfocitos T CD45RA+ y de los CD45RO+ decrecen. Los adultos infectados inicialmente muestran una pérdida selectiva de los linfocitos T memoria (338;339), y como existe un decrecimiento de los niveles absolutos de linfocitos T CD4+ a  $< 400/\text{mm}^3$ , los linfocitos T CD4+ CD45RA+ también disminuyen (340;341). En los últimos estadios de la enfermedad hay una caída desproporcionadamente grande de linfocitos T vírgenes CD4+ CD45RA+ en tejido linfático (255). No obstante, en un estudio más reciente en el que se compararon los marcadores de la activación celular entre pacientes en diferente fase de la infección del VIH-1, se observó una pérdida progresiva balanceada de ambos tipos de linfocitos, vírgenes y memoria (342).

Por lo comentado hasta aquí podemos comprender porque en la recuperación de la respuesta inmune tiene una gran importancia la

regeneración de las subpoblaciones vírgenes y memoria de los linfocitos T. Esto hace primordial la comprensión del papel de los linfocitos T memoria y vírgenes, tanto de los CD4+ como de los CD8+, en la inmunopatogénesis y la dinámica de sus pérdidas y regeneraciones en sangre y tejidos linfáticos y su relación con la carga viral en ambos compartimentos.

#### **6.4.3.2. Distribución de los linfocitos vírgenes y memoria**

Nokta y cols. (19) demostraron que la distribución de los linfocitos T y de sus subpoblaciones difieren entre la sangre periférica y los ganglios linfáticos de los pacientes infectados por el VIH-1. A pesar de esta diferencia, parece haber una relación y un equilibrio entre ellos. Más aún, las razones vírgenes/memoria, tanto de los linfocitos T CD4+ como de los CD8+, en sangre periférica y tejido linfático se correlacionan entre ellas. Esto implica que las alteraciones en la composición de las subpoblaciones de linfocitos T, debidas a la apoptosis o regeneración afecta probablemente a la homeostasis de las otras subpoblaciones sistemáticamente. La relación observada indica que los niveles de linfocitos T y sus subpoblaciones en tejido linfático pueden estar influidos por las distribuciones en sangre periférica (19).

Nokta y cols. (19) también demostraron que la carga viral celular está inversamente correlacionada con la razón entre las células vírgenes y memoria tanto en sangre como en tejido linfático. La asociación de células vírgenes y memoria con el patrón de carga viral celular y la diferente susceptibilidad a la infección de ambas subpoblaciones (325) sugieren que la recuperación de la regeneración de las subpoblaciones vírgenes y memoria podría estar afectada por la cantidad de virus en estas localizaciones. El hallazgo de que la razón vírgenes/memoria se halla correlacionado con niveles mayores de linfocitos T CD4+ y más

bajos de ARN viral en plasma y en células (19) puede indicar que esta razón refleja el estado inmune y, posiblemente predecir la progresión de la enfermedad.

La razón entre células vírgenes y memoria es importante para mantener el equilibrio entre las funciones de ambas poblaciones las cuales son necesarias para una respuesta inmune eficiente y para la supresión de la replicación del VIH-1. Esto se apoya por el hecho de que la razón virgen/memoria se correlaciona linealmente con las respuestas proliferativas a antígenos específicos (19). Los pacientes con razones mayores entre linfocitos T CD4+ vírgenes y memoria mostraron una respuesta más robusta al antígeno del CMV y tuvieron mayores niveles de linfocitos T CD4+ absolutos que los pacientes con razones menores.

En conclusión, los linfocitos T CD4+ y sus subpoblaciones en sangre periférica y tejidos linfáticos están en equilibrio. Los valores en sangre periférica reflejan los hechos en los tejidos linfáticos según los estudios de Nokta y cols. (19), aunque queda por comprobar en los diferentes estadios de la enfermedad y en los diferentes tipos de tejido linfático. En adición, la razón de los linfocitos T vírgenes y memoria se correlacionan con los marcadores de la enfermedad por VIH-1 y la respuesta inmunogénica a antígenos. La razón vírgenes/memoria en sangre periférica parece reflejar el microambiente en ganglios linfáticos y puede potencialmente usarse como marcador de la eficacia del tratamiento y de la reconstitución inmune (19).

### **6.4.3.3. *Influencia del tratamiento en los niveles de linfocitos vírgenes y memoria***

El tratamiento con TARGA produce una recuperación de la respuesta inmune, la cual depende de la regeneración de las células T CD4+ vírgenes y memoria.

En las primeras semanas después de iniciar el tratamiento hay un aumento de la liberación de células memoria desde los tejidos linfáticos a sangre periférica (18), pero después hay un aumento de estas células en ambos compartimentos debido al descenso de la proliferación y muerte de los linfocitos CD4+ (223;224;230).

El tratamiento con TARGA también produce un aumento de nuevas células vírgenes, en sangre y tejido linfático, debido, posiblemente, a un incremento en la producción tímica (230-232), y/o una expansión en sangre periférica de las células vírgenes (312). La población virgen de CD4+ en tejido linfático aumenta a una velocidad lenta de unos  $8 \times 10^7$  células/día (100;255;255). Después de 12-14 meses de supresión de la infección activa con TARGA, la proporción de linfocitos T CD4+ CD45RA+ se ha recuperado hasta la mitad de los niveles normales (255). En sangre periférica, los linfocitos T CD4+ vírgenes también aumentan lentamente pero sólo después de varios meses de tratamiento (95). Las alteraciones en los niveles de linfocitos T CD4+ en los estadios tardíos de la infección persisten generalmente como mínimo durante seis meses de tratamiento (81), a pesar de que está descrita una leve normalización temprana (96).

Nokta y cols. (19) demostraron que los linfocitos T CD4+ y sus subpoblaciones virgen y memoria en sangre periférica y tejido linfático ganglionar están en equilibrio y que la razón entre las células vírgenes y memoria en sangre periférica refleja el microambiente linfático y puede potencialmente usarse como un marcador para valorar la eficacia del tratamiento o de la reconstitución inmune. Sin embargo, creemos que antes de considerar útil esta relación como marcador debe ampliarse su estudio en diferentes fases de la infección y el tratamiento, diferentes tipos de tejido y con un mayor número de pacientes.

#### **6.4.3.4. Aumento de la razón virgen/memoria con el tratamiento**

Con el TARGA, a pesar de que los niveles absolutos de linfocitos T vírgenes y memoria aumentan al aumentar los niveles de linfocitos T CD4+, el aumento de las células vírgenes es mayor que el de las memoria, lo que influye en la razón vírgenes/memoria. Existe un aumento de la razón virgen/memoria y puede ser el resultado de un aumento de la producción tímica y/o una expansión de los linfocitos T vírgenes o la destrucción de los linfocitos T memoria.

**Linfocitos T CD4+ vírgenes.** El aumento de la razón es improbable que sea por la caída de los linfocitos T memoria ya que Nokta y cols. (19) observaron un aumento de células memoria, las cuales también se correlacionaron positivamente con los niveles de linfocitos T CD4+ y negativamente con la CVP. Por tanto, el aumento de la razón es consistente con un aumento lineal en la subpoblación de células vírgenes por repoblación de los linfocitos T CD4+ vírgenes por timopoyesis u otros mecanismos periféricos como una expansión periférica de los linfocitos vírgenes sin cambio fenotípico o a una disminución del recambio celular (343;344).

El aumento de los linfocitos T CD4+ vírgenes asociado con la reducción de la carga viral podría ser también debido al resultado de una activación inmune menor. Mientras que altos niveles de activación provocados por el antígeno podrían provocar un descenso del pool de células vírgenes a causa de sus altos niveles de diferenciación a células memoria o efectoras, a medida que el estímulo antigénico disminuye con el tratamiento podría haber una conversión de linfocitos T CD4+ CD45RO+ a CD4+ CD45RA+. Tal proceso de conversión ha sido documentado, aunque sobre un periodo largo de tiempo (3.5 años) (345), y por el mismo es difícil que sea la causa del aumento del número total de linfocitos T CD4+ y del número total de la subpoblación CD45RA+ (255).

**Linfocitos T CD4+ memoria.** La mayor eficacia de la terapia triple para aumentar los linfocitos T CD4+ memoria en sangre y tejido linfático puede ser un reflejo de la mayor eficacia para suprimir la replicación del VIH-1 en los tejidos linfáticos. De hecho, la reducción de la carga de VIH en los tejidos linfáticos periféricos después de TARGA en pacientes con infección avanzada permite la redistribución de los linfocitos T CD4+ memoria hacia la sangre, lo que provoca un rápido aumento de linfocitos T CD4+ en estos pacientes tras tratamiento (95-100). Sin embargo, en pacientes con estadios iniciales de la infección tratados con TARGA durante 3 meses hay una proliferación de los linfocitos T CD4+ memoria intrafoliculares, a pesar de que el ARN del VIH es indetectable (104). Por lo tanto, tanto la redistribución como la regeneración en periferia de los linfocitos T CD4+ memoria influyen en el aumento de las células memoria circulantes observados en los pacientes con infección reciente y tratados con TARGA.

**Linfocitos T CD8+ vírgenes y memoria.** El aumento de los linfocitos T CD8+ memoria y vírgenes refleja un estado de activación del sistema inmune. Como se ha explicado anteriormente, un aumento del porcentaje de CD8+CD38+ (marcador de activación) en sangre podría usarse como un predictor temprano de la pérdida de los linfocitos T CD4+ (105). Después de 12 meses de tratamiento, las células memoria CD8+ en sangre y tejido linfático disminuyeron significativamente y en sangre alcanzaron valores casi normales. No obstante, el porcentaje de CD8+ con fenotipo virgen estaba reducido a pesar de que el número absoluto estaba aumentado. Aunque después de 12 meses de terapia los valores de los linfocitos T CD8+ disminuyen, todavía permanece más alto que en pacientes no infectados (78).

#### **6.4.4. Subpoblaciones de los linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH-1**

Como ya hemos comentado anteriormente, en las fases iniciales de la infección se evidencian unos niveles bajos de linfocitos T CD4+ y altos de CD8+, y consecuentemente una disminución de la razón entre CD4+ y CD8+ tanto en sangre como en las áreas interfoliculares del tejido linfático. Con el TARGA se observa una recuperación de los niveles con un aumento de los linfocitos T CD4+ y un descenso de los linfocitos T CD8+. De estos últimos interesa estudiar también algunas de sus subpoblaciones con relevancia especial como son los linfocitos T CD8+ CD38+, los CD8+ CD28+ y los CD8+ citotóxicos.

##### **6.4.4.1. Linfocitos CD8+CD38+**

La infección por el VIH-1 provoca un sufrimiento continuo del sistema inmune y un daño progresivo. Estos pacientes tienen un aumento de la expresión de CD8+ CD38+, la cual indica una activación del sistema inmune. El porcentaje de CD8+CD38+ sanguíneo ha sido descrito previamente como un predictor del riesgo de desarrollar SIDA (280) y de la tasa de descenso de los linfocitos CD4+ en sangre periférica y está correlacionado con la persistencia de replicación viral in vivo (86;87;105). Con la triple terapia, la expresión de esta subpoblación disminuye a niveles casi normales lo que implica que la reducción de la replicación viral permite cierta recuperación de la función inmune. En los casos con enfermedad avanzada se han conseguido beneficios menores (95) lo que apoya que es mejor iniciar el tratamiento en fases tempranas (11).

Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que después del tratamiento durante 12 meses con TARGA se observa un descenso en sangre periférica de los linfocitos T CD8+ y que ocurre principalmente

como resultado de la reducción de las subpoblaciones activada (CD38+) y memoria (CD45RO+) (78). Para conseguir resultados más importantes es mejor la terapia antirretroviral triple que incluso logra disminuir el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD38+). La efectividad de la terapia triple en reducir la activación de los linfocitos T es consistente con su mayor eficacia en la supresión de la replicación del VIH-1, reduciendo los niveles de ARN plasmáticos a niveles indetectables en un alto porcentaje de los pacientes (78). Otros autores han encontrado correlación entre los niveles de linfocitos T CD8+CD38+ y el ARN plasmático de VIH-1 tanto antes como después del TARGA durante 1 año, y tanto en fases iniciales (78;86) como avanzadas (95) de la infección.

#### **6.4.4.2. Linfocitos CD8+ CD28+**

Los pacientes con infección por VIH-1 tienen un descenso de la expresión de CD8+ CD28+ en los periodos iniciales de la infección y, por lo tanto, una expansión de los linfocitos T CD8+ que no expresan CD28, en las fases iniciales de la infección crónica (88). Esta reducción del CD28+ en los CD8+ ha sido asociada con una progresión de la enfermedad (94) y es otro indicador de la alteración del sistema inmune (88). Esta disminución también se ha observado en otras situaciones donde existe un estado de hiperactivación, tales como infecciones virales crónicas, enfermedades autoinmunes y en pacientes con cáncer; e incluso se ha visto como resultado del envejecimiento (101). Se cree que la ausencia del antígeno de superficie CD28 y la falta de una respuesta proliferativa en condiciones de cultivo reflejan un estadio de maduración más tardío de las células como resultado de una estimulación antigénica repetida o un aumento del número de ciclos de divisiones celulares (102).

Después del TARGA, la expresión de esta subpoblación aumenta hasta niveles casi normales (78) lo que implica que la reducción de la replicación viral permite cierta recuperación de la función inmune. Este aumento indica probablemente la presencia de nuevos linfocitos T CD8+ que expresan la molécula CD28 de novo más que una reducción en el pool de linfocitos T CD8+ viejos.

### **6.4.4.3. Linfocitos citotóxicos en tejido linfático**

Se cree que los linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica, los cuales expresan granzima B, TIA-1 y esterasa, juega un papel importante en el control de la diseminación viral (342;346). En estudios preliminares se sugirió que el nivel de actividad citotóxica específica contra el VIH-1 se correlacionaba con el estadio de la enfermedad por VIH-1 en pacientes y que la actividad citotóxica se perdía con la progresión de la enfermedad (347).

Knowles y Chadburn (229) describieron que, al igual que los linfocitos CD8+, los linfocitos citotóxicos estaban aumentados con respecto a los sujetos controles no infectados tanto en las áreas intrafoliculares como en las estructuras interfoliculares en las primeras fases de la infección y su aumento hasta los estadios tardíos de la infección por VIH-1, que según algunos autores se debe al aumento en la activación pero no al aumento de la tasa de muerte celular (224;225). Estas células se encuentran principalmente en las áreas interfoliculares pero Laman y cols. (348) demostraron que son atraídas al interior de las estructuras foliculares por un efecto quimiotáctico producido por el virus.

Existen pocos datos sobre la respuesta al TARGA de esta subpoblación y su utilidad como marcador de la infección por el VIH-1.

## **6.5. EFECTO DEL TARGA SOBRE EL VIRUS Y LAS POBLACIONES CELULARES INFECTADAS EN TEJIDO LINFÁTICO**

Los objetivos de la terapia antirretroviral son obtener una supresión de la replicación en plasma y compartimentos para evitar (211;349) el desarrollo de resistencias genotípicas a la terapia y de esta manera obtener una durabilidad de la eficacia antirretroviral, y también conseguir una recuperación de la función normal del sistema inmune que evite la progresión a SIDA o muerte en las personas infectadas con el VIH-1 (12).

Muchos de los beneficios obtenidos con el TARGA ya han sido explicados en los capítulos anteriores, en especial su influencia con algunas subpoblaciones específicas. En este apartado haremos un repaso general y profundizaremos algunos puntos no comentados todavía.

### **6.5.1. Impacto del tratamiento en los tejidos linfáticos**

La introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (TARGA) ha cambiado el pronóstico de la infección por VIH, debido a la restauración de la inmunidad que ocasiona en los pacientes (95;98).

Estudios posteriores han demostrado concluyentemente que la reducción de la carga de ARN del VIH-1 en sangre periférica y el concomitante aumento de linfocitos T CD4+ periféricos se asocian a un beneficio significativo de la supervivencia y a menos infecciones oportunistas (5;7;129). No obstante, algunos pacientes sólo experimentan un pequeño o insignificante aumento en los linfocitos T CD4+ con el inicio de la terapia, a pesar de la supresión exitosa de la viremia plasmática. A causa de la importancia del microambiente en la homeostasis de los linfocitos T, se ha hipotizado que las anomalías patológicas

persistentes en tejido linfático podrían ser las responsables de los diferentes aumentos de linfocitos T CD4+ y por eso es tan importante el análisis del tejido linfático (236).

Después de pocos meses de supresión efectiva de la replicación del virus y de la reducción de la masa antigénica en tejido linfático se produce una mejoría inmune y una resolución de algunas de las anormalidades en las poblaciones de linfocitos T CD4+ (255;315;320) e, incluso, la respuesta linfoproliferativa a antígenos específicos mejora significativamente (95;98). Los niveles de marcadores de activación inmune (tales como  $\beta$ 2-microglobulina y neopterin) y de citocinas proinflamatorias (tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , interferón  $\gamma$ , IL-1 e IL-6) disminuyen en sangre y tejidos a medida que la carga viral disminuye (18;350). La susceptibilidad de los linfocitos a la apoptosis mediada por el virus también disminuye durante la terapia (351), lo que se correlaciona con la mejoría del número de linfocitos T CD4+ y la disminución de la progresión de la enfermedad (352). La arquitectura del tejido linfático vuelve hacia la normalidad después de una terapia potente, aumentando la organización de los folículos linfáticos y la red de las células dendríticas foliculares (353). Esta mejoría inmunológica se refleja en la disminución de las infecciones oportunistas y la mortalidad asociada al SIDA (129;354).

El aumento inicial de los niveles de linfocitos cuando los pacientes inician el tratamiento antiretroviral atañe a todas las subpoblaciones (linfocitos B, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+) y no sólo a la de linfocitos T CD4+ (262). El aumento de células T CD4+ en plasma y en tejidos linfáticos en las primeras fases del tratamiento es a expensas de células memoria y no de células "vírgenes", lo que indica que primeramente tiene lugar una redistribución de las células desde otros tejidos (95;100). Esto también lo defiende Zhang (255) al observar que el aumento de linfocitos T CD4+ inicial no se acompañan con cambios significativos en la proliferación y la apoptosis. Los efectos

antiinflamatorios de la supresión de la carga viral se asocian con la disminución de la expresión de moléculas de adhesión (VCAM e ICAM) que normalmente median en la distribución de los linfocitos hacia los tejidos inflamados (18). Es posible que el aumento total de las poblaciones de linfocitos se acompañe de una disminución global de las poblaciones de linfocitos en los tejidos linfáticos después de TARGA (262).

#### **6.5.2. Cambios de la carga viral en tejido linfático y en plasma después de la terapia antirretroviral**

El TARGA consigue una reducción de la CVP a niveles casi indetectables pero sin embargo en tejido linfático no es tan efectivo (11;14;16;281). Así mediante la utilización de técnicas de PCR, diversos autores (14;195;205) encuentran niveles indetectables de CVTL cuando los niveles de CVP son inferiores a 20 copias/ml, valores similares a los descritos por otros autores que utilizan otras técnicas de cuantificación (196;220). Mediante técnicas de hibridación in situ, método que nos permite detectar partículas víricas en el seno del tejido linfático, se ha demostrado que aunque con el TARGA el nivel de replicación puede bajar hasta un 99% en ganglios linfáticos (220) es posible detectar células infectadas con la expresión vírica en la mayoría de los casos después de 6 meses de tratamiento efectivo (16;104;196). Esto nos estaría indicando que la CVP indetectable durante periodos de tiempo prolongados, mediante el uso de técnicas de PCR ultrasensibles, no siempre refleja una completa supresión del VIH-1 en tejido linfático. Según Pantaleo y cols. (281) esta replicación residual podría relacionarse con células con bajo nivel de replicación, predominantemente macrófagos y células dendríticas. Su presencia, a pesar de un tratamiento con supresión

efectiva nos podría explicar el rápido rebrote que presentan estos pacientes una vez se finaliza el tratamiento (355).

Entre los estudios que han demostrado la diferencia entre la CVTL y la CVP después de TARGA destacan, por orden cronológico los de a) Lafeuillade y cols. (14), que encuentra CVTL variables en ganglios linfáticos según el régimen de TARGA; b) un trabajo de nuestro grupo (11), realizado en tejido linfático al año de TARGA; y c) el realizado por Günthard y cols (13) que demostraron que en los ganglios linfáticos había una mayor persistencia de CV que en las secreciones genitales y líquido cefalorraquídeo a los dos años de tratamiento.

La viremia basal no es sólo el mejor predictor de la progresión de la enfermedad (5;7) sino, como demostró Rizzardì y cols. (282), también es un buen predictor del tiempo de respuesta al tratamiento antirretroviral. Además, en el mismo estudio encontraron que la CVTL y la CVP iniciales tenían una capacidad predictora del tiempo para conseguir que la viremia bajase a niveles indetectables con TARGA similares.

### **6.5.3. Recambio linfocitario en los tejidos linfáticos secundario al TARGA**

Después de varios meses de iniciar el tratamiento, suele haber un retorno gradual de células T con marcadores “vírgenes”, lo que sugiere que no sólo es una redistribución incidental de los linfocitos (262). Parece ser que se debería a un aumento de la producción celular a partir del timo residual o de órganos extratímicos, con aumento de estas células en plasma (95) y en tejidos linfáticos (255). El porcentaje de linfocitos T vírgenes que proceden de la transición de linfocitos T memoria a un estado de reposo no está claramente definido (307;308;310;345). Los estudios que han intentado resolver si el aumento de los niveles de linfocitos representa una proliferación clonal de las células periféricas o una producción tímica han mostrado conclusiones contradictorias (81;96).

Después de la supresión viral con TARGA, hay unos niveles supranormales de células emigradas desde el timo que se detectan en sangre y en tejidos linfáticos (356), lo que sugiere que los adultos con infección por el VIH mantienen alguna capacidad para producir nuevos linfocitos T con receptores específicos noveles (262).

En aquellos pacientes no tratados, la vida media de los linfocitos T disminuye sin una compensación por el aumento de la producción (230). Poco después del inicio de la terapia, la tasa de producción aumenta gradualmente (230). Experimentalmente se ha demostrado que el VIH-1 puede interferir con la producción de linfocitos T a nivel de las células progenitoras y que, incluso en adultos, el TARGA puede mejorar la capacidad para reiniciar esta actividad (357). Sin embargo, al mismo tiempo la mayor proliferación dirigida por la activación inmune puede disminuir con la terapia. Los linfocitos T vírgenes que se activan o aquellos que están en un estado transicional para convertirse en células efectoras también expresan el marcador Ki67, lo que puede provocar

fluctuaciones a corto término en la activación inmune que dificulten las conclusiones sobre el recambio global de las poblaciones de linfocitos T.

Después de 12 meses de supresión viral con TARGA, la tasa de recambio y la producción absoluta han vuelto a la normalidad (230).

En conclusión, los efectos del VIH sobre la dinámica de los linfocitos es una compleja interrelación entre el aumento de la destrucción y las interferencias con la producción. La interpretación de la dinámica celular es más complicada todavía debido a la heterogeneidad entre pacientes y entre las subpoblaciones celulares.

### ***6.5.3.1. ¿Por qué la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD45RA+ se afecta desproporcionadamente por la infección por el VIH-1 y su tratamiento?***

La infección por el VIH-1 conduce a una diferenciación y una activación de las células vírgenes y memoria. Algunas de las células activadas se convertirán en células infectadas productivas y morirán, imponiendo un adicional drenaje a un sistema inmune que antes de la infección se mantenía estable, puede que complicado por la infección y daño sobre el timo (293). El descenso documentado en la capacidad regenerativa de  $10^9$  linfocitos T CD4+ CD45RA+/día en niños hasta  $<10^8$ /día en adultos (322) es consistente con la noción que el reemplazo de los linfocitos T CD4+ por timopoyesis u otros mecanismos periféricos normalmente actúa en adultos cerca de la máxima capacidad justo para mantener las poblaciones en un sistema de mantenido. Zhang y cols. (255) llamaron a este modelo como el de la Reina Roja (Red Queen Model) por analogía de lo que le respondió dicha reina a Alicia en el libro de Lewis Carroll titulado "A través del espejo" ("corre todo lo puedas para quedarte en el mismo sitio"). El resultado neto es que el número de linfocitos T CD4+ CD45RA+ decrece a una tasa equivalente a su

representación en la población de células infectadas productivas. Cuando se realiza el tratamiento para estas pérdidas adicionales, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> pueden crecer a una tasa ajustada a la capacidad de renovación en el individuo infectado. El lugar y la eventual extensión de la repoblación será, en general, lenta y variable, dependiendo en los casos concretos del estadio de la infección, la depleción preexistente y la capacidad residual de renovación en el momento en que el tratamiento se inicia.

#### **6.5.3.2. Dos poblaciones de células infectadas son eliminadas a diferente velocidad por el TARGA**

En un estudio sobre los efectos del TARGA sobre los reservorios de tejido linfático amigdalares en pacientes sin tratamiento previo se observó que casi no se observaban células infectadas activas con  $\geq 75$  copias de ARN del VIH-1 por célula (220). Este resultado se explica porque las células infectadas que están en los estadios tardíos del ciclo vital viral tienen una concentración más alta de ARN vírico y una esperanza de vida más corta al sucumbir por los efectos citopáticos de la replicación viral. Cuando el TARGA interrumpe la propagación de la infección en el tejido linfático existe una rápida disminución del virus en sangre y en el pool de células dendríticas.

En biopsias posteriores se pueden observar aún células con  $\geq 20$  pero con  $< 75$  copias de ARN viral pero en una proporción pequeña. La disminución de las células infectadas activas en esta población es similar a la que ocurre con el virus en sangre periférica. Esto podría deberse a que la producción de virus puede seguir probablemente en macrófagos que no sucumben tan rápidamente a la infección (286) y/o a linfocitos T CD4<sup>+</sup> que están crónicamente infectados produciendo pequeñas

cantidades de virus y por lo tanto tienen una esperanza de vida más larga (220).

### **6.5.4. Efecto del TARGA sobre el pool en las células dendríticas foliculares**

Como ya hemos descrito anteriormente, el pool de VIH-1 asociado a las células dendríticas foliculares representan un estímulo persistente (21) de más de  $10^{11}$  viriones que presumiblemente conduce a unos procesos de activación, proliferación y muerte celular en tejido linfático que, junto con la pérdida de células infectadas, son directa o indirectamente responsables de la depresión inmune (315;320). Con el TARGA se esperaría que el pool de VIH-1 en las células dendríticas foliculares cambiaría lentamente como otros antígenos en un periodo de muchos meses o más, pero sorprendentemente, el nivel de ARN viral disminuye a un ritmo paralelo al de las células infectadas activas. Se consigue la disminución de la replicación y la CVTL en pacientes sin tratamiento previo a niveles casi indetectables al finalizar la tercera semana de tratamiento y al 6 mes la cantidad de VIH-1 asociado con las células dendríticas foliculares se reduce a un tercio (220).

Dos poblaciones de linfocitos T CD4+ infectadas producen el virus en los tejidos linfáticos que mantienen los niveles de virus en sangre, líquidos extracelulares y en los tejidos. Los inmunocomplejos de virus y anticuerpo se depositan en las células dendríticas foliculares, donde se procesan formando agregados de inmunocomplejos llamados iccosomas (297). Se asume que la producción del virus, su almacenaje y su liberación está en equilibrio antes del tratamiento. Después de la instauración del TARGA, las células infectadas que producen la mayoría de los virus y que tienen una esperanza de vida más corta desaparecen rápidamente, lo que se refleja en una rápida disminución del virus en la

circulación y en el pool de las células dendríticas foliculares. La tasa con la que estos niveles disminuyen es lenta debido a la producción continuada de virus por las células con una esperanza de vida más larga que no se afectan inmediatamente por el TARGA (75).

#### **6.5.5. Recuperación de los cambios histopatológicos**

Los beneficios obtenidos con el TARGA en sangre periférica deben acompañarse con beneficios en los tejidos.

##### ***6.5.5.1. Arquitectura de los ganglios linfáticos en pacientes con niveles de linfocitos T CD4+ conservados***

A pesar de un excelente estado clínico al inicio de la infección se observan alteraciones de la morfología de los ganglios linfáticos en la infección por el VIH, incluso en aquellos ganglios sin hipertrofia macroscópica (104). El microambiente de los centros germinales está alterado. Por ejemplo, hay mucho infiltrado por linfocitos T CD8+ y el antígeno CD23 está aumentado en la red de células dendríticas foliculares (104). La red de células dendríticas foliculares se expande en aquellos casos con centros germinales hiperplásicos, pero no se observa daño estructural. Esto contrasta con los estadios avanzados con hiperplasia folicular en los que se observa un deterioro de la red de células dendríticas foliculares (104).

Se conoce que los centros germinales de pacientes sin tratamiento previo contienen partículas del VIH-1, proteínas gag y ARN viral, retenidas en la superficie de las células dendríticas foliculares (358). El VIH-1 atrapado se encuentra exclusivamente en la zona clara donde las células dendríticas foliculares están activadas. Se piensa que el VIH-1 dentro de los centros germinales es responsable de alguna manera de la muerte de

células dendríticas foliculares. No obstante, Tenner-Racz y cols. (104) no encontraron pérdida de células dendríticas foliculares en sus pacientes a pesar de la presencia de ARN del VIH-1, proteína p24 y una sustancial historia de infección (entre 1 y 6 años), por lo que sugirieron que la infección por el VIH-1 por sí misma no produce un daño a las células dendríticas foliculares (104). Es posible que la pérdida de linfocitos T CD4+ provoque una alteración de la función de las células dendríticas foliculares, y en los casos de Tenner-Racz y cols. los niveles de linfocitos T CD4+ estaban conservados. Esta hipótesis está apoyada por experimentos que demuestran la necesidad de transferir linfocitos T y B para que se desarrolle las células dendríticas foliculares en monos con inmunodeficiencia combinada severa (359).

Los cambios histológicos observados en los ganglios linfáticos son similares a los descritos para la enfermedad más extensa incluyendo la linfadenopatía generalizada. La mayor diferencia es que la extensión de la hiperplasia folicular, la cual es mínima en los ganglios linfáticos no hipertrofiados (104). Por lo tanto y como mediante pruebas basadas en hibridación in situ con ARN del VIH-1 se puede demostrar que las células infectadas son también particularmente numerosas en los centros germinales (51;121;193;194;221), Tenner-Racz y cols. (104) defienden que los factores del huésped, más que los del virus en sí o los componentes virales depositados en los centros germinales, son los responsables de la hiperplasia folicular.

Las estrategias terapéuticas deben por tanto reducir estos grandes depósitos de ARN viral y de células infectadas en el tejido linfático. La CVP y la CVTL son sensibles a la triple terapia antiretroviral (104). Cavert y cols. (220) fueron de los primeros en documentar una disminución marcada del ARN viral en biopsias de amígdalas de pacientes con enfermedad avanzada que fueron tratados con combinaciones de medicamentos antiretrovirales. La mayoría de las células T productivas

infectadas en los ganglios linfáticos desaparecen en los primeros 3 meses.

#### **6.5.5.2. Proliferación de los linfocitos T CD4+ en tejido linfático**

La reconstitución inmune es un aspecto de vital importancia de la terapia y la supresión de la replicación del virus puede estar acompañada por aumentos en el número de linfocitos T CD4+ circulantes (81;83;95;97;124;350;360;361). Se ha sugerido que la expansión de los linfocitos T CD4+ es un reflejo de la proliferación celular. Por el contrario, Wolthers y cols. (361) documentaron que la redistribución celular, más que la producción de novo de los linfocitos T CD4+, es la responsable del aumento inicial de los linfocitos T memoria durante la terapia. Tenner-racz y cols. (104) demostraron una tasa de proliferación alta (marcada por el antígeno Ki-67) en los linfocitos T CD4+ en ganglios linfáticos comparada con controles no infectados que proporciona una prueba directa de que existe un recambio celular acelerado de linfocitos T CD4+ durante la infección por el VIH-1. La alta tasa de proliferación ocurre en los linfocitos CD4+ CD45RO+ intrafoliculares, mientras los centros germinativos de los sujetos control no infectados contienen muchos de esos linfocitos pero pocos en proliferación. Posiblemente la proliferación de los linfocitos T CD4+ intrafoliculares antes y después del tratamiento es conducida por inmunocomplejos de p24 VIH-1 presentados por las células dendríticas foliculares o células dendríticas del centro germinal. Está demostrado que en el mono, los linfocitos T en los centros germinales proliferan ante la estimulación antigénica (362). Tenner-Racz y cols. (104) encontraron una capacidad regenerativa periférica dentro de los centros germinales y esta debe influir en los aumentos de linfocitos T CD4+ que se observan con la triple terapia.

Con formato: Numeración y viñetas

Eliminado: (38 de tenner-racz)

Una respuesta terapéutica también puede restaurar la arquitectura del tejido linfático (229). La hiperplasia folicular se observa habitualmente en pacientes con linfadenopatía generalizada persistente. Está asociada con diferentes grados de daño en la célula dendrítica folicular y a una elevación importante de los linfocitos CD8+ tanto en la zona T-dependiente como en los centros germinales, esta última es un lugar inusual de linfocitos T CD8+.

### ***6.5.5.3. Persistencia de las anomalías en tejido linfático a pesar de tratamiento exitoso***

Schacker y cols. (236) analizaron muestras de pacientes que habían recibido TARGA y que tenían una supresión de la replicación viral al menos durante 1 año. Querían determinar el impacto del TARGA sobre la arquitectura y el tamaño de la población de linfocitos T CD4+ en tejido linfático, el principal lugar de la replicación del VIH-1. Hipotetizaron que los pacientes con carga en plasma de ARN del VIH-1 indetectable y mayores niveles de linfocitos T CD4+ en sangre periférica tendrían una arquitectura más normal, con una mayor población de linfocitos T CD4+ en tejido linfático, sugiriendo una significativa reconstitución de la función inmune. Esta hipótesis se basaba en la importancia del microambiente linfático en la homeostasis de los linfocitos T y en estudios previos que habían documentado una mejoría inmunológica asociada a la supresión de la replicación viral y al aumento de linfocitos en sangre periférica (5;7;129). Sorprendentemente Schacker y cols. (236) no encontraron una correlación exacta entre la mejoría en sangre y el estado del tejido linfático. De hecho, todos los tejidos que analizaron demostraron algún grado significativo de anormalidades histopatológicas. Mediante medidas clínicas, todos sus pacientes estaban considerados como éxitos terapéuticos en el momento de la biopsia por tener niveles de ARN del

VIH-1 en plasma <50 copias /ml., y la mayoría con niveles de linfocitos T CD4+ aumentados en comparación con el inicio del tratamiento. En conclusión, no encontraron una relación significativa o una tendencia a la restauración a la arquitectura normal.

En los casos que presentaron Schacker y cols. (236) se describió una hipoplasia folicular o una depleción al año de iniciar el tratamiento. Esta era consistente con la regeneración lenta y variable de la red de células dendríticas foliculares (353). Sin embargo, no supieron explicar porque algunos pacientes presentaron una hiperplasia folicular y una baja repoblación con linfocitos T CD4+ del tejido linfático, ni tampoco porque aquellos pacientes tenían más antígeno p24 en los folículos del tejido linfático (236). No obstante, este antígeno residual podría ser la explicación de la hiperplasia folicular, la cual estaría causada por mecanismos que interfieren con la restauración de la población interfolicular de linfocitos T CD4+ y que podrían consistir en competición por el espacio o los factores de crecimiento, activación inespecífica, aumento de la muerte celular inducida por la activación y la alteración del tráfico de linfocitos. Es posible que la replicación viral prolongada y persistente en los linfocitos T CD4+ del espacio interfolicular, junto con atentados locales al control inmunológico, causen una pérdida de la estructura tisular tal que el espacio interfolicular no sea capaz de mantener una población de linfocitos T CD4+ durante largo tiempo. También es posible que los tejidos requieran un periodo más largo de la supresión viral para remodelar y para que la población de linfocitos T CD4+ pueda ser mantenida.

En conclusión, se han observado anomalías en la estructura folicular y niveles de linfocitos T CD4+ bajos en muestras de tejido linfáticos de pacientes, que por medidas clínicas, habían sido un éxito con TARGA. Las anomalías persistentes podrían ser secundarias a una duración limitada del tratamiento o a la persistencia de replicación viral en

tejido linfático que no es detectado por medidas periféricas de la replicación viral. (236)

#### **6.5.6. Influencia de los tipos de regímenes terapéuticos**

Existe una controversia considerable sobre los regímenes terapéuticos óptimos y el momento de su inicio para el tratamiento de los pacientes infectados por el VIH-1. En particular, la opinión se divide respecto a la inclusión de inhibidores de la proteasa si se consigue la supresión con sólo análogos de los nucleósidos.

En 1996, la introducción clínica de los IP proporcionaron la primera oportunidad para demostrar un descenso significativo de la cantidad de virus detectable, tanto en sangre periférica como en tejidos linfáticos, el principal sitio de replicación y almacenaje del VIH-1 (195;220;363). Desde entonces es una práctica habitual iniciar el TARGA con combinaciones que contengan un IP y otros antiretrovirales para conseguir supresiones de la replicación viral más completas y duraderas (236).

Algunos autores defienden que el uso de los IP debe reservarse a una terapia de segunda línea en orden de conservar opciones de tratamiento subsecuentes y minimizar los efectos adversos asociados al tratamiento. Otros argumentan que la terapia óptima debe suprimir la replicación viral rápida y profundamente, usando las más potentes combinaciones disponibles. Estudios previos de nuestro grupo y de otros autores sugieren que el tratamiento debería incluir un IP porque confiere a los regímenes terapéuticos una eficacia mayor para reducir la viremia en los tejidos linfoides que aquellos regímenes con sólo inhibidores de la transcriptasa inversa (14;16;104;205;211). Nuestros estudios previos sugieren que únicamente con triple terapia (2 inhibidores de la transcriptasa asociados a un inhibidor de la proteasa) se puede obtener una supresión completa de la replicación viral en tejido linfático y, de esta

forma, extender la durabilidad de la eficacia antirretroviral (364). Además, nuestro grupo ha demostrado que es posible obtener una supresión casi completa de la replicación viral en plasma, tejido linfático y LCR después de TARGA con dos ITIAN y un IP, sin encontrar resistencias como se habían observado con doble terapia (365).

El tejido linfático proporciona un reservorio donde el VIH-1 puede persistir en una forma potencialmente viable. La infección persistente por el VIH-1 se acompaña por una disrupción progresiva de la estructura de los órganos linfáticos (229). Diferentes combinaciones de medicamentos pueden tener efectos diferentes sobre el tejido linfático y, en particular, los regímenes con IP pueden suprimir efectivamente el VIH-1 en tejido linfáticos (14;104;220;363). Sin embargo, a causa de que las células infectadas en latencia pueden persistir durante meses y años, la replicación viral puede continuar durante el tratamiento antirretroviral en varios reservorios celulares o tisulares (68;104;196;211).

Los estudios que evalúan los efectos a largo plazo del TARGA sobre la replicación en los tejidos linfáticos se basan principalmente en el ARN del VIH-1 que contiene los ganglios linfáticos (14;203). No obstante, es muy importante distinguir entre la producción activa del virus (linfocitos T CD4+ infectados productivos) y los viriones atrapados en la red de las células dendríticas foliculares (16). Algunos autores han demostrado que el tejido linfático almacena células infectadas, y en algunas de ellas hay pruebas de niveles bajos de expresión de genes virales después de un periodo de 6 meses de TARGA (104;220;363;366).

Miembros de nuestro equipo (16) demostraron que la supresión de la viremia en plasma con regímenes que contuvieran IP tiene un mayor efecto sobre los ganglios linfáticos que la que se consigue con regímenes que tienen sólo análogos de los nucleósidos, a pesar de niveles de supresión del ARN en plasma similares. Además, los regímenes que contenían un IP parecían ser más efectivos para revertir los cambios inmunopatológicos inducidos por el VIH-1 en los tejidos linfáticos. De

acuerdo con otros autores (104;363), nuestro grupo confirmó que la replicación viral a menudo continua en tejido linfáticos a pesar de viremia indetectable en plasma, como se ha determinado por pruebas ultrasensibles cuantitativas para detectar ARN por PCR (16). Con las combinaciones de inhibidores de la transcriptasa pueden conseguir la supresión del VIH-1 en plasma durante años (367) y con una mejoría significativa inmunológica en algunos pacientes pero que son menos efectivas en los que contienen un IP. Estos resultados obligan a redefinir el significado de la carga de ARN indetectable en plasma y a buscar la actividad viral en tejido linfático cuando se define la eficacia de nuevos abordajes terapéuticos (16).

Técnicas histomorfométricas publicadas previamente para cuantificar el ARN unido a las células dendríticas foliculares y los linfocitos T CD4+ infectados productivos sugieren una correlación entre la cantidad de ARN en los ganglios linfáticos y la viremia plasmática (21;104;220). Sin embargo, los resultados previos de nuestro grupo encuentran que podría no haber una correlación generalizada entre estos parámetros al encontrar un gran atrapamiento de viriones, principalmente en pacientes con tratamiento con análogos de los nucleósidos, con viremia plasmática indetectable. (16). No obstante, La ausencia de correlación en dicho estudio (16) puede estar relacionada con los diferentes abordajes terapéuticos usados (múltiples análogos de los nucleósidos versus análogos de los nucleósidos + IP regímenes). Algunos autores han encontrado también discrepancias entre la respuesta observada en sangre y aquellas vistas en ganglios linfáticos en pacientes que reciben solo análogos de los nucleósidos (14;203;363).

El impacto del TARGA es mayor en pacientes que no han iniciado ninguna terapia antirretroviral que en aquellos pacientes con múltiples tratamientos previos (16). Esta relación parece ocurrir en ganglios linfáticos después de un año de triple o cuádruple terapia. La adicción de inhibidores de la proteasa en pacientes con tratamiento antirretroviral

previo durante un prolongado periodo de tiempo puede significar una reducción del nivel de ARN plasmático (211) así como de los niveles de ARN niveles en ganglios linfáticos (14;104;363). No obstante, de acuerdo con otro trabajo, las células infectadas y la expresión viral persiste después de TARGA (220;363).

Además del ARN unido a las células dendríticas foliculares, después del TARGA, diferentes niveles de células productoras de virus fueron también detectados en algunos pacientes (16). El virus se puede aislar de células del ganglio linfático en algunos pacientes usando metodología estándar (16), pero con mejores condiciones de cultivo se puede obtener virus de todos los pacientes como han demostrado algunos investigadores (196;211). No está claro si los reservorios más estables del virus disminuyen o se eliminan después de terapia prolongada. Finzi y cols. (211) no observaron un descenso significativo en la frecuencia de linfocitos T CD4+ infectados latentes al aumentar el tiempo de TARGA. No obstante, estos datos están basados en análisis in vitro.

A pesar de una carga de ARN plasmática baja, algunos abordajes terapéuticos pueden tener como resultado una supresión incompleta de la replicación del VIH-1 en el tejido linfático permitiendo la emergencia de resistencias a drogas. Los hallazgos genotípicos junto con los ensayos de hibridación in situ indican la superioridad de los regímenes que tienen una IP en el compartimiento de los ganglios linfáticos (16).

En un estudio previo de nuestro grupo se sugirió que una supresión más completa podría estar asociada con la restauración de los cambios patológicos (16). A esta hipótesis se llegó a observar que los típicos cambios patológicos en los ganglios linfáticos asociados con la replicación son más pronunciados en pacientes que recibieron análogos de los nucleósidos solos comparados con los que recibieron regímenes con IP. En particular la hiperplasia folicular, la fragmentación folicular, la

infiltración por linfocitos T CD8+ y el daño de las células dendríticas foliculares fueron más prominentes en aquellos pacientes.

Dicho estudio (16) demostró que la viremia indetectable en plasma incluso durante periodos prolongados de tiempo puede no siempre reflejar una supresión profunda en el compartimiento linfático. También destaca las cuestiones relevantes sobre la necesidad de cambiar los tratamientos en aquellos pacientes que tienen ARN indetectable en plasma con sólo análogos de los nucleósidos.

En conclusión, un control del tejido linfático debería incluirse cuando se monitoriza la eficacia de los regímenes de tratamiento que buscan una supresión completa de la replicación del virus y una recuperación de los cambios inmunopatológicos en los órganos linfáticos. Finalmente, se requieren estudios para determinar si la mayor supresión observada con los regímenes que contienen un IP es atribuible exclusivamente a la aportación de los IP o a la potencia del tratamiento, el cual puede ser también conseguible con un régimen altamente potente que no contenga un IP (16).

### **6.5.7. El TARGA controla pero no erradica la infección**

Los efectos del TARGA, inhibición de la replicación viral y mejoría de los niveles de virus en sangre y en tejido linfático, han sido descritos ampliamente en varios estudios (196;202-204;220;363). Sin embargo, se ha demostrado que, a pesar del tratamiento con TARGA, persiste una replicación subyacente del virus (8;9). Las biopsias de tejido linfático obtenido de modelos animales y humanos revelan células T CD4+ activadas y en reposo. Las células T CD4+ pueden haber sido infectadas mientras estaban activadas y han vuelto al estado de reposo. Estas células T en reposo, infectadas con VIH no contribuyen a la viremia y

representan un reto para las terapéuticas antirretrovirales. Si bien éstas disminuyen considerablemente la detección de VIH en el tejido linfático (104;220;283), los inhibidores de las enzimas virales, tanto de la transcriptasa como de la proteasa, no tienen efecto sobre las células quiescentes con material viral integrado.

Por otro lado, el tratamiento con TARGA no permite la generación o el refuerzo de una respuesta inmunológica protectora de células T anti-VIH-1 que pueda controlar la infección una vez suspendida la terapia. Al contrario, la suspensión del TARGA va seguida de forma invariable de un rebrote explosivo de la replicación vírica, aún cuando la carga viral plasmática había alcanzado niveles indetectables (196;368). Este hecho ocurre incluso después de 1 o 2 años del tratamiento con TARGA continuado, iniciado cuando la homeostasis y funcionalidad de las células T están todavía ampliamente preservadas, tal como ha demostrado nuestro grupo de Investigación sobre el SIDA del Hospital Clínic de Barcelona (78;140;355). Las respuestas inmunológicas del huésped del tipo Th (T helper o colaborador) y de linfocitos T citotóxicos anti VIH-1 son distintas si se inicia el tratamiento con TARGA en la infección aguda o en la crónica. Así, los pacientes tratados durante la infección aguda, antes de la seroconversión, da lugar a una recuperación de las respuestas Th y de linfocitos T citotóxicos (265;266). Por el contrario, cuando el TARGA se inicia en la infección crónica, aunque sea en fases iniciales de la misma, estas respuestas no se recuperan (140;355).

Por tanto existen dos obstáculos importantes para la eliminación del VIH-1 en pacientes que reciben TARGA: un pool de linfocitos T CD4+ infectados latentes que persisten (67;196;211) y una replicación viral de bajo nivel en algunos pacientes a pesar de tener una viremia baja o indetectable durante periodos prolongados (9;369-374). Evidencias de estos dos mecanismos se han estudiado principalmente en células mononucleares de sangre periférica (8;369;370;373;375;376) y en plasma (373;374).

### **6.5.7.1. Replicación viral residual**

El TARGA hace posible la supresión de forma considerable de la replicación del VIH-1 en un alto porcentaje de pacientes, lo que nos lleva a una rápida y permanente caída de la CVP a  $< 20$  copias /ml y a un aumento de los niveles de linfocitos T CD4+ (354). Pero, las discrepancias entre las respuestas inmunológicas y virológicas han sido descritas en ambas direcciones, es decir, una respuesta persistente de linfocitos T CD4+ a pesar de una respuesta virológica incompleta (377) o incluso un progresivo descenso en los niveles de linfocitos T CD4+ a pesar de una aparente respuesta virológica (378).

Las bases fisiopatológicas para la discrepancia entre un descenso en la CVP por debajo de los niveles de cuantificación y un progresivo descenso en los niveles de linfocitos T CD4+ no son claras. Las potenciales explicaciones pueden involucrar factores genéticos, virológicos, inmunológicos o la toxicidad directa de la terapia antiretroviral (379). Pero la explicación más apropiada es la persistencia de replicación residual a pesar de la respuesta aparente en plasma (379).

Nuestro grupo presentó un caso con caída de la CVP pero con descenso también de los niveles de linfocitos T CD4+ incluso después de una año de TARGA. En ese caso, a pesar de la baja replicación en plasma, los marcadores de activación (porcentaje de linfocitos T CD8+CD38+) aumentaron, mientras que el porcentaje de CD8+ CD28+ (involucrados en la presentación del antígeno y, por tanto, necesarios para la correcta función de los linfocitos T) (380) decreció durante este periodo. Por el contrario, 1 año después de los cambios a un régimen más efectivo, el porcentaje de linfocitos CD8+ CD38+ disminuyó mientras que el porcentaje de CD8+ CD28+ aumentó, como había sido descrito con respecto a pacientes asintomáticos que recibieron terapia triple (78;381).

Además, las respuestas proliferativas a mitógenos y antígenos específicos (citomegalovirus) también aumentaron durante este periodo, llegando a niveles similares a aquellos pacientes asintomáticos después de la terapia (78;381). Por tanto, un cambio a un régimen más potente parece llevar a una recuperación del sistema inmune función (379). Con el caso anterior se puede concluir que existen niveles bajos de replicación residual que pueden explicar las discrepancias entre una respuesta completa virológica aparente, medida con los estándares (respuesta durable a <20copias /ml) y un progresivo descenso en los niveles de linfocitos T CD4+. Las determinaciones de la CVP por métodos más sensibles (con más bajos límites de cuantificación a <5 copia /ml) o por biopsias de tejidos linfáticos pueden ser necesarios para detectar esta replicación residual. Es probable que cambiando o intensificando la terapia con regímenes más potentes se pueda prevenir un descenso en los niveles de los linfocitos T CD4+ y mejorar la función del sistema inmune (379).

#### **6.5.7.2. Células infectadas crónicamente y latentes**

Algunos autores han demostrado la existencia de células infectadas crónicamente y latentes y de replicación viral en tejido linfático después de la supresión de la viremia plasmática (67;196;211;382). También se ha descrito que se puede detectar ARN vírico en el pool de las células dendríticas foliculares después de un año de TARGA exitoso (220). Algunos autores también sugirieron que sitios como el sistema nervioso central o el tracto genital podrían ser responsables de parte importante de esta replicación de bajo nivel debido a la poca accesibilidad de los medicamentos o por tener diferente recambio de las células infectadas (375;383;384).

Después de TARGA, desaparecen la mayoría de las células infectadas activas con  $\geq 20$  copias de ARN vírico por células, pero quedan algunos casos con células con pocas copias de ARN viral ( $\leq 5$  copias/célula) (220). La significación de estas células para la replicación viral es incierta. Pueden ser células infectadas de forma crónica que mantienen un bajo nivel de producción de virus; o pueden ser células en las que el ciclo vital del virus es incompleto porque los niveles de expresión de los genes reguladores víricos (ej. rev, tat) son insuficientes para apoyar las últimas fases del ciclo vital vírico (385).

No obstante, algunos estudios sugieren que en más del 50% de los pacientes que consiguen las reducciones de la CVP que se buscaba a  $<$  de 50 copias de ARN de VIH /ml, ocurre una incompleta supresión de la replicación (9). Hay autores que han demostrado esta supresión incompleta mediante la evolución o el fallo de la reducción en el porcentaje de células infectadas latentes, que parece correlacionarse con la reaparición esporádica de bajos niveles de viremia detectable mientras se recibe terapia o con una bajada menos rápida de la viremia durante el inicio de la terapia (369;376). La mayoría de los estudios sobre la supresión viral incompleta con TARGA se basan en sangre periférica y no en los sitios anatómicos donde ocurre la replicación. Para encontrar estrategias más efectivas es necesario determinar si la supresión completa de la replicación viral depende de tratamientos con mayor actividad en sangre y tejido linfático o con mayor penetración en sistema nervioso central o tracto gastrointestinal o ambas cosas (13;366).

### **6.5.7.3. La red de células dendríticas**

Otra fuente potencial para mantener la infectividad son los virus residuales dentro de la red de células dendríticas foliculares de los tejidos linfáticos donde ocurre la mayoría de la replicación y almacenaje del virus

y que representa el grueso de la carga viral en los pacientes no tratados (21;121). La respuesta a la terapia antiretroviral del virus y el provirus presente en este compartimiento tisular crítico es de importancia primordial en el éxito a largo término de cualquier estrategia terapéutica. Las descripciones que algunos autores han hecho de reducciones rápidas iniciales de la CVTL en respuesta a TARGA en periodos de 6 meses a 1 año fueron prometedoras (220;278;363). Después de 6 meses de TARGA, Cavert y cols. documentaron una importante disminución del pool de viriones en las células dendríticas foliculares y que al año de tratamiento es casi indetectable (220).

Por tanto, la contribución combinada de las células infectadas crónicamente y latentes y los virus residuales en las células dendríticas foliculares suponen unas fuentes potenciales importantes de virus que pueden reiniciar la infección si el tratamiento es inefectivo o se suspende por alguna razón. En estas circunstancias, la infección se reestablece rápidamente con la reaparición de células infectadas activas y ARN vírico en el pool de células dendríticas foliculares con una cinética similar a la de la infección aguda (363). La persistencia del virus y la recrudescencia de la infección suponen un fracaso en el esfuerzo de erradicar el VIH-1 o de suspender los caros y complicados tratamientos requeridos para suprimir la replicación activa.

## **7. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La infección por el VIH-1 de ciertas células del sistema inmunológico resulta en una inmunosupresión del paciente que pueden tener devastadoras consecuencias para el paciente.

Desde la primera descripción del Síndrome de la Inmunodeficiencia humana Adquirida (SIDA) en 1981(1-3), se han buscado parámetros objetivos que sirvieran para constatar el control clínico y realizar el seguimiento y el pronóstico así como la valoración de la respuesta al tratamiento en sangre periférica de los sujetos infectados por el VIH. Los más utilizados han sido los marcadores de replicación del virus y los marcadores inmunológicos (sobre todo el nivel de linfocitos CD4+). Estos han permitido monitorizar la historia natural de la infección por el VIH-1, predecir la evolución clínica y evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos antirretrovirales. Pero en estos pacientes, la mayoría de la replicación y el principal reservorio viral se produce en el tejido linfático que sigue una evolución diferente a la sangre periférica. Lo que se ha demostrado con contradicciones entre los cambios obtenidos en la replicación viral (11-16) y los niveles de linfocitos (17-19) al compararlos con los observados en sangre periférica de pacientes antes y después del tratamiento. Incluso se ha descrito la presencia de carga viral en tejido amigdalario con carga viral plasmática indetectable (14;386).

En modelos experimentales en animales se ha detectado la presencia de virus VIH en ganglios linfáticos inguinales a las pocas horas de inoculación vaginal del virus (263). Después de la exposición mucosa, el VIH contacta primero con la célula de estirpe monocitaria. Tiene particular papel la célula de Langerhans, una célula dendrítica con potente capacidad de activación de linfocitos T. Las amígdalas y tejido adenoideo contienen células dendríticas que son capaces de transferir la infección de VIH a las células CD4+, en el tejido linfático (267). De hecho, el principal

receptor del VIH-1 en las células humanas es la molécula CD4, que es expresada principalmente por los linfocitos T colaboradores. Estos linfocitos colaboradores CD4+ están involucrados directa o indirectamente en la mayor parte de las funciones inmunológicas del organismo. La destrucción de estas células por parte del VIH es la responsable del progresivo deterioro inmunológico de estos pacientes. Estudios recientes defienden que la destrucción inicial de linfocitos T CD4+ en las mucosas es masiva, ya sea de forma directa por el efecto citopático o indirecta por la activación y acortamiento de su vida media, y que es ampliamente responsable de aspectos de la enfermedad que ocurren durante la fase crónica de la infección (290). Estos cambios iniciales en el tejido linfático asociado a las mucosas no se reflejan en sangre periférica hasta fases crónicas de la enfermedad. En el tejido linfático es, pues, donde tienen lugar los cambios inmunológicos que acontecen en la infección por VIH y ahí radica la importancia de su estudio.

Además, la carga viral también está asociada con los cambios histológicos e inmunológicos en tejido linfático. Tras la infección por VIH-1, se inician importantes cambios en la arquitectura y celularidad del tejido linfático amigdalario y de los ganglios linfáticos. Los cambios histológicos se han clasificado basándose en los patrones de los ganglios linfáticos. Estos patrones histopatológicos se correlacionan perfectamente con los estadios evolutivos de la infección durante el curso prolongado de la enfermedad tanto a nivel inmunológico en periferia (niveles de CD4+, carga viral,...) como clínico (desarrollo de infecciones oportunistas y el pronóstico de la enfermedad) del paciente (228;271;387-392). La expansión del tejido linfático en pacientes en fases tempranas de la infección ocasiona linfadenopatías generalizadas, hiperplasia del tejido amigdalario y esplenomegalia. Esta hiperplasia linfoide tiene lugar preferentemente en los centros germinales de los folículos linfoides, donde el virus es atrapado. En una fase posterior, la célula dendrítica folicular (CDF) involucrena, con alteración importante de la arquitectura

del tejido linfático. Se suceden cambios de lisis folicular, seguidos de involución folicular y, finalmente, depleción linfoide (228). El estudio inmunohistoquímico del tejido linfático revela cambios importantes de las poblaciones linfoides durante esta progresión. En los pacientes portadores del VIH existe un descenso de la relación CD4:CD8, con aumento de células linfoides T CD8+ citotóxicas. Se observa, además, disminución de las células CD4, fundamentalmente por un proceso de apoptosis inducida por el virus, que afecta no sólo las células infectadas, sino también las no infectadas (228;253;254).

El estudio de la distribución y dinámica de la infección por VIH-1 ha sido efectuado previamente mediante técnicas de hibridación "in situ" (21). Estos estudios han demostrado que el virus se localiza preferentemente en las CDF en las primeras fases de la infección (21;276), pasando posteriormente a infectar las células linfoides, donde se replica. Por tanto, los tejidos linfoides han demostrado ser los principales reservorios del virus y el aumento de la detección viral en plasma en pacientes no tratados es el reflejo del aumento de la replicación viral en los tejidos linfoides.

Los linfocitos circulantes en sangre representan aproximadamente un 2 % del contenido total de estas células en el organismo. En condiciones normales existe un tránsito de células linfoides entre los diferentes compartimentos del organismo. Este tránsito está modulado por las denominadas moléculas inflamatorias de adhesión, que se localizan en la superficie de los leucocitos, determinando los fenómenos de adhesión y trans migración de estas células. A medida que progresa la infección por VIH-1, estas moléculas están sobreexpresadas en el tejido linfático y, de forma paralela, disminuye la proporción de células linfoides en sangre periférica (255).

La introducción de la terapéutica antirretroviral altamente activa (TARGA) ha cambiado el pronóstico de la infección por VIH, debido a la restauración de la inmunidad que ocasiona en los pacientes. La respuesta

linfoproliferativa de los linfocitos T colaboradores frente a antígenos específicos aumenta significativamente tras la instauración con TARGA (95;98). El aumento de células T CD4+ en plasma en las primeras fases del tratamiento es a expensas de células de memoria y no células “vírgenes”, lo que indica que en un primer lugar tiene lugar una redistribución de las células desde los tejidos (100). Sin embargo, después de varios meses de iniciar el tratamiento, suele haber un retorno gradual de células T con marcadores “virgen”, lo que sugiere un aumento de la producción celular a partir de timo residual u órganos extratímicos, con aumento de estas células en plasma (95) y en tejidos linfoides (255).

Sin embargo, se ha demostrado que, a pesar del tratamiento con TARGA, persiste una replicación subyacente del virus (8;9). Las biopsias de tejido linfático obtenido de modelos animales y humanos revelan células T CD4+ activadas y en reposo. Las células T CD4+ pueden haber sido infectadas mientras estaban activadas y han vuelto al estado de reposo. Estas células T en reposo, infectadas con VIH no contribuyen a la viremia y representan un reto para las terapéuticas antirretrovirales. Si bien con los tratamientos antirretrovirales altamente activos (TARGA) se disminuye considerablemente la detección de VIH en el tejido linfático (104;220;283), los inhibidores enzimáticos, como son la transcriptasa y la proteasa, no tienen efecto sobre las células quiescentes con material viral integrado. Por otro lado, el tratamiento con TARGA no permite la generación o el refuerzo de una respuesta inmunológica protectora de células T anti-VIH-1, que pueda controlar la infección una vez suspendida la terapia. De hecho ha sido documentado el reestablecimiento de la viremia tras la interrupción del TARGA, aún cuando la carga viral plasmática había alcanzado niveles indetectables (196;393). Este hecho ocurre incluso después de 1 o 2 años del tratamiento con TARGA continuado, iniciado cuando la homeostasis y funcionalidad de las células T están todavía ampliamente preservadas, tal como ha demostrado

nuestro grupo de Investigación sobre el SIDA del Hospital Clínic de Barcelona (355;394).

Estos resultados han destacado la importancia de los parámetros virales e inmunológicos medidos a nivel del tejido linfático para el pronóstico de la enfermedad y para el diseño de nuevas estrategias para la erradicación del VIH.

Por tanto la principal justificación del estudio consiste en que las nuevas terapéuticas se orientan a suprimir el reservorio viral en el tejido linfático y dependen de una comprensión de los aspectos dinámicos de la infección del VIH. Las investigaciones para determinar la eficacia o proponer nuevas terapéuticas deben basarse en el estudio de los mecanismos de infección celular del VIH, no sólo "in vitro", sino "in vivo", en los diferentes estadios clínicos de la enfermedad. Por otro lado, el estudio de las subpoblaciones linfoides T, con marcaje de linfocitos "vírgenes" y memoria, así como la determinación de células en proliferación explica las alteraciones que están ocurriendo en la inmunidad de los pacientes, ya sea las ocasionadas por el VIH, como las que resultan secundarias a las diferentes terapias. El estudio debe completarse con el estudio de la apoptosis en el tejido linfático, especialmente con los linfocitos T CD4+ y la influencia con el tratamiento. Por tanto, los parámetros que mejor predicen la evolución del paciente y la respuesta al tratamiento se obtienen del estudio del tejido linfático pero este estudio es complejo, nuestro grupo intenta encontrar marcadores en sangre periférica que puedan utilizarse para estimar la carga viral y el estado histopatológico del tejido linfático. Estos marcadores podrían utilizarse como guía para el tratamiento clínico de las personas infectadas por VIH-1.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Este estudio se ha realizado en los servicios de Enfermedades Infecciosas y Anatomía Patológica del Hospital Clínic con pacientes infectados por el VIH-1, asintomáticos, con buen estado inmunológico y sin tratamiento previo.

En esta tesis se plantan dos **hipótesis**:

1ª. La replicación viral en tejido linfático, tanto antes del tratamiento como la residual después del mismo, influiría de forma determinante en parámetros del sistema inmunológico, tanto en periferia como en tejido linfático.

2ª. En periferia podría haber algún marcador inmunológico que predijera el control de la replicación viral en tejido linfático. Como los pacientes con TARGA y CV elevada en el tejido linfático tienen mayor riesgo de fracaso, estos marcadores servirían para definir cuales son estos pacientes.

Los **objetivos** concretos desarrollados en los dos artículos presentados son:

- 1- Cuantificar el VIH-1 mediante técnicas de PCR (carga viral) en tejido linfoide antes y después del tratamiento con TARGA.
- 2- Correlacionar la carga viral en tejido linfoide con la carga viral y subpoblaciones linfoides estudiadas en sangre periférica, antes y después del tratamiento.

- 3- Estudiar la inmunarquitectura del tejido linfoide y cuantificar las subpoblaciones celulares en el mismo, antes y después del tratamiento. Correlacionarlas con la carga viral en tejido linfoide y los mismos parámetros en sangre periférica.
- 4- Estudiar la presencia y distribución del antígeno viral p24 en el tejido linfoide, mediante técnicas de inmunohistoquímica, antes y después del tratamiento.

## **MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS**



# ARTÍCULO 1



## ABSTRACT 1º ARTÍCULO

En pacientes naive infectados de forma crónica por el VIH, se observa una correlación entre la carga viral de tejido amigdalario y diferentes parámetros inmunológicos y virológicos de sangre periférica, que no se observan después de 1 año de tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA). Los regímenes que contienen un inhibidor de la proteasa son los mejores predictores de una buena respuesta virológica en el tejido amigdalario después de un año de TARGA.

**Palabras clave:** carga viral en tejido amigdalario, carga viral plasmática, marcadores, activación inmune.

## Short communication

# Predictors of tonsillar tissue HIV-1 viral burden at baseline and after 1 year of antiretroviral therapy

Pilar Navarrete<sup>1</sup>, Vanessa Morente<sup>5</sup>, Felipe García<sup>1\*</sup>, Lluçia Alós<sup>5</sup>, Mireia Arnedo<sup>2</sup>, Montserrat Plana<sup>3</sup>, Cristina Gil<sup>6</sup>, Miguel Caballero<sup>4</sup>, José M Miró<sup>1</sup>, Esteban Martínez<sup>1</sup>, Emilio Fumero<sup>1</sup>, Pedro Castro<sup>1</sup>, José L Blanco<sup>1</sup>, Josep Mallolas<sup>1</sup>, José L Blanch<sup>4</sup>, Anna Cruceta<sup>1</sup>, Gabriel Mestre<sup>1</sup>, Tomás Pumarola<sup>2</sup>, Teresa Gallart<sup>3</sup> and José M Gatell<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Infectious Diseases, <sup>2</sup>Microbiology and <sup>3</sup>Immunology Units, Clinic Institute of Infectious Diseases and Immunology; <sup>4</sup>Servicio de Otorrinolaringología; <sup>5</sup>Servicio de Anatomía Patológica. IDIBAPS, Hospital Clinic, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

\*Corresponding author: Tel: +34 93 2275400 (ext 2884); Fax: +34 93 4514438; E-mail: fgarcia@medicina.ub.es

In 81 antiretroviral-naïve HIV-1 chronic-infected patients, we found a correlation among tonsillar tissue viral load, and virological and immunological measures in blood at baseline. No correlation was observed after 1

year of antiretroviral therapy. A protease inhibitor-containing regimen was the best predictor of good tonsillar tissue virological response.

## Introduction

Despite sustained viral load suppression in plasma, HIV RNA can be detected in tonsillar tissue in some patients (TTVL) [1,2]. Lymphatic tissue biopsies are an invasive procedure and difficult to be repeated. It would be useful to study the relationships among the different virological, immunological and histological measures in both tonsillar tissue (TT) and peripheral blood before and after 1 year of antiretroviral therapy (ART). We also analysed the predictors of an effective virological response in TT after 1 year of therapy.

## Methods

All consecutive adult patients who were antiretroviral-naïve with chronic asymptomatic HIV-1 infection and CD4 lymphocyte count above 500 cells  $\times 10^6/l$  were eligible for performing tonsillar biopsy if written informed consent was granted. Of the 378 patients visited from January 1996 to December 2000, 181 (48%) did not have accessible TT. Eighty-one (41%) out of 197 remaining patients consented in performing a tonsillar biopsy and were recruited for this study. Measurements of plasma viral load (PVL), TTVL and lymphocyte immunophenotyping were performed at day 0 before any ART and 1 year thereafter as previously described [3,4]. All the samples were examined by a pathologist and confirmed the presence of lymphoid tissue. Hematoxylin and eosin staining was performed and two observers independently performed

the microscopic analysis in a blinded fashion (scored the TT biopsies without knowing the level of TTVL or PVL). Each sample was classified as stage I, II or III (no lymphocyte depletion/prominent germinal centres, follicular involution and absence of follicles/follicular depletion, respectively). The mean follicular size and the proportion of follicular centres with regard to total lymphoid tissue were also assessed. Non-routine procedures were approved by the Institutional Review Board. Spearman Rank Order Correlations were performed on quantitative data. After 1 year of ART, we divided the cohort in two groups: group 1, patients with undetectable TTVL; group 2, patients with detectable TTVL. The differences between these two groups were compared with a Student's t-test. A univariate and multivariate analysis (logistic regression analysis) was performed to find which baseline variables predict an effective virological response in TT (defined as undetectable viral load, TTVL below 40 copies/mg of tissue) after 1 year of therapy.

## Results

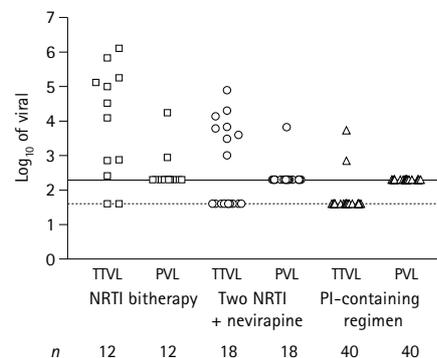
At baseline, two samples of TT were obtained in 81 patients. None of the patients suffered or complained of local or systemic side effects. The mean  $\pm$ SE TTVL and PVL was 5.4  $\pm$  1.3  $\log_{10}$  copies/mg of tissue and 3.9  $\pm$  0.9  $\log_{10}$  copies/ml, respectively. The mean  $\pm$ SE of CD4 and CD8 T cells were 703  $\pm$  267 and 997  $\pm$  475 cells/mm<sup>3</sup>,

respectively. There was a significant positive correlation of TTVL with PVL ( $r=0.61, P=0.0001$ ) and CD8CD38 T cells ( $r=0.46, P=0.0001$ ). There was a significant negative correlation of TTVL with CD4 T cells ( $r=-0.30, P=0.001$ ), ratio of naive/memory CD8 T cells ( $r=-0.29, P=0.006$ ) and CD8CD28 T cells ( $r=-0.39, P=0.0001$ ). A second biopsy was performed in 70 out of 81 after 1 year of ART (four patients did not start ART and seven were lost for follow-up). TTVL was undetectable in 38 out of 40 patients (95%) who received a non-boosted protease inhibitor containing regimen [indinavir, nelfinavir or ritonavir either with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) ( $n=26$ ) or one NRTI + efavirenz ( $n=4$ )] versus in 10 out of 18 patients (56%) who received a nevirapine-containing regimen (plus two NRTIs) and versus in two out of 12 patients (17%) who received NRTI bitherapy (ANOVA test with Bonferroni correction for multiple comparisons,  $P=0.004$ ) (Figure 1). PVL was undetectable in 67 out of 70 patients (95%) after 1 year of therapy (Figure 1).

As we found that half of patients of the nevirapine-containing regimen had detectable TTVL after 1 year of treatment, we analysed the histology of the samples of this group ( $n=18$ ) to study if the presence of active replication in TT after 1 year of ART was associated with persistence of morphological abnormalities. At baseline, 13 out of 18 patients showed follicular depletion (stage III). Only two patients had a tonsillar sample classified as stage I. After 1 year of ART, none of the samples showed follicular depletion (stage III) and seven out of 18 were classified as stage I. Mean TTVL was lower in patients with TT in stage I than in patients with samples with follicular involution (stage II) ( $2.17 \pm 0.38$  and  $3.75 \pm 0.47 \log_{10}$  copies/ml, respectively,  $P=0.032$ ). Moreover, TTVL was inversely correlated with the amount of follicular centres and mean follicular size ( $r=-0.596, P=0.019$ ; and  $r=-0.567, P=0.028$ , respectively).

We analysed the predictors of an effective virological response in TT after 1 year of therapy. In the univariate analysis, baseline TTVL, memory CD4 T cells and type of ART were associated with an effective TT virological response (Table 1). Baseline PVL did not predict the TTVL response after 1 year of ART [mean  $\pm$ SE baseline PVL:  $3.8 \pm 0.2$  and  $4.1 \pm 0.2 \log_{10}$  copies/ml, undetectable versus detectable TTVL groups, respectively ( $P=0.19$ )]. Moreover, TT viral response after 1 year of ART was not correlated with the time to decrease PVL below 200 copies/ml or the number of blips. When a multivariate analysis (logistic regression analysis) was performed, only type of ART remain as significant independent predictor of response (Table 1).

**Figure 1.** Plot of the viral load in plasma versus tonsillar tissue for each patient after 1 year of antiretroviral therapy



Dashed line limit of detectable level for tonsillar tissue viral load. Continuous line limit of detectable level for plasma viral load. Protease inhibitor-containing regimen: protease inhibitor-containing regimen [either with two NRTIs ( $n=26$ ) or one NRTI + efavirenz ( $n=14$ )].

## Discussion

At baseline, a 72% of the patients showed follicular depletion in TT even in this early stage (all of them had a baseline CD4 T cells above  $500 \text{ cells/mm}^3$ ). We observed a good correlation between TTVL and PVL and peripheral blood lymphocyte subsets, suggesting that virological and immunological measures are good surrogate markers of TT HIV-1 viral burden in antiretroviral-naive patients.

Despite 1 year of a nevirapine-containing regimen (plus two NRTIs) and an undetectable PVL, half of the patients had persistent histological abnormalities,

**Table 1.** Baseline predictors of good response in tonsillar tissue viral load after 1 year of antiretroviral therapy (defined as undetectable tonsillar tissue viral load)

Variable	TTVL <40 copies/mg of tissue †	TTVL >40 copies/mg of tissue †	P-value
<i>Univariate analysis</i>			
Log <sub>10</sub> BITVL*	5.3 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.2	0.04
CD4CD45RA-RO+ T cells (%)	50 $\pm$ 3	37 $\pm$ 5	0.05
Type of antiretroviral therapy			
PI-containing regimen, n (%)	38 (95)	2 (5)	0.0001
NVP-containing regimen, n (%) §	10 (56)	8 (44)	
NRTI bitherapy, n (%) §	2 (17)	10 (83)	
<i>Multivariate analysis</i>			
PI-containing regimen, Hazard ratio (95% CI)	24 (1.34–445)	0.031	

\*Mean  $\pm$ SE. † After 1 year of antiretroviral therapy. § Nevirapine + two NRTIs or NRTI bitherapy. BITVL, Baseline tonsillar tissue viral load (copies/mg of tissue); PI, protease inhibitor.

consistent with findings reported recently [5]. Remarkably, those samples in stage I, with bigger follicular centre or higher amount of follicular centre had lower TTVL. Moreover, as it has been observed by other authors [1,2,6,7], we found discrepancies between TTVL and PVL after 1 year of ART. Discrepancies have also been observed during the transition from primary to chronic HIV infection. In this setting, the level of TTVL remains elevated despite the fact that PVL drop significantly [8].

In a multivariate analysis, protease inhibitor-sparing regimens (nevirapine + two NRTIs or NRTI bitherapy) were associated independently with a worse response in TTVL. As the TTVL was correlated with histological findings, it is possible to speculate that these patients also had a higher risk of remaining with persistent histological abnormalities. Other variables such as TTVL or PVL, which are important to predict time to suppress viraemia below detectable level [9], did not predict the response in TTVL.

## Acknowledgements

This study was supported in part by grants: FIPSE 3118/00\*, SAF 98/0021, FIS 01/1595, SAF 01/2591 and RIS\*\*.

\*FIPSE is a non-profit Foundation including: Spanish Ministry of Health, Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp and Dohme, and Roche.

\*\*Red Temática Cooperativa de Grupos de Investigación en Sida del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS).

## References

1. Ruiz L, van Lunzen J, Arno A, Stellbrink HJ, Schneider C, Rull M, Castella E, Ojanguren I, Richman DD, Clotet B, Tenner-Racz K & Racz P. Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue. *AIDS* 1999; **13**:F1-F8.
2. Lafeuillade A, Chollet L, Hittinger G, Profizi N, Costes O & Poggi C. Residual human immunodeficiency virus type 1 RNA in lymphoid tissue of patients with sustained plasma RNA of <200 copies/ml. *Journal of Infectious Diseases* 1998; **177**:235-238.
3. Martinez E, Arnedo M, Giner V, Gil C, Caballero M, Alos L, Garcia F, Holtzer C, Mallolas J, Miro JM, Pumarola T & Gatell JM. Lymphoid tissue viral burden and duration of viral suppression in plasma. *AIDS* 2001; **15**:1477-1482.
4. Plana M, Garcia F, Gallart T, Tortajada C, Soriano A, Palou E, Maleno MJ, Barcelo JJ, Vidal C, Cruceta A, Miro JM & Gatell JM. Immunological benefits of antiretroviral therapy in very early stages of asymptomatic chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2000; **14**:1921-1933.
5. Schacker TW, Nguyen PL, Martinez E, Reilly C, Gatell JM, Horban A, Bakowska E, Berzins B, van Leeuwen R, Wolinsky S, Haase AT & Murphy RL. Persistent abnormalities in lymphoid tissues of human immunodeficiency virus-infected patients successfully treated with highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases* 2002; **186**:1092-1097.
6. Gunthard HF, Havlir DV, Fiscus S, Zhang ZQ, Eron J, Mellors J, Gulick R, Frost SD, Brown AJ, Schleif W, Valentine F, Jonas L, Meibohm A, Ignacio CC, Isaacs R, Gamagami R, Emini E, Haase A, Richman DD & Wong JK. Residual human immunodeficiency (HIV) type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *Journal of Infectious Diseases* 2001; **183**:1318-1327.
7. Garcia F, Romeu J, Grau I, Sambeat MA, Dalmau D, Knobel H, Gomez-Sirvent JL, Arrizabalaga J, Cruceta A, Clotet BG, Podzamczar D, Pumarola T, Gallart T, O'Brien WA, Miro JM & Gatell JM. A randomized study comparing triple versus double antiretroviral therapy or no treatment in HIV-1-infected patients in very early stage disease: the Spanish Earth-1 study. *AIDS* 1999; **13**:2377-2388.
8. Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzardi GP, Kahn J, Fox CH, Schnittman SM, Schwartz DH, Corey L & Fauci AS. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nature Medicine* 1998; **4**:341-345.
9. Rizzardi GP, De Boer RJ, Hoover S, Tambussi G, Chapuis A, Halkic N, Bart PA, Miller V, Staszewski S, Notermans DW, Perrin L, Fox CH, Lange JM, Lazzarin A & Pantaleo G. Predicting the duration of antiviral treatment needed to suppress plasma HIV-1 RNA. *Journal of Clinical Investigation* 2000; **105**:777-782.

---

Received 19 May 2003; accepted 12 August 2003

## **ARTÍCULO 2**



## ABSTRACT 2º ARTÍCULO

La carga viral plasmática y las determinaciones de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica son los marcadores usados para monitorizar la infección por VIH. Sin embargo, la replicación viral y la mayoría de los cambios inmunológicos suceden en los tejidos linfoides (TL) Hemos estudiado las biopsias amigdalares de 30 pacientes en estadios tempranos de la enfermedad, antes del inicio de cualquier tratamiento y después de 12 y 36 meses de tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA). Se ha investigado el ARN del VIH mediante técnicas de PCR (carga viral en TL), la inmunexpresión de la proteína p24 viral y la arquitectura del tejido linfoide y subpoblaciones celulares por medio de un morfómetro. La carga viral en TL y la inmunexpresión de p24, la cual fue encontrada asociada principalmente a células foliculares dendríticas, desciende significativamente después del tratamiento, pero no desaparece en todos los casos, incluso después de 36 meses de tratamiento. Fue observada una mejoría significativa de la arquitectura del TL después del tratamiento, con recuperación de las estructuras foliculares. Estos cambios histológicos se correlacionan con la carga viral en TL. Además, el número de células CD4+ se incrementa, mientras los linfocitos CD8+ y citotóxicos (CD8+granzymeB+) descienden significativamente, la última tanto en el área folicular como interfolicular. Sin embargo estos niveles celulares después del tratamiento no alcanzan

los de los pacientes control sanos. Las células naive (CD45RA+) y memoria (CD45RO+) aumentan significativamente después del tratamiento. En conclusión, en la infección por VIH el impacto del tratamiento sólo puede ser establecido completamente en los reservorios de TL, donde la mayoría de los virus se almacenan y se asocian a células foliculares dendríticas. TARGA produce una recuperación significativa de la arquitectura del TL y de las subpoblaciones linfocitarias, las cuales están asociadas a un descenso en la carga viral en TL. Sin embargo, estos parámetros estudiados en TL no se restablecen completamente, incluso después de 36 meses de TARGA.

**Palabras clave:** TARGA, VIH, Inmunohistoquímica, tejido linfoide, morfometría, p24.

# Immunoarchitecture of lymphoid tissue in HIV-infection during antiretroviral therapy correlates with viral persistence

Llúcia Alòs<sup>1</sup>, Pilar Navarrete<sup>1</sup>, Vanesa Morente<sup>1</sup>, Felipe Garcia<sup>2</sup>, Marta Garrido<sup>1</sup>, Montse Plana<sup>3</sup>, Anna Mozos<sup>1</sup>, Anna López<sup>3</sup>, Cristina Gil<sup>4</sup>, Tomás Pumarola<sup>4</sup>, Miguel Caballero<sup>5</sup>, Jose L Blanch<sup>5</sup>, Emilio Fumero<sup>2</sup>, José M Miró<sup>2</sup>, Teresa Gallart<sup>3</sup>, José M Gatell<sup>2</sup> and Elias Campo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Pathology; <sup>2</sup>Department of Infectious Diseases; <sup>3</sup>Department of Immunology; <sup>4</sup>Department of Microbiology and <sup>5</sup>Department of Otolaryngology of Hospital Clinic of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Spain

**Plasma viral load and T-cell subset determinations in blood are the markers used for monitoring HIV-1 infection. However, key pathogenesis events, viral replication and most immunologic changes occur in the lymphoid tissues. We have studied the tonsillar biopsies of 30 patients in the early stages of the disease, before initiating treatment and after 12 and 36 months of fully effective highly active antiretroviral therapy. We have investigated the HIV RNA by polymerase chain reaction (lymphoid tissue viral load), the immunohistochemical HIV-p24 antigen expression, as well as the lymphoid tissue architecture and lymphoid cell subsets using morphometry. The lymphoid tissue viral load and the immunoexpression of p24, which was found to be mainly associated with follicular dendritic cells, decreased significantly after treatment, but did not disappear in all cases, even after 36 months of treatment. A significant improvement of the lymphoid tissue architecture was also observed after treatment, with recovery of follicular structures. These histological changes correlated with the lymphoid tissue viral load. Moreover, the counts of CD4<sup>+</sup> increased whereas CD8<sup>+</sup> and cytotoxic lymphocytes (CD8<sup>+</sup> granzyme B<sup>+</sup>) decreased significantly, the latter in both interfollicular and intrafollicular areas. However, these cellular counts after treatment did not reach those of lymphoid tissue of non-HIV-infected patients used as control cases. Naive (CD45RA<sup>+</sup>) and memory (CD45RO<sup>+</sup>) cells also improved significantly after treatment. In conclusion, in HIV-infection the impact of treatment can only be assessed completely in the lymphoid tissue reservoir, where most of the virus is stored and associated with follicular dendritic cells. Highly active antiretroviral therapy produces a significant recovery of lymphoid tissue architecture and lymphoid cell subsets, which are associated with the decrease of lymphoid tissue viral load. However, these parameters studied in lymphoid tissue are not re-established completely, even after 36 months of highly active antiretroviral therapy.**

*Modern Pathology* (2005) 18, 127–136, advance online publication, 24 September 2004; doi:10.1038/modpathol.3800267

**Keywords:** HAART; HIV; immunohistochemistry; lymphoid tissue; morphometry; p24

In HIV-1 infection, viral replication and storing take place in lymphoid tissues. The infection generates a large number of virions, most of which are stored in immune complexes associated with follicular dendritic cells.<sup>1–4</sup> These cells play an important role in the transmission of HIV to cells and represent a

major reservoir for HIV, facilitating the infection of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and producing a subsequent systemic spread.<sup>1</sup> Consequently, there is an impairment of CD4<sup>+</sup> helper or inducer cells, probably due to several mechanisms, such as a persistent immune activation with an increased T-cell proliferation and cell death,<sup>5–8</sup> and a decrease of cell production by preventing maturity of lymphoid precursors.<sup>9,10</sup> CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are involved either directly or indirectly in most of the body's immunologic functions and their destruction results in progressive impairment of the immune response and ultimately in the marked immunodeficiency

Correspondence: Dr L Alòs, MD, Department of Pathology, Hospital Clinic of Barcelona, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: lalos@clinic.ub.es

Received 14 May 2004; revised and accepted 16 July 2004; published online 24 September 2004

characteristic of AIDS. Moreover, the HIV-1 infection induces an increase of the specific anti-HIV cytotoxic reaction, for which cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells are responsible. These cells are recruited to the germinal center of the lymphoid tissue by a chemotactic effect of the virus, but in most cases, this cytotoxic action is insufficient to stop the viral replication. As a consequence of these facts the follicular dendritic cells are destroyed as innocent bystanders, resulting in damage to their meshwork.<sup>11</sup> These changes in the T-lymphoid cell subsets induced by the virus, led to a progressive alteration in the lymphoid tissue architecture, that correlates with the evolution of the disease.<sup>12,13</sup>

The introduction of highly active-antiretroviral therapy (HAART) has changed the prognosis of this disease, due to the decrease of the virus replication, and the CD4<sup>+</sup> T lymphocyte recovery. Under HAART, the CD4<sup>+</sup> T cell increase is determined by a decrease of dying T cells,<sup>6,7,14</sup> and also by thymic output.<sup>15,16</sup> These events are associated with a suppression of the plasma viral load and an increase of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in peripheral blood. However, in spite of this improvement, after interrupting HAART there is a rebound of the plasma viral load again. This fact occurs even when the plasma viral load had been undetectable and it is attributed to the persistence of lymphoid tissue viral reservoir.<sup>17,18</sup> Moreover, these patients present an incomplete immune restoration measured by means of phenotypical and functional parameters, even when T-cell counts have improved in peripheral blood.<sup>19</sup> Previous studies of the lymphoid tissue in HIV-infected persons on HAART have demonstrated a partial improvement of the lymphoid tissue architecture after 12 months of treatment,<sup>20,21</sup> but there are no studies comprising longer follow-up.

The overall goal of the present study was to determine the viral reservoir in lymphoid tissue and its relationship with the changes in the immunorearchitecture of lymphoid tissue, in patients successfully treated with HAART for a long period. To carry out this aim, we have studied the tonsillar lymphoid tissue of 30 HIV-1-infected patients, before initiating HAART and after 12 and 36 months of treatment. We have determined the HIV-1 RNA by PCR and the immunoreexpression of p24 antigen. The lymphoid tissue architecture has been studied by morphometry and we have quantified the lymphoid cell subsets. Moreover, these parameters in lymphoid tissue have been correlated with the plasma viral load and T-cell subsets in peripheral blood, determined in parallel.

## Materials and methods

### Patient Population

In all, 30 adult patients with chronic asymptomatic HIV-1 infection and CD4<sup>+</sup> lymphocyte count above 500 cells  $\times$  10<sup>6</sup>/l, not previously treated with anti-

retroviral therapy, were eligible for tonsillar biopsies. All patients gave written informed consent to be included in the present survey. The study was approved by the local ethics committee. The patients were treated with HAART, defined as a combination of at least two nucleoside reverse transcriptase inhibitors plus a protease and/or a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor.

Five tonsillar therapeutic resections of five non-HIV-infected persons, with sleep apnea syndrome were used as control cases.

### Lymphoid Tissue Collection and Selection of Cases

The tonsillar biopsies were performed in all patients before initiating HAART and after 12 months of treatment. In six cases, tonsillar biopsies were obtained also after 36 months of treatment. Each sample of tonsillar tissue was split into two parts, one-half was frozen immediately in liquid nitrogen and used to determine the lymphoid tissue viral load; the other half was formalin-fixed and paraffin-embedded for histological and immunohistochemical studies. From the latter routine, hematoxylin-eosin stain was carried out. Only biopsies with an adequate amount of lymphoid tissue were selected for immunohistochemical and morphometric analyses. We could evaluate 26 initial biopsies; 28 biopsies performed after 12 months of treatment; and the six biopsies after 36 months of treatment. However, all cases were included in this survey, as we consider they could give us useful information.

### Lymphoid Tissue Viral Load

Lymphoid tissue viral load was determined in frozen tonsillar tissues using the NucliSens HIV-1 RNA QT Assay (Organon Teknika, Turnhout, Belgium). RNA was extracted using the Boom extraction method recommended by the manufacturer's (Organon Teknika) protocol. In brief, 80 slices of 10  $\mu$ m from each specimen (mean total weight 18 mg) were added to 1 ml guanidine thiocyanate containing lysis buffer. After homogenization, 10  $\mu$ l of each sample was added to 1 ml of new lysis buffer with RNA internal standards (NucliSens) and 50  $\mu$ l silica suspension to bind nucleic acid. After centrifugation, the silica pellet was washed five times (twice with guanidine thiocyanate-based wash buffer, twice with 70% ethanol and once with acetone). Subsequently, nucleic acid was eluted using 50  $\mu$ l elution buffer (EDTA). The amplification reaction used 5  $\mu$ l of this nucleic acid solution with 45  $\mu$ l specimen diluent and NASBA (NucliSens). The amount of RNA was expressed as copies per milligram of tissue. The limit of detection of this method for HIV-1 RNA was calculated to be in the order of 40 copies/mg lymphoid tissue.

### Immunohistochemical Techniques

Immunohistochemical studies were carried out using both the automated immunohistochemical system TechMate 500 (Dako, Carpinteria, CA, USA), and the EnVision system (Dako). Briefly, 4  $\mu$ m sections were deparaffinized and hydrated through graded alcohols and water. Peroxidase was blocked for 7.5 min in ChemMate peroxidase-blocking solution (Dako). Then the slides were incubated with the primary antibodies for 30 min and washed in ChemMate buffer solution (Dako). The peroxidase labelled polymer was then applied for 30 min. After washing in ChemMate buffer solution, the slides were incubated with diaminobenzidine substrate chromogen solution and counterstained with hematoxylin. The antibodies used in the study, their sources and dilutions are shown in Table 1. Double immunohistochemical stains were performed in order to determine cytotoxic T lymphocytes (stains for CD8 and granzyme B) and proliferating naive lymphocytes (stains for CD45RA and Ki-67). For this purpose, bindings of granzyme B and Ki-67 antibodies were visualized using the EnVision system, as explained above. The sections were then heat treated again for 5 min and incubated with CD8 and CD45RA antibodies, respectively. The second antibodies were then detected with APAAP using New Fuchsin as red chromogen.

### Study of the Morphology of Lymphoid Tissue and the Immunoreaction for p24

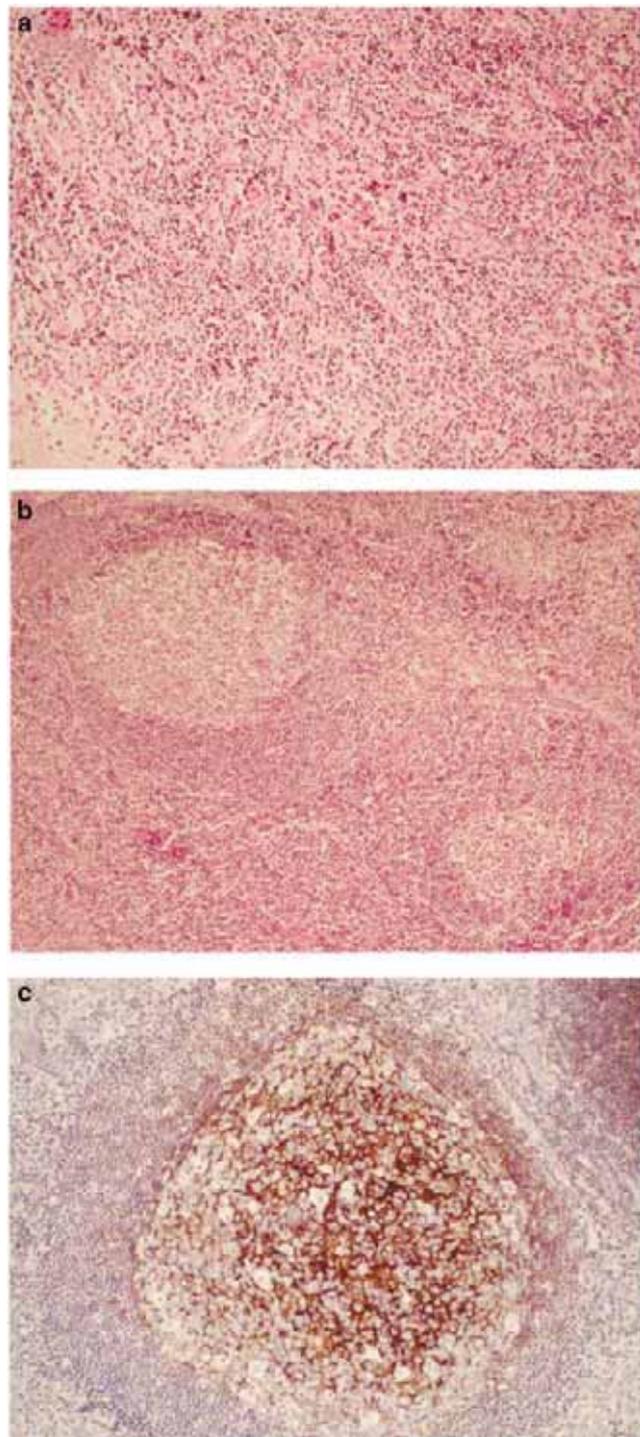
Tonsil tissue sections were examined blindly to evaluate the morphological characteristics of the lymphoid tissue and immunohistochemical results for p24 by two independent observers (LA and PN or VM), who were not aware either of the dates of tonsil biopsy nor the clinical situation of the patients. The morphological study of the lymphoid tissue was performed on hematoxylin–eosin sections, with the aid of immunohistochemical stain for CD20 and CD21 in order to detect secondary follicles. The histological characteristics of the lymphoid tissue

**Table 1** Antibodies used in the study

Antibody	Source	Clone	Dilution
P24	Dako	Kal-1	1:5
CD20	Dako	L26	1:80
CD21	Dako	1F8	1:100
CD4	NCL	1F6	1:5
CD8	NCL	4B11	1:10
Granzyme B	Monosan	GrB-7	1:50
CD45RO	CCT	A6	1:200
CD45RA	Dako	4KB5	1:25
Ki-67	IMT	MIB-1	1:400

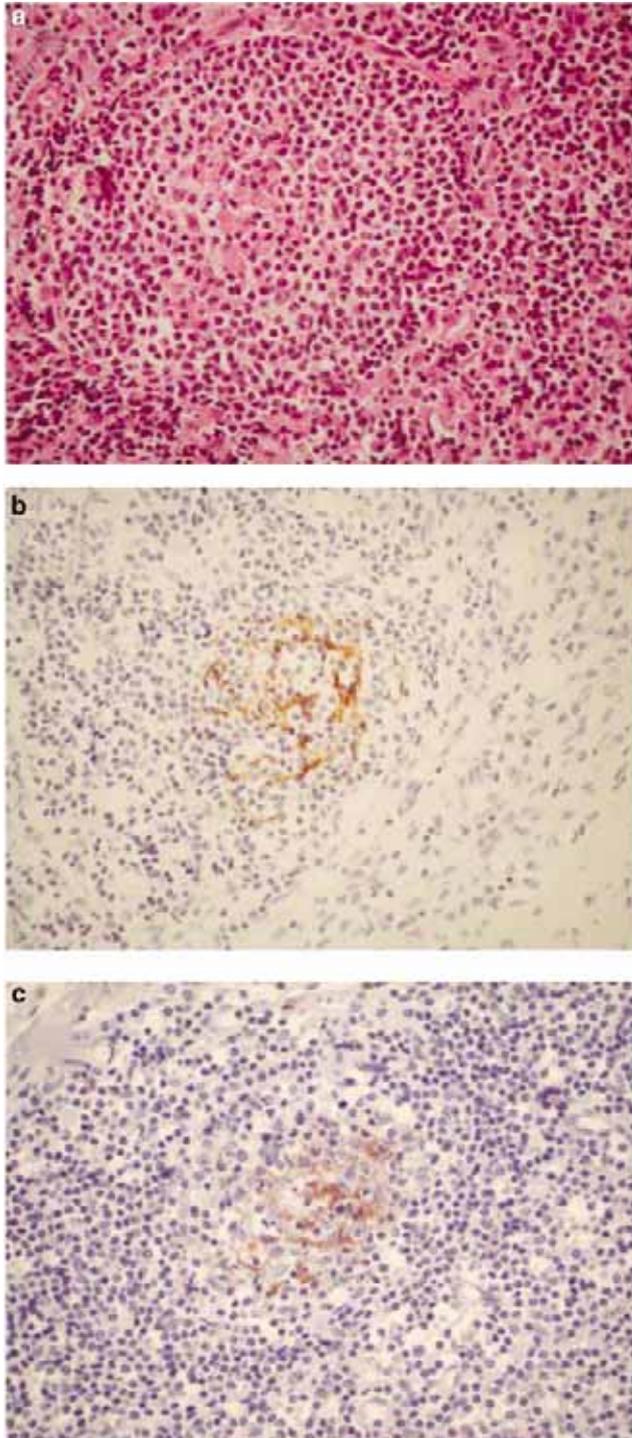
Dako (Carpinteria, CA, USA); NCL: Novocastra Laboratories Ltd (Newcastle, UK); Monosan (Uden, The Neederlands); CCT: Concepta (Barcelona, Spain); IMT: Immunotech (Marseille, France).

was scored in three stages, according to the following definitions: (I) No lymphocyte depletion, prominent germinal centres with well-formed follicular



**Figure 1** Changes in the architecture of the lymphoid tissue at baseline and after HAART. (a) Lymphoid tissue at baseline: lymphocyte depletion, absence of lymphoid follicles and prominent stromal vascularity (stage III). (b) The same case after 12 months of treatment: recovery of the lymphoid tissue architecture. Follicles appear well formed with large germinal centres (stage I). (c) The immunostaining for CD21 demonstrates the improved follicular dendritic cell meshwork after treatment.

dendritic cell network (Figures 1b,c). Follicle lysis images could be seen; (II) Partial lymphocyte depletion, small germinal centres with scarce B lymphocytes and with incomplete follicular dendritic cell network (Figures 2a,b); (III) Marked



**Figure 2** Lymphoid tissue before treatment, in histological stage II. (a) Partial lymphocyte depletion with small germinal centres. (b) An incomplete follicular dendritic cell meshwork is seen using the CD21 antibody. (c) The HIV-p24 immunostaining shows positivity following a follicular dendritic cell pattern.

lymphocyte depletion, absence of lymphoid follicles, accumulation of plasma cells, stromal vascular proliferation (Figure 1a). Moreover, from each specimen, the total amount of lymphoid tissue and the follicular areas were evaluated by planimetry from low-power fields ( $\times 10$  objective), using a morphometer (Microimage Olympus 3.0). The mean follicular area and the proportion of follicular areas with regard to the total amount of lymphoid tissue were determined for each case.

The immunorexpression of p24 protein was quantified in four grades: 0: no positive cells; 1: positive immunoreaction in scattered and scarce cells, with mild intensity; 2: small groups of positive cells, with mild intensity; 3: numerous positive cells with strong intensity (Figure 2c).

### Quantification of Lymphocyte Cell Subsets in Lymphoid Tissue

CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, cytotoxic lymphocytes (CD8<sup>+</sup> granzyme B<sup>+</sup>), memory (CD45RO<sup>+</sup>), naive (CD45RA<sup>+</sup>), naive proliferating (CD45RA<sup>+</sup> Ki-67<sup>+</sup>), and B (CD20<sup>+</sup>) cells were counted in the interfollicular areas. Moreover, the intrafollicular cytotoxic lymphocytes were counted separately. In the five control cases from non-HIV-infected patients CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, and cytotoxic lymphocytes were evaluated.

These cell counts were performed by means semiquantitative Image Analysis, using the morphometer Microimage of Olympus 3.0 which is connected to an Olympus BH2 microscope. In all, 10 high-power fields (HPFs), using a  $\times 40$  objective, were counted. The mean value per HPF for each cell type, was calculated.

### Peripheral Blood Determinations

Plasma viral load was measured using a quantitative polymerase chain reaction method (HIV Monitor test Procedure, Amplicor PCR Diagnostic; Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland), with a limit of quantification of 20 copies/ml.

CD4 and CD8 T-cell counts in peripheral blood were determined by standard flow cytometry. Subpopulations of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were determined using monoclonal antibodies (all from Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). The stained cells were analysed on a FacsCalibur flow cytometer. Data were analysed using CellQuest software.

### Statistical Study

For the purpose of the analysis, RNA values in lymphoid tissue reported as undetectable (below 40 copies/ml) were considered equivalent to 40 copies/ml. Quantitative data were compared

between groups with a Student's *t*-test for paired samples in variables with normal distribution and similar variances, or with the Wilcoxon matched pairs test for those variables without normal distribution. Spearman rank-order correlations were performed on quantitative data. A *P*-value <0.05 was considered significant.

## Results

### Clinical Findings of the Patients

The median age of the patients was 34 years (range 24–49). In all, 21 patients were male and nine were female. The risk factors for HIV-1 infection were drug addiction in nine cases, homosexual transmission in eight cases and heterosexual transmission in 13 cases. The patients had been diagnosed with HIV-1 infection a median of 24 (range 13–120) months prior to initiation of HAART.

### Lymphoid Tissue Viral Load, Morphology of the Lymphoid Tissue and p24 Expression

The results of the lymphoid tissue viral load, the morphological study of the lymphoid tissue and the immunoexpression of p24 are summarized in Tables 2 and 3. In initial biopsies, before treatment, the median lymphoid tissue viral load was 1 542 691 copies/mg tissue, and it decreased significantly after

12 months of treatment to 8915 copies/mg tissue (*P* = 0.013). However, after 36 months of treatment, the lymphoid tissue viral load was still detectable in four out of six cases evaluated, and it did not change significantly from the previous determination (median of 12 030 copies/mg tissue).

The morphological study could be performed in 26 cases at baseline. In all, 15 cases (58%) showed an histological stage III (Figure 1a); nine cases (35%), a stage II (Figure 2a, b); and two cases (7%), a stage I. After 12 months of treatment, 28 biopsies could be evaluated. There was a significant improvement in the lymphoid tissue morphology (*P* < 0.001): 15 cases (54%) were in histological stage II; 13 cases (46%), in stage I (Figure 1b, c); and none in stage III. Four out of six biopsies performed after 36 months of treatment were in histological stage I (67%), but two were still in stage II (33%). There was a positive statistical correlation between lymphoid tissue viral load and the histological stage: high levels of lymphoid tissue viral load correlate with high histological stages, and low levels of lymphoid tissue viral load correlate with low histological stages (*P* = 0.040).

In basal biopsies, the median follicular area was 0.05 mm<sup>2</sup> and the median proportion of follicular areas with regard to the total amount of lymphoid tissue was 1.61% (range 0–15.52%). These parameters increased significantly after 12 months of treatment: the median follicular area was 0.17 mm<sup>2</sup>

**Table 2** Relationship between lymphoid tissue viral load (LTVL) and follicular area (FA) in HAART-treated patients

	Time after treatment	Total cases	Median	Range	P-value
LTVL (copies/mg tissue)	Basal	30	1 542 691	405–8 380 952	0.013 <sup>a</sup>
	12 mo.	30	8915	<40–100 000	
	36 mo.	6	12 030	<40–35 000	
FA (mm <sup>2</sup> )	Basal	26	0.05	0–0.24	0.018 <sup>a</sup>
	12 mo.	28	0.17	0.04–1.23	
	36 mo.	6	0.15	0.07–0.33	

<sup>a</sup>*P*-value between samples at baseline and after 12 months of treatment.

**Table 3** Relationship between histological stages and p24 expression in HAART-treated patients

	Time after treatment	Total cases	N. cases (%)			P-value	
			I	II	III		
Histological stages	Basal	26	2 (7)	9 (35)	15 (58)	<0.001 <sup>a</sup>	
	12 mo.	28	13 (46)	15 (54)	0		
	36 mo.	6	4 (67)	2 (33)	0		
p24 grades			0	1	2	3	<0.001 <sup>a</sup>
	Basal	17	0	2 (11)	3 (18)	12 (71)	
	12 mo.	20	10 (50)	7 (35)	3 (15)	0	
	36 mo.	6	2 (33)	4 (67)	0	0	

<sup>a</sup>*P*-value between samples at baseline and after 12 months of treatment.

( $P=0.018$ ), and the median proportion of follicular areas with regard to the total amount of lymphoid tissue was 8.47% (range 2–20.59%) ( $P<0.001$ ). However, these parameters did not change significantly after 36 months of treatment, when compared with those after 12 months of treatment (the median follicular area was 0.15 mm<sup>2</sup> and the median proportion of follicular areas with regard to the total amount of lymphoid tissue was 10.72%). There was a statistical correlation between the histological stage with both follicular area and the proportion of follicular areas with regard to the total amount of lymphoid tissue ( $P<0.001$ ).

The immunoexpression of p24 was assessed in 17 initial biopsies. All cases were positive with 12 cases (71%) in grade 3 (Figure 2c); three cases (18%), in grade 2; and two cases (11%) in grade 1. After 12 months of treatment, the immunoexpression of p24, assessed in 20 cases, decreased significantly ( $P<0.001$ ). However, it was still positive in 10 cases: seven in grade 1 (35%), and three in grade 2 (15%). p24 was negative in the other 10 cases (50%). After 36 months of treatment, the p24 expression was still positive in four out of six cases (67%), all them in grade 1. In the cases with follicular structures (stages I and II) the immunoexpression of p24 was superposed on the CD21 expression (Figure 2b, c).

### Lymphocyte Subset in Interfollicular Areas of the Lymphoid Tissue

The results of the counts of CD4+, CD8+ cells, cytotoxic lymphocytes, memory, naive, naive proliferating, and B lymphocytes in the interfollicular areas are shown in Table 4.

At baseline, the median counts of CD4+ and CD8+ cells were 251 and 246 cells per HPF, respectively. The median count of cytotoxic lymphocytes was 198 cells per HPF. A significant increase of CD4+ cells ( $P<0.001$ ) (Figures 3a, b) and decrease of CD8+ cells and cytotoxic lymphocytes (both  $P<0.001$ ) was observed after 12 months of treatment (median of 456, 121, and 97 per HPF, respectively). Consequently, the ratio CD4+/CD8+ in lymphoid tissue also increased significantly ( $P<0.001$ ). We found a positive correlation between the number of CD8+ and the histological stage of the lymphoid tissue ( $P=0.010$ ). After 36 months of treatment the mean value for each cell count did not change significantly (median CD4+: 426, CD8+: 143 and cytotoxic lymphocytes: 89 per HPF), when compared to that of the previous determination. The tonsils of non-HIV persons, used as control cases had a higher median of CD4+ cells (638 per HPF), and a lower number of CD8+ cells (96 per HPF) and cytotoxic lymphocytes (65 per HPF), even when compared with the determinations of HIV-infected persons after treatment (Figure 3c).

**Table 4** Cells per HPF in interfollicular areas of lymphoid tissue in HAART-treated patients

	Time after treatment	Range	Median	P-value
CD4+	Basal	60–449	251	<0.001 <sup>a</sup>
	12 mo.	158–623	456	
	36 mo.	345–510	426	
	Control	550–737	638	
CD8+	Basal	81–343	246	<0.001 <sup>a</sup>
	12 mo.	25–268	121	
	36 mo.	60–226	143	
	Control	90–104	96	
Cytotoxic lymphocytes (CD8+ granzyme B+)	Basal	68–297	198	<0.001 <sup>a</sup>
	12 mo.	41–198	97	
	36 mo.	45–102	89	
	Control	61–75	65	
CD45RO+	Basal	240–580	372	<0.001 <sup>a</sup>
	12 mo.	310–720	496	
	36 mo.	206–482	420	
CD45RA+	Basal	82–336	192	<0.001 <sup>a</sup>
	12 mo.	164–576	420	
	36 mo.	198–375	312	
CD45RA+Ki67+	Basal	2–20	10	0.110 <sup>a</sup>
	12 mo.	4–24	12	
	36 mo.	6–12	10	
CD20+	Basal	35–175	100	0.160 <sup>a</sup>
	12 mo.	14–132	89	
	36 mo.	38–119	81	

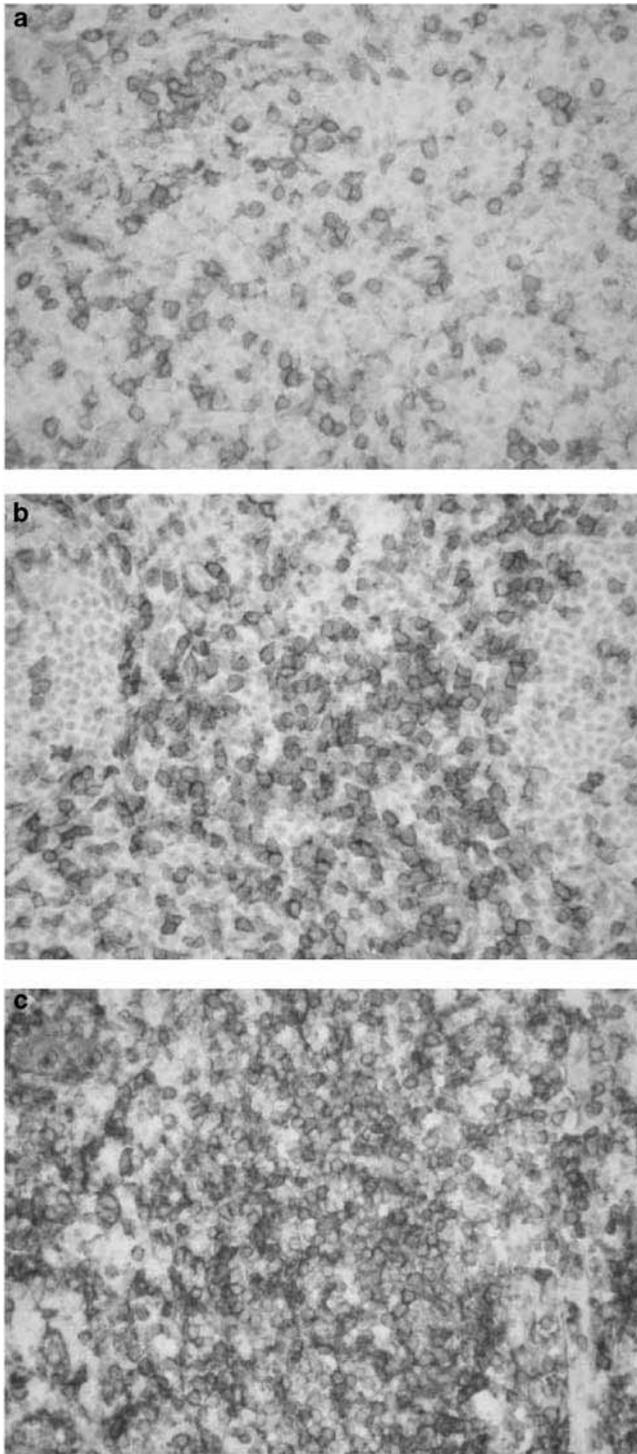
<sup>a</sup>P-value between samples at baseline and after 12 months of treatment.

In initial biopsies, the median counts of memory, naive, and proliferating naive cells were 372, 192, and 10 per HPF, respectively. After 12 months of treatment, both memory and naive cells increased significantly (median of 496 and 420 per HPF, respectively) (both  $P<0.001$ ), but the increase of naive cells was higher, and there was an improvement in the ratio naive/memory cells. Proliferating naive cells also increased, but not significantly (median of 12 per HPF). After 36 months of treatment, these parameters did not change significantly, and the median counts of memory cells were 420, naive cells 312, and the proliferating naive cells 10 per HPF. Only naive cells correlated with lymphoid tissue viral load ( $P=0.045$ ).

The median count of CD20+ cells (B lymphocytes) in interfollicular areas at baseline was 100 per HPF. After 12 and 36 months of treatment this parameter did not change significantly, and it was 89 and 81 per HPF, respectively.

### Intrafollicular Cytotoxic Lymphocytes

Cytotoxic lymphocytes (CD8+ granzyme B+ cells) inside the follicular structures were counted in 11



**Figure 3** CD4<sup>+</sup> cells in interfollicular areas of the lymphoid tissue. (a) Before treatment, the number of CD4<sup>+</sup> cells is impaired. (b) The same case after 12 months of HAART shows recovery of the number of CD4<sup>+</sup> cells. (c) Lymphoid tissue of non HIV-infected person (control case): higher number of CD4<sup>+</sup> than that of HIV-infected persons, even after treatment.

cases with follicular structures in the initial biopsies. In these cases, the median count of intrafollicular cytotoxic lymphocytes was 20 cells per HPF (range 7–30). After 12 months of treatment, the

median count of cytotoxic lymphocytes decreased significantly, and it was of 11 cells per HPF (range 5–19) ( $P=0.004$ ). After 36 months of treatment, the median intrafollicular cytotoxic lymphocyte count was 16 (range 6–22), and there was no statistical difference when compared to the previous determination. The median intrafollicular cytotoxic lymphocytes counted in the tonsillar lymphoid tissue of non-HIV-infected persons (control cases) was two cells per HPF (range 1–3).

### Peripheral Blood Determinations

Plasma viral load decreased significantly after 12 months of treatment ( $P<0.001$ ), and turned into undetectable in all cases. It was still undetectable after 36 months of treatment. We found a statistical correlation between plasma viral load and the histological stage of the lymphoid tissue ( $P=0.013$ ); but not with lymphoid tissue viral load or other lymphoid tissue parameters.

In peripheral blood also there was a significant increase of CD4<sup>+</sup> ( $P=0.02$ ) and decrease of CD8<sup>+</sup> after treatment ( $P=0.019$ ). Thus, the ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in peripheral blood increased significantly after treatment ( $P<0.001$ ). At the moment of the third biopsy, after 36 months of treatment, these parameters did not change significantly.

The ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was lower in peripheral blood than in lymphoid tissue. We did not find statistical correlation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in peripheral blood with CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> in lymphoid tissue. However, the ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in peripheral blood correlated with the same ratio in lymphoid tissue ( $P=0.049$ ).

### Discussion

Tonsillar biopsies can be performed repeatedly in the same patient and provide an accessible source of lymphoid tissue. In spite of these biopsies being small samples, they are useful to measure the HIV RNA (lymphoid tissue viral load), to study the lymphoid tissue architecture, and to perform immunohistochemical procedures for p24 antigen and lymphoid cell subset assessment. The quantification of lymphocyte cell subsets can be more exact using flow cytometry. However, this technique requires larger amounts of lymphoid tissue and does not supply other useful information, such as the lymphoid tissue architecture and lymphoid cells arrangement.

In HIV infection, the follicular dendritic cells are responsible for the transmission of the infection, binding virions on their surfaces in immune complexes.<sup>1–4</sup> We have demonstrated viral presence in lymphoid tissue by means of polymerase chain reaction and immunohistochemistry using a monoclonal antibody which recognizes the HIV p24 core antigen.<sup>22</sup> Some reports have stated that the

localization of the immunohistochemical reaction of HIV p24 gives results parallel to viral RNA determined by hybridization *in situ*.<sup>23,24</sup> In our cases, the immunohistochemical reaction for HIV p24 was positive mainly following a follicular dendritic cell distribution, as the immunoexpression of this antigen has been superposed on that of CD21, a follicular dendritic cell marker (Figure 2b, c). Retention of infectivity of HIV-1 associated with follicular dendritic cells indicates that this compartment behaves as a continuing source of infection.

After treatment with HAART, the lymphoid tissue viral load and the immunoexpression of p24 antigen decreased significantly. However, lymphoid tissue viral load did not disappear in all cases. Moreover, p24 antigen was still positive in half of the cases after 12 months of treatment, and even in four cases out of six after 36 months of treatment, in spite of all cases showing an undetectable plasma viral load. These facts demonstrate that the study of lymphoid tissue is more accurate than that of the peripheral blood for determining the viral suppression with the treatment.

The architectural changes in lymphoid tissue during HIV-1 infection have been exhaustively described in past years and have been related to the stage of the disease.<sup>12,13</sup> The HIV-1 infection produces firstly a lymphoid follicular hyperplasia, in which germinal centres are prominent. In this stage, the mantle cell can be effaced, and follicle lysis images can be seen. The following stage in the progression of the infection is the follicular involution of the lymphoid tissue. In this stage, follicles are small and the meshwork of follicular dendritic cell is disrupted, the follicles are mainly formed by these cells, whereas B centre cells are scarce. When the disease progresses, there is a depletion of lymphocytes and the follicles disappear. In this stage, there is usually stromal vascular proliferation. These histological alterations described above correlate perfectly with the clinical evolution of the HIV-1 infection in untreated HIV-1 infected persons.<sup>12,13</sup> In this study, we have demonstrated that these morphological alterations correlate significantly with the quantification of HIV-1 RNA in lymphoid tissue and peripheral blood. In initial biopsies, the lymphoid tissue in histological stage II had lower lymphoid tissue viral load than those in stage III. After treatment, the cases in stage I had lower lymphoid tissue viral load than those in stage II. In fact, high levels of lymphoid tissue viral load correlated with advanced histological stages, even when T-cell subsets in peripheral blood did not show such an extreme alteration. Before initiating treatment, all patients had a number of CD4+ lymphocytes in peripheral blood  $>500 \times 10^6/l$ , and at the same time, in 15 out of 26 (58%) cases, the lymphoid tissue showed destruction of the lymphoid follicles and prominent stromal vascularity, and it was classified as stage III (Figure 1a). Our study also confirms the recovery of lymphoid tissue

architecture after treatment with HAART, as most cases evolved to stages I or II, in which the follicular structures reappeared well or partially formed, respectively (Figures 1b,c). The capacity of recovery of the follicular dendritic cells after treatment with HAART had been pointed out in previous studies.<sup>20,21,25</sup>

The architectural changes in lymphoid tissue are associated with a progressive alteration in the balance of T-cell subsets. The infection produces a decrease of CD4+ T lymphocytes, which we have demonstrated clearly in lymphoid tissue before treatment. CD8+ T lymphocytes, specially the cytotoxic lymphocytes, which express immunohistochemically granzyme B, TIA-1 and esterase, are increased in first phases of the infection.<sup>13</sup> These cells are found mainly in the interfollicular areas, and also inside the follicular structures, attracted by a chemotactic effect produced by the virus.<sup>11</sup> We have observed a high number of CD8+ cells, most of them cytotoxic lymphocytes, in interfollicular areas, as well as inside the follicular structures, before treatment. After treatment, we have observed a significant increase of CD4+ and decrease of CD8+ cells and cytotoxic lymphocytes, the latter in both interfollicular and intrafollicular areas. However, in spite of treatment, we have demonstrated that this improvement in the T-cell subsets do not reach the normal parameters observed in tonsils of non-HIV-infected persons, used as control cases. These observations also confirm that the presence of high number of intrafollicular cytotoxic lymphocytes could be considered a hallmark of HIV infection. This is the first time that lymphoid tissue of HIV-infected persons has been studied after 36 months of treatment with HAART. Our results indicate that the morphology and the lymphoid subsets do not improve after such a long period of treatment.

In spite of the fact that the values in peripheral blood reflect the events in lymphoid tissue, T cells in the circulating blood represent only 1–2% of the total body pool. We have not found a correlation between CD4+ and CD8+ cells in both compartments before and after treatment. The ratio CD4+/CD8+ was higher in lymphoid tissue than in peripheral blood, as other studies using flow cytometry have observed.<sup>26</sup> However, we have found a positive statistical correlation between the ratio CD4+/CD8+ in lymphoid tissue and peripheral blood, which indicates a constant equilibrium between both compartments.

CD4+ and CD8+ lymphocytes emigrate from the thymus when they are physiologically matured, and they express a specific isotype of the CD45 family, the CD45RA antigen.<sup>27</sup> These cells, immunologically naive, turn into a CD45RO+ phenotype characteristic of memory T cells, after challenging an antigen in the periphery.<sup>28</sup> The balance between the naive and memory T cells is crucial for maintaining an efficient immune response. In HIV infection, naive

and memory CD4+ T-cell counts decrease in different stages of disease. Persons with HIV infection initially show a selective loss of memory cells, and as absolute CD4+ T-cell counts decrease, the naive CD4 T cells are also lost.<sup>29</sup> These events can be explained taken into account the several mechanisms by which HIV depletes CD4+ T lymphocytes. On one hand, HIV induces an increased immune activation that leads a persistent proliferation and a higher rate of death of CD4+ T cells.<sup>4-7</sup> On the other, in HIV-infected persons there is an impaired production of T cells by suppression of hematopoiesis.<sup>9,10</sup> These mechanisms do not act equally on CD8+ T cells, which increase until the late stages of HIV-1 infection, due to an increased activation, but not an increase in the death rate.<sup>6,8</sup>

The treatment with HAART produces a recovery of the immune response, which is dependent on the regeneration of the naive and memory CD4+ T cells. In first weeks after initiating the treatment there is a release of memory cells from lymphoid tissue to peripheral blood,<sup>30</sup> but later there is an increase of memory cells in both compartments due to a decrease of CD4+ cells proliferation and death.<sup>6,7,14,31</sup> However, the treatment with HAART also produces an increase of newly generated naive cells due to an increase of thymic production<sup>14-16</sup> and/or a peripheral expansion of naive cells.<sup>32</sup> In our study, we have observed an increase of both naive and memory cells in interfollicular areas of the lymphoid tissue, after 12 and 36 months of HAART. Interestingly, the relation naive/memory cells improved after treatment, indicating that the treatment effect on the T-cell turnover works preferably on the lymphoid production, at this time. The proliferating naive cells (CD45RA+ Ki-67+) have shown only a slight increase after 12 months of treatment. It has been proposed the value of naive cells as a marker of the improvement of the immunity of these patients during treatment.<sup>26</sup> We have found a correlation between the increase of naive cells in lymphoid tissue and the decrease of lymphoid tissue viral load. In our cases, after treatment, there was an increase of naive, memory and CD4+ cells in interfollicular areas of the lymphoid tissue, whereas a decrease of CD8+ cells and a practically invariable number of B lymphocytes occurred in this site. Therefore, most of these increased naive and memory cells must be CD4+ cells.

In conclusion, the changes in the lymphoid tissue architecture correlate with the viral quantification in both lymphoid tissue and peripheral blood. In spite that the treatment with HAART produces a significant improvement of all the parameters studied in lymphoid tissue, this recovery is not complete, even after 36 months of treatment. Thus, the study of lymphoid tissue in HIV infection provides a more accurate information about viral reservoir and cellular immunological improvement than peripheral blood determinations, for monitoring responses to therapy.

## Acknowledgements

We thank Margarita Mainar and Elena Gonzalvo for performing the immunohistochemical techniques. Dr José M Miró was a recipient of a Research Grant from IDIBAPS, Barcelona, Spain. This study has been partially supported by 'Red Temática Cooperativa de Investigación en Sida del FIS (Red de Grupos 173)'.

## References

- 1 Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, *et al*. Follicular dendritic cells are major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T helper cells. *Am J Pathol* 1992;140:15-22.
- 2 Haase AT, Henry K, Zupancic M, *et al*. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 1996;274:985-989.
- 3 Cavert W, Notermans DW, Staskus K, *et al*. Kinetics of response in lymphoid tissue to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997;276:960-964.
- 4 Tenner-Racz K, Stellbrink HJ, vanLunzen J, *et al*. The unlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of Highly Antiretroviral Therapy. *J Exp Med* 1998;187:949-959.
- 5 Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, *et al*. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 1999; 5:83-89.
- 6 Mohri H, Perelson AS, Tung K, *et al*. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J Exp Med* 2001; 194:1277-1287.
- 7 Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, *et al*. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med* 2001;194:1731-1741.
- 8 Ribeiro RM, Morí H, Ho DD, *et al*. *In vivo* dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:15572-15577.
- 9 Moses A, Nelson J, Bagby GC. The influence of immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood* 1998;91:1479-1495.
- 10 Huang SS, Barbour JD, Deeks SG, *et al*. Reversal of human immunodeficiency virus type 1-associated hematosuppression by effective antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000;30:504-510.
- 11 Laman JD, Claassen E, Van Rooijen N, *et al*. Immune complexes on follicular dendritic cells as a target for cytolytic cells in AIDS. *AIDS* 1989;3:543-548.
- 12 Chadburn A, Metroka C, Moudradian J. Progressive lymph node histology and its prognostic value in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Hum Pathol* 1989;20: 579-587.
- 13 Knowles DM, Chadburn A. Lymphadenopathy and lymphoid neoplasms associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). In: Knowles DM (ed). *Neoplastic Hematopathology*. William and Wilkins: Baltimore, 2001, pp 987-989.

- 14 McCune JM, Hanley MB, Cesar D, *et al*. Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J Clin Invest* 2000;105:R1–R8.
- 15 Franco JM, Rubio A, Martinez-Moya M, *et al*. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2002;99:3702–3706.
- 16 Kolte L, Dreves AM, Ersboll AK, *et al*. Association between larger thymic size and higher thymic output in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002;185:1578–1585.
- 17 Martinez E, Arnedo M, Giner V, *et al*. Lymphoid tissue viral burden and duration of viral supresión in plasma. *AIDS* 2001;15:1–6.
- 18 Naverrete P, Morente V, Garcia F, *et al*. Predictors of tonsillar tissue HIV-1 viral burden at baseline and after 1 year of antiretroviral therapy. *Antiviral Therapy* 2003;8:635–637.
- 19 Lange CG, Valdez H, Connik E, *et al*. Limited immune restoration after 3 years suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS* 2002;16:1859–1866.
- 20 Macias J, Japon MA, Leal M, *et al*. Structural normalization of the lymphoid tissue in asymptomatic HIV-infected patients after 48 weeks of potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2001;15:2371–2378.
- 21 Schacker TW, Nguyen PL, Martinez E, *et al*. Persistent abnormalities in lymphoid tissues of HIV-infected persons successfully treated with anti-retroviral therapy. *J Infect Dis* 2002;108:1092–1097.
- 22 Kaluza G, Willems WR, Lohmeyer J, *et al*. A monoclonal antibody that recognizes a formalin-resistant epitope on the p24 core protein of HIV-1. *Path Res Pract* 1992;188:91–96.
- 23 Wenig BM, Thompson LDR, Frankel SS, *et al*. Lymphoid changes of the nasopharyngeal and palatine tonsils that are indicative of human immunodeficiency virus infection. A clinicopathologic study of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 1996;20:572–587.
- 24 Kuster H, Opravil M, Ott P, *et al*. Treatment-induced decline of human immunodeficiency virus-1 p24 and HIV-1 RNA in lymphoid tissue of patients with early human immunodeficiency virus-1 infection. *Am J Pathol* 2000;156:1973–1986.
- 25 Zhang ZQ, Schuler T, Cavert W, *et al*. Reversibility of the pathological changes in the follicular dendritic cell network with treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:5169–5172.
- 26 Nokta MA, Li XD, Nichols J, *et al*. Homeostasis of naive and memory T cell subpopulations in peripheral blood and lymphoid tissues in the context of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2001;183:1336–1342.
- 27 Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Development of human T and natural killer cells. *Blood* 1995;85:2654–2670.
- 28 Clement LT. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers of human T cell differentiation. *J Clin Immunol* 1992;12:1–10.
- 29 Ginaldi L, DeMartinis M, D'Ostilio A, *et al*. Activated naive and memory CD4+ and CD8+ subsets in different stages on HIV infection. *Pathobiology* 1997;65:91–99.
- 30 Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, *et al*. Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999;103:1391–1398.
- 31 Zhang ZQ, Notermans DW, Sedgewick G, *et al*. Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:1154–1159.
- 32 Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, *et al*. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-infection. *J Clin Invest* 1999;103:453–460.

## DISCUSIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

Los reservorios del VIH-1 se establecen en fases muy iniciales de la infección. Un estudio reciente documenta la presencia de gran cantidad de ARN vírico en ganglios linfáticos de individuos expuestos dos días después de la aparición de síntomas asociados con la infección aguda, incluso antes de la detección de anticuerpos (276).

También se ha demostrado la existencia de un pequeño pool de células de vida media larga, linfocitos T CD4+ infectados, a partir del cual se puede recuperar el virus mediante técnicas de cultivo ultrasensible (68;196;211), teniendo la mayoría de los linfocitos T CD4+ fenotipo memoria. La vida media de este reservorio es contradictoria, estimándose entre 6 (9) y 43 meses (211), aunque datos recientes sugieren que podría durar más de 60 meses (382). De todas maneras los linfocitos T CD4+ infectados que permanecen latentes son sólo uno de los reservorios en la infección por el VIH-1 existiendo otros como pueden ser el sistema nervioso central, el semen, el tejido renal y el tejido linfático que es el motivo principal de nuestros estudios.

Los principales marcadores para el seguimiento y pronóstico de los pacientes infectados con el VIH-1 son la carga viral plasmática y las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica. Su eficacia para el estudio de la replicación viral y la inmunodeficiencia o como predictores de la evolución de pacientes con o sin tratamiento ha sido ampliamente demostrada (5;7;126;191;207-210). Sin embargo, en ocasiones, pueden no ser suficiente para el estudio de los cambios acaecidos después de la terapia antirretroviral administrada ya que diversos trabajos han evidenciado discrepancias entre los hallazgos en sangre periférica y en tejido linfático, tanto al valorar la replicación viral (11-16;365) como los cambios en los niveles de las subpoblaciones de linfocitos (17-19). Incluso

se ha descrito la existencia de pacientes con carga viral plasmática indetectable pero con presencia de carga viral en varios compartimentos, entre ellos el tejido linfático (14;16). Esto podría explicar casos clínicos de respuesta discordante de pacientes con caída de linfocitos T CD4+ a pesar de tener un buen control de la replicación viral (379).

**Comentario [mcb2]:** Página: 226  
Escrito por felipe

El manejo de la infección por el VIH-1 se basa actualmente en el uso de tratamientos antirretrovirales altamente efectivos combinados con la monitorización del efecto virológico del tratamiento en plasma. El objetivo de estos tratamientos es suprimir la replicación viral con tal de prevenir el desarrollo de resistencias y la progresión clínica, y permitir así la restauración de la función inmune (130).

En diversos estudios de investigación se produce la discusión de cómo se produce la restauración inmunológica, de cual es la replicación viral residual después de la supresión de la viremia (13) o porque existen discrepancias entre la carga viral y la respuesta de las células CD4+ en algunos pacientes infectados por el VIH-1 que reciben terapia antirretroviral (5). Este conocimiento de la dinámica de la replicación viral y de las poblaciones linfocitarias es esencial para poder combatir esta infección. Se cree que la CVTL influye sobre la CVP y los parámetros del sistema inmunológico del tejido linfático y de la sangre periférica tanto antes como después de TARGA, además de correlacionarse con los cambios anatomopatológicos en tejido linfático.

Está demostrado que los pacientes con CVP < 200 copias/ml y CVTL detectable tienen más posibilidad de fracaso que aquellos con CVTL indetectable. Por lo tanto, el conocimiento de las relaciones entre el tejido linfático y la sangre periférica permitiría identificar marcadores en periferia, más accesibles y repetibles, que nos indicasen qué pacientes están realmente inhibidos en tejido linfático y por tanto tienen menor riesgo de fracaso (15). Esto permitiría modificar las pautas de TARGA para evitar dicho fracaso.

Estos últimos interrogantes y el comportamiento diferente entre la sangre periférica y el tejido linfático ha promovido que las investigaciones actuales profundicen en el estudio de este tejido para poder dilucidar su papel como reservorio de la replicación viral y poder valorar con mayor exactitud el efecto de la medicación antirretroviral y la recuperación inmunológica con inmunoterapia o para pronosticar el tiempo con viremia suprimida después del tratamiento (13).

Siguiendo esta línea, en nuestros estudios, hemos investigado las relaciones entre los cambios producidos en la carga viral y las subpoblaciones de linfocitos en el tejido linfático amigdalario y en sangre periférica con el objetivo de buscar marcadores más exactos para el seguimiento y pronóstico de los pacientes infectados con el VIH-1, así como la influencia de esta carga viral, antes o después de la instauración del tratamiento, en la persistencia de las alteraciones en el sistema inmunológico del tejido linfático.

**Comentario [mcb3]:** Página:  
227  
Escrito por felipe

## **2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL LINFÁTICO. BIOPSIAS AMIGDALARES**

Existen una serie de problemas que aparecen cuando se estudia la carga viral en compartimentos extraplasmáticos. Entre ellos están la falta de consenso sobre el lugar anatómico donde debe ser investigado, el procedimiento ideal para realizar la biopsia, qué método utilizar para la medida de la carga viral y la unidad que debe ser medida (células, miligramos,...).

Los sitios más comunes para medir la carga viral en el tejido linfático son la mucosa rectal, las amígdalas y los ganglios linfáticos. Los primeros estudios con material linfático se realizaron con material obtenido de la biopsia de ganglios linfáticos (13). Sin embargo, este procedimiento presenta algunos inconvenientes. El principal es que es una técnica invasiva que necesita una intervención quirúrgica con los riesgos inherentes a la misma. Además, es difícil de repetir muchas veces.

Estos problemas con las biopsias de los ganglios linfáticos han obligado a algunos autores a buscar otras formas de obtener muestras de tejido linfático. Otra técnica que se ha utilizado es la punción y aspiración de los ganglios linfáticos con aguja fina (PAAF) (17;197-199). Este procedimiento es menos agresivo, pero tiene unas importantes limitaciones. La primera es que necesita un técnico experimentado para realizarla, que en la mitad de los casos no se obtiene material analizable y cuando se obtiene sólo permite el estudio citológico, perdiéndose la información sobre la arquitectura del nódulo linfático.

Algunos de los más relevantes avances en este campo se han realizado mediante una tercera técnica, la biopsia de las amígdalas palatinas (21;120;220;395). Como hemos presentado en nuestros trabajos, el estudio de las amígdalas permite no sólo el estudio y comparación de la carga viral, las subpoblaciones de linfocitos T y las

respuestas linfoproliferativas a las terapias instauradas sino también la repercusión en la constitución del tejido linfático. Entre los dos trabajos presentados (233;396) se realizaron 172 biopsias sin que se presentaran complicaciones importantes en ningún caso lo que demuestra que la técnica es poco invasiva y reproducible lo que permite el estudio seriado de los pacientes. La experiencia en el Hospital Clínic de Barcelona en la práctica de las biopsias de amígdalas respalda la seguridad de este procedimiento (11;12;15;78;233;365;396) en los que sólo se produjeron cinco hemorragias leves que se limitaron con compresión y dos moderadas que debieron ser cauterizadas con nitrato de plata, todas ellas sin afectación del estado general del paciente (datos no presentados).

### **3. RELACIÓN ENTRE LAS CARGAS VIRALES Y LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T ENTRE EL PLASMA Y EL TEJIDO LINFÁTICO AMIGDALAR**

La carga viral plasmática se ha convertido en una herramienta decisiva para la predicción de progresión a SIDA y muerte, y control de la efectividad del tratamiento antirretroviral en pacientes infectados por el VIH-1. Pero en algunos casos y sobre todo en estudios de inmunopatogenia es necesario investigar el valor de la carga viral en otros compartimentos distintos al plasma, como el tejido linfático, el líquido cefalorraquídeo y el semen. La importancia del estudio de estos otros compartimentos radica en que si el objetivo de la terapia antirretroviral es una completa supresión de la replicación viral, para evitar el desarrollo de resistencias al tratamiento y, de esta forma, mantener la durabilidad de su eficacia (211), se debería comprobar en todos los compartimentos, al menos en trabajos de investigación, ya que la dinámica de reducción de carga viral en estos reservorios podría ser diferente a la del plasma. En nuestros trabajos nos hemos centrado en el estudio del tejido amigdalario. Para poder tener un mejor conocimiento de su estado en los diferentes estadios de la infección y de la respuesta al tratamiento hemos buscado las relaciones con los marcadores en sangre periférica.

En líneas generales, el estudio de la carga viral y las subpoblaciones de linfocitos en el tejido amigdalario y su relación con los niveles plasmáticos sugieren que los parámetros sanguíneos son unos buenos marcadores del estado del tejido linfático de los pacientes que no han recibido tratamiento. Pero, en ocasiones, no son suficientes, especialmente para el estudio exhaustivo de la restauración inmunológica, de la replicación viral residual después de la supresión de la viremia (13) o para explicar las discrepancias entre la carga viral y la respuesta de las células CD4+ en pacientes infectados con el VIH-1 que reciben terapia antirretroviral (379).

### **3.1. RELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL EN TEJIDO LINFÁTICO AMIGDALAR Y PLASMA**

#### **3.1.1. Carga viral en tejido linfático y en plasma antes del tratamiento antirretroviral**

En los pacientes estudiados, 81 en el primer artículo (233) y 30 en el segundo (396), observamos una buena correlación entre la CVTL y los hallazgos en sangre periférica al inicio del estudio. Concretamente, al comparar los niveles de carga viral en tejido linfático y sangre periférica se demostró una correlación positiva significativa entre el  $\log_{10}$  de la carga viral en tejido amigdalario y el  $\log_{10}$  de la carga viral en plasma. Estos datos coinciden con los aportados por otros autores y sugieren que las medidas virológicas en plasma son buenos indicadores de los reservorios víricos en tejido amigdalario en pacientes sin tratamiento previo (80;279;280).

#### **3.1.2. Cambios de la carga viral en tejido linfático y en plasma después de la terapia antirretroviral**

La buena correlación entre las cargas virales del tejido linfático y sangre demostradas al inicio del estudio no se correspondió con la que encontramos en una segunda biopsia después del tratamiento antirretroviral. El efecto encontrado al comparar la carga viral en ambos compartimentos es similar a las discrepancias descritas durante la transición de la infección primaria a crónica. Mientras que el nivel de replicación del VIH-1 en tejido linfático permanece elevado, con una CVTL alta, la CVP disminuye significativamente (281).

Los datos descritos en la bibliografía sobre el nivel de replicación en tejido linfático en pacientes en tratamiento antirretroviral, varía según la metodología aplicada. Así mediante la utilización de técnicas de PCR, diversos autores\_(14;195;205) encuentran niveles indetectables de CVTL cuando los niveles de CVP son inferiores a 20 copias/ml, valores similares a los descritos por otros autores que utilizan otras técnicas de cuantificación (196;220). Una de estas técnicas es la hibridación in situ, método que nos permite detectar partículas víricas en el seno del tejido linfático. Mediante estas técnicas se ha demostrado que aunque con el TARGA el nivel de replicación puede bajar hasta un 99% en ganglios linfáticos (220) es posible detectar células infectadas con la expresión vírica en la mayoría de los casos después de 6 meses de tratamiento efectivo (16;104;196). Esto nos estaría indicando que la CVP indetectable durante periodos de tiempo prolongados, mediante el uso de técnicas de PCR ultrasensibles, no siempre refleja una completa supresión del VIH-1 en tejido linfático. Según Pantaleo y cols. (281) esta replicación residual podría relacionarse con células con bajo nivel de replicación, predominantemente macrófagos y células dendríticas. Su presencia, a pesar de un tratamiento con supresión efectiva nos podría explicar el rápido rebrote que presentan estos pacientes una vez se finaliza el tratamiento (355).

Como ha sido observado previamente por nuestro grupo y por otros autores (11;14;16;281), en nuestro estudio actual también encontramos diferencias entre la carga viral en plasma y tejido linfático después de un año de TARGA. En el primer estudio (233), en el tejido amigdalario de los pacientes que no habían recibido tratamiento previo se observó un alto número (70%) de pacientes con más de 100,000 copias/mg de tejido y sólo en 4 casos (5%) la carga viral era indetectable (por debajo de 40 copias/mg). En plasma, 4 pacientes (5%) tuvieron una carga viral por encima de 100,000 copias/ml y sólo en 10 (12%) fue indetectable (por debajo de 200 copias/ml). Después de un año de tratamiento, la mayoría

de los pacientes en ambos estudios (95% en el primero y 100% en el segundo) negativizaron los niveles de carga viral plasmática. Sin embargo, la disminución de la carga viral en tejido amigdalár fue menor, negativizándose sólo en un 71%. Estos resultados no se modificaron al valorar las cargas, en una tercera toma de muestras, a los 36 meses (2º artículo) (396) manteniéndose indetectable en todos los casos los niveles en sangre y detectándose en la mayoría (4/6) de los análisis del tejido amigdalár. El nivel medio de la carga viral a los 36 meses fue superior aunque no se pudo demostrar una diferencia significativa con los resultados del primer año. Las diferencias entre ambos compartimentos al medir la carga viral después de un año de tratamiento con antirretrovirales ya había sido presentada previamente por nuestro grupo y otros autores (11;14;16;281). Nuestros resultados a los 36 meses no se han podido contrastar porque no hemos encontrado otros estudios en la literatura que hicieran este estudio después de un seguimiento terapéutico tan largo.

Con formato

Entre los estudios que coinciden con los presentados en esta tesis sobre la diferencia entre la CVTL y la CVP después de TARGA destacan, por orden cronológico los de a) Lafeuillade y cols. (14), que encuentra CVTL variables en ganglios linfáticos según el régimen de TARGA; b) un trabajo de nuestro grupo (11), realizado en tejido linfático al año de TARGA; y c) el realizado por Günthard y cols (13) que demostraron que en los ganglios linfáticos había una mayor persistencia de CV que en las secreciones genitales y líquido cefalorraquídeo a los dos años de tratamiento.

La viremia basal no es sólo el mejor predictor de la progresión de la enfermedad (5;7) sino, como demostró Rizzardì y cols. (282), también es un buen predictor del tiempo de respuesta al tratamiento antirretroviral. Además, en el mismo estudio encontraron que la CVTL y la CVP iniciales tenían una capacidad predictora del tiempo para conseguir que la viremia bajase a niveles indetectables con TARGA similares. Sin embargo, en nuestro primer estudio, la respuesta de la CVTL después de un año de

TARGA no demostró estar correlacionada con el tiempo para conseguir la supresión de la CVP por debajo de 200 copias por minuto (233).

En resumen, los pacientes con infección crónica por el VIH-1 que no han recibido tratamiento antirretroviral presentan una correlación entre la carga viral en el tejido amigdalario y en el plasma. Sin embargo, después de un año de tratamiento antirretroviral se observan importantes discrepancias entre los cambios que presentan ambos compartimentos.

### **3.1.3. Cambios de la carga viral en tejido linfático y en plasma dependiendo del tipo de terapia antirretroviral. Predictores de la respuesta de la carga viral en tejido linfático.**

Al analizar los predictores de una respuesta virológica efectiva después de un año de TARGA se observó que estaban asociadas la CVTL al inicio del tratamiento, los linfocitos T CD4+ memoria y el tipo de TARGA. Sin embargo, en el estudio multivariado el tipo de TARGA permaneció como único predictor independiente de respuesta.

Después de un año de TARGA, la CVP fue indetectable en el 95% de los pacientes, sin poderse observar diferencias entre los diferentes regímenes terapéuticos; sin embargo, la CVTL demostró ser un método más sensible al detectar diferencias de la efectividad de las diferentes combinaciones terapéuticas. Los pacientes del primer estudio (233) que presentaron estos niveles indetectables en tejido amigdalario fueron 38 de los 40 pacientes (95%) que recibieron un régimen que incluía un inhibidor de la proteasa (ya fuera con 2 ITIAN o 1 ITIAN + 1ITINAN (efavirenz)) *versus* los 10 de los 18 pacientes (56%) que recibieron un régimen que contuviera nevirapina (más 2 ITIAN) y *versus* los 2 de los 12 pacientes (17%) que recibieron sólo dos ITIAN. El análisis multivariado demostró que aquellos pacientes que recibieron un régimen que contenía un

inhibidor de la proteasa tenían unos niveles menores en el análisis de la CVTL. Estudios previos de nuestro grupo y de otros autores también han demostrado que los regímenes que contenían un inhibidor de la proteasa tenían una eficacia mayor para reducir la viremia en los tejidos linfoides que aquellos con sólo inhibidores de la transcriptasa inversa (14;16;104;205;211). Nuestros estudios previos sugieren que únicamente con triple terapia (2 inhibidores de la transcriptasa asociados a un inhibidor de la proteasa) se puede obtener una supresión completa de la replicación viral en tejido linfático y, de esta forma, extender la durabilidad de la eficacia antirretroviral (364).

El fármaco ITIAN de primera elección en la actualidad es el efavirenz mientras que la nevirapina es el ITIAN alternativo. En nuestro estudio (233) se utilizó el efavirenz en 14 pacientes con buena respuesta plasmática y en tejido linfático. Algunos estudios aleatorizados han demostrado con efavirenz una supresión superior o similar a otros regímenes (397-400). En nuestro trabajo los estudios basados en un IP (más dos ITIAN o más efavirenz y un ITIAN) demostraron mejores resultados que la biterapia con dos ITIAN y que los pacientes que recibieron nevirapina más dos ITIAN. Sin embargo existen estudios, como el 2 NN (400), que demuestran una eficacia clínica similar entre efavirenz y nevirapina. En nuestro trabajo se observa que la mitad de los pacientes tienen la CVTL detectable con 2 ITIAN (estavudina + didanosina) + nevirapina pero sí hay otros autores que han conseguido CVTL indetectables con efavirenz (401). Además, en un estudio previo de nuestro grupo también se observó que la combinación de 2 ITIAN (zidovudina y lamivudina) + un IP (nelfinavir) era tan efectiva como los mismos ITIAN con nevirapina (402). En resumen, se puede especular que la nevirapina podría tener una menor eficacia en tejido linfático que efavirenz y que los IP. Hay que ser cautos de toda forma ya que no hay estudios comparativos en tejido linfático y pudiera ser que los 2 ITIAN utilizados en nuestro estudio + la nevirapina sean la causa de la menor

eficacia virológica y que otras combinaciones de 2 ITIAN (ej. zidovudina y lamivudina o tenofovir + lamivudina/emtricitabina) con nevirapina puedan ser más eficaces, aunque no hay datos.

Las dos mayores limitaciones del efavirenz son los efectos sobre el sistema nervioso central y el posible efecto teratogénico sobre los fetos. Por esto, a pesar de esta posible menor eficacia, la nevirapina es el ITIAN alternativo sobre todo en mujeres adultas con posibilidades de ser gestantes o con mal control anticonceptivo (130). Aunque en la actualidad hay un warning sobre su utilización como terapia inicial en mujeres con niveles de CD4 superiores a 250-300 cel/mm<sup>3</sup>. Las complicaciones mayores que presenta la nevirapina son a nivel hepático e incluso pueden ser mortales.

Los regímenes con IP (1 o 2 IP + 2 ITIAN) revolucionaron el tratamiento de la infección por el VIH-1. Consiguieron una supresión viral importante, mejoraron la función inmunológica y prolongaron la supervivencia del paciente (130). En nuestro trabajo demostraron que tenían una eficacia mayor que los otros regímenes para disminuir la carga viral en tejido linfático. Las complicaciones asociadas a estos fármacos son principalmente metabólicas como dislipemia y distribución anómala de la grasa.

Algunos estudios han demostrado mayor eficacia con efavirenz que con IP no potenciados (398;399). Sin embargo, en nuestro estudio hemos demostrado que cuando los IP se potencian con 2 ITIAN o 1 ITIAN + efavirenz tienen mejor resultado que la nevirapina + 2 ITIAN y que con regímenes basados en doble ITIAN. No obstante ya se había demostrado previamente que los regímenes que contienen efavirenz son más efectivos que las triples terapias con ITIAN para el tratamiento inicial de la infección por VIH-1 (397). Pero como ya hemos resaltado antes, **estos datos tienen que ser tomados con precaución ya que los ITIAN que tomaban los pacientes con tratamiento con nevirapina no son**

comparables con los que tomaban los pacientes con regímenes que contenían IP .

Comentario [mcb4]: Página:  
237  
Escrito por felipe

La alta sensibilidad demostrada por la CVTL es importante, primero, para estudiar la efectividad de las nuevas drogas antirretrovirales no sólo sobre la CVP; y segundo, como factor pronóstico como ha demostrado recientemente un estudio de nuestro grupo en el que aquellos pacientes con CVP indetectable pero con CVTL detectable tenían una duración menor de tiempo de supresión viral en el plasma al compararlos con aquellos pacientes a los que se podía detectar la carga viral en tejido amigdalario (15).

### **3.2. RELACIÓN ENTRE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN TEJIDO LINFÁTICO Y PLASMA**

A pesar de que los valores en sangre periférica pueden ser un reflejo de lo sucedido en el tejido linfático, puede haber discrepancias entre ambos compartimentos debido a que las células T en la circulación sanguínea sólo representan el 1-2% de la cantidad total del cuerpo. En nuestro estudio, hemos observado discrepancias entre las determinaciones de subpoblaciones de linfocitos T en tejido linfático y sangre periférica.

En los dos estudios presentados, se estudiaron y compararon los niveles de CD4+ y CD8+ entre tejido linfático y sangre periférica. Además, se analizaron las diferentes subpoblaciones de linfocitos en las áreas interfoliculares y su evolución con el tratamiento: linfocitos memoria (CD45RO+), vírgenes (CD45RA+), vírgenes proliferantes (CD45RA+ Ki67+), linfocitos B (CD20+) y los citotóxicos (CD8+ granzima B+). Estos últimos también se analizaron en el interior de los folículos linfoides.

### **3.2.1. Comparación de los niveles de linfocitos CD4+ y CD8+ en tejido linfático y sangre**

Está descrito que al inicio de la infección hay una disminución de las células CD4+ y un aumento de las CD8+ tanto en sangre periférica como en tejido linfático (19). Estos datos coinciden con nuestros resultados ya que nuestros pacientes con infección por el VIH-1, y que no habían recibido tratamiento previo, también tenían unos niveles de linfocitos T CD4+ en el tejido linfático inferiores que los controles sin infección.

Como han demostrado algunos autores, la supresión estable de la replicación del VIH después del TARGA se asocia con unos beneficios clínicos e inmunológicos en la mayoría de los pacientes, a pesar de que el grado de reconstitución inmune es sólo parcial, sobre todo una vez que el sistema inmune ha sido gravemente dañado, lo que ocurre en pacientes con infección avanzada por el VIH -1 (94-100). Hasta hace poco tiempo, se aceptaba que se podía conseguir una normalización completa de las subpoblaciones y la función de los linfocitos T si la supresión de la replicación de VIH -1 se iniciaba y se mantenía durante los estadios iniciales de la infección asintomática, cuando la homeostasis de los linfocitos T CD3+ todavía estaba preservada y los niveles de linfocitos T CD4+ se mantenían estables con  $> 500 \times 10^6$  células/l (78).

Sin embargo Brenchley y cols. (273) han cuestionado la teoría aceptada hasta la fecha de que la deplección de los linfocitos CD4+ se debe a una infección y muerte celular provocada por el virus mientras existe un reemplazo por parte de células que proceden de la sangre o del timo y así la deplección se debía a un balance negativo entre la muerte y el reemplazo en las etapas finales de la infección. Ellos defienden que los linfocitos CD4+ se activan desde el inicio de la infección y esta activación inmune puede provocar la deplección de los linfocitos T

al imponer una cadena irreversible de continuas situaciones de activación y muerte que drenará lentamente los pools de linfocitos T vírgenes y memoria. Esta destrucción masiva de los linfocitos T CD4+ ocurriría en las mucosas en la fase de infección aguda por lo que tendría una repercusión menor en sangre periférica. Esta teoría ha sido demostrada en estudios en simios, en los que se observó que la estimulación crónica puede provocar una inmunodeficiencia. Esta teoría podría explicar porque es tan difícil identificar una correlación coherente entre la inmunidad y la evolución y la progresión de la enfermedad a partir de estudios que examinan los linfocitos en sangre periférica y por tanto incrementa la importancia del estudio en profundidad del tejido linfático desde las primeras fases de la infección.

En líneas generales, la supresión de la replicación del VIH-1 después de un año de TARGA en las fases iniciales de la infección crónica por el VIH-1 resulta en un sustancial aumento en el número de linfocitos T CD4+ y una disminución del número de linfocitos T CD8+ tanto en tejido linfático como en sangre periférica que coinciden con los datos presentados por nuestro grupo en un estudio previo (78). Sin embargo, los niveles siguen sin llegar a igualar los de los controles no infectados, incluso en aquellos casos en los que se analizaron después 36 meses de tratamiento.

A pesar de un comportamiento similar en ambos compartimentos, tejido linfático y sangre, no pudimos demostrar una correlación entre el tejido linfático y la sangre para ninguno de los grupos de linfocitos ni antes ni después del tratamiento.

Los cambios que se producen con TARGA provocan un aumento significativo de la razón CD4+/CD8+. Esta ratio CD4+/CD8+ resultó mayor en tejido linfático que en sangre periférica, como ya se había descrito por otros estudios mediante citometría de flujo en ganglios linfoides (19;304) y en tejido amigdalario (19). A pesar de no haber encontrado correlaciones entre los linfocitos CD4+ ni los CD8+ al comparar sangre periférica y el

tejido linfático, sí se encontró una correlación positiva cuando se comparó la ratio CD4+/CD8+ entre ambos compartimentos, al igual que habían encontrado Nokta y cols. (19). Estos resultados sugieren que la distribución de linfocitos T CD4+ y CD8+ en tejido linfático y sangre periférica está en un equilibrio constante. Esto implica que las alteraciones en la composición de las subpoblaciones de linfocitos T, debidas a apoptosis o regeneración, probablemente afecta la homeostasis de las otras subpoblaciones sistemáticamente. La relación observada indica que los perfiles de linfocitos T y sus subpoblaciones en tejido linfático pueden ser deducidas a partir de las distribuciones en sangre periférica (19).

**Comentario [mcb5]:** Página: 240  
importante

En resumen, la mejoría de los niveles de las subpoblaciones de linfocitos conseguida con TARGA demostrada en tejido amigdalario con el tratamiento, tanto a los 12 como a los 36 meses, no alcanza los parámetros normales correspondientes a los presentados por personas sin infección por VIH, usadas como controles; y parece existir una interrelación entre la sangre y el tejido linfático como demuestra la correlación entre la ratio CD4/CD8 en ambos compartimentos.

### **3.2.2. Comparación de los niveles de linfocitos vírgenes y memoria en tejido linfático y sangre**

Los linfocitos CD4+ y CD8+ emigran desde el timo cuando están maduros fisiológicamente. Estas células expresan un isotipo específico de la familia CD45, el antígeno CD45RA+ (326). Inicialmente inmunológicamente vírgenes (naive), se convierten en fenotipo CD45RO+, característico de las células memoria, después del contacto con un antígeno en la periferia (224;327). El balance entre las células T vírgenes

y memoria es crucial para el mantenimiento de una respuesta inmune efectiva.

En la infección por VIH, la cifra de células T CD4+ vírgenes y memoria desciende en los diferentes estadios de la enfermedad. Los enfermos infectados por VIH inicialmente muestran una pérdida selectiva de las células memoria y, como hay un descenso en el número absoluto de linfocitos T CD4+, las células T CD4+ vírgenes también disminuyen (342). Estos cambios pueden explicarse al valorar los diferentes mecanismos por los cuales el VIH produce el descenso del número las células T CD4+. Por un lado, el VIH provoca un incremento de la activación del sistema inmune que conduce a una proliferación persistente y una elevada tasa de mortalidad de las células T CD4+ (104;222-224). Por otro lado, en los infectados por VIH existe una afectación de la producción de células T por supresión de la hematopoyesis (226;227). Estos mecanismos no actúan igual sobre las células T CD8+, las cuales van aumentando en sangre periférica hasta los estadios tardíos de la infección por VIH-1, debido al aumento en la activación pero no al aumento de la tasa de muerte (224;225).

Como se observa en nuestro estudio, en las áreas interfoliculares del tejido linfático existe una dinámica similar a la sangre y también existe una disminución tanto de las células vírgenes como memoria. Estos datos coinciden con los presentados por otros autores (19;75).

El tratamiento con TARGA produce una recuperación de la respuesta inmune, la cual depende de la regeneración de las células T CD4+ vírgenes y memoria. En las primeras semanas después de iniciar el tratamiento hay un aumento de la liberación de células memoria desde los tejidos linfáticos a sangre periférica (18), pero después hay un aumento de estas células en ambos compartimentos debido al descenso de la proliferación y muerte de los linfocitos CD4+ (223;224;230).

Sin embargo, el tratamiento con TARGA también produce un aumento de nuevas células vírgenes, en sangre y tejido linfático, debido,

posiblemente, a un incremento en la producción tímica (230-232), y/o una expansión a sangre periférica de las células vírgenes (312). En nuestro estudio se pudo demostrar un aumento en sangre y en las áreas interfoliculares de ambos tipos de células, memoria y vírgenes, con el tratamiento antirretroviral a los 12 meses, sin modificarse con los parámetros obtenidos a los 36 meses. Otros autores habían descrito previamente una recuperación de los niveles de linfocitos vírgenes CD4+ en tejido linfático hasta la mitad de los niveles normales tras supresión de la infección activa con TARGA durante 12-14 meses (255). En sangre periférica también aumentan lentamente tras varios meses de tratamiento (95).

Sin embargo, en el análisis del tejido linfático el aumento de las células vírgenes fue mayor que el de las células memoria por lo que la razón entre células vírgenes y memoria mejoró después del tratamiento. Este resultado indica que el efecto del tratamiento sobre el turnover de las células T es, principalmente, a nivel de la producción linfoide. La proporción de células vírgenes proliferantes (CD45RA+Ki-67+) sólo mostró un ligero incremento después de 12 meses de tratamiento. Nokta y cols. (19) demostraron que los linfocitos T CD4+ y sus subpoblaciones virgen y memoria en sangre periférica y tejido linfático ganglionar estaban en equilibrio y que la razón entre las células vírgenes y memoria en sangre periférica refleja en microambiente linfoide y puede potencialmente usarse como un marcador para valorar la eficacia del tratamiento o de la reconstitución inmune.

En nuestros casos, como después de tratamiento hubo un aumento de células CD45RA+ (vírgenes), CD45RO+ (memoria) y CD4+ en las áreas interfoliculares del tejido linfático y, al mismo tiempo, un descenso de las células CD8+ y un número invariable de linfocitos B, concluimos que la mayoría de estas células vírgenes y memoria aumentadas deben ser CD4+.

Al comparar los resultados obtenidos a los 36 meses con los de los 12 meses, nuestros resultados sugieren que no existen mejorías sobre los niveles de las subpoblaciones de linfocitos en las áreas interfoliculares del tejido linfático después de un periodo tan largo de tratamiento, aunque estamos en fase de confirmarlos con estudios en los que se incluyen un mayor número de pacientes. Esta es la primera vez que tejido linfático de personas infectadas por VIH es estudiado después de 36 meses de tratamiento con TARGA.

Como conclusión destacamos que las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y memoria se encuentran en equilibrio entre la sangre periférica y el tejido linfático y como algunos estudios han demostrado que la razón entre estas células puede estar relacionadas con el estado inmunológico y probablemente predecir la progresión de la enfermedad (19) podrían convertirse en un marcador para valorar dicho estado inmunológico y la eficacia del tratamiento.

### **3.2.3. Comparación de los niveles de Linfocitos B (CD20+)**

Estos linfocitos no modificaron de forma significativa sus valores después de tratamiento, incluso a los 36 meses, como había sido presentado anteriormente por otros autores (235).

### **3.2.4. Estudio de los niveles de linfocitos citotóxicos en las áreas intrafoliculares**

Se cree que los linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica, los cuales expresan granzima B, TIA-1 y esterasa, juega un papel importante en el control de la diseminación viral (342;346). En estudios preliminares

se sugirió que el nivel de actividad citotóxica específica contra el VIH-1 se correlacionaba con el estadio de la enfermedad por VIH-1 en pacientes y que la actividad citotóxica se perdía con la progresión de la enfermedad (347).

En nuestro estudio, al igual que los linfocitos CD8+, los linfocitos citotóxicos estaban aumentados con respecto a los sujetos controles tanto en las áreas intrafoliculares como en las estructuras interfoliculares. Knowles y Chadburn (229) habían descrito anteriormente este incremento en las primeras fases de la infección y su aumento hasta los estadios tardíos de la infección por VIH-1, que según algunos autores se debe al aumento en la activación pero no al aumento de la tasa de muerte celular (224;225). Estas células se encuentran principalmente en las áreas interfoliculares pero Laman y cols. (348) demostraron que son atraídas al interior de las estructuras foliculares por un efecto quimiotáctico producido por el virus.

Después del tratamiento durante un año percibimos un significativo descenso de los linfocitos CD8+ citotóxicos en las áreas inter e intrafoliculares que permanecieron invariables al valorarlos a los 36 meses. Sin embargo, los niveles no llegaron a ser similares al de las personas no infectadas. El número de linfocitos CD8+ intrafolicular se correlacionó positivamente con el estadio histopatológico del tejido linfático. Con estos resultados podríamos considerar la presencia de un alto número de linfocitos citotóxicos intrafoliculares como un marcador de infección por el VIH.

Comentario [mcb6]: Página: 244

### **3.3. RELACIÓN ENTRE LA CARGA VIRAL EN TEJIDO AMIGDALAR Y PLASMA CON LAS SUBPOPLACIONES DE LINFOCITOS**

Uno de los puntos más importantes de nuestro estudio radica en analizar la relación entre la carga viral del tejido linfático con la de la

sangre y con las subpoblaciones de linfocitos antes y después del tratamiento.

Al inicio del estudio, hubo una correlación positiva significativa entre el  $\log_{10}$  de la carga viral en tejido amigdalario y el  $\log_{10}$  de la carga viral en plasma, la razón entre las células T CD4+ vírgenes/memoria y las células T CD8+CD38+. Además, hubo una correlación negativa significativa entre el  $\log_{10}$  de la carga viral amigdalario y las células T CD4+, la razón entre células T CD8+ vírgenes/memoria y las células T CD8+CD28+.

Al contrario de lo que ocurría en los pacientes sin tratamiento previo, en los 70 pacientes del primer estudio a los que se les realizó una segunda biopsia al año del inicio de la terapia antirretroviral se encontraron discrepancias entre la CVTL y los hallazgos en sangre periférica.

Como hemos discutido en el apartado 3.1.3., al estudiar los predictores de una respuesta virológica efectiva en tejido linfático, en el análisis univariado, la CVTL, los linfocitos T CD4+ memoria y el tipo de TARGA estuvieron asociados a una respuesta efectiva, pero en el análisis multivariado, sólo el tipo de TARGA permaneció como predictor independiente de la respuesta. Concretamente, aquellos regímenes terapéuticos conteniendo un IP tenían mayor probabilidad de conseguir unos niveles negativos de CVTL.

Por lo tanto, en este apartado volvemos a resaltar que, en líneas generales, se observó una correlación positiva entre la CVTL y los hallazgos en sangre periférica, en este caso las subpoblaciones de linfocitos, al inicio del estudio pero no después del tratamiento.

### **3.3.1. Linfocitos CD4+ y CD8+**

En nuestro estudio se evidenció unos niveles bajos de CD4+ y altos de CD8+ tanto en sangre como en las áreas interfoliculares del tejido linfático.

La CVP está correlacionada de forma positiva con los linfocitos T CD4+ en sangre y de forma negativa con los linfocitos T CD8+ en sangre como habían demostrado otros autores (80;279;280). Sin embargo, en nuestro estudio, al realizar la correlación con la CVTL sólo se pudo demostrar la correlación positiva con los niveles de linfocitos CD4+ en sangre y sólo antes del tratamiento. Esperábamos encontrar que los pacientes con niveles indetectables de CVTL tendrían un patrón de recuperación inmune del sistema inmune en sangre periférica diferente al de los pacientes con niveles detectables de CVTL como pasa en aquellos pacientes con niveles indetectables de CVP versus aquellos con CVP detectable (11;78). Sin embargo tampoco encontramos diferencias relevantes en los niveles de subpoblaciones de linfocitos en ambos grupos. Esto podría explicarse por una dinámica y redistribución de las subpoblaciones de linfocitos diferente entre la sangre periférica y el tejido linfático como otros autores han observado (18).

Tampoco se pudo demostrar una correlación entre la CVP con ninguna de las poblaciones linfocitarias en el tejido linfático.

### **3.3.2. Linfocitos CD8+CD38+**

El porcentaje de CD8+CD38+ sanguíneo ha sido descrito previamente como un predictor del riesgo de desarrollar SIDA (280) y de la tasa de descenso de los linfocitos CD4+ en sangre periférica y están correlacionados con la persistencia de replicación viral in vivo (86;87;105). En nuestro estudio se observó que estaba relacionado con la CVTL al inicio del estudio.

Como se ha descrito anteriormente, después del tratamiento durante 12 meses con TARGA se observó un descenso en sangre periférica de los linfocitos T CD8+ y ocurrió principalmente como resultado de la reducción de las subpoblaciones activada (CD38+) y memoria (CD45RO+). Estos

resultados coinciden con los datos presentados por nuestro grupo en estudios previos (78). Sin embargo, estos niveles de los CD8+CD38+ no se pudo relacionar estadísticamente con la CVTL después de un año de TARGA.

Para conseguir resultados más importantes es mejor la terapia antirretroviral triple que incluso logra disminuir el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD38+). La efectividad de la terapia triple en reducir la activación de los linfocitos T es consistente con su mayor eficacia en la supresión de la replicación del VIH-1, reduciendo los niveles de ARN plasmáticos a niveles indetectables en un alto porcentaje de los pacientes (78). Algunos autores habían descrito previamente, como en nuestro estudio, que los niveles de linfocitos T CD8+CD38+ y el ARN plasmático de VIH-1 se correlacionan antes del TARGA durante 1 año; e incluso también después del mismo, a diferencia de nuestro estudio, y tanto en fases iniciales (78;86) como avanzadas (95) de la infección.

### **3.3.3. Linfocitos CD8+ CD28+**

La población de linfocitos T CD8+CD28+ se encontraban disminuidos en sangre periférica antes del tratamiento y presentaban una correlación negativa con la CVTL. Esta disminución de linfocitos T CD8+CD28+ y, por lo tanto, una expansión de los linfocitos T CD8+ que no expresan CD28, en las fases iniciales de la infección crónica ya había sido descrita con anterioridad e indica una función inmunológica defectuosa (88). Esta disminución también se ha observado en otras situaciones donde existe un estado de hiperactivación, tales como infecciones virales crónicas, enfermedades autoinmunes y en pacientes con cáncer; e incluso se ha visto como resultado del envejecimiento (101). Se cree que la ausencia del antígeno de superficie CD28 y la falta de una respuesta proliferativa en condiciones de cultivo reflejan un estadio de

maduración más tardío de las células como resultado de una estimulación antigénica repetida o un aumento del número de ciclos de divisiones celulares (102).

Después del TARGA se observó un aumento de linfocitos T CD8+CD28+ como ya había sido descrito en otro estudio previo de nuestro grupo (78). Este aumento indica probablemente la presencia de nuevos linfocitos T CD8+ que expresan la molécula CD28 de novo más que una reducción en el pool de linfocitos T CD8+ viejos. Sin embargo, el nivel de CD28+ (ahora aumentados) al año de TARGA no se pudo relacionar con el descenso de la CVTL en nuestro estudio (233).

### **3.3.4. Linfocitos vírgenes/memoria**

En contraste con lo observado en pacientes con enfermedad avanzada (94-100), los pacientes con infección temprana por el VIH-1 muestran pocas alteraciones en el compartimiento de células vírgenes/memoria (78). Antes del tratamiento, el porcentaje de linfocitos T CD4+ con fenotipos virgen o memoria, así como el número total de linfocitos T CD4+ vírgenes era similar a los pacientes sin infección; sin embargo el número total de linfocitos T CD4+ estaba reducido. En nuestros casos, en el estudio inicial se observó una correlación entre la razón entre los linfocitos vírgenes y memoria en sangre y la CVTL.

Después de 12 meses de TARGA, el estudio univariado demostró una relación entre los linfocitos T CD4+ memoria en sangre periférica y la CVTL, aunque en el estudio multivariado no se demostró como un predictor independiente (artículo 1) (233). Al estudiar el tejido interfolicular se observó un aumento de las células memoria y, sobre todo, vírgenes que provocó un aumento de la razón entre ambas poblaciones (artículo 2) (396). No se demostraron diferencias entre los que siguieron 12 o 36 meses de tratamiento. El incremento de células vírgenes en tejido linfático

se correlacionó con el descenso de la carga viral en dicho tejido. La asociación de la razón entre las células vírgenes y las memoria con la carga viral y la diferente susceptibilidad a la infección de ambas subpoblaciones sugieren que la recuperación y la regeneración de las subpoblaciones vírgenes y memoria pueden afectarse por la cantidad de virus. Como demostraron Nokta y cols. (19), los cambios de la razón vírgenes/memoria se asocian con cambios en el mismo sentido de los niveles de linfocitos T CD4+ y se correlacionan negativamente con los niveles de ARN de VIH-1 en plasma y tejido linfático. Por lo tanto, esta razón puede reflejar el estado inmune y, posiblemente, predecir la progresión de la enfermedad.

Por tanto, la triple terapia aumenta el número absoluto de linfocitos T CD4+ vírgenes y memoria en sangre periférica y en tejido linfático. Al año de tratamiento los niveles en sangre eran similares, pero no iguales, a los de las personas sin infección. El número aumentado de linfocitos T CD4+ vírgenes en sangre puede deberse a un aumento de la producción tímica, a una expansión periférica de los linfocitos vírgenes sin cambio fenotípico o a una disminución del recambio celular. La mayor eficacia de la triple terapia para aumentar los linfocitos T CD4+ memoria en sangre y tejido linfático puede ser un reflejo de la mayor eficacia para suprimir la replicación del VIH-1 en los tejidos linfoides. De hecho, la reducción de la carga de VIH en los tejidos linfoides periféricos después de TARGA en pacientes con infección avanzada permite la redistribución de los linfocitos T CD4+ memoria hacia la sangre, lo que provoca un rápido aumento de linfocitos T CD4+ en estos pacientes tras tratamiento (95-100). Sin embargo en pacientes con estadios iniciales de la infección tratados con TARGA durante 3 meses hay una proliferación de los linfocitos T CD4+ memoria intrafoliculares, a pesar de que el ARN del VIH es indetectable (104). Por lo tanto, tanto la redistribución y la regeneración en periferia de los linfocitos T CD4+ memoria influyen en el aumento de las células

memoria circulantes observados en los pacientes con infección reciente y tratados con TARGA.

Por los resultados que hemos analizado hasta este punto tenemos una relación entre la razón entre los linfocitos vírgenes: memoria entre la sangre y el tejido linfático y estos niveles, como concluye Nokta y cols. (19), parecen reflejar el microambiente del tejido linfático y predecir la progresión de la enfermedad. En conclusión, la razón entre linfocitos vírgenes y memoria puede potencialmente utilizarse como marcador para valorar el estado inmune a nivel del tejido linfático.

El aumento de los linfocitos T CD8+ memoria y vírgenes refleja un estado de activación del sistema inmune. Como se ha explicado anteriormente, un aumento del porcentaje de CD8+CD38+ (marcador de activación) en sangre podría usarse como un predictor temprano de la pérdida de los linfocitos T CD4+ (105). Después de 12 meses de tratamiento, las células memoria CD8+ en sangre y tejido linfático disminuyeron significativamente y en sangre alcanzaron valores casi normales. No obstante, el porcentaje de CD8+ con fenotipo virgen estaba reducido a pesar de que el número absoluto estaba aumentado. Después de 12 meses de terapia, los valores de esta subpoblación todavía permanece más alto que en pacientes no infectados (78).

Esperábamos encontrar un patrón de recuperación del sistema inmune en sangre periférica diferente entre los pacientes con un nivel de CVTL indetectable de aquellos en los que sí se detectaba, del mismo modo que nuestro grupo había descrito en estudios previos que ocurría entre los que presentaban una carga indetectable de CVP y los que se detectaba una CVP (p.e. los niveles de las células T CD8+CD38+ son mayores y los niveles de células T CD8+CD28+ son menores en los pacientes con niveles detectables de CVP) (11;78). El aumento de linfocitos T CD8+CD28+ en sangre periférica observado en los pacientes después del tratamiento indica, probablemente, la presencia de nuevos linfocitos T CD8+ que expresan la molécula CD28 *de novo* (78). Sin

embargo, no encontramos diferencias relevantes entre las subpoblaciones de linfocitos entre el grupo de CVTL detectable y el grupo con CVTL indetectable, excepto en las células memoria tanto CD4+ como CD8+. Esto no puede atribuirse al efecto de los medicamentos antirretrovirales en los parámetros de la sangre periférica ya que los cambios en las subpoblaciones de linfocitos observados con el tratamiento antirretroviral en esta cohorte son similares a los observados anteriormente por nuestro grupo (78). Se podría explicar por la existencia de una dinámica diferente y una redistribución de las subpoblaciones de linfocitos entre el tejido amigdalario y la sangre periférica como otros autores han observado (18). Otras interpretaciones son que la medición de inmunofenotipo y respuesta linfoproliferativa es bastante pobre para detectar diferencias no importantes en la replicación viral; o que la replicación viral que queda en el tejido linfático no supone un impedimento para la recuperación correcta del sistema inmune. Esto lleva a pensar si esta CVTL es realmente replicación viral efectiva o simplemente como sugiere algún autor es la que se encuentra asociada a células dendríticas foliculares que implica un reservorio, pero no un daño mantenido del sistema inmune. Hay datos como los publicados por Martínez y cols. (15) en el sentido en el que los pacientes con persistencia de una CV detectable en tejido linfático tienen más riesgo de fracaso virológico en sangre periférica. Esto sugiere que en estos pacientes con CV detectable en tejido linfático, el virus que se detecta no sólo es el asociado a células dendríticas foliculares, sino que hay una replicación mantenida subyacente, lo que explicaría el rápido rebrote de la CV tras la interrupción del TARGA (355) y es sugerido por el trabajo de otro autor (8). Por otro lado, esta replicación no sería de suficiente intensidad como para impedir una recuperación parecida del sistema inmune, a la de los pacientes con CVTL indetectable, a menos con los parámetros utilizados en nuestro trabajo. Otro estudio del sistema inmunológico que midiera aspectos más funcionales podría encontrar diferencias, lo que sugiere nuevos estudios. En cualquier caso, los

hallazgos de los trabajos que se presentan son consistentes con los de falta de diferencia de la población linfocitaria y de respuesta linfoproliferativa medida en nuestro estudio cuando se comparan dos terapias de eficacia virológica diferente como pueden ser terapias con 2 ITIAN + nevirapina vs 2 ITIAN + 1 IP (364;403).

**Comentario [mcb7]:** Página: 252  
escrito por felipe

Por otro lado, nuestros resultados difieren de la conclusión presentada por Nokta y cols. (19) que observaron que la razón entre las células vírgenes y la memoria en sangre periférica parecen reflejar los cambios linfoides y puede ser un marcador para valorar la eficacia del tratamiento y la reconstitución inmunológica. Una explicación de esta discrepancia podría ser que el estudio de Nokta y cols. (19) se realizó en tejido linfático diferente al amigdalario (nódulo linfático cervical); una explicación alternativa podría ser que su estudio fue realizado solamente en 16 pacientes, algunos de los cuales eran sin tratamiento previo y otros en diferentes periodos de tratamiento (3-6 meses) y las biopsias no se repitieron y, por lo tanto, no se pudieron observar los cambios en las poblaciones de linfocitos en el tejido linfático en los mismos individuos antes y después del tratamiento.

En resumen, en los pacientes con infección crónica por el VIH-1 que no han recibido tratamiento antirretroviral parece que hay una correlación entre la carga viral en el tejido amigdalario y en el plasma, las subpoblaciones de linfocitos T en sangre y las respuestas linfoproliferativas. Sin embargo, después de un año de tratamiento antirretroviral podrían haber importantes discrepancias entre los cambios que presentan el tejido amigdalario y la sangre periférica.

#### **4. INMUNOARQUITECTURA DEL TEJIDO LINFÁTICO EN LA INFECCIÓN DEL VIH-1**

Una de las grandes ventajas que tienen las amígdalas palatinas es que permiten la obtención fácil de tejido linfático mediante biopsias. Además, en la mayoría de los pacientes se pueden realizar de forma repetida hasta un cierto número de casos. Esta pequeña limitación, la mayor complejidad que los análisis sanguíneos y la importancia que tiene el conocimiento de la situación inmunológica y virológica en tejido linfático son las razones que nos impulsan para buscar marcadores en sangre que puedan predecirnos el estado de dicho tejido.

Aunque con las biopsias se obtengan muestras pequeñas son suficientes para cuantificar el ARN del VIH (carga viral en tejido linfático), para analizar la arquitectura del tejido linfático y para realizar técnicas de inmunohistoquímica para estudiar el antígeno p24 y las subpoblaciones de linfocitos. Con la citometría de flujo se puede cuantificar las subpoblaciones de células linfocitarias de forma más exacta. Sin embargo, esta técnica precisa gran cantidad de tejido linfático y pierde otra información útil como la arquitectura del tejido linfático y la distribución de las células linfoides.

##### **4.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTÍGENOS VIRALES**

Para demostrar la presencia vírica en el tejido linfático realizamos técnicas de PCR e inmunohistoquímica usando un anticuerpo monoclonal que reconoce el antígeno p24 del core del VIH (277). Algunos trabajos han concluido que la localización del antígeno viral p24 mediante la reacción inmunohistoquímica da resultados paralelos a las determinaciones del ARN viral mediante hibridación *in situ* (278).

La técnica de inmunohistoquímica presenta algunas ventajas y desventajas con respecto a la medición de la carga viral. La CV informa de forma cuantitativa del virus que se encuentra en todo el tejido linfático, mientras que el estudio inmunohistoquímico es de carácter cualitativo pero permite mostrarnos la relación del virus con la estructura del tejido linfático.

### **4.1.1. Distribución de los antígenos virales antes del tratamiento antirretroviral**

En nuestro segundo trabajo (396), se realizó el análisis inicial de 17 casos para valorar la intensidad y distribución del antígeno p24. En todos los casos la reacción inmunohistoquímica fue positiva, evidenciándose en dos casos (11%) pocas células con intensidad leve (grado 1); en tres (18%), pequeños grupos de células marcadas con intensidad leve (grado 2); y en la mayoría, 12 casos (71%), numerosas células con fuerte intensidad (grado 3).

En los casos con estructuras foliculares, es decir, aquellos pacientes que tenían estadios I o II, la reacción inmunohistoquímica para el antígeno p24 del VIH fue positiva siguiendo principalmente la distribución de las células dendríticas foliculares, superponiéndose su inmunoexpresión a la de CD21 (un marcador de las células dendríticas foliculares). Estos resultados coinciden con los presentados por Tenner-Racz y cols. (104) al estudiar los ganglios linfáticos de pacientes en el mismo estadio clínico que los nuestros. Tenner-Racz y cols. (104) encontraron una ausencia de pérdida de células dendríticas foliculares a pesar de la presencia de ARN de VIH-1 y proteína p24 y de que sus pacientes tenían una sustancial historia de infección (de 1 a 6 años) por lo que sugirieron que la infección por VIH-1 per se no daña las células dendríticas foliculares. Ellos creían

que posiblemente la pérdida de linfocitos T CD4+ era la responsable de la alteración funcional de las células dendríticas foliculares.

En la infección por VIH, las células dendríticas foliculares en tejido linfático juegan un papel muy importante como responsables de la transmisión de la infección al unir viriones en sus superficies formando inmunocomplejos y produciendo una propagación sistémica de la infección (21;104;220;221). La localización de antígenos virales asociados a la red de células dendríticas foliculares indica que este compartimiento es una fuente continua de infección.

#### **4.1.2. Distribución de los antígenos virales después de tratamiento antirretroviral**

Como ya se comentó en apartados anteriores, a pesar de que en todos los casos del segundo estudio (396) la carga viral plasmática era indetectable después del tratamiento con TARGA, la carga viral en tejido linfático y la inmunoexpresión del antígeno p24 descendió significativamente pero no desapareció en algunos pacientes: a los 12 meses del tratamiento, diez casos (50%) tenían un grado 0; siete (35%), grado 1; y tres (15%), grado 2. Al analizar los resultados a los 36 meses, la CVP continuaba indetectable y 2 casos estaban en grado 0, pero 4 se diagnosticaron como grado 1.

Por tanto, el antígeno p24 continuó positivo en la mitad de los pacientes después de 12 meses e, incluso, en 4 de los 6 casos en los que se analizó después de 36 meses de tratamiento. Estos hallazgos demuestran que el estudio del tejido linfático es más preciso que el de la sangre periférica para determinar el éxito de la supresión viral con el tratamiento. Queda pendiente el estudio de qué diferencia clínica y de pronóstico pueden tener estos pacientes respecto a los que presentan una supresión completa. Por otro lado, el significado clínico de esta presencia de Ag p24

en tejido linfático también queda por determinar. Es importante valorar si esta pudiese ser la causa de la falta de recuperación completa que se observa en algún paciente o si esta replicación mantenida llevaría a un daño continuo en tejido linfático. Sin embargo, como ya hemos comentado, Tenner-Racz y cols. (104) creen que es la pérdida de CD4+ la que provoca una alteración de la red de células dendríticas foliculares y no la presencia del Ag 24.

Al igual que ocurría en el estudio inicial, en los casos con estructuras foliculares (estadios I y II), la inmunoexpresión del antígeno p24 del VIH siguió la distribución de las células dendríticas foliculares, y por lo tanto, respalda que este compartimiento continúa siendo una fuente continua de infección después del tratamiento.

Las células infectadas de forma crónica y en estado de latencia junto con el virus residual en las células dendríticas foliculares del tejido linfático representan unos recursos potenciales de virus que pueden reiniciar la infección si el tratamiento es inefectivo o es interrumpido por alguna razón (75). En estas circunstancias, la infección se reestablece con la reaparición de células infectadas productivas y ARN viral en el pool de células dendríticas foliculares con una cinética similar a la de la infección aguda (363). La persistencia del virus y la recrudescencia de la infección pueden frustrar los esfuerzos para erradicar el VIH-1 (75).

### 4.2. MORFOLOGÍA DEL TEJIDO LINFÁTICO INFECTADO POR EL VIH-1

El estudio morfológico se realizó en 26 casos al inicio, en 28 al año y en 4 a los 36 meses. Estos últimos pacientes suponen una importante fuente de información porque no existen trabajos en la literatura con tanto tiempo de seguimiento, aunque los datos de estos últimos pacientes deben tomarse con cautela hasta que sean confirmados con estudios que incluyan un número mayor de pacientes.

**Comentario [mcb8]:** Página: 257  
escrito por felipe

#### **4.2.1. Morfología del tejido linfático infectado por el VIH-1 antes del tratamiento antirretroviral**

Los cambios que ocurren en la arquitectura del tejido linfático durante la infección por VIH-1 y su evolución en los diferentes estadios de la enfermedad han sido descritos exhaustivamente en otros estudios previos (228;229). La infección por VIH-1 produce inicialmente una hiperplasia folicular linfoide en la que los centros germinales son prominentes. En este estadio I las células del manto pueden ser eliminadas y observarse imágenes de lisis folicular. En el siguiente estadio de la progresión de la infección por VIH-1 se observa una involución folicular del tejido linfático. En este estadio II los folículos linfoides son pequeños y existe una discontinuidad de la malla de las células dendríticas foliculares. Los folículos están constituidos principalmente por estas células mientras las células B son escasas. En los últimos estadios de la enfermedad existe una depleción linfocitaria y los folículos desaparecen. Esta fase corresponde al estadio III y se acompaña, generalmente, de una proliferación del estroma vascular en el tejido linfático. En el análisis inicial, la mayoría de nuestros 26 pacientes mostraron una depleción folicular en tejido amigdalal, concretamente 15 casos (58%); mientras que nueve casos (35%) mostraron un estadio II y dos casos (7%), un estadio I.

Algunos autores han demostrado que las alteraciones histológicas del tejido linfático se correlacionan perfectamente con la evolución clínica de la infección por VIH-1 en pacientes no tratados (228;229). Los resultados de nuestros artículos demuestran que estas alteraciones histopatológicas también se correlacionan significativamente con la cuantificación del ARN del VIH-1 en tejido linfático (carga viral en tejido linfático) y en sangre periférica. De hecho, los niveles elevados de carga viral en tejido linfático se correlacionaron con estadios histológicos avanzados, incluso cuando las subpoblaciones de células T en sangre

periférica no mostraban alteraciones importantes. Antes de iniciar el tratamiento, todos nuestros pacientes tenían un número de linfocitos CD4+ en sangre periférica  $>500 \times 10^6/L$  y, al mismo tiempo, en la mayoría de los casos evaluados, el tejido linfático mostró una destrucción de los folículos linfoides y un prominente estroma vascular, clasificándose como estadio III. También se demostró una correlación estadística entre el estadio histológico y el área folicular y la proporción del área folicular respecto al total del tejido linfático.

### **4.2.2. Morfología del tejido linfático infectado por el VIH-1 después de tratamiento antirretroviral**

Los resultados del segundo trabajo (396) confirmaron la recuperación de la arquitectura del tejido linfático después del tratamiento con TARGA. En la mayoría de los casos se obtuvo una reestructuración volviendo a estadios I o II, en los que las estructuras foliculares reaparecieron parcial o completamente. De los 28 casos en los que se efectuó el análisis a los 12 meses, 13 casos (46%) mostraron un estadio I; 15 (54%), un estadio II; y ninguno en estadio III. A los 36 meses 4/6 pacientes tenían un estadio I y 2/6 en estadio II. La capacidad de recuperación de las células dendríticas foliculares después del tratamiento con TARGA había sido documentada por otros estudios previamente (9;235;236).

Ruiz y cols.(16) demostraron que los regímenes que contenían un inhibidor de la proteasa tenían una eficacia mayor para reducir la carga viral y recuperar la arquitectura de los nódulos linfoides que aquellos con sólo análogos de nucleósidos. En nuestro estudio, también se demostró que los pacientes que recibieron una combinación terapéutica que contuviera un inhibidor de la proteasa tenían unos resultados mejores en

tejido amigdalario que los que los que siguieron tratamiento con nevirapina (más dos ITIAN) o los que sólo recibieron dos ITIAN.

Como la mitad de los 18 pacientes del primer artículo (233) que recibieron un régimen terapéutico que contenía nevirapina y dos ITIAN presentaron una CVTL detectable después de un año de tratamiento, a pesar de tener una CVP indetectable, se analizó la histología de este grupo para comprobar si la presencia de replicación activa en tejido linfático se asociaba a alteraciones morfológicas. Al inicio del estudio dos pacientes tenían un estadio I, tres un II, y 13 un III; mientras que al año de tratamiento se observó una clara mejoría no habiendo ningún caso con depleción folicular (estadio III), estando siete en estadio I y los otros 11, en estadio II. En la muestra de 7 casos con centros foliculares prominentes (estadio I), la CVTL fue inferior a la de los 11 con involución folicular (estadio II), y además, la CVTL estaba inversamente correlacionada con la cantidad de centros foliculares y el tamaño folicular. Por lo tanto, al igual que ocurría al inicio del estudio, después de recibir tratamiento las alteraciones histopatológicas se correlacionaron significativamente con la cuantificación del ARN del VIH-1 en tejido linfático (carga viral en tejido linfático) y en sangre periférica: a mayor carga viral mayor desestructuración de los folículos linfoides. Esta alteración histológica después del tratamiento con un régimen que contiene nevirapina (más dos inhibidores nucleótidos de la transcriptasa inversa) a pesar de tener una CVP indetectable es consistente con los resultados presentados recientemente por Schacker y cols. (236). Debido a la correlación entre la CVTL con los hallazgos histológicos, podríamos especular con que en los pacientes que no negativizan los niveles de CVTL tienen un alto riesgo de continuar con las lesiones histológicas.

También se demostró una correlación estadística entre el estadio histológico y el área folicular y la proporción del área folicular respecto al total del tejido linfático. Por lo tanto, como el estadio mejoró después de 12 meses de tratamiento antirretroviral, tanto la media del área folicular

Comentario [mcb9]: Página: 260

Comentario [mcb10]: Página: 260

Comentario [mcb11]: Página: 261

como su proporción del total del tejido linfático aumentó significativamente; sin embargo la continuación del tratamiento hasta los 36 meses no demostró un aumento de esta mejoría. Como son pocos pacientes, esto debe ser confirmado en una muestra mayor. De ser confirmado, esto podría explicar el porqué la recuperación de los niveles de linfocitos T CD4+ se detiene después de 3-4 años de TARGA.

Comentario [mcb12]: Página: 261  
felipe

Como hemos explicado anteriormente, los cambios que se producen en la arquitectura de los tejidos linfáticos se asociaron a una alteración progresiva en el balance de las subpoblaciones de linfocitos T. Al igual que ocurría en los pacientes sin tratamiento, se pudo demostrar una correlación positiva entre las células CD8+ y el estado histopatológico. Es decir, el incremento inicial de CD8+ va asociado a un aumento del grado de alteración histopatológica, mientras que el descenso de CD8+ después del tratamiento se correlaciona con una mejoría de la arquitectura y por tanto con un descenso del grado histopatológico.

En resumen, la superposición del antígeno p24 con las células dendríticas foliculares antes y después del tratamiento identifica a estas células como una fuente continua de infección. Además, se ha demostrado que la terapia antirretroviral durante un año recupera, aunque no de forma completa en todos los casos, la morfología del tejido linfático; pero que el tratamiento durante 36 meses no parece conseguir mejores resultados en los pocos casos que hemos estudiado con tan larga evolución. Estas alteraciones histopatológicas se correlacionan con la CVTL, antes y después del tratamiento, y con la CVP antes del tratamiento. Además también está correlacionado el estadio histológico con el área folicular y la proporción del área folicular respecto al total del tejido.

## **CONCLUSIONES**



**CONCLUSIONES**

**Biopsias amigdalares**

1. Las amígdalas palatinas proporcionan una fuente de tejido linfoide accesible y reproducible.

**Relación entre la carga viral entre el tejido amigdalares y el plasma**

2. Los pacientes con infección crónica por el VIH-1 que no han recibido tratamiento antirretroviral presentan una correlación entre la carga viral en el tejido amigdalares y en el plasma.

3. Después del tratamiento, existen discrepancias entre la CVP y la CVTL. Mientras la primera disminuye y desaparece en casi todos los casos, la segunda se mantiene detectable en un número elevado de pacientes. Por lo tanto, la CVTL es un método más preciso que la CVP para valorar la efectividad del tratamiento.

**Predictores de la respuesta de la CVTL al TARGA**

4. El tipo de tratamiento es el único predictor independiente de la respuesta. Los pacientes que recibieron un régimen con triple terapia que contenía un inhibidor de la proteasa tienen unos niveles menores de CVTL que aquellos que sólo recibieron combinaciones de inhibidores de la transcriptasa, ITIAN o ITINAN.

**Subpoblaciones de linfocitos**

5. En los pacientes sin tratamiento previo, los linfocitos T CD4+ están disminuidos y los CD8+ aumentados en sangre y tejido linfático. Después de un año de tratamiento se corrigen estas alteraciones pero sin igualar los niveles de los controles no infectados por VIH-1. A pesar de una respuesta similar con el tratamiento, los niveles de linfocitos T CD4+ no mostraron correlación con los de CD8+ entre el tejido linfático y la sangre periférica.

**Comentario [mcb13]:** Página a: 265  
 Los principales marcadores para el seguimiento y pronóstico de los pacientes infectados con el VIH-1 son la carga viral plasmática y las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica. Sin embargo, sobre todo después de tratamiento antirretroviral, se ha demostrado que el estudio del tejido linfático proporciona mayor información, sobre todo en estudios de inmunopatogenia y para poder explicar, por ejemplo, las discrepancias entre la carga viral en sangre y la respuesta de las células CD4+ en algunos pacientes con terapia antirretroviral. Siguiendo esta línea, en nuestros estudios, hemos investigado las relaciones entre los cambios producidos en la carga viral y las subpoblaciones de linfocitos en el tejido linfático amigdalares y en sangre periférica con el objetivo de buscar marcadores más exactos para el seguimiento y pronóstico de los pacientes infectados con el VIH-1, así como la influencia de esta carga viral, antes o después de la instauración del tratamiento, en la persistencia de las alteraciones en el sistema inmunológico del tejido linfático.

**Comentario [mcb14]:** Página a: 265  
 Estos datos tienen que ser tomados con precaución ya que los pacientes no estaban aleatorizados y los ITIAN que tomaban los pacientes con tratamiento con nevirapina no son comparables con los que tomaban los pacientes con regímenes que contenían IP.

6. La razón CD4+/CD8+ es mayor en tejido linfático que en sangre periférica. No obstante, los valores de la razón en sangre y tejido linfático se encuentran correlacionados positivamente. Los perfiles de linfocitos T y sus subpoblaciones en tejido linfático podrían ser deducidos a partir de las distribuciones en sangre periférica.

**Comentario [mcb15]:** Página: 266  
lo que sugiere que la distribución de linfocitos T CD4+ y CD8+ en tejido linfático y sangre periférica está en un equilibrio constante y, por tanto, que

7. Las subpoblaciones de linfocitos T vírgenes y memoria aumentan con el tratamiento. El aumento de las células vírgenes es mayor, lo que indica que el efecto del tratamiento sobre el turnover de las células T es, principalmente, a nivel de la producción linfática. Estas poblaciones se encuentran en equilibrio entre la sangre periférica y el tejido linfático.

**Comentario [mcb16]:** Página: 266  
La razón entre estas células se relaciona con el estado inmunológico y puede ser un marcador para valorar dicho estado inmunológico y la eficacia del tratamiento.

8. Los niveles altos de linfocitos citotóxicos se consideran un marcador de la infección por VIH-1. En nuestro estudio demostramos que el tratamiento antirretroviral durante 12 meses disminuye sus niveles tanto en las áreas inter como intrafoliculares del tejido linfático. Además, el número de linfocitos citotóxicos intrafoliculares está relacionado con el estadio histopatológico del tejido linfático.

### CV y subpoblaciones de linfocitos

9. Existe una buena correlación entre la CVTL y los hallazgos en sangre periférica (CVP, razón entre linfocitos T CD4+ vírgenes/memoria y linfocitos T CD8+CD38+) en pacientes sin tratamiento previo. Después del tratamiento se observan discrepancias entre la CVTL y los hallazgos en sangre periférica.

10. Al comparar los pacientes con CVTL detectable con los que tenían CVTL indetectable, no encontramos diferencias relevantes entre las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica, excepto en las

células memoria tanto CD4+ como CD8+. Esto sugiere que la replicación viral que queda en el tejido linfático no supone un impedimento para la recuperación correcta del sistema inmune, al menos al medirlo en sangre periférica.

11. El porcentaje de linfocitos T CD8+CD38+ está correlacionado con la persistencia de la replicación viral. Antes del tratamiento se encuentra elevado y correlacionado con la CVTL. Después de la terapia antirretroviral desciende pero no se pudo correlacionar con la CVTL.

12. El porcentaje de linfocitos T CD8+ CD28+ sirve como marcador de un estado de hiperactivación. Se encuentra disminuido antes del tratamiento y aumenta con el tratamiento. Se correlaciona de forma negativa con la CVTL pero sólo antes del tratamiento.

13. La razón entre los linfocitos vírgenes y memoria en sangre se correlaciona con la CVTL antes del tratamiento. Esto sugiere que la recuperación y la regeneración de las subpoblaciones vírgenes y memoria pueden afectarse por la cantidad de virus en tejido linfático. Por lo tanto, esta razón puede reflejar el estado inmune. Esta relación no se pudo demostrar después del tratamiento.

## INMUNOARQUITECTURA DEL TEJIDO LINFÁTICO

### Ag p24

14. El antígeno p24 del VIH-1 sigue principalmente la distribución de las células foliculares dendríticas del tejido amigdalario. Su persistencia después del tratamiento antirretroviral indica que el tejido linfático amigdalario podría ser una fuente continua de infección.

### Morfología del tejido linfático infectado por el VIH

15. La mayoría de los pacientes sin tratamiento previo presentan alteraciones importantes de la arquitectura del tejido linfático amigdalario

que se recuperan después del tratamiento antiretroviral pero sin igualar la de los pacientes controles no infectados.

16. Existe una correlación entre la CVTL y la CVP con la inmunoarquitectura del tejido linfoide. Este dato sugiere que los pacientes con CVTL detectable después del tratamiento tienen un alto riesgo de continuar con lesiones histológicas.

17. Los pacientes con un régimen terapéutico que incluía un inhibidor de la proteasa tuvieron una recuperación de la morfología del tejido linfoide mejor que los que siguieron tratamiento con nevirapina (más dos ITIAN) o con sólo dos ITIAN.

18. La mejoría del estadio histológico obtenido con el TARGA durante 12 meses se correlacionó con un aumento del área folicular y de la proporción del área folicular respecto al total del tejido linfático.

### Tiempo de tratamiento

19. El tratamiento prolongado hasta los 36 meses no mejora los resultados virológicos, inmunológicos o histológicos obtenidos a los 12 meses.

**Comentario [mcb17]:** Página: 268  
. Sin embargo, la continuación del tratamiento hasta los 36 meses no demostró una continuación de esta mejoría (siempre teniendo en cuenta las limitaciones de los resultados obtenidos en este reducido grupo de pacientes).

### Conclusión final

20. El estudio del tejido linfoide en los pacientes infectados con el VIH produce una información más exacta sobre los reservorios virales y la mejoría inmunológica celular que las determinaciones sanguíneas y permite, por tanto, una mejor monitorización de la respuesta a las terapias instauradas.

**Comentario [mcb18]:** Página: 268  
aunque debe ser confirmado en estudios que incluyan un mayor número de pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) **Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, si. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. N Engl J Med 1981; 305:1425-1431.**
- (2) **Masur M, Michelis MA, Greene JB, si. An outbreak of community-acquired Peumocystis carinii pneumonia. N Engl J Med 1981; 305:1431-1438.**
- (3) **Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, S.I. Severe adquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. N Engl J Med 1981; 305:1439-1444.**
- (4) **Stein DS, Korvick JA, Vermund SH. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. J Infect Dis 1992; 165:352-363.**
- (5) **Mellors J, Munoz AM, Giorgi JV. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. Ann Intern Med 1997; 126(12):946-954.**
- (6) **O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte count relative to treatment and progression to AIDS. N Engl J Med 1995; 334:426-431.**
- (7) **Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White M, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science 1996; 272:1167-1169.**
- (8) **Furtado MR, Callaway DS, Phair JP et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy [see comments]. N Engl J Med 1999; 340(21):1614-1622.**
- (9) **Zhang L, RAMRATNAM B, Tenner-Racz K et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy [see comments]. N Engl J Med 1999; 340(21):1605-1613.**
- (10) **Kure K, Llena JF, Lyman WD et al. Human Immunodeficiency Virus-1 Infection of the Nervous-System - An Autopsy Study of 268 Adult, Pediatric, and Fetal Brains. Human Pathology 1991; 22(7):700-710.**

- (11) Garcia F, Romeu J, Grau I et al. A randomized study comparing triple versus double antiretroviral therapy or no treatment in HIV-1-infected patients in very early stage disease: the Spanish Earth-1 study. *AIDS* 1999; 1999 Dec 3;13(17):2377-2388.
- (12) Garcia F, Alonso MM, Romeu J et al. Comparison of immunologic restoration and virologic response in plasma, tonsillar tissue, and cerebrospinal fluid in HIV-1-infected patients treated with double versus triple antiretroviral therapy in very early stages: The Spanish EARTH-2 Study. Early Anti-Retroviral Therapy Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25(1):26-35.
- (13) Gunthard H, Havlir D, Fiscus S, et al. Residual human immunodeficiency (HIV) type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis* 2001; 183:1318-1327.
- (14) Lafeuillade A, Chollet L, Hittinger G, Profizi N, Costes O, Poggi C. Residual human immunodeficiency virus type 1 RNA in lymphoid tissue of patients with sustained plasma RNA of < 200 copis/ml. *J Infect Dis* 1998; 177:235-238.
- (15) Martinez E, Arnedo M, Giner V et al. Lymphoid tissue viral burden and duration of viral suppression in plasma. *AIDS* 2001; 15(12):1477-1482.
- (16) Ruiz L, van Lunzen J, Arno A et al. Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue. *AIDS* 1999; 13(1):F1-F8.
- (17) Bart PA, Meuwly JY, Corpataux JM et al. Sampling lymphoid tissue cells by ultrasound-guided fine needle aspiration of lymph nodes in HIV-infected patients. *AIDS* 1999; 13:1503-1510.
- (18) Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn C, et al. Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999; 103:1391-1398.
- (19) Nokta M, Li X, Nichols J, Pou A, Asmuth DM, Pollard RB. Homeostasis of naive and memory T cell subpopulations in peripheral blood and lymphoid tissues in the context of

- human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2001; 183:1336-1342.
- (20) Ruiz L, van Lunzen J, Arno A et al. Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue. *AIDS* 1999; 1999 Jan 14;13(1):F1-F8.
- (21) Haase AT, Henry K, Zupancic M et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 1996; 274(5289):985-989.
- (22) C.D.C. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) - United States. *MMWR* 1982; 31:507-514.
- (23) Davis KC, Horsburgh CR, Hasiba U, si. Acquired immunodeficiency syndrome in a patient with hemophilia. *Ann Intern Med* 1983; 3:284-286.
- (24) Poon M-C, Landay A, Prasthofer EDF, si. Acquired immunodeficiency syndrome with *Pneumocystis carinii* pneumonia and *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in a previously healthy patient with classic hemophilia. *Ann Intern Med* 1983; 98:287-290.
- (25) Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, si. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Science* 1983; 220:868-871.
- (26) Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, si. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224:500-502.
- (27) Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuru JM, Oshiro LS. Isolation of lymphotropic retrovirus from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225:840-842.
- (28) Goedert JJ, Biggar RJ, Winn DMY et al. Determinantes de los anticuerpos contra retrovirus (VLTH-III) y de los procesos de inmunodeficiencia en varones homosexuales. *Lancet (Edición española)* 1985; 6:84-896.
- (29) Kitchen L, Leal M, Wichmann I et al. Antibodies to human T-cell leukemia virus type III in haemophiliacs from Spain. *Blood* 1985; 66:1473-1475.

- (30) Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, si. Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS. *Science* 1986; 233:343-346.
- (31) Levy JA. HIV pathogenesis and long term survival. *AIDS* 1993; 7:1401-1410.
- (32) Haseltine WA, Wong-Staal F. The molecular biology of the AIDS virus. *Sci Am* 1988; 259(4):52-62.
- (33) Green WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:308-317.
- (34) Sodroski J, Rosen C, Wong-Staal F, si. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* 1985; 227:171-173.
- (35) Gaynor R. Cellular factors involved in the regulation of HIV-1 expression. *AIDS* 1992; 6:347-363.
- (36) Feinberg MB, Jarrett RF, Aldovini A, Gallo RC, Wong-Staal F. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* 1986; 46(6):807-817.
- (37) Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef Induces Cd4 Endocytosis - Requirement for A Critical Dileucine Motif in the Membrane-Proximal Cd4 Cytoplasmic Domain. *Cell* 1994; 76(5):853-864.
- (38) Kestler HW, Ringler DJ, Mori K et al. Importance of the Nef Gene for Maintenance of High Virus Loads and for Development of Aids. *Cell* 1991; 65(4):651-662.
- (39) Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E et al. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 1992; 66(11):6489-6495.
- (40) Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(15):7311-7315.
- (41) Re F, Braaten D, Franke EK, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 1995; 69(11):6859-6864.

- 
- (42) Emerman M. HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr Biol* 1996; 6(9):1096-1103.
- (43) Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990; 64(2):621-629.
- (44) Margottin F, Bour SP, Durand H et al. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1998; 1(4):565-574.
- (45) Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 1984; 224:497-500.
- (46) Folks T, Benn S, Rabson A et al. Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(13):4539-4543.
- (47) McDougal JS, Kennedy MS, Slich JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JK. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 1986; 231(4736):382-385.
- (48) Gartner S, Markovits P, Markovits DM, si. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 1986; 233:215-219.
- (49) Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, si. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 1986; 233:1089-1093.
- (50) Nicholson JKA, Cross GD, Callaway CS, si. In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). *J Immunol* 1986; 137:323-328.
- (51) Biberfeld P, Chayt KJ, Marselle LM, Biberfeld G, Gallo RC, Harper ME. HTLV-III expression in infected lymph nodes and relevance to pathogenesis of lymphadenopathy. *Am J Pathol* 1986; 125(3):436-442.

- (52) Martin D, Bandres J. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Def Syndr* 1999; 22:413-429.
- (53) Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 1986; 47(3):333-348.
- (54) Jansson M, Popovic M, Karlsson A et al. Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(26):15382-15387.
- (55) Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE, Jr., Peden K, Kabat D. CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1997; 71(2):873-882.
- (56) Bleul CC, Farzan M, Choe H et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382(6594):829-833.
- (57) Oberlin E, Amara A, Bachelier F et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382(6594):833-835.
- (58) Doranz BJ, Rucker J, Yi Y et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85(7):1149-1158.
- (59) Frade JM, Mellado M, del Real G, Gutierrez-Ramos JC, Lind P, Martinez AC. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol* 1997; 159(11):5576-5584.
- (60) Agace WW, Amara A, Roberts A, et al. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 2000; 10:325-328.
- (61) Simmons G, Clapham PR, Picard L, et al. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997; 276:276-279.
- (62) Fortin JF, Cantin R, Tremblay MJ. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human

- immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* 1998; 72(3):2105-2112.
- (63) Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL et al. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 1991; 253(5017):320-323.
- (64) McDougal JS, Mawle A, Cort SP et al. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. *J Immunol* 1985; 135(5):3151-3162.
- (65) Esté J. HIV resistance to entry inhibitors. *AIDS Rev* 2001; 3:121-132.
- (66) Karczewski M, Strebel K. Cytoskeletal association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol* 1996; 70:494-507.
- (67) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13193-13197.
- (68) Chun TW, Carruth L, Finzi D et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body fat viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997; 387(6629):183-188.
- (69) Alcami J, Lain dL, Folgueira L et al. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14(7):1552-1560.
- (70) Chen BK, Feinberg MB, Baltimore D. The kappaB sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat enhance virus replication yet are not absolutely required for viral growth. *J Virol* 1997; 71(7):5495-5504.
- (71) Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10:405-455.
- (72) Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87(1):13-20.
- (73) Cullen BR. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev* 1992; 56(3):375-394.

- (74) Kaplan A. Assembly of the HIV-1 core particle. *AIDS Rev* 2002; 4:104-111.
- (75) Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:625-656.
- (76) Sereti I, Lane C. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus: implications for immune-based therapies. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1738-1755.
- (77) Oyaizu N, Pahwa S. Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis. *J Clin Immunol* 1995; 15:217-231.
- (78) Plana M, García F, Gallart MT et al. Immunological benefits of antiretroviral therapy in very early stages of asymptomatic chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2000; 14:1921-1933.
- (79) Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:487-512.
- (80) Wong MT, Dolan MJ, Kozlow E et al. Patterns of virus burden and T cell phenotype are established early and are correlated with the rate of disease progression in human immunodeficiency virus type-1 infected persons. *J Infect Dis* 1996; 173:877-888.
- (81) Connors M, Kovacs JA, Krevat S et al. HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies [see comments]. *Nat Med* 1997; 3(5):533-540.
- (82) Ho DD, Moudgil T, Alam M. Quantitation of Human Immunodeficiency virus type I in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989; 321:1621-1625.
- (83) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen WVA, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-126.
- (84) Margolick JB, Munoz A, Donnenberg AD et al. Failure of T-Cell Homeostasis Preceding Aids in Hiv-1 Infection. *Nature Medicine* 1995; 1(7):674-680.
- (85) Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Cd8 Naive T-Cell Counts Decrease

- Progressively in Hiv-Infected Adults. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95(5):2061-2066.
- (86) Bouscarat F, LevacherClergeot M, Dazza MC et al. Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA levels in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *Aids Research and Human Retroviruses* 1996; 12(1):17-24.
- (87) Giorgi JV, Liu ZY, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated Levels of Cd38+Cd8+ T-Cells in Hiv-Infection Add to the Prognostic Value of Low Cd4+ T-Cell Levels - Results of 6 Years of Follow-Up. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1993; 6(8):904-912.
- (88) Caruso A, Licenziati S, Canaris AD et al. Contribution of CD4+, CD8+CD28+, and CD8+. *J Clin Invest* 1998; 101(1):137-144.
- (89) Lane HC, Masur H, Edgar LC, et al. Abnormalities of b-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1983; 309:453-458.
- (90) Nath A. Pathobiology of human immunodeficiency virus dementia. *Sem Neurol* 1999; 19:113-127.
- (91) Meltzer MS, Skillman DR, Hoover DL, et al. Macrophages and the human immunodeficiency virus. *Immunol Today* 1990; 11:217-223.
- (92) Cauda R, Tumbarello M, Ortona L, et al. Inhibition of normal human natural killer cell activity by human immunodeficiency virus synthetic transmembrane peptides. *Cell Immunol* 1988; 115:57-65.
- (93) Aliaga L. Atlas básico de la infección por VIH/SIDA. Manifestaciones clínicas en adultos. Madrid: Merck, Sharp and Dohme, 2000.
- (94) Angel J, Kumar A, Parato K, et al. Improvement in cell-mediated immune function during potent anti-Human Immunodeficiency Virus therapy with ritonavir plus saquinavir. *J Infec Dis* 1998; 177:898-904.
- (95) Autran B, Carcelain G, Li TS et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis

and function in advanced HIV disease [see comments].  
*Science* 1997; 277(5322):112-116.

- (96) Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy [see comments]. *Nat Med* 1998; 4(2):215-221.
- (97) Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA. Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-infected protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996; 173(2):321-329.
- (98) Lederman MM, Connick E, Landay A et al. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998; 178(1):70-79.
- (99) Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait MH, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998; 351(9117):1682-1686.
- (100) Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ et al. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998; 1998 Feb;4(2):208-214.
- (101) Merino J, Martinez-Gonzalez MA, Rubio M, Inoges S, Sanchez-Ibarrola A, Subira ML. Progressive decrease of CD8(high+) CD28(+) CD57(-) cells with ageing. *Clinical and Experimental Immunology* 1998; 112(1):48-51.
- (102) Effros RB, Allsopp R, Chiu CP et al. Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 1996; 10(8):F17-F22.
- (103) Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Hoflich C, Reinke P, Volk HD. The enigma of CD57+ CD28- T cell expansion- anergy or activation? *Clin Exp Immunol* 1996; 104(1):180-184.
- (104) Tenner-Racz K, Stellbrink HJ, van Lunzen J et al. The Unenlarged Lymph Nodes of HIV-1-infected, Asymptomatic Patients with High CD4 T Cell Counts Are Sites for Virus Replication and CD4 T Cell Proliferation. *The Impact of Highly*

- Active Antiretroviral Therapy. *J Exp Med* 1998; 187(6):949-959.
- (105) Echaniz P, Arrizabalaga J, Iribarren JA, Cuadrado E. CD8+CD38+ and CD8+DR+ peripheral blood lymphoid subsets of HIV- infected intravenous drug abusers correlate with CD4+ cell counts and proliferation to mitogens. *Cell Immunol* 1993; 150(1):72-80.
- (106) Kahn JO, Walter BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998; 339:33-39.
- (107) Nabel GJ, Sullivan NJ. Clinical implications of basic research. Antibodies and resistance to natural HIV infection. *N Engl J Med* 2000; 343:1263-1265.
- (108) Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, et al. The antigenic structure of the human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998; 393:705-711.
- (109) Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, et al. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* 1997; 176:924-932.
- (110) Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, et al. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 in vivo. *Immunity* 1999; 10:431-438.
- (111) Katz JD, Mitsuyasu R, Gottlieb MS, et al. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. 2. Normal antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by effector cells defective in natural killer (NK) cytotoxicity. *J Immunol* 1987; 139:55-60.
- (112) Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science* 1996; 271:173-178.
- (113) Tsomides T, Aldovini A, Johnson R, et al. Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* 1994; 180:1283-1293.
- (114) Brander C, Walker BD. T lymphocyte responses in HIV-1 infection: Implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:451-459.

- (115) Goulder PJ, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, et al. Anti-HIV cellular immunity: Recent advances towards vaccine design. *AIDS* 1999; 13(Supl. A):121-136.
- (116) Walker BD. Characterization of the HIV-specific-T-helper cell response. In: Pantaleo GWBD, editor. *Retroviral immunology*. Totowa: Humana Press, 2001: 237-247.
- (117) Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:753-777.
- (118) Wei X, Ghosh S, Taylor M et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-122.
- (119) Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332:201-208.
- (120) Faust RA, Henry K, Dailey PJ et al. Outpatient biopsies of the palatine tonsil: access to lymphoid tissue for assessment of human immunodeficiency virus RNA titers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114:593-598.
- (121) Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362(6418):355-358.
- (122) Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332:209-216.
- (123) Poli G, Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1993; 17:S224-S229.
- (124) Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science* 1996; 271:1582-1586.
- (125) CDC. 1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992; 41:1-20.

- (126) Montaner JSG, Montesori V, Raboud J, et al. How low is low enough? Suppression of plasma viral load below 20 copies/ml is necessary for long term virologic response. 12th World AIDS Conference, Geneva, June 28 - July 3, 1998 1998.
- (127) Gatell JM, Clotet B, Podzamcer D, Miro JM, Mallolas J. Guia practica del SIDA. Clinica diagnostico y tratamiento. 7<sup>a</sup> edición ed. Barcelona: Masson-Salvat, 2002.
- (128) Fischl MA, Richman DD, Grieco MH. Efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex: A double-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med 1987; 317:185-191.
- (129) Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1998; 338:853-860.
- (130) Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents (NIH). October, 2005. [http://aidsinfo.nih.gov/guidelines/adult/AA\\_111003.pdf](http://aidsinfo.nih.gov/guidelines/adult/AA_111003.pdf) 2005.
- (131) Saksela K, Stevens CE, Rubinstein P, Taylor PE, Baltimore D. HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS. Ann Inter Med 1995; 123:641-648.
- (132) Tindall B, Cooper A. Primary HIV infection: host response and intervention strategies. AIDS 1991; 5:1-14.
- (133) Moss AR, Bacchetti P, Osmond D, et al. Seropositivity for HIV and the development of AIDS or AIDS related condition: three year follow up of the San Francisco General Hospital cohort. Br Med J (Clin Res) 1988; 296:745-750.
- (134) Moss AR, Bacchetti P. Natural history of HIV infection. AIDS 1989; 3:55-61.
- (135) Easterbrook PJ. Non -progression in HIV infection. AIDS 1994; 8:1179-1182.
- (136) Clark SJ, Shaw GM. Acute retroviral syndrome and the pathogenesis of HIV-1 infection. Semin Immunol 1993; 5:149-155.

- (137) Kuritzkes DR, Bell SA, BaKhtiari M. Rapid CD4+ cell decline after sexual transmission of a zidovudine-resistant syncytium inducing isolate of HIV-1. *AIDS* 1994; 8:1917-1019.
- (138) Nielsen C, Pedersen C, Lundgren JD, Gerstoft J. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS* 1993; 7:1035-1040.
- (139) Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, x. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Ann Intern Med* 1989; 111:223-231.
- (140) Plana M, Garcia F, Gallart MT, Miro JM, Gatell JM. Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after one year of HAART in very early HIV-1 disease. *Lancet* 1998; 352:1194-1195.
- (141) Levacher M, Tallet S, Dazza MC, Dournon E, Rouveix B, Pocidalo JJ. T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT. Comparison with CD4+ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:177-182.
- (142) Osmond DH, Shiboski S, Bacchetti P, Winger EE, Moss AR. Immune Activation Markers and Aids Prognosis. *AIDS* 1991; 5(5):505-511.
- (143) Chess Q, Daniels J, North E, Macris NT. Serum Immunoglobulin Elevations in the Acquired Immunodeficiency Syndrome (Aids) - Igg, Iga, Igm, and Igd. *Diagnostic Immunology* 1984; 2(3):148-153.
- (144) Bofill M, Gombert W, Borthwick NJ et al. Presence of Cd3(+)Cd8(+)Bcl-2(Low) Lymphocytes Undergoing Apoptosis and Activated Macrophages in Lymph-Nodes of Hiv-1(+) Patients. *American Journal of Pathology* 1995; 146(6):1542-1555.
- (145) Karlsson FA, Groth T, Sege K, Wibell L, Peterson PA. Turnover in Humans of Beta-2-Microglobulin - the Constant Chain of Hla-Antigens. *European Journal of Clinical Investigation* 1980; 10(4):293-300.
- (146) Forman DT. Beta-2 Microglobulin - An Immunogenetic Marker of Inflammatory and Malignant Origin. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1982; 12(6):447-452.

- 
- (147) Fahey JL, Taylor JMG, Detels R et al. The Prognostic Value of Cellular and Serologic Markers in Infection with Human Immunodeficiency Virus Type-1. *New England Journal of Medicine* 1990; 322(3):166-172.
- (148) Lifson AR, Hessel NA, Buchbinder SP, Holmberg SD. The Association of Clinical Conditions and Serologic Tests with Cd4+ Lymphocyte Counts in Hiv-Infected Subjects Without Aids. *AIDS* 1991; 5(10):1209-1215.
- (149) Brew BJ, Bhalla RB, Paul M et al. Cerebrospinal-Fluid Neopterin in Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Infection. *Annals of Neurology* 1990; 28(4):556-560.
- (150) Elovaara I, Iivanainen M, Poutiainen E et al. Csf and Serum Beta-2-Microglobulin in Hiv Infection Related to Neurological Dysfunction. *Acta Neurologica Scandinavica* 1989; 79(2):81-87.
- (151) Fuchs D, Banekovich M, Hausen A et al. Neopterin Estimation Compared with the Ratio of T-Cell Subpopulations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus-I. *Clinical Chemistry* 1988; 34(12):2415-2417.
- (152) Huber C, Batchelor JR, Fuchs D et al. Immune-Response Associated Production of Neopterin - Release from Macrophages Primarily Under Control of Interferon-Gamma. *Journal of Experimental Medicine* 1984; 160(1):310-316.
- (153) Niederwieser A, Joller P, Seger R et al. Neopterin in Aids, Other Immunodeficiencies, and Bacterial and Viral-Infections. *Klinische Wochenschrift* 1986; 64(7):333-337.
- (154) Niederwieser D, Huber C, Gratwohl A et al. Neopterin As A New Biochemical Marker in the Clinical Monitoring of Bone-Marrow Transplant Recipients. *Transplantation* 1984; 38(5):497-500.
- (155) Kramer A, Wiktor SZ, Fuchs D et al. Neopterin - A Predictive Marker of Acquired Immune-Deficiency Syndrome in Human Immunodeficiency Virus-Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1989; 2(3):291-296.
- (156) Balkwill FR, Burke F. The Cytokine Network. *Immunology Today* 1989; 10(9):299-303.

- (157) Mintz M, Rapaport R, Oleske JM et al. Elevated Serum Levels of Tumor Necrosis Factor Are Associated with Progressive Encephalopathy in Children with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *American Journal of Diseases of Children* 1989; 143(7):771-774.
- (158) Allain JP, Laurian Y, Paul DA et al. Long-Term Evaluation of Hiv Antigen and Antibodies to P24 and Gp41 in Patients with Hemophilia - Potential Clinical Importance. *New England Journal of Medicine* 1987; 317(18):1114-1121.
- (159) Gaines H, Sonnerborg A, Czajkowski J et al. Antibody-Response in Primary Human Immunodeficiency Virus-Infection. *Lancet* 1987; 1(8544):1249-1253.
- (160) Teeuwssen VJP, Lange JMA, Keet R et al. Low Numbers of Functionally Active B-Lymphocytes in the Peripheral-Blood of Hiv-1-Seropositive Individuals with Low P24-Specific Serum Antibody-Titers. *AIDS* 1991; 5(8):971-979.
- (161) Lange JMA, Paul DA, Dewolf F, Coutinho RA, Goudsmit J. Viral Gene-Expression, Antibody-Production and Immune-Complex Formation in Human Immunodeficiency Virus-Infection. *AIDS* 1987; 1(1):15-20.
- (162) Phillips AN, Sabin CA, Eford J, Bofill M, Lee CA, Janossy G. Cd8 Lymphocyte Counts and Serum Immunoglobulin-A Levels Early in Hiv-Infection As Predictors of Cd4 Lymphocyte Depletion During 8 Years of Follow-Up. *AIDS* 1993; 7(7):975-980.
- (163) Allain P, Laurian I, Paul D, Senn D. Serological markers in early estages of human immunodeficiency virusinfection in haemophiliacs. *Lancet* 1986; 2:1233-1236.
- (164) Hamilton JD, Hartigan PM, Simberkoff MS et al. A Controlled Trial of Early Versus Late Treatment with Zidovudine in Symptomatic Human-Immunodeficiency-Virus Infection - Results of the Veterans Affairs Cooperative Study. *New England Journal of Medicine* 1992; 326(7):437-443.
- (165) Spector SA, Kennedy C, Mccutchan JA et al. The Antiviral Effect of Zidovudine and Ribavirin in Clinical-Trials and the Use of P24 Antigen Levels As A Virologic Marker. *Journal of Infectious Diseases* 1989; 159(5):822-828.

- (166) Cao Y, Valentine F, Hojvat S et al. Detection of Hiv Antigen and Specific Antibodies to Hiv Core and Envelope Proteins in Sera of Patients with Hiv-Infection. *Blood* 1987; 70(2):575-578.
- (167) Bollinger RC, Kline RL, Francis HL, Moss MW, Bartlett JG, Quinn TC. Acid Dissociation Increases the Sensitivity of P24-Antigen Detection for the Evaluation of Antiviral Therapy and Disease Progression in Asymptomatic Human-Immunodeficiency-Virus Infected Persons. *Journal of Infectious Diseases* 1992; 165(5):913-916.
- (168) Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, et al. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:7089-7093.
- (169) Koot M, Vos AHV, Keet RPM et al. Hiv-1 Biological Phenotype in Long-Term Infected Individuals Evaluated with An Mt-2 Cocultivation Assay. *AIDS* 1992; 6(1):49-54.
- (170) Tersmette M, Lange JMA, DeGoede REY et al. Association Between Biological Properties of Human Immunodeficiency Virus Variants and Risk for Aids and Aids Mortality. *Lancet* 1989; 1(8645):983-985.
- (171) Koot M, Keet IPM, Vos AHV et al. Prognostic Value of Hiv-1 Syncytium-Inducing Phenotype for Rate of Cd4+ Cell Depletion and Progression to Aids. *Annals of Internal Medicine* 1993; 118(9):681-688.
- (172) Schellekens PTA, Tersmette M, Roos MTL et al. Biphasic Rate of Cd4+ Cell Count Decline During Progression to Aids Correlates with Hiv-1 Phenotype. *AIDS* 1992; 6(7):665-669.
- (173) Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122:573-579.
- (174) Clark SJ, Saag MS, Decker WD. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:954-960.
- (175) Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary Human Immunodeficiency Virus type I infection. *N Engl J Med* 1991; 324:961-964.
- (176) Connor RI, Mohri H, Cao YZ, Ho DD. Increased Viral Burden and Cytopathicity Correlate Temporally with Cd4+ T-

- Lymphocyte Decline and Clinical Progression in Human-Immunodeficiency-Virus Type 1-Infected Individuals. Journal of Virology 1993; 67(4):1772-1777.**
- (177) **Lee TH, Sheppard HW, Reis M, Dondero D, Osmond D, Busch MP. Circulating Hiv-1-Infected Cell Burden from Seroconversion to Aids - Importance of Postseroconversion Viral Load on Disease Course. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 1994; 7(4):381-388.**
- (178) **Psallidopoulos MC, Schnittman SM, Thompson LM et al. Integrated Proviral Human Immunodeficiency Virus Type-1 Is Present in Cd4+ Peripheral-Blood Lymphocytes in Healthy Seropositive Individuals. Journal of Virology 1989; 63(11):4626-4631.**
- (179) **Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC et al. The Reservoir for Hiv-1 in Human Peripheral-Blood Is A T-Cell That Maintains Expression of Cd4. Science 1989; 245(4915):305-308.**
- (180) **Yerly S, Chamot E, Hirschel B, Perrin LH. Quantitation of Human Immunodeficiency Virus provirus and circulating virus: Relationship with Immunologic parameters. J Infect Dis 1992; 166:269-276.**
- (181) **Escaich S, Ritter J, Rougier P et al. Relevance of the Quantitative Detection of Hiv Proviral Sequences in Pbmcs of Infected Individuals. Aids Research and Human Retroviruses 1992; 8(10):1833-1837.**
- (182) **Gupta P, Kingsley L, Armstrong J, Ding M, Cottrill M, Rinaldo C. Enhanced Expression of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Correlates with Development of Aids. Virology 1993; 196(2):586-595.**
- (183) **Schnittman SM, Greenhouse JJ, Psallidopoulos et al. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. Ann Intern Med 1990; 113:438-443.**
- (184) **Jurriens S, Van GB, Weverling GJ et al. The natural history of HIV-1 infection: virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? Virology 1994; 204:223-233.**

- 
- (185) Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent Lymphocytes-T As An Inducible Virus Reservoir in Hiv-1 Infection. *Science* 1991; 254(5030):423-427.
- (186) Jurriaans S, Dekker JT, Deronde A. Hiv-1 Viral-Dna Load in Peripheral-Blood Mononuclear-Cells from Seroconverters and Long-Term Infected Individuals. *AIDS* 1992; 6(7):635-641.
- (187) Michael NL, Vahey M, Burke DS, Redfield RR. Viral-Dna and Messenger-Rna Expression Correlate with the Stage of Human-Immunodeficiency-Virus (Hiv) Type-1 Infection in Humans - Evidence for Viral Replication in All Stages of Hiv Disease. *Journal of Virology* 1992; 66(1):310-316.
- (188) Schnittman SM, Greenhouse JJ, Lane HC, Pierce PF, Fauci AS. Frequent Detection of Hiv-1-Specific Messenger-Rnas in Infected Individuals Suggests Ongoing Active Viral Expression in All Stages of Disease. *Aids Research and Human Retroviruses* 1991; 7(4):361-367.
- (189) Saksela K, Stevens C, Rubinstein P, Baltimore D. Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Messenger-Rna Expression in Peripheral-Blood Cells Predicts Disease Progression Independently of the Numbers of Cd4+ Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91(3):1104-1108.
- (190) Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K et al. The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses [published erratum appears in *J Infect Dis* 1999 May; 179(5):1315]. *J Infect Dis* 1999; 1999 Mar;179(3):527-537.
- (191) Katzenstein DA, Hammer SM, Hughes MD et al. The relation of virologic and immunologic markers to clinical outcomes after nucleoside therapy in HIV infected adults with 200 to 500 CD4 cells per cubic millimeter. *ACTG 175. N Engl J Med* 1996; 335:1091-1098.
- (192) Saag MS, Crain MJ, Decker WD. High-level viremia in adults and children infected with human immunodeficiency virus: Relation to disease stage and CD4+ lymphocyte levels. *J Infect Dis* 1991; 164:72-80.
- (193) Fox CH, Tenner-Racz K, Racz P, Firpo A, Pizzo PA, Fauci AS. Lymphoid germinal centers are reservoirs of human

- immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1991; 1164:1051-1057.
- (194) Embretson J, Zupancic M, Ribas JL et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362:359-362.
- (195) Perrin L, Yerly S, Marchal F et al. Virus burden in lymph nodes and blood of subjects with primary human immunodeficiency virus type 1 infection on bitherapy. *J Infect Dis* 1998; 177:1497-1501.
- (196) Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia [see comments]. *Science* 1997; 278(5341):1291-1295.
- (197) Anderson D, DeNobile J, Zhao F et al. Sampling lymph node content of human immunodeficiency virus type 1 nucleic acids and p24 antigen by fine-needle aspiration in early-stage patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 10(Suppl 2):S57-S61.
- (198) Burgisser P, Spertini F, Weyrich-Suter C, Pagani JL, Meylan PR. Monitoring responses to antiretroviral treatment in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients by serial lymph node aspiration. *J Infect Dis* 1997; 175:1202-1205.
- (199) Harris M, Patenaude P, Cooperberg P, et al. Correlation of virus load in plasma and lymph node tissue in Human Immunodeficiency Virus infection. *J Infect Dis* 1997; 176:1388-1392.
- (200) Fiscus SA, Chen S, Hoover D et al. Affordable, abbreviated Roche Monitor assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(8):4200-4202.
- (201) Spearman P, Fiscus SA, Smith RM et al. Comparison of Roche MONITOR and Organon Teknika NucliSens assays to quantify human immunodeficiency virus type 1 RNA in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(4):1612-1614.

- 
- (202) Lafeuillade A, Poggi C, Profizi N, Tamalet C, Costes O. Human immunodeficiency virus type 1 kinetics in lymph nodes compared with plasma. *J Infect Dis* 1996; 174:404-407.
- (203) Lafeuillade A, Poggi C, Tamalet C, Profizi N. Human Immunodeficiency virus type 1 dynamics in different lymphoid tissue compartments. *J Infect Dis* 1997; 176:804-806.
- (204) Tamalet C, Lafeuillade A, Fantini J, Poggi C, Yahi N. Quantification of HIV-1 viral load in lymphoid and blood cells: assessment during four-drug combination therapy. *AIDS* 1997; 11:895-901.
- (205) Notermans DW, Jurriaans S, de Wolf F et al. Decrease of HIV-1 RNA levels in lymphoid tissue and peripheral blood during treatment with ritonavir, lamivudine and zidovudine. Ritonavir/3TC/ZDV Study Group. *AIDS* 1998; 12(2):167-173.
- (206) Graziosi C, Pantaleo G, Demarest JF et al. HIV-1 infection in the lymphoid organs. *AIDS* 1993; 7 (supl 2):S53-S58.
- (207) Coombs RW, Welles SL, Hooper C. Association of plasma human immunodeficiency virus type-1 RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. *J Infect Dis* 1996; 174:704-712.
- (208) Welles SL, Jackson JB, Yen-Lieberman B et al. Prognostic value of plasma human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) rna levels in patients with advanced hiv-1 disease and with little or no prior zidovudine therapy. aids clinical trials group protocol 116a/116b/117 team. *J Infect Dis* 1996; 174(4):696-703.
- (209) Marschner IC, Collier AC, Coombs RW. Use of changes in plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA to assess clinical benefit to antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1998; 177:40-47.
- (210) Reijers MH, Weverling GJ, Jurriaans S et al. Maintenance therapy after quadruple induction therapy in HIV-1 infected individuals: Amsterdam Duration of Antiretroviral Medication (ADAM) study. *Lancet* 1998; 352(9123):185-190.
- (211) Finzi D, Hermankova M, Pierson T et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278:1295-1300.

- (212) Lafeuillade A, Tamalet C, Poggi C, et al. Antiretroviral effect of zidovudine-didanosine combination on blood and lymph nodes. *AIDS* 1997; 11:67-72.
- (213) Pantaleo G, Graziosi C, Fauci T. The immunopathogenesis of Human Immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328:327-335.
- (214) Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996. Recommendations of an international panel. International AIDS Society-USA. *JAMA* 1996; 276(2):146-154.
- (215) Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997: updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 1997; 277:1962-1969.
- (216) Iribarren JA, Labarga P, Rubio R et al. Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en el año 2004. Recomendaciones de GESIDA. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(10):561-563.
- (217) Bush CE, Donovan RM, Markowitz N, Kvale PA, Saravolatz LD. A study of HIV RNA viral load in AIDS patients with bacterial pneumonia. *AIDS* 1996; 13:23-26.
- (218) STAPRANS SI, Hamilton BL, Follansbee SE. Activation of virus replication after vaccination of HIV 1- infected individuals. *J Exp Med* 1995; 182:1727-1737.
- (219) Staszewski S, DeMasi R, Hill AM, Dawson D. HIV-1 RNA, CD4 cell count and the risk of progression to AIDS and death during treatment with HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 1998; 12(15):1991-1997.
- (220) Cavert W, Notermans DW, Staskus K et al. Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 1997; 276(5314):960-964.
- (221) Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss HD, Stein H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am J Pathol* 1992; 140(1):15-22.

- (222) Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nature Medicine* 1999; 5(1):83-89.
- (223) Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA et al. Identification of Dynamically Distinct Subpopulations of T Lymphocytes That Are Differentially Affected by HIV. *J Exp Med* 2001; 194(12):1731-1741.
- (224) Mohri H, Perelson AS, Tung K et al. Increased Turnover of T Lymphocytes in HIV-1 Infection and Its Reduction by Antiretroviral Therapy. *J Exp Med* 2001; 194(9):1277-1288.
- (225) Ribeiro RM, Mohri H, Ho DD, Perelson AS. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: Why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? *PNAS* 2002; 99(24):15572-15577.
- (226) Huang SS, Barbour JD, Deeks SG et al. Reversal of human immunodeficiency virus type 1-associated hematosuppression by effective antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000; 30(3):504-510.
- (227) Moses A, Nelson J, Bagby GC. The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood* 1998; 91(5):1479-1495.
- (228) Chadburn A, Metroka C, Mouradian J. Progressive lymph node histology and its prognostic value in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Hum Pathol* 1989; 20(6):579-587.
- (229) Knowles DM, Chadburn A. Lymphadenopathy and lymphoid neoplasms associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). In: Knowles DM, editor. *Neoplastic Hematopathology*. Baltimore: William and Wilkins, 2001: 987-989.
- (230) McCune JM, Hanley MB, Cesar D et al. Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105(5):R1-R8.
- (231) Franco JM, Rubio A, Martinez-Moya M et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2002; 99(10):3702-3706.

- (232) Kolte L, Dreves AM, Ersboll AK et al. Association between larger thymic size and higher thymic output in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases* 2002; 185(11):1578-1585.
- (233) Navarrete P, Morente V, Garcia F et al. Predictors of tonsillar tissue HIV-1 viral burden at baseline and after 1 year of antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2003; 8(6):635-637.
- (234) Valdez H, Connick E, Smith KY et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS* 2002; 16(14):1859-1866.
- (235) Macias J, Japon MA, Leal M et al. Structural normalization of the lymphoid tissue in asymptomatic HIV-infected patients after 48 weeks of potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15(18):2371-2378.
- (236) Schacker TW, Nguyen PL, Martinez E et al. Persistent abnormalities in lymphoid tissues of human immunodeficiency virus-infected patients successfully treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002; 2002 Oct 15;186(8):1092-1097.
- (237) Nossal GJV, Abbot A, Mitchell J, Lumms Z. Antigens in Immunity .15. Ultrastructural Features of Antigen Capture in Primary and Secondary Lymphoid Follicles. *Journal of Experimental Medicine* 1968; 127(2):277-&.
- (238) Donaldson SL, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. Localization of Antibody-Forming-Cells in Draining Lymphoid Organs During Long-Term Maintenance of the Antibody-Response. *Journal of Leukocyte Biology* 1986; 40(2):147-157.
- (239) Naiem M, Gerdes J, Abdulaziz Z, Stein H, Mason DY. Production of A Monoclonal-Antibody Reactive with Human Dendritic Reticulum Cells and Its Use in the Immunohistological Analysis of Lymphoid-Tissue. *Journal of Clinical Pathology* 1983; 36(2):167-175.
- (240) Vandervalk P, Vanderloo EM, Jansen J, Daha MR, Meijer CJLM. Analysis of Lymphoid and Dendritic Cells in Human Lymph-Node, Tonsil and Spleen - A Study Using Monoclonal and Heterologous Antibodies. *Virchows Archiv* 1984; 45(2):169-185.

- (241) Hsu SM, Cossman J, Jaffe ES. Lymphocyte Subsets in Normal Human Lymphoid-Tissues. *American Journal of Clinical Pathology* 1983; 80(1):21-30.
- (242) Hsu SM, Jaffe ES. Phenotypic-Expression of Lymphocytes-B .1. Identification with Monoclonal-Antibodies in Normal Lymphoid-Tissues. *American Journal of Pathology* 1984; 114(3):387-395.
- (243) Janossy G, Thomas JA, Pizzolo G. The Analysis of Lymphoid Sub-Populations in Normal and Malignant-Tissues by Immunofluorescence Technique. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1981; 101(1):1-11.
- (244) Stein H, Bonk A, Tolksdorf G, Lennert K, Rodt H, Gerdes J. Immunohistologic Analysis of the Organization of Normal Lymphoid-Tissue and Non-Hodgkins Lymphomas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1980; 28(8):746-760.
- (245) Crocker J. The Enzyme-Histochemistry of Lymphoid and Non-Lymphoid Cells of the Human Palatine Tonsil - A Basis for the Study of Lymphomas. *Journal of Pathology* 1981; 134(1):81-95.
- (246) Poppema S, Bhan AK, Reinherz EL, Mccluskey RT, Schlossman SF. Distribution of T-Cell Subsets in Human Lymph-Nodes. *Journal of Experimental Medicine* 1981; 153(1):30-41.
- (247) Stevens SK, Weissman IL, Butcher EC. Differences in the Migration of Lymphocyte-B and Lymphocyte-T - Organ-Selective Localization Invivo and the Role of Lymphocyte-Endothelial Cell Recognition. *Journal of Immunology* 1982; 128(2):844-851.
- (248) Chin YH, Carey GD, Woodruff JJ. Lymphocyte Recognition of Lymph-Node High Endothelium .4. Cell-Surface Structures Mediating Entry Into Lymph-Nodes. *Journal of Immunology* 1982; 129(5):1911-1915.
- (249) Niewenhuis P, Keuning FJ. Germinal Centers and Origin of B-Cell System .2. Germinal Centers in Rabbit Spleen and Popliteal Lymph-Nodes. *Immunology* 1974; 26(3):509-519.
- (250) Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Shimosato Y, Motoi M, Lennert K. S-100 Protein in Langerhans Cells, Interdigitating Reticulum Cells and Histiocytosis X-Cells. *Gann* 1982; 73(3):429-432.

- (251) Janossy G, Tidman N, Selby WS et al. Human Lymphocytes-T of Inducer and Suppressor Type Occupy Different Micro-Environments. *Nature* 1980; 288(5786):81-84.
- (252) Poulter LW, Campbell DA, Munro C, Janossy G. Discrimination of Human Macrophages and Dendritic Cells by Means of Monoclonal-Antibodies. *Scandinavian Journal of Immunology* 1986; 24(3):351-357.
- (253) Gougeon ML, Ledru E, Lecoeur H, Garcia S. T cell apoptosis in HIV infection: mechanisms and relevance for AIDS pathogenesis. *Results Probl Cell Differ* 1998; 24:233-248.
- (254) Ledru E, Lecoeur H, Garcia S, Debord T, Gougeon ML. Differential susceptibility to activation-induced apoptosis among peripheral Th1 subsets: correlation with Bcl-2 expression and consequences for AIDS pathogenesis. *J Immunol* 1998; 160(7):3194-3206.
- (255) Zhang ZQ, Notermans DW, Sedgewick G et al. Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(3):1154-1159.
- (256) Biberfeld G, Brown F, Esparza J et al. Who working group on characterization of HIV-related retroviruses; criteria for characterization and proposal for a nomenclature system. *AIDS* 1987; 1:189-190.
- (257) Cooper DA, MacLean P, Finlayson R et al. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1985; 1:537-540.
- (258) Ho DD, Sarngadharan MG, Resnick L, diMarzo F, Rota T, Hirsch MS. Primary Human T-Lymphotropic Virus Type III infection. *Ann Intern Med* 1985; 103:880-883.
- (259) Koup RA, Saag MS, Yang LC et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68:4650-4655.
- (260) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(24):13193-13197.
- (261) Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED et al. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte

- responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med* 1998; 4(8):953-956.
- (262) Kilby JM. Human immunodeficiency virus pathogenesis: Insights from studies of lymphoid cells and tissues. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33(6):873-884.
- (263) Spira AI, Marx PA, Patterson BK. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996; 183:215-225.
- (264) Zhang ZQ, Schuler T, Zupancic M et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4(+) T cells. *Science* 1999; 286(5443):1353-1357.
- (265) Oxenius A, Price DA, Easterbrook PJ et al. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(7):3382-3387.
- (266) Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997; 278:1447-1450.
- (267) Frankel SS, Wenig BM, Burke AP et al. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 1996; 272(5258):115-117.
- (268) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 1998 Mar 19;392(6673):245-252.
- (269) Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunological Reviews* 2000; 177:134-140.
- (270) Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 1997; 276(5320):1857-1861.
- (271) Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998; 280(5362):427-431.
- (272) Clayton F, Snow G, Reka S, Kotler DP. Selective depletion of rectal lamina propria rather than lymphoid aggregate CD4

- lymphocytes in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:288-292.
- (273) Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006; 7(3):235-239.
- (274) Grossman Z. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8:319-323.
- (275) Reinhart TA, Rogan MJ, Huddleston D, Rausch DM, Eiden LE, Haase AT. Simian immunodeficiency virus burden in tissues and cellular compartments during clinical latency and AIDS. *J Infect Dis* 1997; 176(5):1198-1208.
- (276) Schacker T, Little S, Connick E et al. Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoirs during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2000; 181(1):354-357.
- (277) Kaluza G, Willems WR, Lohmeyer J, Altmannsberger M, Bohle RM, Lübke S. A monoclonal antibody that recognizes a formalin-resistant epitope on the p24 core protein of HIV-1. *Path Res Pract* 1992; 188:91-96.
- (278) Kuster H, Opravil M, Ott P et al. Treatment-induced decline of Human Immunodeficiency Virus-1 p24 and HIV-1 RNA in lymphoid tissue of patients with early Human Immunodeficiency Virus-1 infection. *Am J Pathol* 2000; 156:1973-1986.
- (279) Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 1996; 271:324-328.
- (280) Mocroft A, Bofill M, Lipman M et al. Cd8+,cd38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring hiv-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14(2):158-162.
- (281) Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T et al. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med* 1998; 4(3):341-345.
- (282) Rizzardi GP, de Boer RJ, Hoover S et al. Predicting the duration of antiviral treatment needed to suppress plasma HIV-1 RNA. *J Clin Invest* 2000; 2000 Mar;105(6):777-782.

- 
- (283) Hockett RD, Kilby JM, Derdeyn CA et al. Constant mean viral copy number per infected cell in tissues, regardless of high, low, or undetectable plasma HIV RNA. *J Exp Med* 1999; 189(10):1545-1554.
- (284) Chun TW, Engel D, Berry MM. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8869-8873.
- (285) Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K et al. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* 1999; 285(5431):1261-1265.
- (286) Perelson AS, Essunger P, Cao Y. Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997; 387:188-191.
- (287) Mehandru S. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:761-770.
- (288) Li Q. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 2005; 434:1148-1152.
- (289) Mattapallil JJ. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 2005; 434:1093-1097.
- (290) Brenchley JM. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:749-759.
- (291) Frankel SS, Tenner-Racz K, Racz P et al. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am J Pathol* 1997; 151(1):89-96.
- (292) McIlroy D, Autran B, Cheynier R et al. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 1995; 69(8):4737-4745.
- (293) Stanley SK, McCune JM, Kaneshima H et al. Human-Immunodeficiency-Virus Infection of the Human Thymus and Disruption of the Thymic Microenvironment in the Scid-Hu

- Mouse. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178(4):1151-1163.
- (294) Flamand L, Crowley RW, Lusso P, Colombini-Hatch S, Margolis DM, Gallo RC. Activation of CD8(+) T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: Implications for HIV pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(6):3111-3116.
- (295) Yang OO. CD8 T cells in HIV infection: Mechanisms of immunity. *Hospital Practice* 1998; 33(11):105-+.
- (296) Burton GF, Conrad DH, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol* 1993; 150(1):31-38.
- (297) Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism for delivery of antigen to antigen-processing cells. *J Immunol* 1988; 140(2):341-353.
- (298) Spear GT, Landay AL, Sullivan BL, Dittel B, Lint TF. Activation of Complement on the Surface of Cells Infected by Human-Immunodeficiency-Virus. *Journal of Immunology* 1990; 144(4):1490-1496.
- (299) Spear GT, Takefman DM, Sullivan BL, Landay AL, Zollapazner S. Complement Activation by Human Monoclonal-Antibodies to Human-Immunodeficiency-Virus. *Journal of Virology* 1993; 67(1):53-59.
- (300) Tsunoda R, Hashimoto K, Baba M, Shigeta S, Sugai N. Follicular dendritic cells in vitro are not susceptible to infection by HIV-1. *AIDS* 1996; 10(6):595-602.
- (301) Heath SL, Tew JH, Szakal AK, Burton FG. Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. *Nature* 1995; 377:40-44.
- (302) Schuurman HJ, Krone WJA, Broekhuizen R et al. The Thymus in Acquired Immune-Deficiency Syndrome - Comparison with Other Types of Immunodeficiency Diseases, and Presence of Components of Human Immunodeficiency Virus Type-1. *American Journal of Pathology* 1989; 134(6):1329-1338.
- (303) Su L, Kaneshima H, Bonyhadi M et al. Hiv-1-Induced Thymocyte Depletion Is Associated with Indirect

- Cytopathicity and Infection of Progenitor Cells In-Vivo. Immunity 1995; 2(1):25-36.**
- (304) **Fleury S, de Boer RJ, Rizzardi GP et al. Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection:effect of highly active antiretroviral therapy. Nat Med 1998; 4(7):794-801.**
- (305) **Zurlo JJ, Wood L, Gaglione M, Polis MA. Effect of splenectomy on T lymphocyte subsets in patients infected with the human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1995; 20:768-771.**
- (306) **Tsoukas CM, Bernard NF, Abrahamowicz M et al. Effect of splenectomy on slowing human immunodeficiency virus disease progression. Archives of Surgery 1998; 133(1):25-31.**
- (307) **Sprent J, Schaefer M, Hurd M, Surh CD, Ron Y. Mature Murine-B and T-Cells Transferred to Scid Mice Can Survive Indefinitely and Many Maintain A Virgin Phenotype. Journal of Experimental Medicine 1991; 174(3):717-728.**
- (308) **Sprent J. Life-Spans of Naive, Memory and Effector Lymphocytes. Current Opinion in Immunology 1993; 5(3):433-438.**
- (309) **Tough DF, Sprent J. Turnover of Naive-Phenotype and Memory-Phenotype T-Cells. Journal of Experimental Medicine 1994; 179(4):1127-1135.**
- (310) **Walker RE, Carter CS, Muul L et al. Peripheral expansion of pre-existing mature T cells is an important means of CD4(+) T-cell regeneration HIV-infected adults. Nature Medicine 1998; 4(7):852-856.**
- (311) **McCune JM, Loftus R, Schmidt DK et al. High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection. J Clin Invest 1998; 101(11):2301-2308.**
- (312) **Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ et al. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. Journal of Clinical Investigation 1999; 103(4):453-460.**
- (313) **Hazenber MD, Stuart JWTC, Otto SA et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). Blood 2000; 95(1):249-255.**

- (314) Sewell AK. Cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus: control and escape. *Stem Cells* 2000; 18:230-244.
- (315) Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the AIDS: Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *Engl J Med* 1985; 313:79-83.
- (316) Gougeon ML, Montagnier L. Apoptosis in Aids. *Science* 1993; 260(5112):1269-1270.
- (317) Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-Induced Death by Apoptosis in Cd4+ T-Cells from Human-Immunodeficiency-Virus Infected Asymptomatic Individuals. *Journal of Experimental Medicine* 1992; 175(2):331-340.
- (318) Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RPM, Miedema F. Programmed Death of T-Cells in Hiv-1 Infection. *Science* 1992; 257(5067):217-219.
- (319) Pantaleo G, Fauci AS. Apoptosis in Hiv-Infection. *Nature Medicine* 1995; 1(2):118-120.
- (320) Murocacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of Apoptosis in Lymph-Nodes of Hiv-Infected Persons - Intensity of Apoptosis Correlates with the General State of Activation of the Lymphoid-Tissue and Not with Stage of Disease Or Viral Burden. *Journal of Immunology* 1995; 154(10):5555-5566.
- (321) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(24):13193-13197.
- (322) Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332:143-149.
- (323) Banda NK, Bernier J, Kurahara DK et al. Cross-Linking Cd4 by Human Immunodeficiency Virus-Gp120 Primes T-Cells for Activation-Induced Apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1992; 176(4):1099-1106.
- (324) Sunila I, Vaccarezza M, Pantaleo G, Fauci AS, Orenstein JM. Gp120 is present on the plasma membrane of apoptotic CD4 cells prepared from lymph nodes of HIV-1-infected

- individuals: An immunoelectron microscopic study. *AIDS* 1997; 11(1):27-32.
- (325) Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justement JS, Baseler M, Fauci AS. Preferential Infection of Cd4+ Memory T-Cells by Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 - Evidence for A Role in the Selective T-Cell Functional Defects Observed in Infected Individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87(16):6058-6062.
- (326) Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Development of human T and natural killer cells. *Blood* 1995 1995; 85:2654-2670.
- (327) Clement LT. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers of human T cell differentiation. *J Clin Immunol* 1992; 12:1-10.
- (328) Depaoli P, Battistin S, Santini GF. Age-Related-Changes in Human-Lymphocyte Subsets - Progressive Reduction of the Cd4 Cd45R (Suppressor Inducer) Population. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1988; 48(3):290-296.
- (329) Hannel I, Erkelleryuksel F, Lydyard P, Deneys V, Debruyere M. Developmental and Maturational Changes in Human Blood Lymphocyte Subpopulations. *Immunology Today* 1992; 13(6):215-218.
- (330) Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* 1996; 88(9):3259-3287.
- (331) Tedder TF, Cooper MD, Clement LT. Human-Lymphocyte Differentiation Antigens Hb-10 and Hb-11 .2. Differential Production of B-Cell Growth and Differentiation Factors by Distinct Helper T-Cell Subpopulations. *Journal of Immunology* 1985; 134(5):2989-2994.
- (332) Okumura M, Fujii Y, Takeuchi Y, Inada K, Nakahara K, Matsuda H. Age-Related Accumulation of Lfa-1(High) Cells in A Cd8+Cd45Ra(High) T-Cell Population. *European Journal of Immunology* 1993; 23(5):1057-1063.
- (333) Picker LJ, Treer JR, Fergusondarnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LWMM. Control of Lymphocyte Recirculation in Man .1. Differential Regulation of the Peripheral Lymph-Node Homing Receptor L-Selectin on T-Cells During the Virgin to Memory Cell Transition. *Journal of Immunology* 1993; 150(3):1105-1121.

- (334) Swain SL, Bradley LM, Croft M et al. Helper T-Cell Subsets - Phenotype, Function and the Role of Lymphokines in Regulating Their Development. *Immunological Reviews* 1991; 123:115-144.
- (335) Kristensson K, Borrebaeck CAK, Carlsson R. Human Cd4+ T-Cells Expressing Cd45Ra Acquire the Lymphokine Gene-Expression of Cd45Ro+ T-Helper Cells After Activation *Invitro*. *Immunology* 1992; 76(1):103-109.
- (336) Salmon M, Kitas GD, Bacon PA. Production of Lymphokine Messenger-Rna by Cd45R+ and Cd45R- Helper T-Cells from Human Peripheral-Blood and by Human Cd4+ T-Cell Clones. *Journal of Immunology* 1989; 143(3):907-912.
- (337) Sanders ME, Makgoba MW, Sharrow SO et al. Human-Memory Lymphocytes-T Express Increased Levels of 3 Cell-Adhesion Molecules (Lfa-3, Cd2, and Lfa-1) and 3 Other Molecules (Uchl1, Cdw29, and Pgp-1) and Have Enhanced Ifn-Gamma Production. *Journal of Immunology* 1988; 140(5):1401-1407.
- (338) Depaoli P, Carbone A, Battistin S, Crovatto M, Arreghini N, Santini G. Selective Depletion of the Okt 4+ 4B4+ Subset in Lymph-Nodes from Hiv+ Patients. *Immunology Letters* 1987; 16(1):71-73.
- (339) Klimas NG, Caralis P, Laperriere A et al. Immunological Function in A Cohort of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1-Seropositive and Type-1-Negative Healthy Homosexual Men. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29(7):1413-1421.
- (340) Demartini RM, Turner RR, Formenti SC et al. Peripheral-Blood Mononuclear Cell Abnormalities and Their Relationship to Clinical Course in Homosexual Men with Hiv Infection. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1988; 46(2):258-271.
- (341) Depaoli P, Battistin S, Crovatto M et al. Immunological Abnormalities Related to Antigenemia During HIV-1 Infection. *Clinical and Experimental Immunology* 1988; 74(3):317-320.
- (342) Ginaldi L, DeMartinis M, D'Ostilio A et al. Activated naive and memory CD4+ and CD8+ subsets in different stages on HIV infection. *Pathobiology* 1997; 65:91-99.

- (343) Stutman O. Postthymic T-Cell Development. *Immunological Reviews* 1986; 91:159-194.
- (344) Zheng B, Han SH, Zhu Q, Goldsby R, Kelsoe G. Alternative pathways for the selection of antigen-specific peripheral T cells. *Nature* 1996; 384(6606):263-266.
- (345) Mclean AR, Michie CA. In-Vivo Estimates of Division and Death Rates of Human T-Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(9):3707-3711.
- (346) Kundu SK, Merigan TC. Relationship of HIV-1 provirus load. CD8+CD11+ cells and HIV-1 envelope-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected asymptomatic patients. *Immunology* 1994; 83:81.
- (347) Reddy MM, Grieco MH. Quantitative Changes in T-Helper Inducer (Cd4+ Cd45Ra-), T-Suppressor Inducer (Cd4+ Cd45Ra+), T-Suppressor (Cd8+ Cd11B+), and T-Cytotoxic (Cd8+ Cd11B-) Subsets in Human-Immunodeficiency-Virus Infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1991; 5(2):96-100.
- (348) Laman JD, Claassen E, Vanrooijen N, Boersma WJA. Immune-Complexes on Follicular Dendritic Cells As A Target for Cytolytic Cells in Aids. *AIDS* 1989; 3(8):543-544.
- (349) Hoetelmans RMW, van Heeswijk RPG, Profijt M et al. Comparison of the plasma pharmacokinetics and renal clearance of didanosine during once and twice daily dosing in HIV-1 infected individuals. *AIDS* 1998; 12(17):F211-F216.
- (350) Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine and zalcitabine. *N Engl J Med* 1996; 334:1011-1017.
- (351) Badley AD, Dockrell DH, Algeciras A et al. In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV-infected patients. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 102(1):79-87.
- (352) Liegler TJ, Yonemoto W, Elbeik T, Vittinghoff E, Buchbinder SP, Greene WC. Diminished spontaneous apoptosis in lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected long-term nonprogressors. *Journal of Infectious Diseases* 1998; 178(3):669-679.

- (353) Zhang ZQ, Schuler T, Cavert W et al. Reversibility of the pathological changes in the follicular dendritic cell network with treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(9):5169-5172.
- (354) Hammer SM, Squires KE, Hughes MD et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997; 337(11):725-733.
- (355) Garcia F, Plana M, Vidal C et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(11):F79-F86.
- (356) Douek DC, McFarland RD, Keiser PH et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection [letter]. *Nature* 1998; 396:690-695.
- (357) Clark DR, Repping S, Pakker NG et al. T-cell progenitor function during progressive human immunodeficiency virus-1 infection and after antiretroviral therapy. *Blood* 2000; 96(1):242-249.
- (358) Tenner-Racz K, Racz P. Follicular dendritic cells initiate and maintain infection of the germinal centers by human immunodeficiency virus. *Antigen Depository of the Immune System: Follicular Dendritic Cells* 1995; 201:141-159.
- (359) Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK. Induction of Functional Follicular Dendritic Cell-Development in Severe Combined Immunodeficiency Mice - Influence of B-Cell and T-Cell. *Journal of Immunology* 1993; 150(7):2648-2658.
- (360) Markowitz M, Saag M, Powderly WG et al. A preliminary study of ritonavir, an inhibitor of hiv-1 protease, to treat hiv-1 infection. *N Engl J Med* 1995; 333:1534-1539.
- (361) Wolthers KC, Wisman GBA, Otto SA et al. T cell telomere length in HIV-1 infection: No evidence for increased CD4(+) T cell turnover. *Science* 1996; 274(5292):1543-1547.
- (362) Fuller KA, Kanagawa O, Nahm MH. T-Cells Within Germinal-Centers Are Specific for the Immunizing Antigen. *Journal of Immunology* 1993; 151(9):4505-4512.

- (363) Wong JK, Gunthard HF, Havlir DV et al. Reduction of HIV in blood and lymph nodes after potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12574-12579.
- (364) Plana M, Martínez C, García F et al. Immunological Reconstitution After One Year Of Highly Active Antiretroviral Therapy With Or Without Protease Inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:429-434.
- (365) Garcia F, Knobel H, Sambeat MA et al. Comparison of twice-daily stavudine plus once- or twice-daily didanosine and nevirapine in early stages of HIV infection: the scan study. *AIDS* 2000; 14(16):2485-2494.
- (366) Gunthard H, Wong J, Ignacio C et al. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol* 72, 2422-2428. 1998.
- Ref Type: Journal (Full)
- (367) Arno A, Ruiz L, Juan M et al. Impact on the immune system of undetectable plasma HIV-1 RNA for more than 2 years. *AIDS* 1998; 12(7):697-704.
- (368) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(24):13193-13197.
- (369) Gunthard HF, Frost SDW, Leigh-Brown AJ et al. Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *Journal of Virology* 1999; 73(11):9404-9412.
- (370) Lewin SR, Vesanen M, Kostrikis L et al. Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1 infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. *Journal of Virology* 1999; 73(7):6099-6103.
- (371) Sharkey ME, Teo I, Greenough T et al. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nature Medicine* 2000; 6(1):76-81.
- (372) Dornadula G, Zhang H, VanUitert B et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active

- antiretroviral therapy. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1999; 282(17):1627-1632.
- (373) Fischer M, Gunthard HF, Opravil M et al. Residual HIV-RNA levels persist for up to 2.5 years in peripheral blood mononuclear cells of patients on potent antiretroviral therapy. *Aids Research and Human Retroviruses* 2000; 16(12):1135-1140.
- (374) Yerly S, Kaiser L, Perneger TV et al. Time of initiation of antiretroviral therapy: impact on HIV-1 viraemia. *AIDS* 2000; 14(3):243-249.
- (375) Chun TW, Davey RT, Ostrowski M et al. Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy. *Nature Medicine* 2000; 6(7):757-761.
- (376) RAMRATNAM B, Mittler JE, Zhang LQ et al. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nature Medicine* 2000; 6(1):82-85.
- (377) Carpenter CCJ, Fischl MA, Hammer SM et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 2000: updated recommendations of the International AIDS Society–USA panel. *JAMA* 2000; 276:146-154.
- (378) Perrin L, Telenti A. HIV treatment failure: Testing for HIV resistance in clinical practice. *Science* 1998; 280(5371):1871-1873.
- (379) García F, Vidal C, Plana M et al. Residual low-level viral replication could explain discrepancies between viral load and CD4+ cell response in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000; 30:392-394.
- (380) June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of the Cd28 Receptor in T-Cell Activation. *Immunology Today* 1990; 11(6):211-216.
- (381) Plana M, Martínez C, García F et al. Immunological Reconstitution After One Year Of Highly Active Antiretroviral Therapy With Or Without Protease Inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:429-434.

- (382) Finzi D, Blankson J, Siliciano JD et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5(5):512-517.
- (383) Kepler TB, Perelson AS. Drug concentration heterogeneity facilitates the evolution of drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(20):11514-11519.
- (384) Schragger LK, D'Souza MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1998; 280(1):67-71.
- (385) Seshamma T, Bagasra O, Oakes JW, Pomerantz RJ. A Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain-Reaction for Hiv-1-Specific Rna Species. *Journal of Virological Methods* 1992; 40(3):331-345.
- (386) Ruiz L, van Lunzen J, Arno A et al. Protease inhibitor-containing regimens compared with nucleoside analogues alone in the suppression of persistent HIV-1 replication in lymphoid tissue. *AIDS* 1999; 1999 Jan 14;13(1):F1-F8.
- (387) Biberfeld P, Ost A, Porwit A et al. Histopathology and Immunohistology of Htlv-Iii/Lav Related Lymphadenopathy and Aids. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica Section A-Pathology* 1987; 95(1):47-65.
- (388) Chan WC, Brynes RK, Spira TJ et al. Lymphocyte Subsets in Lymph-Nodes of Homosexual Men with Generalized Unexplained Lymphadenopathy - Correlation with Morphology and Blood Changes. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1985; 109(2):133-137.
- (389) Fernandez R, Mouradian J, Metroka C, Davis J. The Prognostic Value of Histopathology in Persistent Generalized Lymphadenopathy in Homosexual Men. *New England Journal of Medicine* 1983; 309(3):185-186.
- (390) Gerstoft J, Pallesen G, Mathiesen L et al. Stages in Lav/Htlv-Iii Lymphadenitis .2. Correlation with Clinical and Immunological Findings. *Scandinavian Journal of Immunology* 1987; 25(1):93-99.
- (391) Pileri S, Rivano MT, Raine E et al. The Value of Lymph-Node Biopsy in Patients with the Acquired-Immunodeficiency-

- Syndrome (Aids) and the Aids-Related Complex (Arc) - A Morphological and Immunohistochemical Study of 90 Cases. *Histopathology* 1986; 10(11):1107-1129.
- (392) Schuurman HJ, Kluin PM, Meijling FHJG, Vanunnik JAM, Kater L. Lymphocyte Status of Lymph-Node and Blood in Acquired-Immundeficiency-Syndrome (Aids) and Aids-Related Complex Disease. *Journal of Pathology* 1985; 147(4):269-280.
- (393) Chun TW, Stuyver L, Mizell SB et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(24):13193-13197.
- (394) Garcia F, Plana M, Ortiz GM et al. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15(9):F29-F40.
- (395) Glushakova S, Baibakov B, Margolis IB, Zimmerberg J. Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis. *Nat Med* 1995; 1(12):1320-1322.
- (396) Alos L, Navarrete P, Morente V et al. Immunoarchitecture of lymphoid tissue in HIV-infection during antiretroviral therapy correlates with viral persistence. *Mod Pathol* 2005; 18(1):127-136.
- (397) Gulick RM, Ribaldo HJ, Shikuma CM, et al. Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2004; 350(18):1850-1861.
- (398) Squires K, Lazzarin A, Gatell JM, et al. Comparison of Once-Daily Atazanavir With Efavirenz, Each in Combination With Fixed-Dose Zidovudine and Lamivudine, As Initial Therapy for Patients Infected with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36(5):1011-1019.
- (399) Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. *N Engl J Med* 1999; 341(25):1865-1873.
- (400) van Leth F, Phanuphak P, Ruxrungtham K, et al. Comparison of first-line antiretroviral therapy with regimens including nevirapine, efavirenz, or both drugs, plus stavudine and

lamivudine: a randomised open-label trial, the 2NN Study. *Lancet*, 2004 2004; 363(9417):1253-1263.

- (401) Dybul M, Chun TW, Ward DJ et al. Evaluation of lymph node virus burden in human immunodeficiency virus-infected patients receiving efavirenz-based protease inhibitor-sparing highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181(4):1273-1279.
- (402) Podzamczar D, Ferrer E, Consiglio E et al. A randomized clinical trial comparing nelfinavir or nevirapine associated to zidovudine/lamivudine in HIV-infected naive patients (the Combine Study). *Antiviral Therapy* 2002; 7(2):81-90.
- (403) Plana M, Ferrer E, Martinez C et al. Immune restoration in HIV-positive, antiretroviral-naive patients after 1 year of zidovudine/lamivudine plus nelfinavir or nevirapine. *Antivir Ther* 2004; 9(2):197-204.