

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA**

**DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA
CONTRA EL VIH, BASADA EN BCG
RECOMBINANTE**

**TESIS DOCTORAL: ELIAS B. PEZZAT SAID
21 DE JUNIO DE 2005**

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I.1 GENERALIDADES VIH/SIDA

I-1.1 EPIDEMIOLOGÍA

Hace más de 20 años que el SIDA apareció por primera vez en el verano de 1981, en EEUU. En la actualidad se ha convertido en una de las pandemias más importantes del mundo en toda su historia (Fauci 2003); con aproximadamente 20 millones de muertes en estas dos décadas. La OMS estima que diariamente 14,000 nuevas personas se infectaron en el 2001 por lo que se podría llegar a 100 millones de infectados en los siguientes 10 años (http://www.unaids.org/epidemic_update/)

Más del 95% del total de personas con la infección VIH-SIDA, se localizan en los países subdesarrollados (UNAIDS 2004), pasando a formar parte de las enfermedades de la pobreza y la ignorancia debido a su particular dinámica de propagación en personas sexualmente activas, involucrando en forma directa a otros grupos susceptibles como mujeres y niños que representan los grupos más desprotegidos de la población. El problema es particularmente delicado en el continente Africano, debido al gran número de infectados por el VIH-SIDA, que desconocen su estado de portador-transmisor. En la región Subsahariana 1 de cada 10 adultos de entre 15-49 años está infectado, el 80% de las transmisiones se produce durante las relaciones sexuales no protegidas. De estas un 75% son relaciones heterosexuales, estando infectados hasta el 20% de la población total en algunos países como por ejemplo: Botswana, Lesotho, Namibia y Zimbabwe. El 90% de los casos de niños infectados en todo el mundo, son hijos de madres seropositivas, adquiriendo la infección durante la gestación, el parto y la lactancia, fenómeno que podría ocasionar 14 millones de huérfanos para el 2005.

A nivel mundial, solo del 5 al 10% de los casos totales está representado por infecciones en usuarios de drogas por vía parenteral. Este mecanismo de transmisión es más frecuente en algunos países desarrollados, alcanzando niveles mayores en los países de la antigua Unión Soviética.

INTRODUCCIÓN

El SIDA se caracteriza por una alta mortalidad, por involucrar mayoritariamente a personas entre los 15-45 años, que representa la edad más productiva, impactando, así directamente a nivel social, económico y por supuesto demográfico. Afectando sensiblemente el grado de desarrollo de las regiones con mayor número de casos (Fauci S.A.2 2003).

En los países occidentales, el uso a partir de 1996 de la terapia combinada con inhibidores de la proteasa (HAART), permitió el descenso de la morbi-mortalidad en un 50-70%, pero su elevado costo la hace impensable en los países poco industrializados (Fauci S.A.1 2003).

Dadas las circunstancias médico-biológicas y sociales que rodean a este proceso infeccioso, sumado a las características propias del virus causal y su transmisión principalmente sexual; se resalta el papel de la educación sanitaria, encaminada a disminuir las prácticas de riesgo en la mayoría de la población, sobre todo, considerando las limitaciones de la terapia antiviral disponible por su elevado costo y toxicidad. Además de la inexistencia de vacunas preventivas (Idemyor V., 2003), o terapéuticas.

El desarrollo de una vacuna representa un gran reto para la comunidad científica mundial. La posibilidad de obtener una vacuna preventiva, contra el VIH, eficaz, segura de fácil administración, disponible para todo el mundo y compatible con otras vacunas es una prioridad (W.H.O. 2003, Esparza J. 1 2001 y 2 2003). Considerando que el estado de inmuno-protección para esta infección, podría ser resultado de complejas interacciones de factores inmunológicos, genéticos y virales (Bojak A. 2002). Se sugiere que la combinación de una fuerte respuesta inmune específica celular y humoral, puede contribuir en el control de la replicación del VIH, por tanto disminuir el grado de viremia que limita la progresión de la enfermedad (McMichael A.1, Hanke T. 2003, Letvin N. 2002)

Los avances en la terapia antirretroviral y en la detección oportuna de la infección, han permitido prolongar la supervivencia de las personas con VIH-SIDA y disminuir la transmisión materno-fetal; pero es claro que sin una vacuna preventiva o por lo menos terapéutica no podremos hacer frente a esta pandemia.

INTRODUCCIÓN

Un prometedor vector para el desarrollo de una vacuna preventiva contra el VIH es el Bacilo de Calmette Guérin (BCG), cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, utilizado ampliamente como vacuna antituberculosa en todo el mundo (Altet G.M. 2003), mostrando un buen perfil de seguridad y estabilidad en los millones de dosis aplicadas desde el año 1948.

Esta vacuna se ha utilizado sobre todo para proteger a la población infantil de los países en desarrollo, contra la tuberculosis pulmonar (Sterne 1998), proporcionando con una sola dosis, protección de hasta 10 años.

Además BCG, es un germen cuya producción, procesamiento y almacenamiento resulta barato, es un buen adyuvante, y si se requiere puede administrarse por la vía oral induciendo inmunidad celular y humoral a nivel sistémico y local. Esta respuesta es de larga duración gracias a prolongada ubicación intracelular, por lo que sería un vector atractivo para su uso, en el diseño y construcción de vacunas preventivas frente al VIH, representando con esto una prometedora línea de investigación en el campo de vacunas recombinantes y en especial contra esta infección.

I-1.2 ESTRUCTURA Y CICLO VITAL DEL VIH

Este virus está representado por una partícula esférica de entre 80-100 nm, su estructura más externa es la envoltura lipoprotéica, derivada de la célula huésped en la que se encuentran insertas las glicoproteínas ó espículas además de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y II, también originados en las células afectadas, posteriormente encontramos la cápside proteica icosaédrica, que rodea y protege a las enzimas y el genoma constituido por 2 hebras sencillas de RNA idénticas con polaridad positiva y 9,6 kilo bases de longitud (entre 7000 y 12000 nucleótidos), figura 1.

Taxonomía:

Familia: Retroviridae

Género: Lentivirus

Especie: VIH tipos: 1 y 2

Grupos de VIH-1: M, O y N

Subtipos del VIH-1: 11 de la A-K

INTRODUCCIÓN

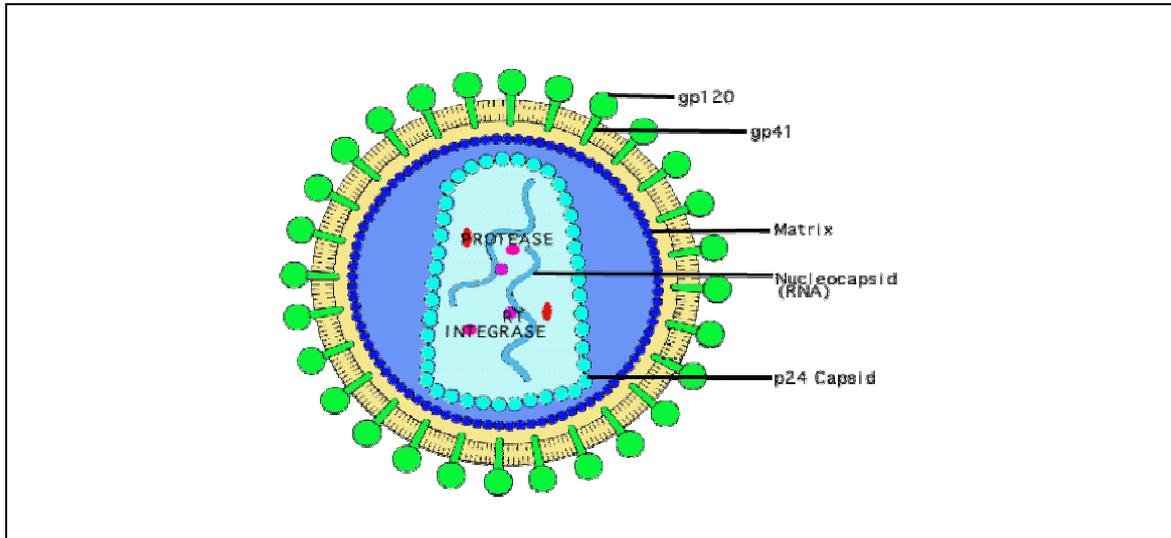


Figura 1. Estructuras del Virus de la inmunodeficiencia humana (WWW.Biology.kenyon.edu/Scienceprojects)

Desde el punto de vista genético el VIH se considera un Retrovirus complejo, pues además de los 3 genes indispensables (gag, pol y env), contiene genes que codifican para proteínas reguladoras (tat y rev), su característica diferencial es la presencia de la enzima ADN polimerasa dependiente de ARN, denominada retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. **Figura 2.** Genoma del VIH

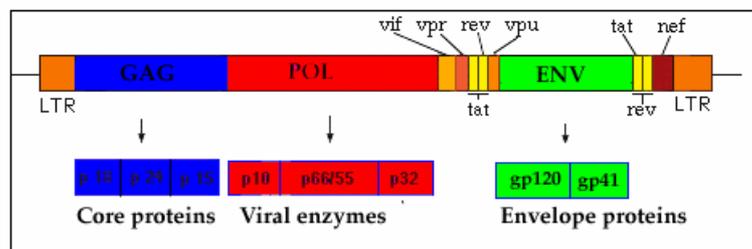


Figura 2. Genoma del VIH

Ciclo de replicación

1. **Unión e ingreso en la célula blanco:** El VIH tiene en la superficie una proteína que se glicosila y denominada gp160, cuya escisión origina a la gp 120 y gp 41, la primera interacciona con los receptores CD4 de

INTRODUCCIÓN

linfocitos T y células de estirpe monocitomacrofágico, esto cambia la conformación de la gp 120, que le permite exponer momentáneamente el dominio V3 para interactuar a su vez con los correceptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4, de las mismas células culminando con la fusión del VIH y su internalización a los linfocitos CD4 (figura 3).

2. **Transcripción inversa e integración:** El VIH en el interior celular, replica su genoma de ARN, gracias a la RT en forma de ADN que posteriormente es integrado en los cromosomas linfocitarios por acción de la integrasa, quedando en estado de latencia (provirus), posiblemente un 1% de los linfocitos infectados exprese ARN viral, requiriendo para ello la activación celular por antígenos, citocinas y mitógenos, además de factores de transcripción de dichas células como NFkB, Sp1 y TFIID.
3. **Expresión genética temprana y tardía:** Se realiza por la transcripción temprana de los genes reguladores, tat, rev y nef que se encargan de acondicionar el interior celular para una óptima replicación viral, por su parte la transcripción tardía incluye a las proteínas estructurales y enzimáticas codificadas por los genes gag, pol y env en conjunto a los genes accesorios vif, vpr y vpu (Mims C. 2004, Letvin N.3 2003, Stevenson M. 2003)
4. **División de la poliproteína viral:** En proteínas más pequeñas y funcionales (estructurales y enzimáticas), por acción de la proteasa, favoreciendo la maduración del VIH.
5. **Ensamble de viriones y salida:** Las proteínas p24 del gen gag se unen formando el cápside al que se agrega el complejo formado por las cadenas de ARN, la proteína p17, también del gen gag y las del gen pol (denominado ribonucleoproteína), posteriormente se desplaza a la membrana celular para adquirir la envoltura lipídica con la glicoproteínas insertadas que le rodean al salir maduro y con capacidad infecciosa, esto favorecido por la proteína del gen vif y la p16 del gen vpu que además afecta la síntesis de CD4 (Mims C. 2004).

INTRODUCCIÓN

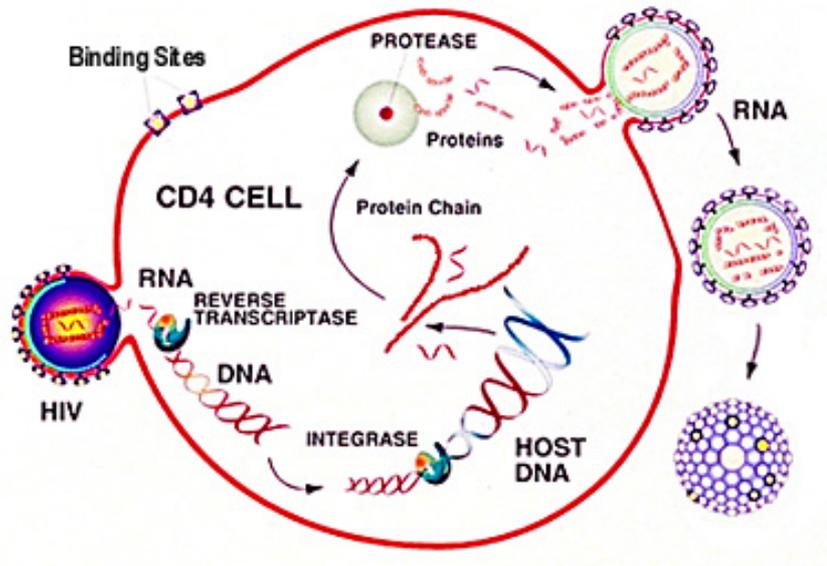


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH

I-1.3 RESPUESTA INMUNITARIA E INFECCIÓN POR EL VIH

El sistema inmune representa en conjunto los mecanismos de defensa de los organismos vertebrados, lo que les permite hacer frente a la agresión de diferentes agentes, físicos, químicos y biológicos, que determina en su momento la evolución de una infección y su posible progresión a la enfermedad, dependiendo básicamente del tipo de interrelación que se da entre el hospedador y agresor (Mims 2004, Letvin N.3 2003, Stevenson M. 2003). La respuesta inmune, es generada por una gran variedad de células y moléculas capaces de distinguir entre lo propio y lo extraño, dichas células y moléculas interactúan conjuntamente en una red dinámica y adaptable a las condiciones de cada tipo de relación hospedero-agresor.

Nuestro sistema inmunológico tiene dos grandes rutas de defensa, la inmunidad innata y la adquirida (tabla 1). La inmunidad innata representa la primera línea de defensa, contra los diferentes agentes infecciosos y su agresión, hecho que ha sido poco valorado y estudiado para el VIH-SIDA (Levy

INTRODUCCIÓN

J.A. 1 2001, Siegal F.P.1 2001). Los virus por su carácter intracelular y en especial el VIH, causante del SIDA que tiene además una gran capacidad replicativa, de mutación, latencia y sobre todo por afectar directamente a las células del sistema inmune (CD4); evadiendo incluso las defensas antivirales. Logra disminuir y finalmente suprimir a la misma. Los virus por sus características biológicas, estimulan las respuestas inmunes celular y humoral, que por lo general logran controlar su acción patógena, evitando así la enfermedad (McMichael A.2 2003). El VIH origina una infección persistente y finalmente progresiva en la mayoría de los casos, la influencia del grado de respuesta inmune durante la infección aguda de cada persona y su progresión a SIDA, sigue siendo sujeto de estudio y discusión (Levy J.A. 2 1998).

El inicio de una respuesta inmune, es el reconocimiento del patógeno, gracias a la habilidad que tiene el sistema inmune para detectar diferencias químicas mínimas, con otros microorganismos y discriminarlas al mismo tiempo con lo propio. Involucrando con ello una gran variedad de células y moléculas y en consecuencia montar una respuesta particular para cada caso

El VIH origina una infección persistente y finalmente progresiva en la mayoría de los casos, la influencia del grado de respuesta inmune durante la infección aguda de cada persona y su progresión a SIDA, sigue siendo sujeto de estudio y discusión (Levy J.A. 2 1998). El inicio de una respuesta inmune, es el reconocimiento del patógeno, gracias a la habilidad que tiene el sistema inmune para detectar diferencias químicas mínimas, con otros microorganismos y discriminarlas al mismo tiempo con lo propio. Involucrando con ello una gran variedad de células y moléculas y en consecuencia montar una respuesta particular para cada caso. Lo que se denomina función efectora, que tiene el objetivo de neutralizar o eliminar al germen agresor. Esta respuesta será más rápida y eficiente en posteriores exposiciones al mismo microorganismo. Esto se denomina memoria inmunológica, característica exclusiva de la inmunidad adquirida, que determinara en el futuro la menor o mayor susceptibilidad de cada individuo frente a un mismo agente agresor.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Componentes de la Inmunidad innata y adquirida*

A. Sistema Inmune Innato	B. Sistema Inmune Adquirido
Células Dendríticas Macrófagos Neutrófilos Células NK Células Dendríticas Plasmacitoides (PDCs) Células CD8, no citotóxicas B-1 células Factores solubles Citocinas (ejemplo:interferones) Quimiocinas Defensinas Complemento Proteínas unidas a lectina (colectinas) Fiebre (fase aguda)	Células Dendríticas Macrófagos Linfocitos B Linfocitos CD4+ Linfocitos CD8+ (citotóxicas) Factores solubles Anticuerpos Citocinas (IL-12)

* Levy J.A. Protection from HIV/AIDS: the important of innate immunity. Clinical Immunology 108: 167-74 2003

Sistema de Inmunidad Innata

Este sistema es el primero (minutos a días) en hacer frente a la entrada de los microorganismos y el daño que esto puede representar, para el tejido afectado y gracias a los componentes de la superficie microbiana, y su interacción con los receptores de las células inmunitarias, de lo que depende además en el futuro la respuesta adaptativa (días a semanas), (Medzhitov R. 2000), por ejemplo las lectinas unidas a manosa (MBLs = mannose-binding lectins), que

INTRODUCCIÓN

son componentes solubles de este sistema innato con actividad anti VIH, al que lisan directamente en presencia de complemento (Spear G. 1993, Ezekowitz A. 1989, Saifuddin M. 2000) o facilitan su fagocitosis por los macrófagos. También bajos niveles de MBLs y polimorfismos del promotor del mismo, se han asociado con incremento de la infección por VIH y rápida progresión a SIDA (Pastinen T 1998, Boniotto M. 2000).

Otro importante factor soluble del plasma, que interactúa directamente con el virus es el complemento, que lisando viriones libres representa un mecanismo rápido contra la infección por VIH (Sullivan B. 1996).

Una importante función de la inmunidad innata, son las vías de señalización intracelular que se activan por el reconocimiento de receptores de superficie de las denominadas células presentadoras de antígenos (APC=células dendríticas y macrófagos), estos TLR (toll-like receptors), interactúan de forma específica con ligandos (Barton G. 2003, Pasare C. 2004) que desencadenan una serie de procesos, que enlazan la inmunidad innata con la adquirida, de efectos inmunológicos muy importantes, para nuestro sistema de defensa, como la activación del NFkB y la producción de citocinas

Factores Solubles Innatos

Citocinas

Grupo de proteínas de bajo peso molecular (menos de 30 kDa), producidas por diferentes células del sistema inmune pero principalmente por macrófagos, linfocitos T (Th) y células NK. Estas sustancias que funcionan como intercomunicadores entre las diferentes células del sistema inmune y sobre la misma célula que le produce, de cuya interacción depende la eficiencia de la respuesta inmune antimicrobiana (Bogdan C. 2000, Brinkmann V. 1993).

Entre sus funciones destaca la regulación del desarrollo de células efectoras (controlando su activación, diferenciación y proliferación), directamente relacionado con el incremento de la inmunidad adaptativa, vía aumento de la expresión MHC en células blanco y mejor función de células presentadoras de antígenos (Pastinen T. 1998, Brinkmann V. 1993, Hiroishi K. 2000), de lo que

INTRODUCCIÓN

depende la intensidad y duración de la respuesta inmune, algunas citocinas son por si mismas efectoras directas (Pastinen T. 1998). Dentro de este conjunto de sustancias, se agrupan: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral. Algunos autores consideran a las citocinas como inmunohormonas que ejercen su acción induciendo efectos muy variables en la respuesta inmune por ejemplo:

1. Activación de los mecanismos de inmunidad natural: macrófagos, otros fagocitos, células NK y eosinófilos.
2. Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos
3. Intervención en la repuesta celular específica.
4. Intervención en la reacción de inflamación aguda y crónica.
5. Control de los procesos hematopoyéticos de la medula ósea.
6. Reparación tisular.

Particularmente importante en infectados por el VIH, es la interleucina IL-2, pues su producción por células CD4+, después de interactuar con los antígenos virales, permite la unión de esta molécula con sus receptores en linfocitos CD8, linfocitos B, células NK, monocitos y en los propios CD4 incrementando de esta manera su proliferación (Wordaz D. 2001) y maduración, efecto importante sobre todo para los CD8+ (citotóxicos) por su papel regulador en la viremia de los infectados.

Estas proteínas regulan también la producción de anticuerpos y algunas citocinas, determinan el predominio de respuesta inmune adquirida Th1 o Th2, y ambas poblaciones linfocitarias están sujetas a finos controles cruzados.

Células Th1: Producen IL-2, IFN- γ y TNF- β . Son responsables de la función de inmunidad celular, destinadas a responder a parásitos intracelulares (virus, protozoos y algunas bacterias).

Células Th2: Producen IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13. Actúan en la activación de células B frente a la acción de bacterias intracelulares y helmintos. Están además implicadas en reacciones alérgicas, ya que IL-4 activa la producción de IgE y la IL-5 activa eosinófilos.

INTRODUCCIÓN

La regulación cruzada entre la respuesta Th1 y Th2 esta asociada principalmente al IFN- γ secretado por las Th1 que inhibe la proliferación de las Th2, que por su lado produce IL-10 que inhibe la secreción de IL-2 e IFN- γ , recientemente se describió que los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno producen también citocinas como la IL-12 que induce la proliferación de células

NK y Th1, que aumentan a su vez la producción de IFN- γ que favorece la activación de los macrófagos cerrando así el circuito de retroregulación positiva entre macrófagos y Th1, para potenciar la rama celular de la inmunidad.

Quimiocinas

Por lo menos se conocen 30 proteínas diferentes, que constituyen esta familia de mediadores inmunológicos, divididas en 4 grupos C, CC, CXC y CX3C, estos factores solubles de bajo peso molecular tienen como función principal la de ser mediadores inflamatorios involucrados en los procesos de migración y activación leucocitaria, sus productores más importantes están representados por los monocitos, polimorfonucleares y linfocitos CD4 y CD8. Las quimiocinas interaccionan con diferentes receptores celulares localizados en la membrana celular para efectuar sus funciones, los cuales actúan también como correceptores del VIH (Cochi F. 1995, Mackewicz C.1, 1996, Samson M. 1996, Liu R.1996), CCR5 y CXCR4, determinando el tropismo de las cepas de VIH. Este fenómeno también se ha estudiado con fines médicos para tratar de evitar la infección por el virus bloqueando los correceptores con sus respectivas quimiocinas, (tabla 2, figuras 4 y 5).

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Correceptores del VIH y quimiocinas ligantes

Virus	Correceptor	Quimiocina	Sincitios
Cepa	Tropismo		
X4	CXCR4	Sdf-1 α y β	Si
R5	CCR5	RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β .	No
R5X4	DUAL		

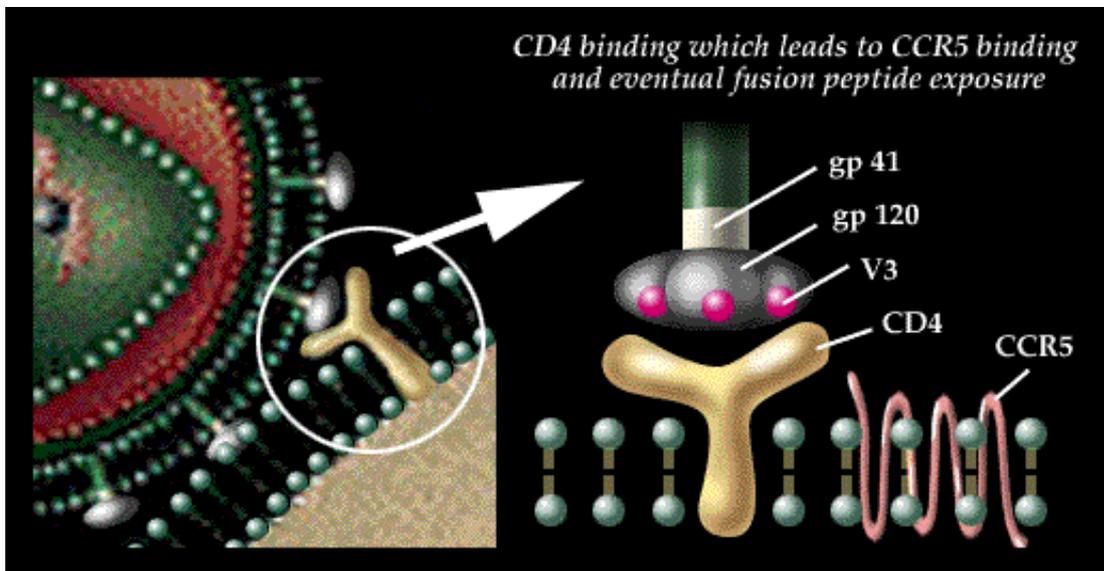


Figura 4. Interacción de la gp 120 de cepas de VIH macrofagotrópicas con el receptor CD4 y correceptor CCR5 que expresan macrófagos y linfocitos T (WWW.Biology.Kenyon.edu/Scienceprojects)

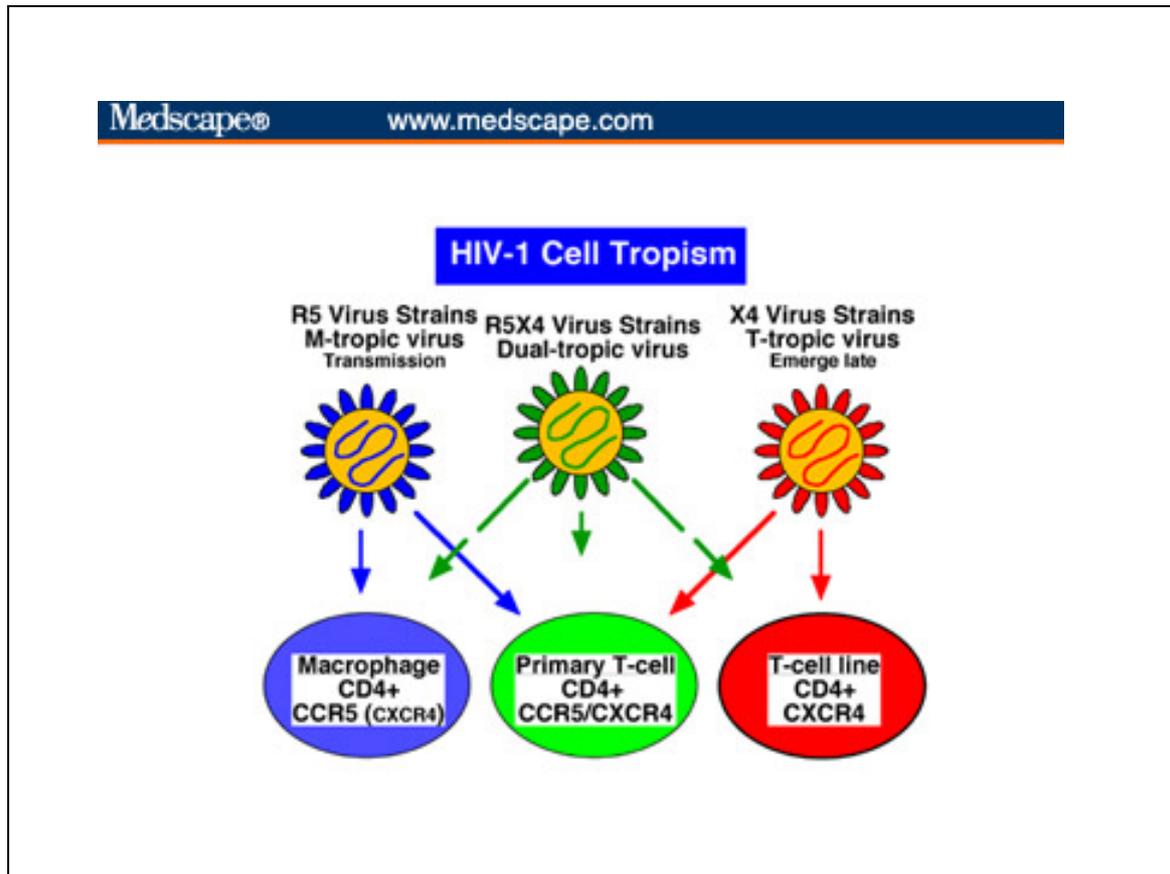


Figura 5. Cepas del VIH en base a su tropismo por receptores y correceptores.

Las quimiocinas que se unen a los correceptores CCR5 y CXCR4, RANTES y SDF respectivamente son capaces de inhibir la infección por el VIH, al competir por los receptores celulares mencionados, representando un importante mecanismo antiviral in vivo. La caracterización de esta propiedad ha permitido definir una serie de variantes genéticas que se asocian con resistencia a la infección o con progresión lenta de la enfermedad (Cochi F.1 1995, Mackewicz C.1 1996, Samson M. 1996, Liu R. 1996).

Interferones

Factores celulares de estructura glicoproteica e inducibles, con efecto inmunomodulador, antiviral y antiproliferativo, cuya producción se asocia a células nucleadas principalmente linfocitos B y NK, para IFN- α y fibroblastos, células epiteliales y macrófagos para IFN- β , siendo los linfocitos T los macrófagos y las células NK los productores de IFN- γ .

INTRODUCCIÓN

Estas glucoproteínas se clasifican actualmente en tres grupos principales:

A. IFN-tipo 1, formado por el IFN- α , IFN- β , por su receptor que es estructuralmente diferente al del IFN- γ .

B. IFN-tipo 2, formado solo por el IFN- γ ., agrupación que obedece además de los receptores celulares para cada uno, a las células que los producen.

Los interferones son producidos por las ahora denominadas: células dendríticas plasmacitoides (PDCs), antes células productoras de interferón (IPCs), el papel del IFN-1 en la infección por el VIH fue descrito por varios autores (Lopez C. 1983, Siegal F.1 2001, 2 1986 y 3 1999), demostrando que su inducción en infectados, disminuía notablemente el riesgo de infecciones oportunistas, prolongando así su supervivencia. Estas células en condiciones normales producen de 200 a 1000 veces más IFN que otras células en respuesta a la infección microbiana (Siegal F.3 1999). Las PDCs, purificadas in vitro, pueden ser infectadas por aislados de VIH cepas NSI y cepas SI, esto con baja producción de virus. La presencia de CD4+ en el cultivo, puede incrementar la susceptibilidad a la infección, pero las células infectadas con VIH pueden estimular la producción de IFN por las PDCs, inhibiendo la replicación del virus en las células infectadas, proceso que inicialmente se efectúa en los nódulos linfáticos (Soumelis V.1 2001,2 2002).

Transmisión del VIH y fases iniciales de la infección

A nivel mundial, la más común de transmisión del VIH es la vía sexual. La probabilidad de transmisión en un único encuentro sexual es muy baja (0.001%) y está relacionada proporcionalmente con el valor de carga viral en plasma, siendo infrecuente cuando los valores son inferiores a 1.500 copias/ml (11). Otros factores implicados en el riesgo de transmisión son la ausencia de circuncisión, la presencia de inflamación del epitelio vaginal (enfermedades de transmisión sexual, uso de nonoxynol-9, vaginosis bacteriana) y la ectopia cervical (Aubert B. 2001, Msuya S.E. 2002, Martin 1999).

El virus que se transmite en la IAVIH generalmente corresponde a las poblaciones macrófago-trópicas. Estas cepas requieren para la infección de los linfocitos CD4 de la presencia del correceptor CCR5 por lo que se denominan cepas R5 o también cepas no productoras de sincitio.

INTRODUCCIÓN

En contraposición las cepas que aparecen en estadios avanzados de la infección requieren la expresión del cofactor CXCR4 por lo que se denominan cepas X4, linfo-tròpicas o productoras de sincitio (Dragic T. 2001). El virus atraviesa el epitelio dañado e infecta a las células de Langerhans y las células dendríticas que se encuentran en el epitelio estratificado de la mucosa y submucosa vaginal respectivamente.

Estas células son células presentadoras de antígeno y expresan en su superficie DC-SIGN, una lectina a la que se adhiere el virus y que es responsable de que el VIH sea transportado al tejido linfático por la migración de las células presentadoras de antígeno. Por otra parte, estas células y los linfocitos CD4 expresan CCR5 pero no CXCR4, ya que la elevada presencia de la quimiocina SDF-1, ligando natural del CXCR4, en las mucosas y tejido linfático que hace que este correceptor esté regulado negativamente y no se exprese, lo que explica la elevada susceptibilidad a la infección por cepas R5 en la IAVIH.

Experimentos realizados en animales demuestran que la infección de estas células ya es evidente a las 24-72 horas de la infección (Hu J. 2000). En las 24-48 horas siguientes las células dendríticas infectadas migran a los ganglios linfáticos regionales donde en los centros germinales activan e infectan a gran cantidad de linfocitos CD4, amplificando en forma explosiva la infección y producción viral. La carga viral se expande de forma exponencial, duplicándose cada 0'3 días durante las primeras 2-3 semanas de la infección, alcanzándose el pico más elevado en plasma, secreciones genitales y otros compartimentos a las 4 semanas de la infección (13). Por tanto, en menos de una semana el virus se disemina por vía hematògena a todo el organismo (ganglios linfáticos, sistema nervioso central, sistema digestivo, gónadas) de forma que cuando el paciente presenta síntomas, el virus ya está en todos los órganos y el reservorio viral ya se ha establecido (Zhang Z. 1999). En esos momentos es cuando se está iniciando la respuesta inmune adaptativa o celular que tratará de contener la infección. El reservorio viral es el responsable de que este virus no se pueda erradicar.

INTRODUCCIÓN

Dinámica viral y celular

Los linfocitos CD4 activados son la principal diana del VIH, a la vez que constituyen su principal fuente de producción. Cada día se generan entre 10^9 y 10^{10} partículas virales con una vida media de 6 horas, que son las responsables de continuar el ciclo de infección de nuevos linfocitos. El balance entre la producción y muerte de estas células da como resultado el recuento de CD4 en estos pacientes (Ho D.D. 1995). Cada célula infectada produce 20 células hijas durante su ciclo vital, que es inferior a 24 horas, por lo que cada día mueren entre 10 y 100 millones de linfocitos CD4. Este estado de inmunosupresión y recambio celular muy importante en la IAVIH (Gascon R.L. 2002).

La disminución de los linfocitos CD4 se produce por diversos mecanismos entre los que se incluyen un efecto citopático directo, la apoptosis inducida por proteínas virales (gp120, gp41), la lisis mediada por mecanismos inmunes por respuesta celular específica (respuesta CTL) o inespecífica (células NK), por anticuerpos, por el bloqueo de su producción a nivel tímico o por su redistribución con un "atrapamiento" a nivel linfático. La pérdida de la capacidad del organismo de mantener la cifra de linfocitos CD4 (figura 6) dentro de los valores normales es la responsable de la inmunosupresión celular que permite la desarrollo de infecciones oportunistas y tumores y la manifestación del SIDA (Stevenson M. 2003).

Respuesta inmunológica al VIH

Respuesta humoral: anticuerpos

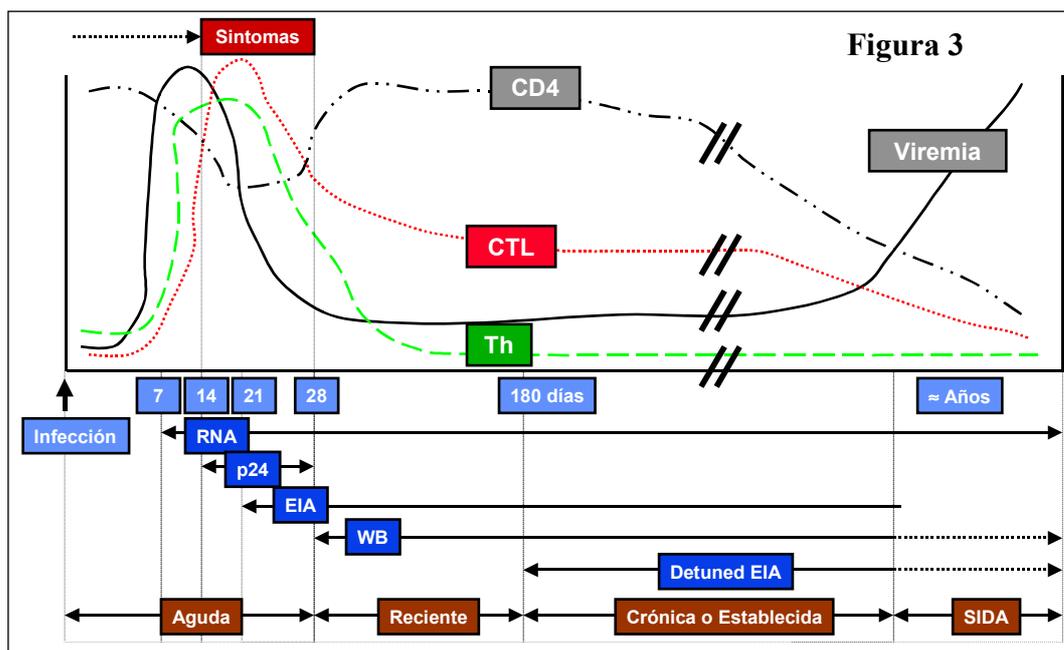
Los anticuerpos se detectan en la sangre a las cuatro semanas de la infección. Sin embargo, la mayoría de estos anticuerpos tienen escasa capacidad neutralizante y solo serán útiles para el diagnóstico serológico. Los anticuerpos neutralizantes suelen detectarse a partir de las 8 semanas de la infección, una vez ya ha pasado el pico de viremia (13), y aunque inicialmente ejercen una importante presión inmunológica frente al VIH esta no es duradera dada la aparición de escape virológico y la diversidad viral. Estudios en monos infectados por el SIV a los que se les deplecionó de linfocitos B (productores de células plasmáticas y anticuerpos), demostraron que el descenso del pico

INTRODUCCIÓN

inicial de carga viral es previo a la aparición de anticuerpos neutralizantes (Schmitz J.E. 2003) y la infusión de gamaglobulina hiperinmune antiVIH a pacientes infectados no ha demostrado tener un efecto beneficioso sostenido en la progresión de la enfermedad (Vittecoq D. 1995).

Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la administración de anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), administrados a macacos son capaces de evitar la infección y de disminuir la progresión de aquellos animales que se infectan tras la inoculación (Mascota J.R. 2000, Nishimura Y. 2003) lo que ha abierto nuevamente el debate y la investigación en esta área.

Figura No.6 Grafica evolución clínica del SIDA



Respuesta celular

La respuesta celular frente al VIH esta formada por la respuesta específica colaboradora por linfocitos T CD4 (necesaria tanto para una adecuada respuesta humoral como citotóxica específica), linfocitos T CD8 citotóxicos (células CTL) y células NK. Este tipo de respuesta es más precoz e importante

INTRODUCCIÓN

que la respuesta humoral en el control de la replicación viral, y su aparición se ha correlacionado con la disminución del pico inicial de carga viral durante la IAVIH (Letvin N. 2003). La respuesta citotóxica (CTL) ha sido la más extensamente estudiada y se ha relacionado desde hace tiempo en el control de la replicación viral. Esta afirmación surgió inicialmente de trabajos *in vitro* donde se demostró que los linfocitos CD8 específicos anti-VIH producen factores solubles que inhiben la replicación viral (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CAF) y lisan (granzimas, perforinas) las células infectadas (Cocchi F. 1995,2. 2000, Zhang L. 2002). Estudios con monos infectados con SIV demostraron que la depleción de CD8 impide a los animales controlar el pico inicial de viremia, acelerando la progresión a SIDA (Schmitz J.E. 2003) y que la estimulación de estas respuestas por vacunas logra disminuir la carga viral y retardar la enfermedad (Barouch D.H. 2000). Niveles altos de este tipo de respuesta se han observado en los pacientes que no progresan a largo plazo (LTNP), (Ortiz G.M. 1999). El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) codifica las moléculas HLA que se expresan en las células presentadoras de antígeno y que se unen a fragmentos de proteínas virales para presentarlas a las células efectoras a través de los cañones HLA-1 (CTL entre otras células) y HLA-2 (solo los linfocitos CD4) con el fin de iniciar la respuesta inmune. Se han identificado determinados alelos específicos que codifican moléculas HLA tipo 1 y que son predictores de un mejor control del virus (HLA-A2, HLA-B27, HLA-B57), (Liu C. 2003), mientras que otros se han asociado con un peor pronóstico (HLA-B35P), (Gao X. 2001).

Hasta un 85% de los pacientes no progresores a largo plazo (pacientes que mantienen viremias bajas y estabilidad clínica durante varios años) o LTNP presentan el HLA B57 (Migueles S.A. 2000). Sin embargo, durante la evolución de la infección la mayoría de los pacientes pierden el control de la replicación viral debido al escape inmune que la presión selectiva del sistema inmunitario provoca en el virus en fase de replicación, lo que le permite seleccionar mutaciones que le garanticen una mejor supervivencia. Se ha documentado escape viral tanto con la respuesta humoral (evasión viral a los anticuerpos

INTRODUCCIÓN

neutralizantes) como con la respuesta celular (escape al daño citotóxico de células infectadas), (Goulder P.J. 2001, Parren P.W. 1999).

La respuesta proliferativa específica mediada por los linfocitos CD4 es básica para organizar toda la respuesta patógeno-específica en el organismo. La respuesta proliferativa es crucial para mantener la respuesta citotóxica (CTL) adecuada (13). Sin embargo, estas células son la diana de la infección por el VIH y durante la IAVIH se origina una activación generalizada de las mismas, incluyendo los linfocitos CD4 específicos frente al VIH, con su posterior destrucción.

Reservorio

La latencia celular (provirus integrado sin una replicación activa) es una característica de todos los retrovirus. En el VIH esta latencia se puede establecer en varios estadios, tanto antes como después de la integración en la célula infectada. Inicialmente se consideró a las células CD4 en reposo infectadas como el principal reservorio. Estas células, en pacientes en TARV y con la replicación suprimida, se estiman en 1-100 millones de células (1% de los linfocitos CD4) que pueden ser activadas dando lugar a la producción de virus que conservan su capacidad infectiva como lo demuestran estudios in vitro (Wong J.K. 1997).

Los linfocitos CD4 junto con los macrófagos y células de otros tejidos forman el reservorio viral, que es el principal obstáculo para la erradicación del virus con TARV (Pomerantz R.J. 2002).

Manifestaciones clínicas

En 1985 Cooper et al publicaron la primera descripción de los síntomas atribuibles a la IAVIH en 12 pacientes homosexuales que presentaron un cuadro compatible con una “mononucleosis infecciosa” (fiebre, faringitis y rash) con serología negativa para el Virus Epstein Barr y en los que se confirmó la infección por VIH (Cooper D.A. 1985). Desde entonces este síndrome se conoce como “síndrome retroviral agudo”, “síndrome de seroconversión aguda”, “primoinfección por el VIH” o “infección aguda por el VIH (IAVIH)”.

El periodo de incubación de la infección por el VIH varía entre una y tres semanas (típicamente 14 días) y la duración del periodo sintomático es de 7-10

INTRODUCCIÓN

días, raramente más de 2 semanas. En diferentes estudios, la prevalencia de síntomas durante la IAVIH varía entre un 40% y 90%. En estudios prospectivos de pacientes expuestos con grupo control (por ejemplo, pacientes atendidos en centros de atención de enfermedades de transmisión sexual) la presencia de síntomas analizados en forma individual en el grupo de pacientes infectados fluctúa entre el 53% y 88%, pero hasta un 50% de los pacientes sin infección reportan los síntomas similares, lo que demuestra su inespecificidad. Algunos estudios han observado que los síntomas de la IAVIH son menos frecuentes en los usuarios a drogas por vía parenteral.

El espectro clínico de la IAVIH varía desde cuadros banales, que se atribuyen a una viriasis inespecífica, hasta cuadros graves con afectación neurológica. Los síntomas más frecuentes incluyen fiebre, rash, úlceras orales y/o genitales, linfadenopatías, astenia marcada, artromialgias y meningitis aséptica (ver **tabla 1**)(12). Cuando se valora la gravedad de los síntomas, menos de la mitad de los pacientes consideran el cuadro suficientemente importante como para consultar a un médico. Algunos pacientes pueden requerir ingreso hospitalario para su valoración, y en general consultan por síntomas neurológicos o un síndrome febril prolongado.

La fiebre es el síntoma más frecuente (80-87% de los casos) y el primero en aparecer en todas las series. La duración es variable y oscila entre 3 días a 3 semanas. La temperatura suele ser muy alta al inicio y se desaparece lentamente, pudiendo persistir con febrícula varios días. Generalmente se asocia a sudoración nocturna y astenia importante, que obliga a un reposo prolongado (Schaker T. 1997).

El rash o exantema suele aparecer en las 24-48 horas posteriores al inicio de la fiebre, con una frecuencia que oscila entre el 21% y el 57% de los casos. Puede ser generalizado o afectar sólo a cara y el tronco, tiene características maculopapular o eritematoso y en ocasiones se presenta como urticaria, descamación de palmas y plantas o alopecia. Se describe con mucha menor frecuencia en razas no caucásicas (Bollinger R.C.1997, Hecht F.M. 2002, Labreys L. 2000).

INTRODUCCIÓN

La afectación faríngea también se presenta con mayor frecuencia en las series de pacientes de raza blanca, en los que aparece hasta en el 60% de casos. Las lesiones más frecuentes son el dolor inespecífico, el edema, el enantema o las ulceraciones. Es poco frecuente el hallazgo de exudado (Tindall B. 1988).

Con menos frecuencia se han reportado linfadenopatías cervicales, axilares, occipitales o generalizadas, que en algunos casos pueden persistir durante varios meses, incluso años posteriores a la seroconversión.

Las manifestaciones gastrointestinales son en su mayoría diarrea, náuseas o vómitos. También se ha reportado dolor abdominal y casos de pancreatitis (Vanhems P. 1999).

Las manifestaciones neurológicas de la IAVIH incluyen la meningitis viral, la meningoencefalitis, la mielitis, la neuropatía periférica, y el síndrome de Guillén Barré. Globalmente estos cuadros representan un 8-12 % de los pacientes y son la causa más frecuente de ingreso hospitalario. Se han documentado casos de depresión, parálisis facial, neuritis óptica, trastornos cognitivos o psicosis aguda (Tindall B. 1988).

Además, algunos pacientes pueden presentar simultáneamente infecciones relacionadas con su conducta de riesgo e incluso infecciones de las categorías B o C del CDC (12). En este sentido hay que descartar en los pacientes que adquirieron la infección por vía sexual otras enfermedades de transmisión sexual (p.ej. sífilis) o en los usuarios de drogas por vía parenteral las infecciones relacionadas con esta práctica (p.ej. endocarditis infecciosa). Con respecto a las infecciones relacionadas con el VIH, en general se tratan de episodios de Herpes simplex o zoster, candidiasis oral o esofágica (Lafeuillade A. 1992, Pena 1991), pero también se han descrito casos de tuberculosis, de toxoplasmosis cerebral (Mateos R.F. 1998), de neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (antes *P. carinii*), (Szabo S. 2002) o criptosporidiosis (Moss P.J. 1995). La mayoría de estos casos se observaron en pacientes con IAVIH que tuvieron una disminución de linfocitos CD4 (Vento S. 1993).

Especificidad de los síntomas

Es muy importante conocer que síntomas son los mejores predictores de una IAVIH en los pacientes expuestos con el fin de sospechar precozmente de esta

INTRODUCCIÓN

infección. En un estudio prospectivo se evaluaron los síntomas que presentaron 258 estudiantes universitarios que consultaron tras una exposición sexual de riesgo, 40 de ellos presentaron una IAVIH confirmada. Analizados en forma individual los síntomas más sensibles fueron la fiebre (80%) y la astenia (68%) mientras que los más específicos fueron la pérdida de peso de 2.5 kg (86%) y la presencia de úlceras orales (85%), pero la sensibilidad de estos dos últimos fue menor al 40%. La asociación de síntomas que fue más específica fue la combinación de “fiebre con exantema” (especificidad, 91%). Sin embargo, fue poco sensible (sensibilidad, 46%), (Hecht F.M. 2002) . En otro estudio realizado en mujeres de Kenia que consultaban por infecciones de transmisión sexual, la presencia de dos o más síntomas o signos (el estudio consideraba fiebre, vómitos, diarrea, astenia, linfadenopatías inguinales y candida vaginal) se correlacionó con la IAVIH con valores similares de sensibilidad (51%) y especificidad (83%), (Labreys L. 2000).

La combinación de síntomas muy frecuentes pero poco específicos y la escasa sensibilidad de los que se relacionan con la IAVIH hace que no pueda formularse una definición de caso con un valor predictivo positivo alto y obliga a mantener un alto nivel de sospecha, especialmente en pacientes seronegativos con una potencial exposición reciente al VIH.

Relación entre síntomas y pronóstico de la enfermedad

Se ha sugerido que la presencia de una IAVIH sintomática, un periodo de incubación corto antes del inicio de los síntomas o una duración larga de la fase sintomática (mayor de 15 días) se correlaciona con una progresión a SIDA más rápida de los pacientes (Vanhems P. 1.2003, 2.2000). La presencia de síntomas está fuertemente ligada al valor de la carga viral en plasma. En un trabajo se pudo comprobar que por cada síntoma que estaba presente (considerando fiebre, vómitos, cefalea, artralgia, mialgias, odinofagia, astenia, rash o astenia) había un aumento de 0.4 log₁₀ de carga viral en plasma.

Por otra parte, un estudio en pacientes no tratados, demostró que la reducción inicial de la viremia y el “set point” resultante fueron factores independientes de progresión a SIDA. Así, la progresión a Sida, fue significativamente más rápida

INTRODUCCIÓN

en los pacientes que tuvieron un aclaramiento inicial lento ($<0.63 \log_{10}/\text{mL}$ o < 4.260 copias/mL por mes) o en los que el nivel de viremia fue más elevado ($>4.4 \log_{10}/\text{mL}$ o > 25.000 copias/mL). Este estudio demuestra que la respuesta inmunológica inicial tiene un papel importante en la historia natural de la infección por VIH y puede permitir identificar potenciales pacientes para recibir TARV.

El nivel de viremia plasmática depende tanto de factores virológicos (capacidad replicativa del virus) como del individuo (capacidad del sistema inmune del individuo de controlar la viremia sin tratamiento). La inmunidad celular de cada individuo esta determinada por la posibilidad de responder a cada antígeno a través del sistema del complejo mayor de histocompatibilidad que codifica las moléculas HLA-1 y algunos alelos específicos HLA se han relacionado con mejor o peor pronóstico tal como se ha explicado previamente.

También durante un episodio de IAVIH se ha podido demostrar que un alelo determinado (HLA-B57) se correlaciona con una menor carga viral, menor frecuencia de síntomas y un mejor pronóstico a largo plazo.

Alteraciones en las pruebas de laboratorio

Las anormalidades más comunes de laboratorio incluyen alteraciones hematológicas y de las pruebas de función hepática. Hasta un 90% de los pacientes presenta alguna alteración de las pruebas hematológicas. La trombocitopenia es característica y se observa hasta en un 45% de los pacientes y se asoció a la presencia de anticuerpos antiplaquetas. La linfopenia es común y en ocasiones se detecta la presencia de linfocitos activados o de monocitosis. Raramente se observa linfocitosis o neutrofilia. Un 20% de los pacientes presentan alteración de las pruebas de función hepáticas, particularmente un aumento de las transaminasas y de la fosfatasa alcalina. En estos casos debe descartarse una coinfección simultánea de virus hepatotropos. Algunos pacientes con síntomas musculares pueden presentar aumento de las CPK y LDH.

INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de los síntomas de la IAVIH se observa un descenso de los linfocitos CD4, que primero es debido a una redistribución hacia el compartimento linfático y posteriormente es consecuencia de su destrucción por apoptosis. De forma paralela se objetiva un aumento de los linfocitos CD8, a expensas del fenotipo memoria, con una inversión del cociente CD4/CD8. Este proceso se acompaña de una activación del sistema inmune con un aumento de la fracción CD8CD38. Otros indicadores de activación del sistema inmune son el aumento de la beta-2 microglobulina, la neopterina y los receptores solubles de IL-2, que se acompañan de un aumento del interferón gamma y de la interleucina-1B y de un descenso de IL-2.

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la IAVIH es amplio y en la mayoría de casos deben descartarse otros procesos infecciosos (12). El cuadro clínico de fiebre asociado a faringitis y adenopatías (clásico de la mononucleosis infecciosa) se observa solamente en el 15% de los pacientes con IAVIH por lo que la sospecha no debe limitarse a esta forma de presentación. En estos pacientes, sin embargo, la frecuencia de pruebas falsamente positivas para virus de Epstein Barr es excepcional lo que hace relativamente fácil el diagnóstico diferencial entre ambas. En un estudio efectuado en EEUU en pacientes en los que se sospechó una mononucleosis infecciosa por el VEB y las pruebas son negativas, la prevalencia de IAVIH fue de alrededor del 1% (13).

Otras infecciones que deben incluirse en el diagnóstico diferencial son enfermedades de transmisión sexual como la sífilis (en etapa de secundarismo) o la gonococia, las infecciones por citomegalovirus o los virus de la gripe, herpesvirus tipo 6, rubéola o parvovirus B19, la toxoplasmosis, las hepatitis virales en la fase anictérica, la faringitis estreptocócica, las borreliosis y algunas rickettsiosis. En ocasiones una toxicodermia en el contexto del tratamiento antibiótico de otro proceso puede simular una IAVIH. Ante estos casos el médico siempre debería interrogar si el paciente ha tenido algún episodio de exposición sexual en el último mes, sobre todo con parejas ocasionales y sin protección. En Africa, donde la prevalencia de la infección

INTRODUCCIÓN

por VIH es muy elevada, en estudios en pacientes con ETS, la prevalencia de IAVIH osciló entre 1'2 y 2'5% (13).

I-1.4 PACIENTES EXPUESTOS AL VIH Y NO INFECTADOS (ENI)

Los reportes emanados de la evaluación médico biológica de diferentes grupos denominados actualmente como expuestos no infectados representados por: trabajadoras sexuales de Kenia y Gambia, hijos de madres seropositivas al VIH, parejas discordantes (oar.od.nih.gov, Kaul R.1 2000, Rowland –Jones S.2 1995), personal médico-hospitalario y otros pequeños grupos de personas expuestas repetidas ocasiones al virus, que presentan resistencia a la infección por este virus, ha proporcionado valiosa información sobre los posibles mecanismos y factores que implican una menor susceptibilidad a la infección por el VIH en condiciones naturales, que además orientan el trabajo de los diferentes grupos de investigación para diseñar y evaluar nuevos inmunogénos, posibles candidatos a vacunas preventivas contra esta infección. A pesar de que los mecanismos exactos de esta resistencia relativa a la infección por el VIH, son en buena parte desconocidos (Rowland-Jones S. 1 1998, Kaul R.1 2000 y 2 2001, Walter C. 1993), se deduce de la información obtenida del estudio de estos grupos, que se mezclan factores genéticos, inmunológicos y virológicos, por lo que la eficiente y puntual combinación de respuesta inmune innata y específica adaptativa, de las líneas celular y humoral, logran evitar la infección (tabla 4), efecto deseable en los candidatos a vacunas preventivas, resaltándose el hecho de que la presencia de anticuerpos inducidos se mantenga en suficiente cantidad antes y después de la exposición, para lograr proteger contra la infección al mayor número posible de personas con prácticas de riesgo (Parren P. 2000, Burton D.3 2000). Respecto al virus es importante destacar varias de sus propiedades, que han de considerarse para el desarrollo de una posible vacuna, por ejemplo el hecho de que las proteínas de la envoltura sean poco inmunogénicas y de que se presenten en varias isoformas (Parren P. 2000, Burton D.3 2000). Además debido a que existen al menos 9 subtipos en el grupo M o principal del VIH-1 y

INTRODUCCIÓN

sus formas recombinantes. El VIH induce anticuerpos neutralizantes, que no tienen reactividad cruzada entre el aislado y otras cepas heterólogas.

Por otra parte los cambios conformacionales que sufren las glicoproteínas virales gp41 y gp120, durante el proceso de interacción con los receptores CD4, hacen que potenciales épitopos, sean inaccesibles aunado a el hecho de que las mismas se encuentran glicosilados (Botarelli P. 1991), limitan el reconocimiento antigénico por los linfocitos T, por lo que a pesar de la producción de anticuerpos contra la envoltura, estos no logran neutralizar a los viriones infectivos. Estos viriones pueden modificar estructuralmente a la gp 120 en cada generación, surgiendo cepas que escapan a la acción neutralizante de los anticuerpos producidos (Mo H. 1997). Los sitios conservados de la gp 120, conocidos como correceptores CCR5/CXCR4, son vitales para la unión virus-CD4, por lo que su posible bloqueo con anticuerpos específicos supondría una eficiente neutralización viral y por tanto disminuiría la capacidad infecciosa del mismo. Sin embargo trabajos de investigación al respecto no muestran esos posibles beneficios preventivos o terapéuticos contra el VIH (Pincus S. 1997), lo que afecta las expectativas de una posible vacuna basada en proteínas recombinantes de la envoltura y su eficacia variable en dependencia de la presentación del inmunógeno (vectores vivos o DNA). Existen estudios que confirman que la transferencia pasiva de anticuerpos de donadores infectados sanos, puede tener efectos positivos sobre la carga viral, de los individuos infectados vacunados, pero la vida media de estas inmunoglobulinas en los receptores, es solo de 13-16 días (Stiehm E.1999).

Durante la infección aguda la fuerte y específica respuesta de células T CD8, logran controlar la viremia (Schmittz J. 1999), gracias a una eficiente presentación y reconocimiento de regiones conservadas de las proteínas internas del VIH por HLA clase I, en la superficie de las células infectadas, que culmina con la lisis de estas, por la acción conjunta de perforinas y granzimas (Williams N. 1997), los mecanismos de este efecto continúan en estudio.

Existen haplotipos de HLA que influyen en la evolución de la infección por VIH y su progresión a SIDA (Walker B.D. 2001), pues su menor(HLA-B35 y CW*04)

INTRODUCCIÓN

o mayor (HLA-B27 y HLA-B57) avidéz, para presentar los antígenos virales, determina el grado de respuesta de las células T CD8 y por tanto su mayor o menor progresión a SIDA, (Kaslow R. 1996, Carrington M. 1999). Es también importante resaltar que los linfocitos T citotóxicos o CTLs, específicos para el VIH, son productores de algunas citocinas y quimiocinas que participan activamente en el control de la actividad biológica de los virus (Hadida F. 1999), por ejemplo IFN gamma que inhibe la replicación viral en los inicios de la infección (Meylan P.1993) y MIP-alpha, MIP-beta y RANTES, que regulan y compiten con el virus, por el receptor de quimiocinas CCR5 (Cocchi F.2 2000), un correceptor de CD4+, imprescindible para la entrada del virus en la célula.

Durante la infección aguda hay una gran expansión de la población de células T CD8+ específicas, pero el VIH logra evitar su erradicación, por diferentes mecanismos propuestos que siguen en estudio. Entre las que destacan la aparición de cepas mutantes del VIH que substituyen aminoácidos de los péptido de épitopos importantes y a que las proteínas expresadas por los genes nef, tat y vpu del VIH, afecta la acción del HLA clase I, por lo que dejan de ser reconocidos por las células T (Kelleher A. 2001) dificultando la creación de una vacuna efectiva (Mckeating J. 1989, Puppo F. 1997). De tal manera que es bien conocida la incapacidad de los linfocitos CD8+, para controlar al virus en la fase crónica de la infección, pues son funcionalmente deficientes, debido a la inmadurez fenotípica que disminuye la producción de proteínas útiles en la lisis de células infectadas como la perforina (Williams N. 1997), posiblemente por la propia afección directa de los CD4+ ayudadores por el VIH (McMichael A.3 1998, Day 2003), que en las fases avanzadas de la infección dejan de reconocer antígenos presentados por los macrófagos y consecuentemente no inducen a los CD8+ a mantener su memoria y madurez.

La presencia de virus en tejidos santuarios: (órganos linfoides, sistema nervioso central) y CD4+ infectados, que no expresan proteínas virales, evitando su detección por células T asesinas (Chun T. 1997, Pantaleo G. 1993).

INTRODUCCIÓN

I-1.5 TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.

Introducción

El primer ensayo clínico con un medicamento con actividad antirretroviral (la zidovudina, un nucleósido análogo de la timidina que inhibe la transcriptasa inversa) se completó en 1986 (Fischl M.A. 1987). Se incluyeron pacientes con una infección por el VIH-1 en fase muy avanzada (criterios de SIDA o linfocitos CD4+ < 200/ml) y se demostró una reducción significativa de la mortalidad frente a la rama placebo, lo que obligó a interrumpir el ensayo clínico cuando la duración del seguimiento era de apenas 6 meses. Se había probado un concepto aunque pronto se pondría en evidencia que se trataba de un efecto transitorio. A partir de aquel momento, se han precisado pocos años para que se llegaran a comercializar un total de casi 20 medicamentos con actividad frente al VIH-1. Inhiben la fusión, la proteasa o la transcriptasa inversa del VIH-1. Hay como mínimo otros 5-10 medicamentos de las anteriores familias que se encuentran en fases relativamente avanzadas de investigación clínica (**Tabla 1**). Además, es muy probable que en un plazo relativamente corto de tiempo se logre inhibir la replicación del VIH-1 mediante medicamentos dirigidos a otras dianas como pueden ser los complejos procesos de adherencia viral con las células del hospedador (co-receptores CCR5) o la integración del ADN proviral en el ADN celular (inhibidores de la integrasa), Lalezari J. 1999).

La comercialización en 1996 de los inhibidores de proteasa (IP), que coincidió con un cambio de estrategia que consistió en combinar siempre tres o más medicamentos y con la posibilidad de monitorizar la respuesta terapéutica mediante la medición de la carga viral plasmática (Mellors J.W. 1996), representó una verdadera revolución en el tratamiento antirretroviral que condujo a una reducción muy importante de las complicaciones clínicas (infecciones oportunistas y neoplasias asociadas al SIDA) y a un aumento espectacular de la supervivencia (Palella F.J. 1998). El reverso de la moneda es que con los medicamentos actualmente disponibles y las estrategias terapéuticas que estamos utilizando, la posibilidad de erradicar el VIH-1 parece descartada incluso tras más de 10 años de tratamiento aparentemente muy eficaz (Finzi D. 1999). Por todo ello, hay que plantearse un tratamiento que puede ser complejo, difícil de monitorizar, incómodo y relativamente tóxico prácticamente de por vida. En este contexto, cuestiones como la simplificación de las pautas terapéuticas, la adherencia, las interacciones medicamentosas y la tolerancia a largo plazo han pasado a ocupar un primer plano.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de la infección por el VIH-1 requiere una colaboración decidida y entusiasta por parte de los pacientes y el soporte de un equipo de personal sanitario interdisciplinario. Debe incluir a médicos muy especializados, con capacidad para asimilar una gran cantidad de información que cambia rápidamente y con acceso a laboratorios con posibilidad para medir la carga viral (con métodos ultrasensibles y en compartimentos extraplasmáticos en casos seleccionados), la cifra de linfocitos CD4+ (y otras subpoblaciones linfocitarias y parámetros inmunológicos en casos seleccionados) y de determinar resistencias a los antirretrovirales y medir niveles plasmáticos de medicamentos en subgrupos especiales (Iribarren J.A. 2004).

PRINCIPIOS Y FUNDAMENTOS

El principio fundamental del tratamiento antirretroviral en el año 2005 puede enunciarse como suprimir al máximo y de forma duradera la replicación del VIH-1 con la finalidad de permitir que el sistema inmune, de forma espontánea, no tan sólo no siga deteriorándose sino que se recupere. Con ello, se consigue evitar la progresión clínica (reducción en la incidencia de infecciones oportunistas y neoplasias asociadas al SIDA como los linfomas o el sarcoma de Kaposi) y aumentar la supervivencia (Palella F.J. 1998). Si se consigue suprimir al máximo la replicación viral (alcanzando cargas virales en plasma por debajo de los límites de detección utilizando técnicas ultrasensibles (20-50 copias de ARN del VIH-1/ml plasma) y mantener el tratamiento con buena adherencia, esta situación puede mantenerse más de 5 años (y posiblemente mucho más) sin que se seleccionen resistencias (los virus aislados a partir de células con infección latente y los aislados en plasma si el paciente abandona el tratamiento persisten sensibles) y con escasa evolución genética del virus (García F. 1999). Ello indica la persistencia de sólo un mínimo nivel de replicación residual posiblemente en algún compartimento celular no alcanzado por los medicamentos (Zhang L. 1999).

Mediante esta aproximación terapéutica, el sistema inmunológico se recupera a un ritmo más o menos constante y casi independientemente del grado de deterioro que se hubiera alcanzado, aunque es posible que se alcance una meseta o al menos se enlentezca a partir de los 3 años de tratamiento. Ello incluye la capacidad de respuesta frente a nuevos antígenos y la capacidad de respuesta frente a antígenos con los que ya se había estado en contacto pero que aparentemente se había perdido. Por el contrario, cuando el tratamiento se inicia en pacientes con infección crónica por el VIH-1 (que es lo habitual) raramente se recupera la capacidad de respuesta de los

INTRODUCCIÓN

linfocitos CD4+ frente a los antígenos específicos del VIH-1 (Plana M. 1998), que se perdió rápidamente durante las primeras semanas de la infección) y parece que ello es crucial para regular de forma positiva la respuesta citotóxica específica de los linfocitos CD8+ que en definitiva es la que es capaz de controlar de forma eficiente la replicación de los virus incluyendo el VIH-1.

Los indudables beneficios para el paciente del principio fundamental único y maximalista del tratamiento antirretroviral (suprimir la replicación viral, lo antes posible y durante el mayor tiempo posible) deben balancearse con la repercusión sobre la calidad de vida y sobre todo con la toxicidad a medio y largo plazo (Carr A. 1999).

MEDICAMENTOS DISPONIBLES Y SUS CARACTERÍSTICAS

Los medicamentos que se prevé que estarán comercializados o asequibles a través de medicación extranjera o programas compasivos en España en el año 2005 pueden verse en las **Tabla 1**.

A efectos prácticos, los medicamentos actualmente disponibles bloquean la replicación del VIH-1 inhibiendo la TI o la proteasa viral o impiden la fusión virus-célula. Los inhibidores de la TI desde un punto de vista químico y estructural son análogos de nucleósidos, de nucleótidos o bien tienen una estructura diferente muy variable de un compuesto a otro (englobados estos últimos con el nombre de inhibidores de la TI no nucleósidos). Los IP actualmente disponibles son todos ellos compuestos peptidomiméticos análogos o miméticos del substrato que es la poliproteína sintetizada por el VIH-1 al replicarse. El único inhibidor de la fusión disponible es un polipéptido.

Respecto a los inhibidores de la TI análogos de los nucleósidos (ITIAN) hay 8 disponibles (zidovudina, zalcitabina, didanosina, estavudina, lamivudina, emtricitabina, abacavir y tenofovir). Una combinación de dos ITIAN (generalmente un análogo de la timidina como zidovudina o estavudina más un no análogo de la timidina (didanosina o lamivudina) solían constituir la “espinas dorsal” de muchas de las combinaciones triples (Iribarren J.A. 2004). El abacavir es un análogo de la guanósina, muy potente y con toda probabilidad podía utilizarse con ventaja sustituyendo a cualquiera de los mencionados anteriormente. Sin embargo, la mayoría de datos se han generado en forma de una triple combinación de análogos de nucleósidos junto con AZT y 3TC (Staszewski S. 1999). El tenofovir puede sustituir con algunas ventajas a la estavudina. Hasta hace poco tiempo las combinaciones de dos análogos de los nucleósidos para constituir la «espinas dorsal» de una combinación triple se solían efectuar escogiendo dos fármacos casi al azar. Actualmente el panorama se ha clarifi-

INTRODUCCIÓN

cado y aparte de las limitaciones conocidas (no usar ddC, no combinar d4T + AZT, ni d4T+ ddl sobre todo en mujeres embarazadas) se pueden hacer recomendaciones positivas. El 3TC combinado con AZT o tenofovir serían los preferidos y el 3TC combinado con abacavir, ddl o d4T serían alternativas aceptables. El FTC y el 3TC se pueden utilizar de forma indistinta. La combinación de AZT + ddl sería también aceptable mientras que la combinación de tenofovir con ddl no debe usarse por problemas de eficacia y de toxicidad. Finalmente, las combinaciones triples de análogos de nucleósidos/nucleótidos no deberían utilizarse como tratamiento exclusivo en pautas de inducción (p.e. tratamiento inicial). Las combinaciones de AZT + 3TC + ABC o de ddl + d4T + 3TC tienen una menor eficacia que otras alternativas terapéuticas posiblemente por tener una menor potencia intrínseca, una mayor toxicidad o ambas a la vez y solo deben utilizarse en casos justificados y seleccionados. Las combinaciones que incluyen tenofovir + 3TC + abacavir o ddl tienen una tasa de fracasos virológicos muy elevada de forma rápida y con selección de resistencias al 3TC, al tenofovir y a menudo a ambos.

Respecto a los inhibidores de la TI no análogos de los nucleósidos (ITINN) no había comparaciones directas entre ellos, en estudios randomizados. Con el efavirenz combinado con AZT + 3TC (Staszewski S. 1999) o con d4T + 3TC se han obtenido datos muy favorables al compararlo con lo que podríamos denominar hace años el estándar de oro (AZT + 3TC + Indinavir) incluso en pacientes con carga viral basal muy elevada. Los mejores datos con nevirapina se han obtenido al combinarla con AZT + ddl, con d4T + ddl (Podzamczar D. 2002) o con AZT + 3TC y en principio no hay razones para pensar que su eficacia sea inferior a la del efavirenz. El efavirenz y posiblemente también la nevirapina pueden administrarse una sola vez al día. En la práctica hay que considerar que tienen resistencia cruzada, ambos probablemente alcanzan niveles terapéuticos en LCR y afortunadamente su perfil toxicológico es suficientemente diferenciado. Se han publicado dos estudios randomizados comparando directamente la nevirapina con efavirenz. En un estudio de simplificación que incluyó cerca de 500 pacientes con carga viral indetectable, que recibían un régimen con IP, no se encontraron diferencias entre el abacavir, la nevirapina y el efavirenz cuando reemplazaban al IP. En otro estudio que incluyó más de 1.000 pacientes no hubo diferencias significativas entre el efavirenz y la nevirapina, una o dos veces al día, cuando se utilizaban como tratamiento inicial, combinados con d4T + 3TC, salvo una mayor elevación de las transaminasas cuando se comparó la nevirapina una vez al día, con el efavirenz.

INTRODUCCIÓN

Respecto a los inhibidores de la proteasa actualmente disponibles están: saquinavir en gel duro y blando, ritonavir, nelfinavir, indinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir y tipranavir. El uso óptimo de todos ellos se efectúa conjuntamente con pequeñas dosis de ritonavir excepto nelfinavir y obviamente el propio ritonavir. La principal razón para combinar los dos inhibidores de la proteasa es obtener ventajas farmacocinéticas. Existe una amplia experiencia con la combinación ritonavir y saquinavir (Cameron W. 1999) y cuanto menor es la dosis de ritonavir mejor es la tolerancia. De hecho esto es válido para todas las combinaciones de un IP y “baby” dosis de ritonavir. El lopinavir está ya comercializado como una asociación a dosis fija con ritonavir (Kaletra®) y junto con atazanavir potenciado o no con ritonavir, constituyen los IP de elección. Una dosis baja de ritonavir es esencial para optimizar la farmacocinética de todos los inhibidores de la proteasa (saquinavir, indinavir, atazanavir, amprenavir, fosamprenavir y tipranavir) con la excepción del nelfinavir.

TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL INICIAL

Infección aguda

El concepto de infección aguda, o infección primaria suele reservarse para el periodo de tiempo que va entre la infección inicial o contagio y la seroconversión. La mayor parte de las veces se identifica por la presencia de síntomas clínicos (síndrome retroviral agudo) (Miro J.M. 2004). El concepto de infección reciente abarca un periodo de tiempo muy amplio que va desde el contagio hasta pasados más de 3-6 meses cuando ya se ha estabilizado la carga viral plasmática (*set-point*) y su nivel predice la rapidez con que evolucionará el paciente (Pilcher C.D. 2004). La mayoría de estudios se han realizado en pacientes con infección reciente (entre 0-6 meses a partir del contagio) y por tanto han incluido poblaciones no totalmente homogéneas.

Las principales razones para tratar a un paciente con infección reciente son impedir el deterioro del sistema inmunológico o restaurarlo rápidamente y de forma completa incluyendo la respuesta específica frente a los antígenos del VIH (Smith D.E. 2004) y en caso de que el tratamiento se suspenda, alcanzar una situación de equilibrio virológico en un nivel inferior al que se habría llegado de forma espontánea, con lo cual la evolución del paciente sería potencialmente más lenta. Sin embargo, la restauración inmunológica no es constante, quizás sólo se logre si el tratamiento se inicia muy precozmente (durante las manifestaciones clínicas), y aun así no parece que vaya a ser suficiente para preservar el estado de latencia si se retira el tratamiento.

INTRODUCCIÓN

Por el contrario, se “condena” al paciente a un tratamiento incómodo y tóxico de por vida con los consiguientes problemas de adherencia y posibilidad de selección de mutantes resistentes. La recomendación sería incluir a todos los pacientes en ensayos clínicos y si ello no es posible iniciar un tratamiento triple (como mínimo) si vemos al paciente en una fase muy precoz. Si han pasado ya varias semanas desde el contagio, quizás lo más razonable fuera esperar unos meses más, hasta que se establezca el nivel de equilibrio y entonces aplicar los criterios para el tratamiento inicial de la infección crónica o ya establecida (Iribarren J.A. 2004) Algunos estudios de cohortes han demostrado recientemente que a medio plazo no hay diferencia entre iniciar el tratamiento durante la infección aguda por el VIH o más tarde, dentro de los primeros doce meses de la infección por el VIH, desde el punto de vista virológico, inmunológico o clínico (Miro J.M. 2004). Tampoco la administración de vacunas terapéuticas en pacientes tratados desde la infección aguda por el VIH ha cambiado el curso natural de esta infección (Miro J.M. 2004).

Infección crónica o ya establecida

¿Cuándo iniciar el tratamiento?

A partir de 1996 hemos asistido a un aumento espectacular de la supervivencia de los pacientes con SIDA junto con una dramática reducción de las infecciones oportunistas (Palella F.J. 1998) y neoplasias asociadas al SIDA, debido fundamentalmente a la aplicación de tratamientos antirretrovirales muy potentes en los pacientes en estadios avanzados (linfocitos CD4+ < 350-200 células/ml). Iniciar el tratamiento en esta situación está más allá de cualquier duda razonable y los beneficios superan con mucho los potenciales inconvenientes y problemas (Iribarren J.A. 2004, DHHS 2005, Yeni P.G. 2004) **(Tabla. 2)**

Por el contrario, en los pacientes en estadios más precoces (linfocitos CD4>350-500 células /mm³) podemos aspirar a restaurar parte de la capacidad funcional del sistema inmunológico (recuperación de la cifra de linfocitos CD4+ nativos (CD4+ CD45RA) y de la respuesta a mitógenos y antígenos de recuerdo, pero prácticamente nunca de la respuesta a antígenos del VIH-1) (Plana M. 1998) y a retrasar la progresión de la enfermedad hacia estadios más avanzados sobre todo en los pacientes con carga viral alta (> 100.000 copias/ml plasma) en los que el riesgo es mayor. Estos beneficios, cuya traducción clínica no siempre es tangible ni fácil de demostrar deben balancearse con los inconvenientes y riesgos de un tratamiento durante muchos años que hemos enumerado en el apartado anterior (tratamiento de la infección aguda). En particular, el

INTRODUCCIÓN

riesgo de desarrollar un síndrome de lipodistrofia es elevado, puede que no sea reversible y es objeto de gran preocupación.

¿Cómo iniciarlo? (Tabla 3)

Dentro de lo que podríamos denominar regímenes recomendables no hay datos que permitan establecer un orden claro de prioridades. Es necesario tener en cuenta la tolerancia, las interacciones, las ventajas e inconvenientes de cada régimen y también las preferencias de los pacientes y su estilo de vida [Iribarren J.A. 2004, DHHS 2005, Yeni P:G. 2004]. En los pacientes en situación muy avanzada ($CD4 < 50-100$ células/ mm^3), con una carga viral basal muy elevada o que precisen una rápida recuperación inmunológica es posible que haya que considerar regímenes muy potentes con más de tres medicamentos e incluso regímenes que incluyan medicamentos de las tres familias pero valorando siempre la potencial toxicidad, interacciones, aceptación por parte del paciente y la falta de experiencia en ensayos clínicos controlados. La utilización de asociaciones de fármacos a dosis fijas, como es el caso del Combivir®, del Trizivir®, de Truvada®, de Kivexa® o de Kaletra® puede ser ventajosa para reducir el riesgo o retrasar la selección de resistencias o imprescindible para mejorar el perfil farmacocinético.

Cómo monitorizar el tratamiento y la respuesta terapéutica

Adherencia

Para que el tratamiento antirretroviral sea eficaz, la adherencia ha de ser muy elevada. Obviamente, esto es muy difícil de lograr sobre todo a medio y largo plazo, máxime en los pacientes sin manifestaciones clínicas relacionadas con la enfermedad. En general, el médico tiende a sobrestimar la adherencia al tratamiento de sus pacientes y valora como factores potencialmente predictores de un buen o mal cumplimiento variables diferentes a las identificadas por los pacientes (Knobel H. 2005): los pacientes de nuestro país le conceden gran valor al temor a desarrollar efectos secundarios y menor al número total de comprimidos y al número de tomas al día. Las pautas consistentes en una sola toma diaria con no más de 3-5 pastillas, están ganando popularidad y aceptación y son teóricamente posibles, al menos para el tratamiento inicial.

INTRODUCCIÓN

Respuesta inmunológica y virológica

La forma más sencilla de monitorizar la respuesta al tratamiento antirretroviral muy activo es midiendo la carga viral plasmática (Iribarren J.A 2004, DHHS 2005, Yeni P:G. 2004). Durante las primeras 4 semanas debe producirse una caída mínima de 1-1,5 log₁₀ copias/mL, de 2 log₁₀ copias/mL a las 8 semanas y a los 3-6 meses debería ser indetectable (< 200-500 copias/ml plasma si se utilizaron *tests* convencionales y < 20-50 copias/ml si utilizamos *tests* ultrasensibles).

La rapidez de la caída y el mínimo valor alcanzado predicen la duración de la respuesta. En pacientes cuya carga viral basal sea muy elevada (> 100.000 copias/ml de plasma) y sobre todo si utilizamos técnicas ultrasensibles podemos tardar entre 6-12 meses en alcanzar valores indetectables. Por tanto parece razonable medir la carga viral al mes de iniciar el tratamiento y luego cada 2-4 meses. Si el régimen es efectivo solo excepcionalmente la carga viral será > 20 copias/ml de plasma a los 4-6 meses. Si no se alcanzan los anteriores objetivos hay que pensar en problemas de adherencia, farmacocinéticos o en la transmisión de una cepa resistente (resistencias primarias). Una vez se ha alcanzado un nivel indetectable no es infrecuente que reaparezcan rebotes transitorios (“blips”) por diversos motivos incluyendo infecciones intercurrentes, administración de vacunas o debido a la variabilidad de los métodos de determinación. Por ello, se recomienda tener un mínimo de dos determinaciones antes de tomar la decisión de cambiar un tratamiento.

Respecto a la cifra de linfocitos CD4+ suele producirse un incremento relativamente rápido (debido probablemente a fenómenos de redistribución) y luego una respuesta más lenta y sostenida a lo largo del tiempo que puede estabilizarse o enlentecerse a partir de los 3 años. La falta de respuesta en pacientes con una respuesta virológica aparentemente buena es rara y entre otros fenómenos puede explicarse por la persistencia de un cierto grado de replicación residual o por la toxicidad de la medicación (Iribarren J.A. 2004, DHHS 2005).

Monitorización de los niveles de fármacos

Su papel en la clínica práctica no está bien establecido, pero parece que puede ser interesante para el caso de medicamentos como los IP cuya actividad se correlaciona con los niveles plasmáticos, cuya vida media es corta y cuya farmacocinética es bastante variable de unos individuos a otros. Cuando se utilizan combinaciones de uno o dos inhibidores de la proteasa con una dosis baja de ritonavir para potenciar su far --

INTRODUCCIÓN

macocinética, la medición de niveles plasmáticos puede ser de gran ayuda para individualizar las dosis.

Por otra parte los IP y los ITINN son sustratos del citocromo P-450 por lo que sus niveles pueden modificarse por otros inhibidores (p.ej. macrólidos) o inductores del mismo (p.ej. rifamicinas). En estos casos también estaría justificada la determinación de los niveles plasmáticos de estos antirretrovirales. Finalmente, dada la rapidez con que se introducen nuevos fármacos antirretrovirales y sus potenciales interacciones farmacocinéticas, se recomienda consultar frecuentemente bases de datos actualizadas de interacciones (<http://www.interaccionesHIV.com>).

CUÁNDO Y CÓMO CAMBIAR EL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Existen diversas situaciones en las que se puede plantear la necesidad de cambiar todo el tratamiento antirretroviral o de introducir modificaciones en la pauta. El tipo de cambio aconsejable depende en gran medida de la razón que lo motivó. (**Tabla 4**) (Iribarren J:A. 2004, DHHS 2005, Yeni P.G. 2004, Gatell J:M. 2001).

Pacientes con buena respuesta virológica

Las razones para plantear un cambio de tratamiento en esta situación es la toxicidad aguda o crónica relacionada con uno o más medicamentos, tratar de prevenir la toxicidad o simplificar la pauta para que se adapte mejor al estilo de vida del paciente, lo que potencialmente mejorará la adherencia a largo plazo. En caso de toxicidad aguda suele ser relativamente fácil identificar el medicamento responsable y lo indicado es cambiarlo por otro parecido pero sin toxicidad cruzada. En caso de toxicidad crónica o acumulada, la situación no siempre es tan clara. Lo más frecuente son los pacientes con síndrome de lipodistrofia o alteraciones metabólicas (Martinez E. 1999). Hay datos en el sentido de que se mantiene la eficacia virológica, revierten al menos en parte, las alteraciones metabólicas pero no está claro si es posible detener o revertir la clínica de lipodistrofia y, en todo caso, éste sería un proceso muy lento. Cuando las únicas razones para plantear un cambio son prevenir una eventual toxicidad futura (en general el desarrollo de lipodistrofia) o hacer que la pauta sea más cómoda para el paciente, hay que ser prudente antes de modificar algo que “esté funcionando bien”. La alternativa debe ser otra pauta de igual potencia con elevada barrera genética al desarrollo de resistencias y sin potenciales interacciones que puedan comprometer su eficacia.

INTRODUCCIÓN

Pacientes con fracaso terapéutico

El término fracaso terapéutico engloba la incapacidad de suprimir la replicación viral, el que no se produzca el esperado incremento de linfocitos CD4+ o que haya una progresión clínica (nuevos eventos oportunistas asociados a la infección por el VIH-1). El que no se produzca el incremento esperado en la cifra de linfocitos CD4 puede deberse a múltiples factores aparte de la persistencia de replicación viral. Respecto a la progresión clínica sabemos que durante los primeros meses a partir del inicio del tratamiento antirretroviral pueden reactivarse algunas infecciones oportunistas sin que ello indique falta de respuesta al tratamiento.

Por tanto, la respuesta virológica es la mejor manera de monitorizar la eficacia de un tratamiento. Por fracaso virológico se entiende cualquier carga viral plasmática detectable (> 20- 500 copias/ml plasma) en dos o más determinaciones y tras haber descartado problemas intercurrentes como la variabilidad del método (que es mayor si utilizamos técnicas ultrasensibles), infecciones o la administración de vacunas.

Detectar un fracaso virológico no quiere decir que, necesariamente y de forma automática, haya que cambiar el tratamiento. Las causas más frecuentes son los problemas de adherencia al tratamiento (que se deben tratar de detectar y corregir), problemas derivados de la variabilidad interindividual en la farmacocinética de los medicamentos o de las potenciales interacciones medicamentosas (que también son susceptibles de ser detectadas y corregidas).

En los pacientes que reciben tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) con buena adherencia y sin problemas aparentes de farmacocinética ni interacciones, la selección de resistencias es la causa más frecuente de fracaso virológico. Cuando el fracaso virológico se detecta precozmente, es probable que no se hayan seleccionado resistencias a todos los miembros de la combinación sino solamente a aquellos con menor barrera genética (Descamps D. 2000). Si mantenemos la misma pauta terapéutica se irán acumulando resistencias (Descamps 2000). Si disponemos de la posibilidad de determinar resistencias, teóricamente sería posible cambiar sólo los medicamentos implicados manteniendo los demás. Si no disponemos de la posibilidad de determinar resistencias, lo aconsejable es cambiar todos los medicamentos y buscar una pauta alternativa que al menos teóricamente no tenga resistencias cruzadas.

INTRODUCCIÓN

PACIENTES CON HISTORIA DE MÚLTIPLES TRATAMIENTOS Y FRACASOS

En estos pacientes, a pesar de tener una carga viral detectable o incluso muy elevada y de que el virus sea resistente a todos los miembros de la combinación, el tratamiento sigue siendo, al menos, parcialmente eficaz. Ello se debe a que el virus plurimutado tiene una "fitness" o adaptabilidad menor que el virus salvaje. De hecho, si se retira, la carga viral sube más y la cifra de linfocitos CD4 suele caer.

Por tanto, si a pesar del fracaso virológico en un paciente politratado, con múltiples mutaciones de resistencia en el VIH y sin opciones claras de nuevas opciones terapéuticas si la cifra de linfocitos CD4 está por encima de un umbral de seguridad (> 350 células/mm³) y se mantiene estable, quizás lo más razonable es mantener el mismo tratamiento si la tolerancia es buena. Esta situación en la práctica no es infrecuente, se la suele denominar respuesta discrepante, y puede mantenerse durante periodos de tiempo prolongados (Kaufmann D. 1998).

Si optamos por un cambio terapéutico, debemos intentar determinar las resistencias y guiarnos por los resultados (Gatell J.M. 2001, Hirsch M.S. 2003). Se han postulado también otras dos opciones. La primera es la que se ha denominado MEGATARGA que consiste en una combinación de múltiples drogas sin tener demasiado en cuenta el perfil de resistencias. Se han obtenido respuestas parciales en aproximadamente un 50% de pacientes, pero la tolerancia suele ser mala. La segunda opción es interrumpir totalmente el tratamiento durante 1-3 meses con la esperanza de que las cepas sensibles desplacen a las resistentes y se conviertan en la *cuasiespecie* mayoritaria. La reintroducción del tratamiento antirretroviral en estos pacientes origina una reducción transitoria de la carga viral hasta que se selecciona de nuevo la población resistente. El problema que existe es que, simultáneamente a la reaparición de la viremia, se produce una caída importante de la cifra de linfocitos CD4 (aproximadamente 100 células/ μ L), por lo que los pacientes que tienen una situación clínica avanzada con una cifra baja de linfocitos CD4 se ponen en riesgo de desarrollar infecciones oportunistas. Por tanto, con estos datos parece mejor mantener el tratamiento antirretroviral con el fin de evitar un mayor deterioro inmunológico mientras éste no produzca efectos secundarios graves (Iribarren J.A. 2004).

DETERMINACIÓN DE RESISTENCIAS PARA ORIENTAR CAMBIOS TERAPÉUTICOS

INTRODUCCIÓN

En varios estudios randomizados (Iribarren J.A. 2004, Gatell J.M. 2001, Hirsch M.S. 2003) se ha demostrado que, en pacientes avanzados y en general con historia de uno o varios fracasos virológicos previos y de haber recibido varios regímenes terapéuticos, los cambios orientados por los datos de resistencia genotípica proporcionaban un beneficio superior a los cambios sin disponer de estos tests. A la vista de estos resultados, diversas agencias han recomendado la introducción de los test de resistencia genotípica en la clínica rutinaria, si bien quedan numerosos problemas técnicos y de interpretación pendientes de resolver. Se han obtenido datos similares utilizando *tests* de resistencias fenotípica real o virtual aunque los beneficios clínicos de utilizarlos no superan a los obtenidos usando solamente el genotipo.

PROFILAXIS POSTEXPOSICIÓN

El riesgo global de contagio tras una exposición accidental para el caso de personal sanitario es bajo (0,03%) (Iribarren J.A. 2004, CDC 2001). Los factores que incrementan el riesgo son las lesiones profundas, la presencia de sangre visible en la aguja o instrumento causante de la lesión, que la aguja haya sido utilizada para una punción arterial o venosa en la fuente de contagio y que la fuente del contagio padezca una enfermedad avanzada (Iribarren J.A. 2004, CDC 2001).

Actualmente, se sabe que tras un accidente, probablemente las primeras células en infectarse sean las células de Langerhans y a través de ellas el virus se diseminaría hacia los linfocitos T activados. Si ésta es la secuencia de eventos, una profilaxis postexposición puede ser eficaz incluso cuando se utilicen ITIAN que precisan metabolizarse antes de ser activos (Iribarren J.A. 2004, CDC 2001). Se ha demostrado la eficacia de la profilaxis postexposición en modelos animales (Iribarren J.A. 2004, CDC 2001) y se ha comprobado que depende del inóculo, de la rapidez con que se inicie y de su duración (mínimo 10 días y aconsejable 4 semanas). En el humano, la eficacia de los antirretrovirales para reducir la tasa de transmisión materno-fetal, incluso cuando se administran exclusivamente durante el parto y periodo neonatal, constituye una buena demostración de que la profilaxis postexposición es efectiva.

Finalmente, el estudio caso-control publicado por los CDC comparando 33 casos de infección tras exposición accidental con 665 controles, demostró que la profilaxis con zidovudina era uno de los factores independientes capaz de reducir el riesgo de transmisión. La recomendación actual es valorar el riesgo del accidente (CDC 2001).

Los accidentes de alto riesgo se definen como los que implican exposición a un gran volumen de sangre (p.ej. lesión profunda con aguja hueca de orificio de gran tamaño

INTRODUCCIÓN

con sangre visible o con una aguja que se haya utilizado para una punción arterial o venosa), o a sangre que contenga un alto título de virus (primoinfección, enfermedad en estadios avanzados, carga viral alta o recuento de CD4+ bajo). Se recomienda AZT+3TC+ NFV. También debe ofrecerse profilaxis en situaciones de menor riesgo, en cuyo caso podría considerarse AZT + 3TC. Debe valorarse individualmente cada caso teniendo en cuenta la situación y antecedentes de la fuente del potencial contagio. En particular, si se puede obtener una muestra de la fuente del contagio para determinar resistencias o si éstas se conocen, se deberían introducir las modificaciones necesarias en la pauta recomendada. Al haberse descrito algún caso de insuficiencia hepática por nevirapina no sería recomendable utilizar este medicamento para profilaxis postexposición.

Un periodo de 4 semanas parece un tiempo razonable si el tratamiento se tolera bien. La profilaxis postexposición debe iniciarse lo antes posible tras el accidente y siempre dentro de las primeras horas (Iribarren J.A. 2004, CDC 2001). Tras este intervalo, su potencial eficacia es considerablemente inferior. La determinación de resistencias no debería retrasar el inicio de la medicación.

El riesgo de infección (seroconversión) tras una exposición sexual de riesgo o a una aguja contaminada, en el caso de los drogadictos, posiblemente sea similar al de un accidente laboral con material contaminado. Apenas existe información sobre la eficacia, conveniencia, ventajas y desventajas de una profilaxis postexposición. Puede considerarse en algunas situaciones especiales y siempre debe ir acompañada de una labor de educación sanitaria para minimizar el riesgo de futuras exposiciones (Iribarren J.A., CDC 2001).

INTERRUPCIONES DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Se ha planteado interrumpir el tratamiento antirretroviral en pacientes con buena respuesta virológica cuando éste se había iniciado más o menos rápidamente tras la infección aguda o durante la fase crónica de la infección (que es lo habitual). En ambas situaciones (García F. 2001, Deeks S.G. 2001), un pequeño porcentaje de pacientes (algo más elevado cuando el tratamiento se inició tras la infección aguda), tras uno o más ciclos de interrupciones, es capaz de mantener una carga viral relativamente controlada (< 5.000 copias/ml de plasma) durante varios meses. Además, aunque tras la interrupción la carga viral rebrote hasta alcanzar niveles parecidos a los que tenía antes de iniciar el tratamiento antirretroviral, se puede considerar el mantener a los pacientes sin tratamiento mientras persistan clínicamente

INTRODUCCIÓN

asintomáticos y la cifra de linfocitos CD4+ no descienda por debajo de las recomendaciones actuales (Iribarren J.A. 2004, DHHS 2005, Yeni P.G. 2004). Los beneficios de las interrupciones no están demostrados y el riesgo de seleccionar resistencias es considerable, sobre todo si las pautas contienen 3TC o un ITINN. Por el contrario, en los pacientes avanzados y con mala respuesta virológica, interrumpir el tratamiento es perjudicial (descenso rápido de la cifra de linfocitos CD4+ y riesgo de desarrollar infecciones oportunistas) y sólo parece justificado en caso de toxicidad importante o inaceptable para el paciente (Deeks S.G. 2001).

INTRODUCCIÓN

TABLA 1. Medicamentos con actividad antirretroviral que pueden obtenerse en nuestro país en el año 2005.

acceso	Comercializados	En uso compasivo o expandido
ITIAN	Zidovudina (AZT) Zalcitabina (ddC) Didanosina (ddl) Estavudina (d4T) Lamivudina (3TC) Emtricitabina Abacavir	
ITIAN T	Tenofovir	
ITINN	Nevirapina Efavirenz	
IP	Ritonavir Nelfinavir Indinavir Amprenavir Atazanavir Lopinavir/r Saquinavir ¹ Fosamprenavir	Tipranavir
Inh. Fusión	Enfuvirtida	
Otros		Interleucina-2 Ácido micofenólico Hidroxiurea

INTRODUCCIÓN

Comentarios: El ácido micofenólico puede potenciar la acción del abacavir, ddl o tenofovir. AZT + 3TC está comercializado como asociación a dosis fija (Combivir®). AZT + 3TC + Abacavir está comercializado como asociación a dosis fija (Trizivir®). ABC y 3TC y tenofovir y FTC se van a comercializar como asociaciones a dosis fijas que se llamarán Truvada® y Kivexa® respectivamente. La asociación de dosis fijas de lopinavir y ritonavir está comercializada (Kaletra®). IP: Inhibidores de la proteasa. ITIAN: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos. ITIANT: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótidos. ITINN: Inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleósidos. ¹Disponible como gel duro y gel blando.

TABLA 2. Recomendaciones para iniciar el tratamiento antirretroviral basados en la clínica, la cifra de linfocitos CD4+/mm³, la carga viral plasmática (copias de ARN/ml). Los puntos de corte se han seleccionado de forma relativamente arbitraria y con fines prácticos [6,18,19].

Síntomas	CD4+	Carga viral ¹	
		<100.000	≥ 100.000
Si		R	R
No	0-350	R	R
No	>350	E	C

Comentarios: R = Recomendar; C = Considerar; E = Esperar. ¹Categorías B o C de la clasificación de los CDC de 1993. ²Efectuar un mínimo de dos determinaciones. Tener en cuenta la variabilidad del método

INTRODUCCIÓN

TABLA 3. **Ventajas y desventajas de las pautas de tratamiento antirretroviral inicial [6].**

Regímenes recomendados	Ventajas	Desventajas
- 2 ITIAN ² + 1 IP ¹	Datos clínicos Experiencia prolongada	Incomodidad Más pastillas Toxicidad a medio y largo plazo Dificulta alternativas con IP
- 2 ITIAN ² + 1 ITINN ³	Evita IP Menos pastillas Experiencia prolongada	invalida alternativas con ITINN No excluye la toxicidad a medio y largo plazo
Regímenes que pueden considerarse		
- 3 ITIAN ⁴	Evita IP e ITINN Menos pastillas	Menor eficacia Menos experiencia Puede invalidar alternativas con ITIAN
Regímenes en proceso de evaluación		
- 1-2 ITIAN ² + 1 ITINN ³ + 1 IP	Potencia elevada	Toxicidad potencial Invalida todas las alternativas futuras

Comentarios: 1La utilización de ritonavir a dosis bajas para potenciar la farmacocinética del segundo IP puede considerarse como la administración de un único IP; Kaletra® o atazanavir/ritonavir serían los IP preferidos. 2 Las combinaciones con TNF + 3TC/FTC, ABC+3TC/FTC o AZT + 3TC/FTC podrían ser las preferidas mientras que otras combinaciones como d4T o ddl + 3TC o AZT + ddl serían buenas alternativas. El 3TC y el FTC es probable que puedan usarse de forma indistinta.

INTRODUCCIÓN

La combinación d4T + 3TC podría ser algo más tóxica y debería evitarse en mujeres embarazadas. 3Efavirenz o nevirapina. 4Hay experiencia con AZT + 3TC + abacavir y con d4T + ddl + 3TC que han demostrado una menor eficacia que regímenes alternativos. Por el contrario,, regímenes con TNF + ABC + 3TC o TNF + ddl + 3TC deben evitarse debido a una elevada tasa de fracasos precoces con selección de resistencias al tenofovir, al 3TC o a ambos

INTRODUCCIÓN

TABLA 4. **Situaciones en las que puede considerarse un cambio de tratamiento y tipo de cambio que debe efectuarse. Si se dispone de la posibilidad de determinar resistencias el resultado de esta prueba puede orientar el tipo de cambio a efectuar [6,18,19].**

Motivo del Cambio	Observaciones
1.Toxicidad ² o Prevencción de toxicidad ² o Incomodidad o falta de adherencia o Problemas farmacocinéticos	
a) Carga viral indetectable ¹	Cambiar el medicamento implicado si es fácil de identificar
b) Carga viral detectable	Cambiar todo el régimen terapéutico salvo que tengamos datos de resistencias
2. Falta de respuesta virológica	
a) Carga viral todavía detectable tras 8- 24 semanas ³ de haber iniciado el tratamiento	Continuar mismo tratamiento Valorar la adherencia Valorar la resistencia primaria Considerar intensificación
b) Carga viral detectable a las 24- 36 semanas ³ de haber iniciado el tratamiento o rebrote virológico tras respuesta inicial	Cambiar todo el régimen terapéutico salvo que tengamos datos de resistencias

Comentarios: 1Por debajo de 200- 500 copias/ml o de 20- 50 copias/ml según la metodología que estemos utilizando. 2 La situación más frecuente es tratar de revertir las alteraciones metabólicas y la lipodistrofia. 3Los periodos de tiempo indicados son orientativos. El tiempo que se tarda en alcanzar el nadir depende de la potencia del tratamiento, de la carga viral basal y de los CD4 basales y del objetivo que nos proponemos (por ejemplo, quedar por debajo de 500, 50 o 5 copias/ml).

INTRODUCCIÓN

A las 4 semanas de haber iniciado el tratamiento como mínimo se tiene que haber producido una caída de $\geq 1 \log_{10}$ en la carga viral plasmática.

I-2 VACUNAS PREVENTIVAS FRENTE AL VIH

I-2.1 Introducción

La necesidad de una vacuna frente al VIH segura, efectiva, económica y accesible a toda la población, cada día es mayor. De acuerdo con el Informe de ONUSIDA 2004 sobre la epidemia del SIDA, el número de personas que viven con VIH continúa creciendo de 35 millones en 2001 a 38 millones en 2003 y casi cinco millones de personas se infectaron con VIH en 2003. En el mismo año, alrededor de 3 millones de personas murieron de SIDA, y para 2010, el número de niños huérfanos por SIDA podría ser cercano a los 25 millones (UNAIDS 2004). Se estima que 85% de estas nuevas infecciones ocurren en los países en vías de desarrollo. La terapia antirretroviral altamente activa (HAART) no representa una solución definitiva en las diferentes etapas clínicas. A la larga el fracaso terapéutico se puede presentar, debido principalmente a la toxicidad, falta de adhesión y emergencia de virus resistentes. Por otra parte, el acceso universal de antirretrovirales en los países en vías de desarrollo, representa todavía un gran desafío para las autoridades sanitarias de los mismos por su elevado costo (Perrin L. 1998).

Existen diferentes estrategias que podrían llevar a una efectiva vacuna anti SIDA, pero para que sea exitosa contra el VIH debería estimular la inmunidad innata, generar altos niveles de anticuerpos neutralizantes e inducir fuerte respuesta inmune celular e inmunidad en las mucosas. Además esta inmunidad debería ser persistente, de amplio espectro y de reactividad cruzada contra los diferentes subtipos existentes del VIH-1. La comprensión del papel de los mecanismos inmunes que controlan la viremia del VIH debe ayudar a definir las metas para las terapias inmuno-mediadas y las nuevas estrategias de las vacunas contra el SIDA (Tramont E.C. 2003). Por otra parte el desarrollo de nuevos candidatos de vacunas necesita incrementarse.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se están desarrollando diferentes ensayos clínicos de 30 candidatos de vacunas en 19 países de todos los continentes (IAVI report 2004) y sólo una de estas vacunas, diseñada para inducir anticuerpos neutralizantes frente a una proteína soluble del VIH, ha terminado el ensayo de eficacia fase III en humanos. Desgraciadamente, los resultados de este ensayo demostraron una muy baja eficacia de la vacuna (3,8 %).

El diseño de nuevas estrategias de vacunas, los modelos animales, y la investigación clínica están convergiendo para crear una línea prometedora de candidatos a vacunas. Existe además un número elevado de iniciativas comprometidas en un esfuerzo global para el desarrollo de una vacuna contra el SIDA (tabla1). Para superar los desafíos científicos, logísticos y económicos se requiere de la unión de todos los talentos y recursos en una iniciativa global que logre desarrollar una vacuna eficaz contra el VIH (tabla 1).

I-2.2 Respuesta inmune frente al VIH-1. Limitaciones y desafíos.

Inmunidad humoral

A pesar de la producción de anticuerpos neutralizantes durante la primoinfección por VIH y de tener reactividad cruzada, los mismos aparecen después de la respuesta inmune celular y no logran alcanzar los títulos suficientes para controlar la replicación del virus y bloquear su actividad. Además solo neutralizan débilmente los aislados primarios del VIH (Letvin N. 2003).

Esta incapacidad para generar suficiente producción de anticuerpos más eficaces puede ser debida a las siguientes razones: i) destrucción directa de linfocitos CD4 por el VIH que afectaría el reconocimiento del antígeno apropiado y la respuesta de células B; ii) variación de epítipo del loop hipervariable de la gp120; iii) estos anticuerpos son eficaces inactivando y eliminando al virus circulante, pero no pueden evitar la difusión célula-a-célula del VIH, que representa el mayor mecanismo de propagación de VIH en enfermos (8); iv) además, la estructura trimérica y plegada de gp120 nativa en el virión parece enmascarar las regiones más conservadas de la superficie viral que se unen a los receptores celulares y que son los blancos preferenciales

INTRODUCCIÓN

para una neutralización eficaz. Por otro lado, la conformación cambiante de la gp120 en el momento de unirse al receptor CD4 y correceptores CCR5/CXCR4, origina el plegamiento de la gp120, que expone el componente de la proteína viral que había permanecido oculto (Cohen J. 2003); v) las modificaciones post-traduccionales de la superficie viral, en particular la glicosilación directa de los residuos de aminoácido, que genera las estructuras de hidratos de carbono denominadas “escudos glicanos”, que evitan el reconocimiento de los diferentes epítomos por los anticuerpos neutralizantes (Richman D.D. 2003); vi) finalmente, los anticuerpos neutralizantes deben generarse en las mucosas para evitar la infección viral a través del contacto sexual, que representa el mecanismo de transmisión más común. La producción de IgA VIH específica se ha propuesto como uno de los mecanismos más importantes de resistencia a la infección en personas altamente expuestos al virus pero no infectados (ENI), tanto en mujeres como en hombres heterosexuales (Clerici M. 2002).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Iniciativas globales para la investigación y el desarrollo de una vacuna contra el VIH/SIDA

ORGANIZACIÓN	OBJETIVOS
EuroVac (European Vaccine Effort Against HIV/AIDS)	-Desarrollar y evaluar diferentes modelos vacunales, que conduzcan a ensayos fase I de vacunas preventivas frente al SIDA, en Europa, http://www.eurovac.net
ANRS (French National Agency for AIDS Research)	-Investigación y desarrollo de vacunas frente al VIH/SIDA, Hepatitis viral B y C http://www.anrs.fr
ORVACS (Objectif Recherche Vaccin SIDA). International Collaborative Network	-Acelerar la investigación de vacunas terapéuticas y estrategias inmuno-basadas contra el VIH. - Conducir esta investigación complementariamente al desarrollo de ensayos clínicos de candidatos a vacunas evaluados a nivel preclínico. http://www.orvacs.org
CANVAC (Canadian Network vaccines and Immunotherapeutics)	- Unificar los esfuerzos de los sectores públicos y privados, para el desarrollo de una vacuna y ensayos clínicos en Canadá http://www.canvacc.org
IAVI (International AIDS Vaccine Initiative)	-Patrocinan el diseño de nuevas vacunas preventivas, con las facilidades clínicas y de laboratorio para el desarrollo de ensayos clínicos al rededor del mundo. http://www.iavi.org
ACTG (AIDS Clinical Trial Group)	-Complementar los esfuerzos existentes para incrementar la investigación de nuevos modelos vacunales y ensayos en fase I/II en E.E.U.U. http://www.actg.org
AAVP (African AIDS Vaccine Program)	-Red de trabajo de científicos Áfricanos para promover y facilitar la investigación y evaluación de vacunas frente al VIH. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/hiv/aavp
KAVI (Kenya AIDS Vaccine Initiative)	- Combinar esfuerzos mundiales para desarrollar ensayos clínicos fase I en Kenia. http://www.kaviuon.org
HVTN (HIV Vaccine Trial Network), Division of AIDS (DAIDS) of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health (NIH)	-Evaluación de los diferentes candidatos a vacunas frente al VIH, en ensayos clínicos. http://www.hvtn.org/
SAAVI (South African Vaccine Initiative)	- Movimiento internacional que tiene como objetivo el desarrollo de una vacuna para el VIH. http://www.saavi.org.za
EGPAF (Elizabeth Glaser Pediatric AIDS Foundation)	- Proporcionar cuidados y tratamiento a niños con VIH/SIDA, y acelerar el descubrimiento de nuevos tratamientos para estas y otras enfermedades pediátricas. http://www.pedaids.org
The Bill & Melinda Gates Foundation	-La fundación tiene un programa para asegurar que todos los niños tengan acceso a las vacunas y que los nuevos medicamentos, vacunas y diagnósticos que se desarrollen se usen para la prevención y el control del SIDA. http://www.gatesfoundation.org/default.htm
The Global Fund	- Creada para financiar el combate contra el dramático crecimiento del SIDA, tuberculosis y la malaria ver http://www.theglobalfund.org/en/
NIH (National Institute Health)	Institución que tiene entre otros objetivos apoyar el desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA. Ver www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/

INTRODUCCIÓN

Inmunidad celular

El VIH, induce una fuerte respuesta de células T-CD8+ durante la viremia de la fase aguda y normalmente persiste a través de la fase crónica de infección. El control parcial de la replicación viral ocurre temporalmente durante los primeros días después de la infección y se correlaciona con la aparición de la respuesta específica de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ frente al VIH (Walker B.D. 2001).

Existen fuertes evidencias que apoyan la importancia de la respuesta inmune celular en el control de la replicación del VIH en humanos y de la replicación de SIV en monos rhesus.

Aunque el potencial mecanismo de protección es incierto, se ha sugerido que la respuesta de células T CD8+ VIH-específico detectada en las cohortes de ENI, como trabajadores sanitarios y mujeres trabajadoras del sexo, puede contribuir en prevenir la infección por el VIH-1 (Kaul R. 2001).

La habilidad de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) para controlar la replicación del VIH puede depender de varios factores: **i)** genéticos; se ha mostrado una asociación entre la presencia aumentada de receptores CD45RA+ CCR7 - (fenotipo efector de la maduración) de las células T CD8+ VIH específico y el control viral; **ii)** escape CTL: el cambio de un solo aminoácido del péptido inmunodominante KK10 en individuos HLA-B27 se correlaciona fuertemente con la pérdida de control inmune de la replicación viral; **iii)** los defectos en la maduración o función de los CTL: la presencia de CTL inmaduros (falta de expresión de perforina) o defectos en su capacidad proliferativa, se ha observado en las células T CD8+ antígeno específicas no proliferativas.

Retos y potenciales estrategias para superar el escape inmunológico del VIH.

El renovado interés para diseñar y evaluar nuevos inmunógenos capaces de inducir inmunidad humoral viene acompañado del concepto de que las vacunas para el VIH basadas solo en inmunidad celular, lograrían proteger contra la enfermedad, pero no contra la infección y sólo por un periodo limitado de tiempo. El escape inmunológico del VIH y los posibles mecanismos involucrados en el proceso, se han descrito en diferentes situaciones clínicas

INTRODUCCIÓN

y experimentales. Richman D.D. et al. 2003 han demostrado que una potente respuesta inmune contra el VIH mediada por anticuerpos neutralizantes, generada tempranamente después de la infección primaria por el virus, puede ejercer una presión selectiva que conduce a la evolución continua de mutantes de escape de neutralización.

Por otro lado y a pesar de la gran expansión de la población de células T-CD8+ VIH específicas después de la infección aguda, el virus logra escapar de la erradicación. Barouch et al. 2003 han demostrado que la cepa SHIV86.6P puede escapar del control inmune vacuna-inducido, por una mutación de un solo aminoácido, en el epítipo CTL inmunodominante p11 de gag-SIV.

Un estudio reciente mostró que la glicoproteína 120, es refractaria a la unión de la mayoría de los anticuerpos porque la molécula es extraordinariamente flexible, particularmente en las regiones específicas de unión a los anticuerpos. Posiblemente inmovilizando químicamente estos epítopos que se unen a CD4, permitiría producir anticuerpos que se unan a la gp120 o bien una estructura semejante a CD4 y con eso neutralizar al virus (Phimister E.G. 2003). Burton et al. evaluaron las características estructurales poco comunes de tres anticuerpos monoclonales neutralizantes del VIH: el b12, 17b y 2G12. b12 y 17b tienen unas prolongaciones que les permiten alcanzar regiones protegidas de gp120, como son los sitios de unión de la gp 120 con CD4 y CCR5 y el 2G12 presenta más la forma de "I" que la usual forma de "Y". Las peculiares estructuras de estos anticuerpos explicarían al menos una de las dificultades para generar los anticuerpos contra el VIH (Burton D., CROI 2004). La generación de anticuerpos contra los receptores de quimiocinas y correceptor de gp120, es otra opción importante para la inducción de anticuerpos neutralizantes contra VIH-1.

Con respecto a la respuesta inmune celular, una vacuna debe inducir cifras elevadas de células T CD8+ de memoria, las cuales rápidamente secreten citocinas y quimiocinas al contacto subsecuente con el antígeno, iniciando así la lisis de las células infectadas. En este contexto, los diferentes retos deben ser enfocados a los siguientes aspectos: i) una vacuna eficaz necesita inducir una respuesta de células T - CD8+ que sea ampliamente reactiva contra las

INTRODUCCIÓN

diferentes cepas de VIH y ésta debe ser genética y cualitativamente mejor que la respuesta celular T-CD8+ que normalmente se produce durante el curso natural de infección del VIH (Garber D. 2003); ii) la falta de una respuesta adecuada de células T-CD4+ ayudadoras, constituiría uno de los factores principales para el deterioro funcional de los CTL y consecuentemente del fracaso eventual del control inmune de la viremia. Por lo tanto es probable que una vacuna eficaz para el VIH-1 necesite inducir una potente respuesta inmune específica de células T-CD4+ y CD8+; iii) aumentar nuestro conocimiento de los polimorfismos genéticos del hospedero que han demostrado influir en la infección por VIH a nivel de su entrada a las células blanco, la diseminación del virus y el control inmunológico de la replicación viral.

I-2.3 Candidatos a vacunas. Ventajas y limitaciones.

Virus atenuados

La cepa del VIS con deleción en el gen nef (Ruprech R.M. 1999, Daniel M.D. 1992), resulto ser menos patógena, por lo que fue considerada como un posible candidato a vacuna contra el SIDA. En el ensayo pre-clínico, al ser administrada en simios infantes y adultos sanos les protegía del reto con VIS patógeno, durante un periodo de tiempo. Por otro lado en la cohorte Sydney, se detectaron 14 personas infectadas a partir de una fuente común con un mismo virus que resulto ser delectivo, en las secuencias reguladoras de la región 3' LTR del gen nef y que después de 10 años carecían de manifestaciones clínicas propias del síndrome. Sin embargo y en los 2 casos el virus revirtió y la progresión clínica a SIDA fue inevitable. Estas dos experiencias confirmaron el riesgo de ensayos con virus atenuados, por lo que han sido desaconsejadas como modelo vacunal en humanos, por la FDA y otras instituciones médico-reguladoras del mundo.

INTRODUCCIÓN

Virus inactivos

Se basan en el uso de virus sin actividad biológica, debido al tratamiento con sustancias químicas ó calor. Estos virus inertes, normalmente se inoculan acompañados de un adyuvante incompleto (por ejem., el de Freund), para potenciar su efecto inmunológico y sus posibles usos vacunales terapéuticos. Un ejemplo de este modelo lo representa el REMUNE, constituido por un VIH-1 carente de la envoltura e inactivado con formaldehído.

Pseudoviriones

Son partículas semejantes al VIH, pero sin capacidad replicativa y por tanto no infecciosas, lo que les hace más seguras pues carecen de los riesgos de reversión patogénica, recombinación y mutación de los virus vivos atenuados candidatos a vacunas contra el VIH (www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/, Doan LX 2004, Tramont E. 2003). También se denominan VLPs (virus-liked-particles) e incluyen epítomos de las proteínas de la capsida del VIH, que inducen inmunidad humoral y celular a nivel local y sistémico. Los ensayos preclínicos de experimentación animal a los que se administró este inmunogéno en las mucosas confirmaron su inmunogenicidad a este nivel (Doan LX 2004

Replicones

Constituidos por la mínima estructura genética (RNA) de virus diferentes al VIH, capaz de replicarse por si misma en una célula. Lo que le hace una estrategia de interés para su posible uso en ensayos preclínicos en animales (Vajdy M., 2001). Como ejemplo podríamos citar a los virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y al virus sindbis (SIN). Estos se han diseñado para transportar principalmente genes del VIH (gag subtipo C) que codifican las proteínas estructurales p24 (cápside), p17 (matriz) y p7 (nucleocápside).

Proteínas virales

Tratando de imitar el modelo vacunal de hepatitis viral B, se han sintetizado mediante técnicas de biología molecular las proteínas recombinantes gp 120 y 160 del VIH, que administradas en animales de laboratorio logran inducir

INTRODUCCIÓN

elevados títulos de anticuerpos, que sin embargo no neutralizaban diferentes aislados primarios de VIH (Schmitz J. 2003, Burton D. 2002, Klein M. 2003, Esparza J. 2003).

En la actualidad se sigue estudiando en diferentes vectores de expresión y se ha incluido la proteína reguladora expresada por el gen tat, con prometedores resultados de protección en ensayos preclínicos con macacos. (Fanales E. 2002) ha descrito la inducción de respuesta inmune capaz de controlar la infección primaria en los animales inmunizados con dicha proteína y retados con el patógeno SHIV89.6P.

Péptidos virales

Son porciones de proteína viral que contienen los epítomos inmunodominantes para células T y B, y que para ser reconocidos han de emular la conformación secundaria y terciaria de la proteína original. Además se recomienda su aplicación en forma de cocktail, para tratar de cubrir la amplia variedad de subtipos existentes de formas recombinantes circulantes (CRF).

ADN desnudo

Se trata de ADN plasmídico que contiene diferentes genes de VIS o VIH, esta nueva estrategia ha permitido sintetizar el ADN proviral de estos virus, en modelos procariontes, e incluyen los genes gag, env y más recientemente nef (Moore A. 2002) y pol (Casimiro D. 2002). En ensayos preclínicos se ha demostrado que la respuesta inmune inducida, si bien no logra por ahora bloquear la infección, si controla la replicación y por tanto la progresión a SIDA. Los grupos que ensayan con ADN desnudo, enfatizan el hecho de evaluar con mayor detenimiento, diferentes vías y dosis de administración, ya que el ADN por si solo es poco inmunogénico. Por otra parte se ha comprobado que la estrategia de inmunización más útil es el denominado régimen de prime-boost (inducción-refuerzo), o sea inducción con ADN plasmídico y refuerzo con algún vector recombinante vírico o bacteriano, (Klein M. 2003, Esparza J. 2003, Moore A.).

INTRODUCCIÓN

Vectores víricos y bacterianos recombinantes

Este modelo requiere de microorganismos atenuados, normalmente virales ó bacterianos, que expresan proteínas del VIH. de esta forma cuando los vectores se multipliquen en las células receptoras y expresen las proteínas del VIH en estudio, capaces de inducir una fuerte respuesta inmune específica principalmente celular frente al VIH, vía HLA 1. Los vectores víricos más empleados son los poxvirus atenuados, por su baja capacidad replicativa en células humanas, (Medrano L. 2002), en este grupo de vectores destaca el Ankara modificado (MVA), Canarypox (Vcp205-Vcp1452-ALVAC) (Pal R.) y el virus Vaccinia cepa Copenhagen (NYVAC). También se ha usado el adenovirus (Ad5), los alfavirus, virus de la encefalitis equina venezolana VEE, (oar.od.nih.gov). La limitante en el uso de adenovirus es la pre-existencia de inmunidad en humanos. Más recientemente se ha incluido a los virus adeno-asociados.

Los vectores bacterianos BCG y Salmonella, en su forma recombinante expresando los genes pol, env y nef, se están probando en diferentes combinaciones, dosis y vías de administración. La administración oral es de gran interés por su capacidad para inducir protección en mucosas mediante la producción de IgA secretora.

A nivel celular los resultados son alentadores logrando controlar la replicación viral y por tanto la carga viral plasmática (tabla 2).

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Modelos de vacunas VIH/SIDA

MODELO	CARACTERISTICAS	LIMITANTES
ADN Plasmídico	<p>Induce respuesta inmune específica humoral y celular contra el VIH y VIS en ratones y primates no humanos</p> <p>La inducción con ADN y el refuerzo con un vector recombinante vivo o IL-2 como adyuvante del ADN para aumentar la respuesta inmune se ha probado sucesivamente en ensayos preclínicos</p>	<p>-Dificultades para la captación del ADN, bajos niveles de expresión de los genes del VIH-1 y de transfección</p> <p>-Limitada inmunogenicidad en humanos</p> <p>-Integración en los cromosomas</p> <p>-El ADN sólo no es suficiente para inducir inmunidad protectora frente al VIS en simios</p>
<p>Vectores recombinantes, vivos</p> <p>Vaccinia</p> <p>MVA, NYVAC</p> <p>ALVAC</p> <p>Adenovirus</p> <p>AAV</p> <p>VEE</p> <p>VSV</p> <p>VHS-I y II</p> <p>BCG</p> <p>Salmonella y Shigella</p>	<p>En primates no humanos puede inducir potente respuesta CTL frente a proteínas del VIH y VIS. Altos niveles de expresión de la proteína heteróloga. Inserción de grandes fragmentos de DNA</p> <p>Patogenicidad atenuada para humanos</p> <p>-MVA es altamente inmunogénico en monos y confiere protección contra el VIS y VHS producto -res de enfermedad</p> <p>Ciclo de replicación abortivo en células humanas</p> <p>- Tropicismo para superficies de mucosas, induce inmunidad local</p> <p>Impresionante inmunogenicidad en ratones y primates no humanos usando el adenovirus serotipo 5, con replicación defectiva</p> <p>No patógeno y estable</p> <p>Administración oral</p> <p>-El inserto en estudio tiene capacidad de inducir respuesta inmune CTL en ratones y primates no humanos</p> <p>-Inserción de grandes fragmentos</p> <p>Semejante a AAV</p> <p>No expresión de proteínas virales estructurales</p> <p>Incluye varios genes virales</p> <p>Semejantes a AAV</p> <p>Fácil clonación y producción</p> <p>Tropicismo en superficie de mucosas</p> <p>Provee de expresión antigénica al huésped e inmunidad persistente</p> <p>-Induce inmunidad de larga duración</p> <p>-Seguridad confirmada durante mucho tiempo en humanos</p> <p>-Potencial vacuna pediátrica</p> <p>-Potente efecto adyuvante</p> <p>-Induce respuesta humoral y celular para proteínas de VIH y VIS expresadas en BCG recombinante.</p> <p>-Aptitud para inducir respuesta inmune en mucosas</p> <p>Diseñados para transportar plásmidos que contengan casettes de expresión de genes del VIH</p>	<p>Diseminación en individuos inmunocomprometidos</p> <p>Pre-existencia de inmunidad</p> <p>-Pre-existencia de inmunidad</p> <p>-Experiencia limitada en humanos</p> <p>-Inmunogenicidad limitada en humanos</p> <p>-Pre-existencia de inmunidad</p> <p>Pre-existencia de inmunidad</p> <p>Induce baja respuesta humoral</p> <p>Preocupación respecto a la posibilidad de integración</p> <p>Experiencia limitada en humanos</p> <p>Semejante a AAV</p> <p>Limitada capacidad de clonación</p> <p>Reajuste genético</p> <p>Alta tasa de mutación</p> <p>-Seguridad concerniente a la latencia y para su uso en personas inmunocomprometidas</p> <p>Pre-existencia de inmunidad</p> <p>Pre-existencia de inmunidad</p> <p>-Seguridad en personas inmunocomprometidas</p> <p>Reajuste genético del fragmento heterólogo de ADN</p> <p>Estabilidad <i>in vivo del plásmido</i></p> <p>Seguridad respecto al nivel de atenuación</p>
Proteínas recombinantes de la envoltura	Inducción de anticuerpos neutralizantes	<p>No induce anticuerpos neutralizantes frente al VIH-1 aislado de pacientes</p> <p>- Ausencia de respuesta CTL</p>

Tablas adaptadas de las referencias 3, 48 y 52. MVA: Modified Vaccinia Ankara; NYVAC: Mammalian Pox-virus; ALVAC: Avian Pox-virus; AAV: Adeno Associated-virus; VEE: Venezuelan Equine Encephalitis Virus; VSV: Vesicular Stomatitis Virus; HSV: Herpes Simplex Virus; BCG: Bacillus Calmette-Guerin.

INTRODUCCIÓN

I-2.4 Modelo VIS-macaco de SIDA en simios.

El VIH no puede infectar animales pequeños de laboratorio o monos del viejo mundo. Por consiguiente los investigadores han decidido usar los virus VIS o VISH (virus quimérico de VIS-VIH), como modelo de SIDA en macacos.

Muchos de los estudios prometedores sobre vacunas han usado el virus quimérico de inmunodeficiencia simio-humano, denominado SHIV 89.6p como virus reto en los macacos inmunizados. Aunque estas aproximaciones de vacuna han protegido a los monos contra el reto de la cepa patógena SHIV89.6p , los mismos no les han protegido contra el reto de SIVmac239. La limitación para el uso de SHIV89.6p como cepa reto, es su extraordinaria capacidad patogénica que induce depleción de células T CD4 y rápida progresión a SIDA en los macacos rhesus. Alternativamente, se han descrito una variedad de otras cepas de VIS y VISH, algunas de las cuales demuestran una progresión más lenta a SIDA y podrían ser útiles, para imitar su patogénesis en humanos.

I-2.5 Diseño y producción de inmunógenos.

Gracias a las aplicaciones de la biotecnología sobre los microorganismos y/o sus productos tóxicos, se logra disminuir su capacidad patogénica, facilitando así su uso, para desarrollar y producir nuevos inmunogenos. El resultado final de este trabajo científico, es una vacuna capaz de inducir respuesta inmune humoral y celular específica, frente al microorganismo en estudio, que logre que los individuos inmunizados, al infectarse por las cepas naturales no desarrollen la enfermedad. Esto sin duda constituye uno de los máximos logros de la medicina en toda su historia y ha modificado substancialmente la epidemiología de las enfermedades infecciosas prevenibles. Sin embargo, en el caso del SIDA esto no ha sido posible por las características morfo-fisiológicas del VIH y la inmunopatología propia del síndrome que causa (Koslowsky P. 2003, Goldsby R. 2003).

INTRODUCCIÓN

En la actualidad debido a las normativas médico-legal existentes en cada país el diseño, desarrollo, autorización y aplicación de una nueva vacuna, puede tardar muchos años, AIDS vaccines for the world **IAVI** 2000.

Las etapas para el desarrollo y acceso de una vacuna frente al VIH, (www.iavi.org/info@iavi.org) serian las siguientes:

1. Desarrollo del inmunógeno nuevo por ingeniería genética. Etapa de investigación básica en la que se usarán diferentes técnicas de biotecnología y biología molecular en el laboratorio para diseñar un nuevo candidato a vacuna.

2. Evaluación de inmunogenicidad en modelos experimentales animales. Comprende los ensayos preclínicos realizados en ratones y posteriormente simios, que miden la capacidad del inmunógeno en estudio para inducir una respuesta inmune celular y humoral específica frente al VIH, por medio de la inoculación del nuevo inmunogéno en grupos de animales controlados, en igualdad de condiciones con respecto a la vía.

de administración y dosis para comparar los resultados con los del grupo de animales sin inmunizar.

3. Evaluación clínica en humanos

Fase I – Seguridad, dosis óptima y vía de administración del candidato a vacuna; en decenas de personas sanas, sin ningún riesgo confirmado de tener o adquirir la infección.

Fase II – Inmunogenicidad de la vacuna en centenas de personas sanas sin la infección, pero vulnerables a la misma, comparados con igual número de voluntarios que reciben un placebo, para confirmar seguridad, respuesta inmune y su persistencia.

Fase III – Eficacia de la vacuna, en miles de voluntarios, VIH seronegativos y con alto riesgo de infección para el VIH, lo que nos

INTRODUCCIÓN

permitiría determinar si la vacuna en estudio previene la infección por el virus salvaje en el grupo inmunizado, comparandolo con el grupo control que recibió el placebo.

I-2.6 Ensayos clínicos de candidatos a vacunas frente al VIH. Decepción y confusión.

Los avances en el diseño de vacunas, los modelos animales disponibles, y la investigación clínica están convergiendo para crear una línea prometedora de candidatos a vacunas frente al VIH (tabla 2). Actualmente, se están desarrollando ensayos clínicos de 30 candidatos de vacunas frente al VIH en 19 países (tabla 3). El primer ensayo fase I de un candidato a vacuna se emprendió en los EE.UU. en 1987. Las primeras vacunas probadas estaban basadas en las glicoproteínas de la envuelta del VIH-1 gp120 o gp160, con la idea de inducir anticuerpos neutralizantes.

En junio de 1998, VaxGen empezó el primer ensayo fase III que incluyó a 5009 voluntarios de EE.UU., Holanda y Puerto Rico. La vacuna candidato AIDSVAX B/B (VaxGen), está compuesta de formas recombinantes de la proteína de superficie gp 120 de dos cepas del VIH-1 subtipo B. La reducción de infección entre la muestra completa de voluntarios incluyendo todos los grupos raciales, era de 3,8%. Había 67% menos infecciones de VIH entre las minorías étnicas, sin tener en cuenta a los individuos hispanos y 78% menos infecciones de VIH entre voluntarios negros que recibieron la vacuna comparados con el placebo. La protección parecía tener correlación con el nivel más alto de anticuerpos neutralizantes vacuna-inducidos observado en estos grupos, pero no indujo una respuesta celular suficientemente alta en la mayoría de la muestra. Los resultados también indicaron que AIDSVAX, fue bien tolerado y que tenía un buen perfil de seguridad, pero globalmente la gp120 AIDSVAX fue incapaz de prevenir la infección de VIH (McCarthy M. 2003).

La misma compañía inició un segundo ensayo fase III en marzo de 1999 en Tailandia, reclutando a 2500 voluntarios y usando una gp120 bivalente derivada de los subtipos B y E. Los resultados de eficacia han mostrado

INTRODUCCIÓN

recientemente que esta gp120 es incapaz de prevenir la infección por el VIH-1. El gobierno de los E.E.U.U. está patrocinando recientemente un ensayo de fase III en Tailandia de una vacuna basada en el vector replicativo vivo canarypox/ALVAC con refuerzo de gp120 monomérica (Cohen J. 2003). Destacados investigadores discreparon con este estudio porque consideran que no hay datos persuasivos para sugerir que la combinación de ALVAC y gp120 pudiera inducir una mejor respuesta celular o humoral (Burton D.R. 2004, que la inducida por estos vectores por separado. A pesar de todo ello el Ministerio de Salud Pública de Tailandia seguirá adelante con este ensayo en dos provincias, (Trivuthipong C. 2004). En ensayos clínicos de fase I/II, el canarypox recombinante ha mostrado seguridad e inmunogenicidad, induciendo bajos niveles de respuesta por anticuerpos en un 70% de vacunados y respuesta CTL en 30% de los individuos en cualquier punto de tiempo después de la vacunación (Shiver J.W.). Debido a esta limitada habilidad del vector Canarypox recombinante (gp120), para inducir respuesta CTL específica anti VIH, la red de ensayos de vacunas VIH (HVTN), cancelo los estudios de Fase III en los E.E.U.U., usando el régimen Canarypox recombinante con y sin gp 120.

Los resultados de inmunogenicidad de una vacuna frente al VIH con Adenovirus serotipo 5 /Gag (subtipo B) demostraron respuesta CTL significativa en humanos y exhibió reactividad cruzada con diferentes subtipos. Pero los informes también muestran un claro efecto que limita la respuesta inmune, en las personas con inmunidad pre-existente frente a Ad5 (Emini E.A. 2002). El ADN expresando gag, ha mostrado inmunogenicidad baja en voluntarios vacunados las semanas 0, 4, 8 y 26. Comparando los datos de inmunogenicidad de la combinación ADN/Ad5 y Ad5/Ad5, (Emini E.A. 2002), parece ser que el mejor régimen es inducir con Ad5 y complementarlo con un refuerzo de Ad5.

En África, el primer ensayo de fase I/II con vacunas VIH se emprendió en Kampala, Uganda, con el modelo vCP205 ALVAC, basada en canarypox que expresa los genes env pol y gag de VIH-1, subtipo B (McCarthy M. 2003). Aunque la inmunogenicidad de esta vacuna basada en ALVAC-VIH-1 clase B

INTRODUCCIÓN

era baja, ésta indujo respuesta celular T CD8+ con actividad cruzada contra antígenos clase A y D, en una proporción significativa de individuos vacunados (Cao H. 2003).

El primer ensayo de vacunas frente al VIH en África, usando las cepas del VIH de ese continente se realizó en Nairobi, Kenya, en 2001 el candidato probado fue el ADN desnudo y el virus vaccinia modificado, cepa Ankara (MVA), expresando la proteína entera gag y diferentes epítomos CTL del VIH-1, subtipo A predominante en África del este, (Boaz M. 2003, Weidle P.J. 2002).

Por otra parte cabe destacar que sólo 2 % de los 110 ensayos de vacunas VIH que se han completado, han incluido niños en sus ensayos clínicos debido a razones deontológicas. Mientras no sea posible por estas causas incluir niños en cada ensayo de vacunas, nosotros no podríamos asumir que una vacuna desarrollada para los adultos puede funcionar en los infantes (Jeffrey T. 2003).

I-2.7 Novedades y aportaciones científicas de la conferencia mundial sobre vacunas contra el VIH, Lausanne septiembre 2004.

La conferencia contó con la presencia de 800 científicos y fue co-organizada por el Hospital Universitario de Lausanne y la Fundación EuroVac. Se trataron temas relacionados con la necesidad del desarrollo de vacunas preventivas y terapéuticas, inmunología, vacunas pediátricas, ensayos clínicos y de la política económica para su financiamiento.

Inmunidad celular

Autores renombrados han descrito defectos funcionales en la inmuno respuesta específica de células T CD8, (asociadas al control de la viremia por lisis de células infectadas) no medida por ensayos interferón gamma, indicando que la respuesta de células T CD8 frente al VIH es de naturaleza muy compleja (otras citocinas IL-2, MIP1b y TNFa) y que las múltiples funciones de la respuesta inmune de las células T CD8 deben ser medidas con precisión en personas infectadas por el VIH, para conocer su papel (Betts M. 2004).

INTRODUCCIÓN

Vectores

Lorin C. et al. (2004), presentaron al virus de la vacuna del sarampión como un potencial vector para vacunas anti VIH, considerando que esta vacuna MV-HIV polivalente podría proteger a niños y adolescentes contra el sarampión y el SIDA. Ellos construyeron un virus del sarampión recombinante vivo, expresando diferentes genes del SHIV (gag, env, tat y nef). Con este virus denominado cepa SHIV89.6p, inmunizaron macacos confirmando inmunogenicidad además de fuerte y temprana protección de tipo celular en 4 de los 6 animales después del reto.

Inmunidad preexistente en humanos al adenovirus 5 (Ad5) limitaron la inmunogenicidad y utilidad clínica de la vacuna antiVIH basada en el vector Ad5 recombinante y su capacidad de priming o boosting (Barouch D. 2004).

Nuevos inmunogenos para inducir anticuerpos neutralizantes.

Se describieron secuencias del ADN codificante de gp120 generando variantes de nuevos genotipos antigénicos que mejoran la producción de anticuerpos (Xu L. 2004). Presentaron además información sobre el rinovirus recombinante vivo (HRVs), que expresa inmunogenos del VIH, pero manifestaron desconocer si se mantiene la estructura tridimensional de los determinantes antigénicos en su vector. Mencionaron sobre todo la presencia del epítipo conservado ELDKWA de gp41 que interactúa con el Ac neutralizante humano 2F5 (Arnold G.F., 2004). El proyecto Eurovac, reportó la producción adecuada de glicoproteína recombinante clase C y su posible uso vacunal al inducir anticuerpos monoclonales en sueros de animales y humanos evaluados. Un modelo logró inducir fuerte respuesta celular virus-específica, por avances en la inducción de inmunidad innata, como estimulación de quimiocinas que compiten con el VIH por los correceptores o la desregulación de los mismos en las células blanco. Esta respuesta logra controlar la replicación viral y evita temporalmente la progresión a SIDA, en monos Rhesus confrontados con cepas patógenas del VIH sin embargo el escape viral a las CTL hace que finalmente el modelo fracase, dejando importantes conocimientos y experiencia considerables en futuras propuestas y ensayos.

INTRODUCCIÓN

Polémico también fue el análisis del ensayo prime boost del modelo ALVAC/AIDSVAX y su impacto público y médico para considerarlo en futuros ensayos de fase III. Más prometedor han sido los ensayos de inmunización terapéutica que posiblemente inducen fuerte inmunidad celular, capaz de controlar la replicación viral, basado en células dendríticas representan una prometedora esperanza en el futuro.

El rápido crecimiento de la pandemia de SIDA, exigen la cooperación y apoyo científico mundial para acelerar el desarrollo de posibles candidatos a vacunas.

Con altos niveles de calidad, inocuidad, economía y disponibilidad para todos los países más afectados.

I-2.8 Vacunas terapéuticas

La terapia antirretroviral contra el VIH es limitada por su costo, toxicidad, emergencia de cepas resistentes y sobre todo por su incapacidad para eliminar todos los reservorios del virus en el organismo humano. Algunos investigadores han propuesto que el uso de vacunas podría ser de utilidad para incrementar la respuesta inmune específica contra el VIH.

El optimismo generado por la aparición del Remune, vacuna terapéutica basada en viriones completos del VIH-1 o incompletos por deleción de la envoltura e inactivados con formaldehído y administrados con el adyuvante incompleto de Freund (lisados bacterianos), fue desalentador por los resultados observados en un ensayo clínico (806), que finalmente no consiguió el objetivo de proporcionar beneficios adicionales a la terapia.

Recientemente Lu W. et al.(2004), han publicado los resultados preliminares de su investigación sobre la eficacia de una vacuna terapéutica basada en células dendríticas en personas con infección crónica por el VIH. Este es el primer informe en humanos, donde se muestra que una vacuna terapéutica basada en células dendríticas autólogas derivadas de monocitos (MD-CD), pulsadas con el VIH-1 autólogo inactivado con aldrithiol-2, es capaz de inducir una respuesta inmune efectiva y específica de células T frente al VIH-1, suprimiendo sostenidamente al virus. Previamente el mismo grupo había detectado en

INTRODUCCIÓN

monos macacos, una respuesta inmune específica celular y humoral frente al VIS mediada por vacunación con células dendríticas pulsada con VIS químicamente inactivado. Bhardwaj et al. describió que las células dendríticas maduras infectadas con el vector viral canarypox, podrían potencialmente inducir respuesta de células T, CD8 y CD4 ayudadoras in vivo.

Estos resultados son prometedores y refuerzan el concepto de que combinando la terapia HAART con células dendríticas derivadas de monocitos (MD-DCs) y pulsadas ex vivo con el virus autólogo inactivado con calor, podría inducir/reforzar la respuesta celular T CD8+ y CD4+, anti VIH-1 la cual podría ayudar a conseguir el control inmunológico de la replicación viral, después de suspender la terapia HAART.

Otra alternativa para incrementar la inmunidad específica anti VIH en personas infectadas, con terapia ART es la interrupción estructurada del tratamiento (STI). Algunos autores han descrito incrementos en la respuesta inmune específica anti VIH con control transitorio de la replicación viral después de STI en pacientes con ART durante la infección aguda. Sin embargo, los resultados de STI en individuos crónicamente infectados han sido decepcionantes.

En un ensayo fase I, el vector MVA expresando el gen nef del HIV-1, administro 3 dosis de la vacuna a 14 sujetos con HAART, con niveles plasmáticos menores de 50 copias/ml y recuento de CD4 por encima de 400 cél/ml, logrando inducir el reconocimiento de nuevos epítomos por las células T CD8+ y CD4+ en 10 de los 16 sujetos.

Los investigadores ahora tienen la esperanza de que la inducción de respuesta inmune específica frente al VIH-1, mediante la vacunación podría facilitar el control de la replicación viral de forma sostenida de tal manera que eventualmente permitiría la suspensión del tratamiento antirretroviral en sujetos infectados.

I-2.9 Conclusiones

En la actualidad se desconoce la correlación existente entre inmunidad y protección en la infección por el VIH. Se cree que la combinación de múltiples respuestas inmunes actuarían como una barrera protectora frente al VIH.

INTRODUCCIÓN

Inicialmente se pensaba que las vacunas frente al VIH tendrían que inducir inmunidad esterilizante pero ahora se ha aceptado que las vacunas podrían ser efectivas si logran inducir una respuesta inmune capaz de reducir la carga viral. Una carga viral baja se ha asociado con lenta progresión de la enfermedad y menor transmisión, aunque los efectos a largo tiempo aún son desconocidos.

Hasta el momento se han diseñado varios modelos de vacunas para inducir respuesta inmune celular específica frente al VIH y potentes anticuerpos neutralizantes, capaces de suprimir el escape inmunológico del virus. Seguramente en los programas de desarrollo de nuevas vacunas se tendría que tener en cuenta la inducción de inmunidad innata más efectiva como sería la estimulación de quimiocinas inhibitoras de VIH, o más probablemente la disminución de la expresión de algunos factores celulares como el receptor de quimiocina CCR5.

El desarrollo de grandes ensayos clínicos de fase III en humanos de nuevos candidatos de vacunas frente al VIH, que sean inadecuados son realmente desaconsejables. Además deberíamos tener un consenso sobre los end-points inmunológicos aceptados por toda la comunidad científica para poder pasar de ensayos humanos de fase II a la fase III.

Respecto a las vacunas terapéuticas el uso de células dendríticas en el desarrollo de este modelo vacunal tiene un futuro prometedor.

Por otra parte, cabe resaltar que un importante reto para el desarrollo de ensayos clínicos fase III de vacunas es la identificación y reclutamiento de población seronegativa y con alto riesgo de infección por el VIH. Los investigadores tienen que desarrollar estrategias para interrelacionarse con personas que trabajan con usuarios de drogas, trabajadores sexuales y otros grupos de riesgo que faciliten su acceso a los centros de salud para consejería, selección, diagnóstico, y seguimiento de la infección por el VIH. Además tienen que encontrar una manera para resolver la posible resistencia que tienen esos grupos para participar en ensayos con vacunas anti VIH.

La rápida progresión de la epidemia del VIH en todo el mundo tiene grandes repercusiones sociales, políticas y económicas a nivel internacional. Por lo que se requiere un esfuerzo y una participación global para desarrollar una

INTRODUCCIÓN

vacuna contra el SIDA. A pesar de que hay muchos obstáculos que superar con el esfuerzo de los investigadores para el desarrollo de más modelos de vacunas y con el compromiso de la comunidad internacional para proveer los recursos necesarios, a los países en vías de desarrollo posiblemente en el futuro podremos encontrar una vacuna para controlar la epidemia de SIDA en todo el mundo.

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Ensayos clínicos vacunas preventivas, actualmente en desarrollo.

CANDIDATO A VACUNA	INICIATIVA	SUBTIPO	FASE	PAÍS
ALVAC-HIV Vcp1521,AIDSVAX	VaxGen, HVTN, NIAID,			
gp120	Health Ministry Thailand	B and E	III	Tailandia
rgp120	Chiron	E and B	II	Tailandia
PGA2/JS2 DNA	NIAID/HVTN	B	III	USA
MRK Ad5 (gag/pol/nef)	Merk	B	I	USA
EnvPro gp140	SJCRH	D	I	USA
ALVAC vCP205,MRKAd5(gag)	AventisPasteur/Merk	B	I	USA
ADVAX DNA	ADARC,IAVI	C	I	USA
tgAAC09 AAV	CCRI, IAVI	C	I	Bélgica
NYVAC-HIV C	Eurovac, A.Pasteur	C	I	Suecia, UK
gp160 MN/LAI-2	ANRS, A. Pasteur	B	I	Francia
tat DNA	ISS, Parexel	B	I	Italia
EP HIV-1090 DNA	NIAID, HVTN	B	I	Botswana, USA
MRK Ad5-gag	NIAID, HVTN, Merk	B	II	Perú, Tailandia
HIVA.MVA	IAVI, Cobra, IDT	A	I	SudÁfrica,
AVX 101 VEE	NIAID, HVTN, Alpha-Vax	C	I	Suiza, UK
HIVA.DNA y/o HIVA.MVA	IAVI, KAVI, MRC, Cobra, IDT	A	I	SudÁfrica, USA
HIVA.DNA y/o HIVA.MVA	IAVI, UVRI, Cobra	A	I	Kenia, UK
PHIS-HIV-B; FPV-HIV-B	NIH, UNSW,ATVC	B	I/II	
ALVAC vCP 1452(env,gag,pol)	NIAID	B	IIb	Uganda Australia
VCR-HIVDNA009-99-VP-env	NIAID/VRC	A,B,C	I	USA, Brasil,Haiti,
		B	I	Perú,TrinidadTobago
	NIAID	B	I	USA
VCR-HIVDNA00999VP-gag,pol,nef	FIT Biotech	B	I	USA
Nef-Tat fusion/gp120	ANRS	B	I	USA
GTU-Nef DNA				Finlandia
LIPO-4T lipopeptide-gag,pol,nef,TT		B		Francia

Abreviaturas: **ADARC**: Aaron Diamond AIDS Research Center; **ANRS**: Agence Nationale de Recherche sur le SIDA; **ATVC**: Australian– Thai HIV Vaccine Consortium; **CCRI**: Columbus Children’s Research Institute; **EuroVac**: European Vaccine Effort Against HIV/AIDS; **HVTN**: HIV Vaccine Trials Network; **IAVI**: International AIDS Vaccine Initiative; **IDT**: Impfstoffwerk Dessau Tornau GmbH; **ISS**: Instituto Superiore di Sanità; **KAVI**: Kenya AIDS Vaccine Initiative; **MRC**: UK Medical Research Council; **NIH**: National Institutes of Health; **NIAID**: National Institute of Allergy and Infectious Diseases; **SJCRH**: St Jude Children’s Research Hospital; **UNSW**: University of New South Wales; **UVRI**: Uganda Virus Research Institute. Adapted from Vaccine Trials database of IAVI 2004 (see: www.iavireport.com)

I-3 VACUNA FRENTE AL VIH BASADA EN BCG

INTRODUCCIÓN

RECOMBINANTE

I-3.1 Introducción y progresos en el estudio de BCGr

La necesidad de una vacuna contra el VIH/SIDA es cada día mayor. Actualmente 40 millones de personas viven con VIH/SIDA. El acceso universal a los antirretrovirales es limitado, especialmente para los países subdesarrollados lo que representa un gran reto. Adicionalmente la terapia antirretroviral altamente activa (HAART), no logra reducir la carga viral en todos los pacientes (Perrin L. 1998) y tampoco logra restaurar la respuesta específica de células T ayudadoras CD4+ y células T citotóxicas CD8+ en pacientes con infección crónica por el VIH.

Existen fuertes evidencias del importante papel de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) en el control de la replicación del VIH (Koup L. 1994, Rowland-Jones S.L. 1998). Se han desarrollado varios candidatos de vacunas para inducir una respuesta CTL específica frente al VIH. Un candidato prometedor sería *Mycobacterium bovis*, Bacillus Calmette Guerin (BCG), como bacteria viva recombinante vehículo de vacuna. BCG es una cepa avirulenta de *M. bovis*, atenuada por múltiples pases de cultivo *in vitro* durante 13 años en el Instituto Pasteur (1918) y es un germen de crecimiento lento que se replica cada 24 hrs. Sus propiedades adyuvantes residen en el componente de la pared celular (dipéptido muramil) (Melancon-Kaplan J. 1988). La vacuna BCG se ha usado para inmunizar a millones de personas contra la tuberculosis, con un gran porcentaje de seguridad de uso en humanos, induciendo inmunidad duradera (Altet G.M. 2003, Bloom B. 1994, Colditz G.1994). Además se ha demostrado que cepas auxotróficas de BCG representan una potencial vacuna, segura y útil contra la tuberculosis para población con riesgo para el VIH.

El desarrollo y comprensión del sistema genético micobacteriano, ha sido difícil por su lento crecimiento y las características especiales de su pared celular que hacen que se agregue en cultivo. Se han descrito importantes contribuciones que han mejorado el entendimiento de su sistema genético. (Bloom B.1987, Jacobs W.R. 1987) describieron inicialmente el desarrollo de un plasmido puente (shuttle plasmid), E.coli-micobacteria (Jacobs W.R. 1987).

INTRODUCCIÓN

Ellos identificaron un segmento de 1.8-kilobase (oriM) del plasmido pAL5000 aislado de *Mycobacterium fortuitum*, que permitía la replicación en *M. smegmatis* y BCG. El grupo de Yamada diseñó un sistema de secreción de antígenos heterólogos en micobacterias usando el promotor α -antígeno (Matsuo K. 1990). Stover C.K.1 1991 ., desarrollaron 2 sistemas diferentes para propagar ADN extraño en micobacterias: un plasmido multicopia extracromosomal y uno monocopia integrativo en el cromosoma micobacteriano (Fuerst T.R. 1991 y 1992). Importantes contribuciones han sido hechas por Tyagi et al (2000), sobre el uso de BCGr en el desarrollo de vacunas. Ellos han desarrollado un sistema genérico de vectores para la expresión de genes a diferentes niveles bajo el control de una batería de promotores micobacterianos para aumentar la inducción de respuesta inmune (Dhar N. 2000, Dietrich G. 2003, Husson R.N. 1990 y Ziv E. 2004).

El incremento en la respuesta inmune por BCG recombinante (BCGr), fue descrito primero por (Stover et al 1991, Aldovini et al 1991). Usando los plasmidos extracromosómico e integrativo, como vectores de expresión en BCG de las proteínas β -galactosidasa de *E.coli* y gag, TI, Pol y env del VIH, bajo el control de los promotores hsp60 y hsp 70. Dichos grupos describieron que cuando los ratones eran inmunizados con BCGr, se detectaba una respuesta mediada por anticuerpos y células. Winter y col. usaron el promotor groES/EL de *Streptomyces albus* y el promotor pAN de *M. paratuberculosis* para expresar antígenos extraños en BCG (Winter N. 1991 y 1995) . Lagranderie M.1. et al (1993) observaron que cuando los cobayos eran inmunizados con BCGr:lac Z por vía oral o respiratoria, se detectaban altos niveles de respuesta humoral (local, sistémica) y celular (Lagranderie M. 1993).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Expresión de antígenos del VIH y VIS en BCG recombinante e Inmunidad inducida

a) **MODELO MURINO: RATONES Balb/C**

REFERENCIAS	ANTÍGENO RECOMBINANTE	PROMOTOR SEQUENCIA SEÑAL Y VECTOR DE EXPRESIÓN	RUTA	NUMERO DE CÉLULAS (c.f.u)	INDUCCIÓN	INMUNIDAD INDUCIDA
Stover et al.1991	lacZ de E.coli (B – galactosidasa)	hsp60 pMV261 vector (extracromosomal)	Dosis simple. IV,id,IP	2×10^2 2×10^4 2×10^6		Anticuerpos anti β -galactosidasa por todas las vías con 200 ufc IV y 10^4 ufc. ID fueron suficiente para obtener altos titulos de Ac. Con pico en la semana 8 IFN- γ ,CTL.
Stover et al. 1991	gp120 del VIH-1	hsp60 pMV361 vector (integrativo)	Dosis simple	1×10^6		No induce titulos significativos de anticuerpos (dilución>1:100)CTL
Anna Aldovini and Richard Young.1991	Gag del VIH-1 Env del VIH-1	hsp70 Vector multicopia (extracromosomal)	Id or IV	5×10^6	5×10^6 a la semana 4 y 8	IFN- γ (gag VIH) CTL (gagVIH) 3 de 5 vacunados con BCG:gag VIH y 1 de 5 vacunados con BCG:VIH-env tenían niveles detectables de IgG
Winter et al. 1991	Nef del VIH-1	GroES/groELp de Streptomyces albus	Subcutanea	10^7		Respuesta proliferativa células GL(inguinal): 14 días después de la inoculación.
Fuerst et al.1992	gp41 del VIH-1	Hsp70 pMV273 vector (extracromosomal)	Dosis simple ID	10^6		Anticuerpos fueron detectados desde la 4ta. Semana y se incrementaron hasta las 16 semanas después de la inmunización (gp41 VIH-1)

INTRODUCCIÓN

	gp120 del VIH-1 vector PMV361	Hsp60 PMV361(integrativo)	IV	10^6		No se indujeron títulos significativos de anticuerpos anti gp120 CTL anti gp120.
Honda et al.1995	19-aa de la secuencia V3 del VIH-1 fusionado al α -antígeno de Mycobacterium kansasii	Promotor y secuencia señal α – anfigeno	Dosis simple SC	3×10^6		CTLs Protección con SCID/hu y SCID/PBL en ratones.
Winter et al.1995	SIVNef	Secuencia del promotor PAN del elemento de inserción IS900 de Mycobacterium paratuberculosis	Subcutanea	10^7		CTL y respuesta celular proliferativa GL (inguinal): 14 días después de la inoculación.
Wada et al. 1996	VIH-1(IIIb) p17gag epítipo para células B (aa92-110) fusionado a α -antígeno de Mycobacterium kansasii		Subcutanea	10^8	Week2,4 and 6	Pico de Ac en la 8ª. semana En 2 de los 7 ratones el título de Ac persistio hasta los 14 meses
Lagranderie M.2.et al.1997	VIS-Nef	Secuencia del promoter PAN del elemento de inserción IS900 de Mycobacterium paratuberculosis	ORAL	10^9 (x 5 días consecutivos) Total: 5×10^9		Respuesta proliferativa (Bazo y GL cervicales) en las semanas1,2,4,8 y 12 Se indujo respuesta proliferativa 1 mes despues de la inmunización. Pico a los 2 meses CTL (Bazo y GL): en el mes 1,2 y 3 Elevada respuesta CTL en el mes 1,2 y 3 en el bazo

INTRODUCCIÓN

<p>Lim et al. 1997 (</p>	<p>Env de VIS (aa 1-245 : N-terminal medio)</p>	<p>Promotor β-lactamasa de Mycobacterium fortuitum Fusionado al gen β-lactamasa de Mycobacterium fortuitum.</p>	<p>IV S.C.</p>	<p>5×10^6 10^7</p>	<p>10^6 Ac en las semanas 4 y 8</p>	<p>Pico de Ac en la semana 10 (se registran títulos hasta la semana 24) Ac neutralizantes contra aislados primarios del VIS CTL : en GL 14 días después de la inmunización</p>
<p>Lagranderie M. et al. 1998</p>	<p>Cocktail de BCGr: BCGr-VIS-Nef , BCGr-VIS-gag BCGr-VIS env</p>	<p>Secuencia de promotor PAN IS900 elemento insertado de M. paratuberculosis (SIV gag y nef) Env de VIS (N-ter. de gp110 fue fusionada al gen β-lactamasa y el Promotor B-lactamasa de M.fortuitum. (Env de VIS)</p>	<p>ORAL, NASAL, RECTAL</p>	<p>4.5×10^9 3×10^7 9×10^8</p>		<p>Respuesta de Ac inducida contra env y gag de VIS No respuesta de Ac contra nef de VIS IgA:+ 5 semanas después de la inmunización por todas las vías (elevados en heces) IgG:+ 5 semanas después de la inmunización por todas las vías CTL (en Bazo): fuerte CTL contra nef,env y gag de VIS a las 5 semanas después de la inmunización (todas las vías)</p>

INTRODUCCIÓN

b) MODELO ANIMAL COBAYOS

REFERENCIAS	ANTÍGENO RECOMBINANTE	PROMOTOR, SECUENCIA SEÑAL Y VECTOR DE EXPRESIÓN	VÍA	NUMERO DE CÉLULAS (c.f.u)	REFUERZO	IMMUNIDAD INDUCIDA
Lagrandarie M.1. et al. 1993	LacZ de E. coli	Secuencia del promotor PAN IS900 elemento insertado de Mycobacterium paratuberculosis	ID Oral Aerosol	10 ⁶ (id) 6x10 ¹⁰ (oral) : 2x10 ¹⁰ (3 veces c /24h) 10 ⁸		Ac a las 2 semanas. Altos títulos a las 16 semanas todas las vías, similar respuesta de Cel.T respuesta proliferativa (Bazo y GL cervicales). La respuesta de GL cervicales fue más temprano (2 semanas) que las cel. Del bazo. Las respuestas del bazo fueron mayores a las semanas (oral y aerosol)
Honda et al. 1995 (Secuencia de 19-aa del V3 de VIH-1 fusionada a α -antígeno de Mycobacterium kansasii	Promotor α -antígeno y secuencia señal de α -antígeno.	Dosis única			Los 20 cobayos tenían títulos detectables de Ac (1:160 a 1:2560) contra el péptido V3 Neutralización de aislados primarios (cobayos) DTH específica en cobayos
Lim et al. 1997	Env de VIS (aa 1-245 : N-terminal)	Promotor β -lactamasa de Mycobacterium fortuitum Fusionado al gen β -lactamase de Mycobacterium fortuitum.	Subcutanea y oral	10 ⁹ s.c 6x10 ¹⁰ oral	10 ⁶ para Ac semana 4 y 8	Ac (IgG) Ac (IgA) Ac Neutralizantes contra aislados primarios de VIS (s.c) No Ac en cobayos inmunizados oralmente

INTRODUCCIÓN

c) MODELO ANIMAL MONOS: MONOS RHESUS

REFERENCIAS	ANTÍGENO RECOMBINANTE	SECUENCIA SEÑAL, PROMOTOR Y VECTOR DE EXPRESIÓN	RUTA	NUMERO DE CÉLULAS (c.f.u)	REFUERZO	INMUNIDAD INDUCIDA
Yasutomi et al.1993	Gag de VIS aa126 –362	Hsp60 pMV261 extracromosomal	ID	10 ⁸	Semana 19	CTL: 4 semanas después del refuerzo <19 semanas: No Ac No CTL >19 semanas: No Ac Si CTL
Yasutomi et al. 1995	Péptido p11C de gag del VIS	Promotor Hsp60 pMV261	ID	10 ⁸ 2 inoculaciones (semana 19)	Refuerzo con peptido(liposoma). Mes 13 después de la inoculación con BCGr	No Ac CTL No protección después del desafío IV.
Leung et al. 2000	Gag, pol, nef, y env de VIS	Promotor hsp70 pMV261	Dosis única IV			CTL contra gag, pol y env de VIS en 5 de los 6 monos IgA e IgG anti gp130. Las respuestas se incrementaron después de la inmunización.

INTRODUCCIÓN

Semejantes resultados fueron obtenidos por Stover et al (1993), al inmunizar los ratones con BCGr expresando la proteína A (Osp A) en su superficie, de *Borrelia burgderfiori*. La inmunización indujo una respuesta humoral protectora. Langermann et al (1994) demostraron respuesta humoral protectora frente a la infección por *Streptococcus pneumoniae* , después de inmunizar ratones con BCGr expresando proteína A (Psp A) (Langermann S. 1994). Se ha detectado también inmunidad protectora contra leishmaniasis (Connell N.D. 1993), schistosomiasis (Varaldo P.V. 2004), malaria (Zheng C. 2003), toxina del tétanos (Mazzantini K. P. 2004), toxina del cólera (Biet F. 2003) .

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Expresión de Antígenos heterólogos en BCGr

Antígeno recombinante	Inmunidad inducida	Referencia
Bacteria		
<i>B. burgdorferi</i> OspA	IgA e IgG, protección contra la infección modelo murino	Stover et al. 1993
<i>S. pneumoniae</i> PspA	IgG, protección contra la infección.	Largermann et al 1994.
Virus		
VIH-1 nef	INF- γ	Winter et al 1995.
gp120	INF- γ , CTLs	Stover et al 1991
péptido V3	Anticuerpo neutralizantes, CTLs Protección en ratones	Honda et al 1995.
gag	INF- γ Ac, CTLs	Aldovini et al 1991.
envuelta	INF- γ	Aldovini et al 1991.
Nucleoproteína, virus sarampión	Protección contra la infección	Fennelly et al 1995.
Parásitos		
gp63 de Leishmania mayor	Protección contra la infección	Connell et al 1993.
Citocinas		
IL-2 murina	IF γ	O'Donell et al 1994.
IL-2 de rata	IF γ	O'Donell et al 1994.
IL-2 humana	Disminución u.f.c. de BCG	Kong et al 1995.

I-3.2 Expresión de antígenos de VIH y VIS en BCGr e inducción de respuesta inmune.

En 1990, Matsuo y colaboradores (Infection and Immunity 1990), desarrollaron un sistema micobacteriano para la secreción de antígenos heterólogos usando

INTRODUCCIÓN

α -Ag de *M.kansasii* (K- α), como proteína transportadora para secretar antígenos extraños fusionados a partir de BCGr (Matsuo K. 1990). Usando este sistema Wada y colaboradores (1996) confirmaron fuerte y duradera respuesta humoral contra el epítipo de células B del gen gag del VIH-1 fusionado al α -Ag (Wada N. 1996). La respuesta persistió por más de 14 meses, en los ratones inmunizados con BCGr expresando este epítipo. El grupo Matsuo Honda empleo este sistema con BCGr secretando el principal péptido determinante de neutralización (PND) de la secuencia consenso japonesa, de la región V3. Después de la inmunización de 20 cobayos con esta BCGr-PND, ellos detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes para VIH-1 de laboratorio y aislados primarios. Además la administración de suero de los cobayos vacunados fue capaz de bloquear la infección por el VIH en ratones con trasplante de hígado/timo y severa inmunodeficiencia combinada (SCID)hu o (SCID)PBL (Honda M. 1995).

Stover y colaboradores (1991), expresaron varios antígenos del VIH-1: gag, RT, gp120 y gp41, de BCGr bajo el control de los promotores hsp60 y hsp70, usando los plásmidos extracromosomal e integrativo (Stover C.K. 1991). Aldovini y Young (1991), empleando el plasmido multicopia para expresar los genes gag, pol y env del VIH, bajo el control del promotor hsp70 (Aldovini A. 1991). Ambos grupos de investigación detectaron anticuerpos y respuesta celular contra los antígenos del VIH-1 en los ratones inmunizados con esa BCGr.

Winter y colaboradores (1991), inmunizaron ratones con BCGr expresando el gen nef del VIH-1, bajo el control del operon groES/groEl de *S. albus*. Después de 14 días de la inoculación se indujo respuesta proliferativa específica en los ganglios linfáticos inguinales (Winter N. 1995).

En 1998 inmunizaron vía mucosas a ratones con una mezcla de 3 cepas de BCGr (con el promotor pAN de *M. paratuberculosis*), expresando las proteínas de los genes nef, env y gag del VIS. La inmunización en las mucosas indujo anticuerpos IgA además de IgG y linfocitos T citotóxicos (CTLs), a nivel sistémico frente a los 3 antígenos del VIS (Lagranderie M. 1998).

Yasutomi y colaboradores (1993), después de inmunizar a monos Rhesus con BCGr expresando SIVgag (aa 126-362) detectaron una respuesta CTL CD8+

INTRODUCCIÓN

específica frente a gag del SIVmac25 clase 1 restringida por HLA (Yasutomi Y. 1995). Leung y colaboradores (2000), estudiaron la inmunogenicidad de 4 cepas de BCGr expresando las proteínas gag, pol, nef y env del VIS. Una simple y simultánea inoculación de las 4 cepas recombinantes indujo respuesta CTL específica contra gag, pol, nef y env; y anticuerpos IgA e IgG contra gp120. Esta inmunidad humoral se incremento con el tiempo después de la inmunización (leung N.J. 2000).

I-3.3 Efectos de la pre-inmunización con BCG sobre la respuesta a antígenos extraños expresados en BCGr.

En ratones previamente inmunizados con BCG, que fueron subsecuentemente inmunizados con BCGr expresando cualquiera de los antígenos nef de VIH-1 o β -galactosidasa de E.coli, se observo que la respuesta proliferativa contra nef o la β -galactosidasa de E.coli fue decreciendo. Sin embargo, esta supresión nunca excedió el 50% y se asocio con la reducción del crecimiento de BCG en los nódulos linfáticos y el bazo. Contrariamente, los ratones con BCG desarrollaron altos niveles de anticuerpos anti β -galactosidasa después de la inmunización con BCGr expresando este antígeno y los niveles no fueron limitados por la inducción previa con BCG (Gherghiu M 1994).

Kameoka y colaboradores (1994), observaron similares niveles de respuesta CTL péptido-específica (murina clase I, HLA H-2d CTL restringida) en ratones BALB/c preinmunizados y no inmunizados con BCG antes de la inoculación con BCGr expresando V3 env (15aa Arg 315 a Lys 329), (Kameoka M. 1994).

Un inmunogéno consistente en PPD-conjugado al péptido del loop V3 de 5 cepas de VIH-1, fue probado en 7 sujetos seropositivos al VIH-1 y prueba cutánea de PPD positiva. Los vacunados exhibieron un uniforme incremento de anticuerpos neutralizantes, que se incrementaron con el tiempo para la cepa de laboratorio y aislados primarios de VIH-1 (Rubinstein A. 1999).

La inmunización preexistente con BCG no ha presentado interferencia con el uso de BCGr como vector vacunal, ni BCG usada como inmuno adyuvante en el tratamiento de ciertos carcinomas (Kavoussi L. 1988, Alexandroff A. 1999, Yu D. 2004 y Lee C.F.1,2 2004).

Estos resultados indican que la inducción previa con BCG, no serian limitantes

INTRODUCCIÓN

para el uso de vacunas con BCGr en humanos.

I-3.4 Inmunización con BCGr en personas con infección por el VIH-1

Aunque los efectos adversos de BCG no han sido observados en estudios con niños seropositivos al VIH-1 (Lallemant-Le 1991), Centers for Disease Control (CDC), MMWR (1991; 40:833-835), la seguridad de una vacuna con BCG viva atenuada en adultos positivos al VIH-1 es desconocida.

I-3.5 Conclusiones y discusión

El tipo de promotor, secuencia señal, proteína transportadora y el vector, pueden determinar la efectividad de una vacuna basada en BCG recombinante, ya que estas características pueden afectar el nivel de expresión y secreción de la proteína heteróloga por BCG, influyendo finalmente en la efectividad de la vacuna. Parece ser que el promotor hsp60 es mejor que otros promotores y usando la secuencia señal para la secreción podríamos aumentar la respuesta inmune a las proteínas en estudio.

En el desarrollo de vacunas para el VIH basadas en BCG hay que tener en cuenta tres puntos críticos: 1). Localización del antígeno, 2). Optimización de los codones y 3). Estabilidad del plásmido *in vivo*.

La secreción y fusión del antígeno extraño con las lipoproteínas de superficie mycobacterianas, pueden facilitar su acceso vía HLA clase I y subsecuentemente aumentar su inmunogenicidad. Por otra parte el uso de codones micobacterianos, podría incrementar la actividad transcripción/traducción del gen clonado. Para la estabilidad del plásmido consideramos el uso de vectores integrativos y de cepas mutantes auxotróficas de BCG complementadas con un gen transportador, que podría aumentar la estabilidad del plásmido *in vivo*.

La seguridad de la vacuna BCG viva atenuada en adultos con VIH, permanece desconocida. Se ha observado el crecimiento *in vitro* de cepas auxotróficas de BCG en medios suplementados con aminoácidos, pero estas no persisten *in vivo*, durante mucho tiempo. Estas cepas de BCG ofrecen la posibilidad de proveer protección contra la tuberculosis a poblaciones con alto riesgo de

INTRODUCCIÓN

infección por el VIH-1. Aunque la cepas auxotróficas inducen inmunidad, quizás esta no sea tan duradera como la inducida por BCG convencional, la esperanza en estas cepas es que podrían ser totalmente seguras en huéspedes comprometidos, incluidos los que tienen alto riesgo de infección por HIV.

La selección de la cepa de BCG es muy importante y ha determinado el rango de eficacia en ensayos de todo el mundo. A pesar de que en el presente es muy difícil determinar que cepa debería ser usada, la realización de análisis genómicos y de inmunogenicidad de diferentes cepas de BCG nos podría proporcionar información sobre cual cepa sería óptima para el desarrollo de vacunas frente al VIH basadas en BCGr.

La mayoría de estudios usando BCGr para vacunas VIH, han analizado la respuesta inmune de las diferentes construcciones en animales pequeños, pero los ensayos de inmunogenicidad en primates no humanos son escasos.

I.4 Hipótesis

Hipótesis

Hipótesis:

A pesar de que no se conoce aún el tipo de respuesta inmune que se correlaciona con la protección frente a la infección y la enfermedad producida por el VIH, se ha demostrado que las células T CD8+ citotóxicas juegan un papel muy importante en la contención de la replicación del VIH. Muchas vacunas frente al VIH se han diseñado para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y linfocitos T citotóxicos específicos frente al virus. A pesar de ello, los anticuerpos han fracasado a la hora de neutralizar in vitro diferentes aislados clínicos y además las respuestas celulares citotóxicas no han demostrado ser consistentes en los individuos inmunizados.

Nosotros pensamos que BCG, bacteria atenuada que persiste inocuamente en el organismo, podría ser un excelente candidato a vacuna frente al VIH, ya que de forma permanente podría expresar antígenos del VIH, induciendo una respuesta inmunológica efectiva y duradera frente al VIH a nivel de las mucosas y sistémico.

Nuestra experiencia en el desarrollo de BCGr como vacuna contra el VIH nos demuestra que podemos mejorar el vector de expresión micobacteriano probando otros promotores, consiguiendo niveles de expresión más elevados de los antígenos y por consiguiente una respuesta inmune más intensa. También proponemos un protocolo de inmunización original y planteada en este proyecto que se basaría en realizar una primera inmunización con BCG y después volver a inmunizar con un vector vírico recombinante pudiendo conseguir una respuesta inmune más intensa y duradera.