

El síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA) va ésser reconegut com a nova entitat clínica a l'any 1981 (Gottlieb, 1981; Siegal, 1981) a l'observar una elevada incidència de malalties com el sarcoma de Kaposi i la pneumònia per *Pneumocystis carinii* en pacients homosexuals de San Francisco. Es va caracteritzar per la presència d'anomalies immunològiques generalment acompanyades per infeccions oportunistes, desordres neurològics i formes poc usuals de càncer. Els estudis epidemiològics van implicar en la malaltia a un agent infecció transmissible per sang, per productes sanguinis, per contacte sexual, per us de drogues intravenoses i també verticalment de mares a fills. Va ser al 1983, quan a l'Institut Pasteur, Montagnier i els seus col.laboradors van aïllar a partir de nòduls limfàtics d'un pacient amb linfadenopatia un retrovirus capaç de replicar i causar efectes citopàtics en cultius de cèl.lules mononuclears humanes de sang perifèrica (CMSP) (Barre-Sinoussi, 1983). Uns mesos més tard, Gallo i els seus col.laboradors (Popovic, 1984) i Levy i col.laboradors (Levy, 1984) van aïllar un retrovirus a partir de mostres de pacients amb SIDA, que per homologia amb altres retrovirus humans es varen denominar HTLV-III, però que a diferència d'ells posseïa un marcat caràcter citolític en cultiu cel.lular. Actualment, aquest virus s'anomena virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1). Posteriorment, uns anys més tard un segon tipus de virus, el VIH-2, que ocasionava SIDA va ésser aïllat de pacients procedents d'Àfrica Occidental (Clavel i cols., 1986). Actualment el nom de VIH-1 fa referència a un conjunt de virus genèticament relacionats localitzats a Àfrica, Àsia, Europa i Amèrica. D'altra banda amb el nom de VIH-2 es reconeix a un conjunt de virus relacionats amb el virus descrit per Clavel, que és prevalent en determinats països de l'Àfrica Occidental.

El VIH es caracteritza per la seva extraordinària complexitat estructural i evolutiva, reflexada en els aïllats virals que s'estudiaven a finals del segle XX. Només 20 anys més tard de la descripció dels primers casos de la pandèmia humana, les seqüències genètiques són més heterogènies que al principi, quan el subtipus B era el predominant a l'Occident i no s'havien descrit encara formes recombinants circulants, tot i que és probable que algunes ja existissin

prèviament. L'estudi més recent de la pandèmia de SIDA ha permès la caracterització de nou subtipus diferents, essent el subtipus C del VIH-1 el causant de més de la meitat d'infeccions que tenen lloc en el món. Al mateix temps s'han descrit 13 formes recombinants circulants, algunes àmpliament exteses en certes àrees geogràfiques, tot i que les seves característiques patogèniques i de resposta als tractaments amb antivirals són encara poc conegudes (Figura 1).

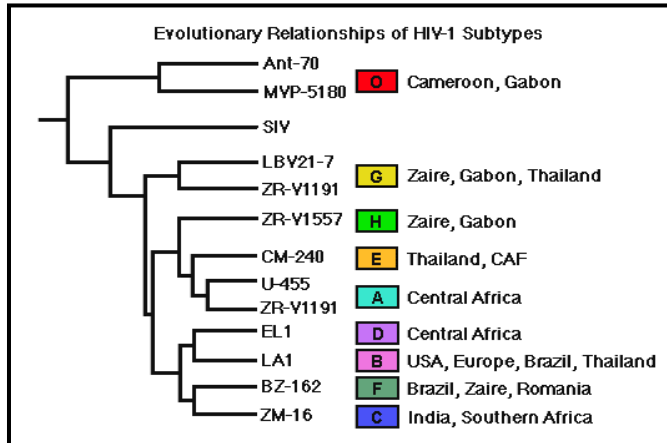


Figura 1.

Taula i Mapa de distribució de subtipus. Representació esquemàtica de la filogènia dels subtipus del virus de la immunodeficiència humana (VIH-1) i del virus de la immunodeficiència en simis (SIV)

L'estudi genètic i molecular del VIH-1 que està avui en dia en ple desenvolupament, reflexa una variabilitat genètica creixent d'aquest virus.

CARACTERÍSTIQUES VIROLÒGIQUES DEL VIH

Classificació

El VIH es classifica dins de la família *Retroviridae*, que engloba a aquells virus ARN que necessiten copiar la seva informació genètica a ADN de cadena doble, integrar-se en el genoma de la cèl.lula que infecten i, des del genoma cel.lular, transcriure's originant d'aquesta manera una nova progènie vírica. Tots els retrovirus tenen una organització genètica similar, amb 3 gens estructurals anomenats *gag*, *pol* i *env* que codifiquen les proteïnes estructurals i els enzims necessaris per la seva replicació i els gens reguladors i accessoris *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* i *nef*. Gens que estan flanquejats per repeticions terminals

llargues (LTRs). Actualment, la família *Retroviridae* s'ha classificat en 7 gèneres (Taula 1).

<u>Família</u>	<u>Gènere</u>	<u>Espècies</u>	<u>Hoste</u>
<i>Retroviridae</i>			
	<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Virus leucosis aviar</i>	Vertebrats
	<i>Betaretrovirus</i>	<i>virus simi Mason-Pfizer</i>	Vertebrats
	<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Virus tumor mamari murí</i>	Vertebrats
	<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Virus leucèmia bovina</i>	Vertebrats
	<i>Epsilonretrovirus</i>	<i>Virus Walleye sarcoma cutàni</i>	Vertebrats
	<i>Lentivirus</i>	<i>Virus Immunodeficiència Humana</i> <i>Tipus 1 i 2</i>	Vertebrats
	<i>Spumavirus</i>	<i>Spumavirus humà</i>	Vertebrats

Taula1. Taxonomia de la família *Retroviridae*

Morfologia i estructura

El VIH-1 és una partícula esfèrica de 80 a 100 nm de diàmetre, amb una estructura de tres capes: la interna o nucleoide, que conté ARN genòmic més la nucleoproteïna i els enzims vírics, proteasa, retrotranscriptasa i integrasa, una càpside proteica icosaèdrica formada per les proteïnes del core del virus codificades pel gen *gag* i un embolcall constituït per una bicapa lipídica derivada de la cèl.lula hoste on s'inserten les glucoproteïnes en 72 projeccions externes codificades pel gen *env* i els antígens d'histocompatibilitat de classes I i II que deriven de la cèl.lula hoste (Cann, 1989; Levy JA, 1993) (Figura 2).

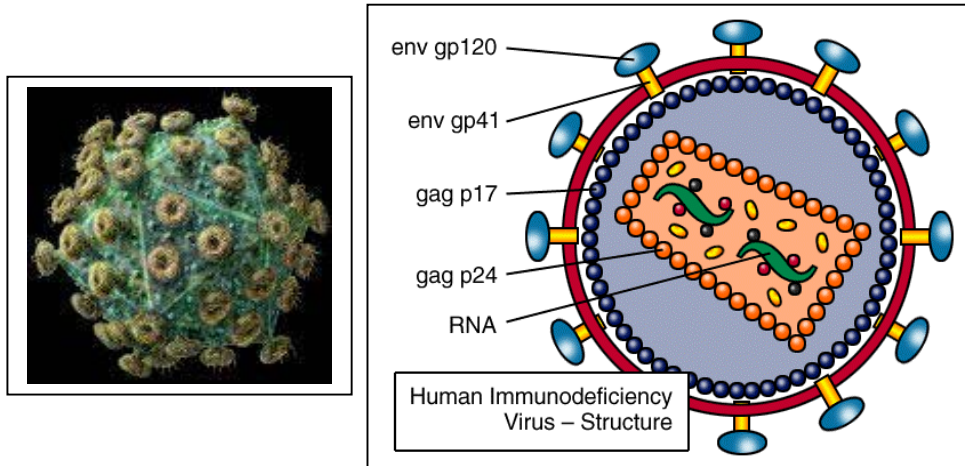


Figura 2. Esquema partícula vírica

Genoma víric: estructura i organització

El virus de la immunodeficiència humana presenta una estructura que codifica per 15 proteïnes virals diferents. A més a més, en la maduració i el transport intracel.lular de les noves partícules s'utilitzen també proteïnes cel.lulars, algunes de les quals passen a formar part dels components del virió. El genoma víric és un ARN (9,2 kb) monocatenari de polaritat positiva, que presenta dues còpies idèntiques, constituït per tres gens estructurals, *gag* codifica el precursor de les proteïnes de la càpside vírica, *env* codifica el precursor per les glicoptoteïnes de l'embolcall i *pol*, codifica el precursor pels enzims vírics, proteasa (PR), retrotranscriptasa (RT), Rnasa H i integrasa (IN).

A més a més presenta dos gens reguladors necessaris per a la replicació vírica, *tat* i *rev* i quatre gens que codifiquen proteïnes accessòries, *nef*, *vif*, *vpr* i *vpu* (Green, 1991) (Figura 3).

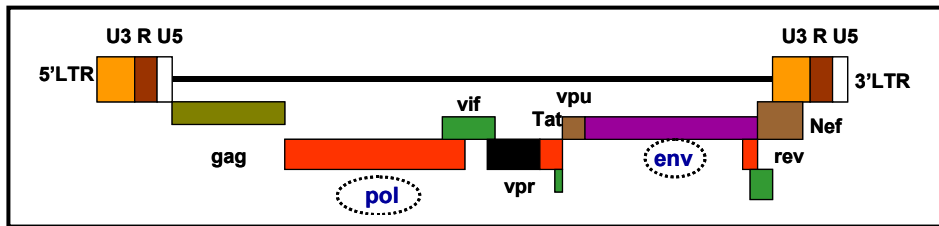


Figura 3. Genoma del virus

En la seva forma de provirus, el genoma víric està flanquejat per unes seqüències repetitives de terminació llarga (LTR) completes que permeten la integració del virus dins del genoma de la cèl.lula hoste. En les LTR és on es localitzen els elements que inicien, dirigeixen i regulen l'expressió del genoma víric (Feinberg, 1986; Sodroski, 1985; Gaynor, 1992).

Tropisme i correceptors

L'entrada del VIH-1 a la cèl.lula es produeix mitjançant la interacció amb dos tipus de receptors. Existeix un receptor específic i comú a tots els subtipus del VIH-1, la molècula de CD4. Aquesta proteïna està present en la superfície dels limfòcits T col.laboradors i en cèl.lules de la línia mononuclear-fagocítica, el que determina el tropisme viral per aquests tipus cel.lulars (Pantaleo G, 1995). Però molt aviat es va demostrar que la presència de la molècula CD4 era condició necessària però no suficient per permetre l'entrada del VIH-1 en la cèl.lula (Maddon, 1986). Avui se sap que aquesta funció de correceptors la realitzen determinats receptors de quimiocines (Feng, 1996; Dragic, 1996; Choe, 1996), fet que va tenir gran transcendència per entendre diferents aspectes patològics de la infecció pel VIH-1. Les quimiocines constitueixen una família de mediadors immunològics dividits en tres grups C, CC i CXC (Baggiolini, 1994). Són molècules solubles de baix pes molecular i la

seva funció principal és actuar com a mediadores inflamatòries implicades en els processos de migració i activació leucocitària. Aquestes quimiocines són produïdes per monòcits, polimorfonuclears i limfòcits CD4 i CD8, així com per fibroblasts, cèl.lules endotelials i estromals. Les quimiocines interaccionen amb diferents receptors situats a la membrana cel.lular que es classifiquen segons la seva capacitat per unir diferents quimiocines en CC i CXC (Murphy, 1994). Els receptors més importants pel VIH-1 són el CCR5 i CXCR4. El CCR5 uneix les CC-quimiocines RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β essent el principal receptor per a les soques monocitotròpiques, abans denominades no inductores de sinciti, NSI, i actualment denominades R5 (Jansson, 1996 ; Kozac, 1997). El receptor CXCR4 té com a lligand natural la quimocina SDF-1 i és el principal receptor de les soques limfotròpiques, abans inductores de sinciti, SI, i actualment denominades X4 (Bleuel, 1997; Oberlin, 1996) (Figura 4).

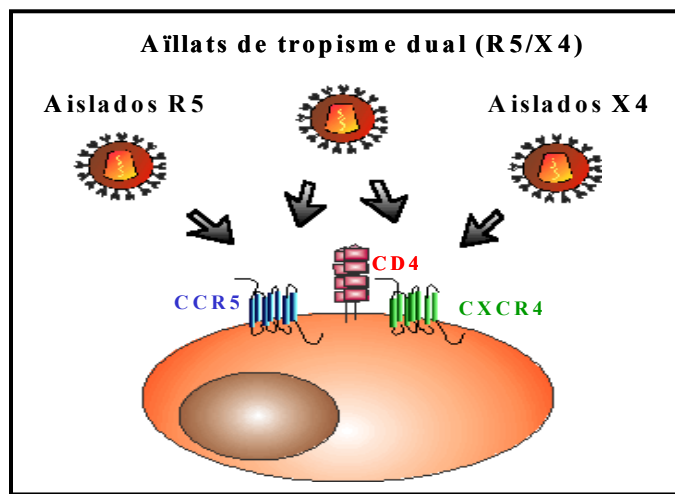


Figura 4. Correceptors

La conformació de les diferents regions de la gp120, especialment de la V3, condiciona el tropisme dels diferents aïllats vírics (Carrillo, 1996 ; Harrowe, 1995; Hoffman N , 2002; Pollakis G, 2001). A més dels virus amb un tropisme estricte s'han descrit variants amb capacitat d'unir-se a altres co-receptors,

com CCR2 o CCR3, i aïllats que poden entrar a través de múltiples co-receptors, soques de tropisme dual, o ampliat, denominades R5X4 (Doranz, 1996 ; Frade, 1997).

Cicle de replicació del VIH-1

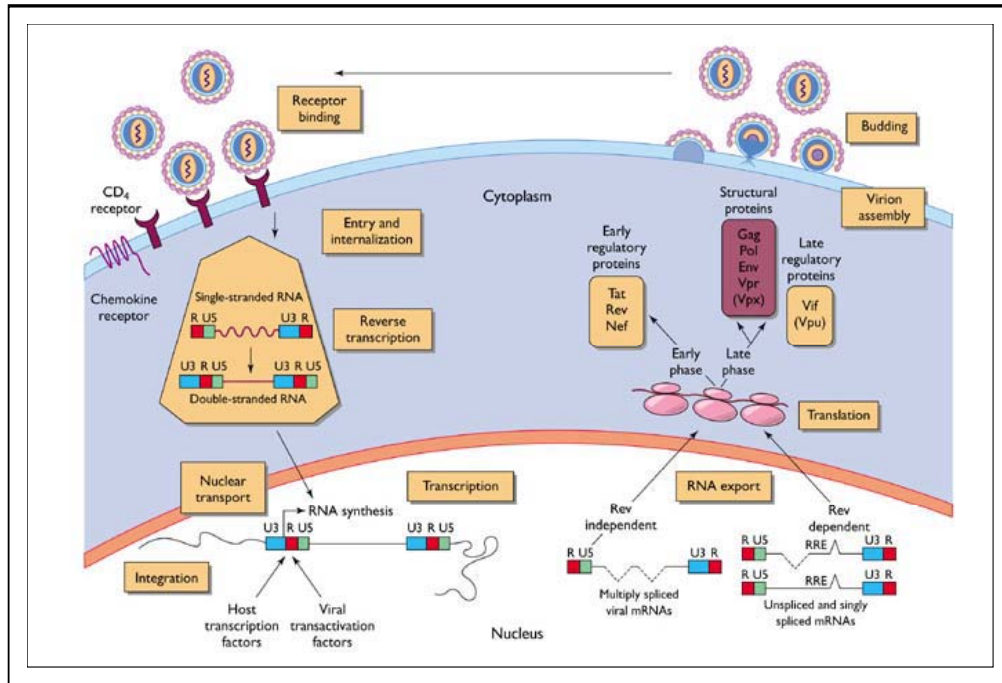


Figura 5. Cicle replicació

Adsorció, fusió i internalització del virió

Les proteïnes de l'envolta del VIH-1 faciliten la fusió de les membranes viral i cel·lular, per que tingui lloc la infecció, permetent la penetració del genoma viral a l'interior cel·lular. El gen *env* codifica una glicoproteïna que es glicosila, la gp160. La seva escissió dóna lloc a una glicoproteïna superficial gp120 i una transmembrana gp41 (Chan DC, 1998). La interacció de gp120 amb el CD4 indueix un canvi conformacional que possibilita la unió d'aquest complex a un

co-receptor CC o CXC (Deng H, 1996). La seqüència aminoacídica de la gp120 conté 5 regions variables (V1-V5), alternades amb regions més conservades. Són aquestes regions variables les que queden exposades a la superfície del virus (Moore JP, 1994). Les regions no continues de la mol.lècula gp120 s'uneixen per formar el lloc d'unió al CD4, per tant, petites deleccions o substitucions tant en el CD4 com en les regions conservades de la gp120 poden dificultar la unió del virus amb la cèl.lula (Peterson A, 1988; Lasky LA, 197; Kowalaski M, 1987).

El darrer pas implicat en l'entrada del virus a la cèl.lula, la fusió de la membrana cel.lular amb l'envolta del virus, es realitza a partir de la gp41. La seqüència molecular de la gp41 inclou les regions repetides (HR1 i HR2), que es caracteritzen per la presència de regions hidrofòbiques periòdiques en les estructures superenrotllades de l' α -hèlix (Gallaher WR, 1989; Delwart EL, 1990).

Transcripció inversa i integració

Un cop ha tingut lloc l'entrada del virus, s'inicia la seva replicació mitjançant la transcriptasa inversa continguda dins del virió, que processa la formació de la primera cadena d'ADN a partir de l'ARN viral (Peliska, 1992 ; Whitcomb, 1990). Per la síntesi de les dues cadenes d'ADN viral es requereix l'acció de la ribonucleasa H, que degrada el motlle d'ARN original. Aquest procés té lloc en el citoplasma. Posteriorment, l'ADN de doble cadena linial es transportat al nucli de la cèl.lula infectada on s'integra en els cromosomes cel.lulars, procés que té lloc a través de la integrasa viral (Gaynor, 1992) constituïnt el provirus integrat, tot i que acostuma a persistir gran quantitat d'ADN viral sense integrar. El transport el realitza la matriu viral, però també hi participen la integrasa, la transcriptasa inversa, la proteïna viral vpr i la nucleocàpside. Recentment s'ha demostrat l'acció de la proteïna nef, també transportada pel propi virió, en l'augment de la retrotranscripció (Spina, 1994). També s'ha demostrat que el procés de retrotranscripció i integració depèn no només de factors vírics sinó també de factors cel.lulars. La integració

depèn de l'estat d'activació de la cèl.lula hoste, tot i que el virus pot infectar a limfòcits quiescents, la retrotranscripció i la integració són ineficaces (Zackj, 1990 ; Bubrinsky, 1991).

Replicació del VIH-1

Un cop s'ha produït la integració, el genoma pot restar latent o bé ser font de producció contínua de virus, depenent de la presència de factors cel.lulars o vírics necessaris per a l'activació de l'iniciador víric.

Inici de la transcripció.

La iniciació de la transcripció comença per la síntesi de l'ARN missatger del VIH-1 a partir de l'ADN proviral. L'activació del procés depèn de factors cel.lulars que interaccionen amb les seqüències reguladores situades en el LTR víric (Gaynor, 1992), permetent la formació del complex transcripcional primari (ARN polimerasa i factors associats) que realitza la transcripció gènica. Entre aquests factors, NF-kB representa el principal element regulador de la transcripció del VIH-1 en limfòcits CD4 a partir de l'estat de latència (Alcamí, 1995 ; Chen, 1997).

Transcripció completa del genoma víric.

La transcripció completa del genoma víric requereix la participació de la proteïna tat que actua augmentant la taxa de transcripció del genoma del VIH-1 i permet la síntesi de la totalitat de l'ARN víric. Tat actua com un transactivador directe en cooperació amb altres factors cel.lulars, en especial el NF-kB, i permet l'elongació completa de l'ARN missatger del virus (Cullen, 1992). En absència de tat no hi ha transcripció de l'ARN víric complet.

Processament de l'ARN missatger (ARNm).

L'ARN missatger se sintetitza en forma d'un únic transcrit que ha de ser transportat al citosol i processat en transcrits de diferents mides, ambdòs processos són realitzats per rev, amb localització preferentment nuclear. En absència de rev, l'ARNm del virus s'acumula en el nucli i no és processat. Rev participa en l'ensamblatge de l'ARNm amb la maquinària de síntesi proteïca i accelera la síntesi de les proteïnes víriques pels polisomes (Green, 1991).

Formació i maduració dels virions.

En aquest procés participen diferents proteïnes víriques entre elles, vif, vpu i la proteasa vírica (Emerman, 1998 ; Cullen, 1998). La proteasa vírica té un paper central al processar el precursor pre-proteïc gag-pol en les proteïnes de la nucleocàpside. El processament de la gp160 en gp41 i gp120 es produeix per una proteasa cel.lular. La maduració i l'ensamblatge correcte de les proteïnes víriques es produeix en el moment final del cicle infectiu, prèviament a la gemmació dels virus a través de la membrana cel.lular, moment en el qual adquireix el seu característic embolcall lipídic d'origen cel.lular i constitueix la partícula vírica madura.

Variabilitat del VIH-1

Variabilitat genètica

Una de les característiques fonamentals del VIH-1, comú a tots els virus ARN, és la seva elevada variabilitat genètica. Aquesta propietat fa necessària la descripció dels aïllats naturals del virus com **quasiespècies** (Figura 6). La variabilitat genètica del VIH-1 va ésser ja evident amb l'anàlisi de les primeres seqüències nucleotídiques dels aïllats obtinguts de pacients infectats (Goodenow, 1989 ; Hahn, 1984 ; Hahn, 1986 ; Wain-Hobson, 1989 ; Wain-Hobson, 1992). Amb l'ampliació d'aquests treballs l'estudi de la població vírica present en un individu infectat va demostrar una distribució poblacional variable, tant en l'espai (Delssus, 1992 ; Wong, 1997 ; Zhu, 1996 ; Korber, 1994) com en el temps (Delwart, 1997 ; Delwart, 1994 ; Ganeshan, 1997 ; Lukashov, 1995 ; Salvatori, 1997 ; Shioda, 1997 ; Wolinsky, 1996 ; Yamaguchi y Gijobori, 1997). El grau de variació al llarg del genoma del VIH-1 no és uniforme, essent el gen *env* el que presenta major variabilitat. (Hahn, 1985). Dins de la glicoproteïna de l'envolta gp120 es troben definides 5 regions hipervariables (V1-V5), tres de les quals es troben molt glicosilades. De fet, la principal variació de les seqüències en aquesta regió consisteix en la creació i pèrdua de llocs de glicosilació. D'altra banda, tot i que en un principi les zones

que separen les regions variables es varen definir com altament conservades (C1-C5), s'ha comprovat que el grau de variació en les regions constants C2 i C3 és major que l'observat en la pròpia regió V3 (Engelstad, 1996). En sentit contrari, la regió més conservada del genoma correspon al gen *pol*.

L'evolució del VIH-1 té lloc fonamentalment mitjançant dos mecanismes genètics: divergència a partir d'un ancestre comú (basada en la variabilitat obtinguda per mutacions puntuals) i recombinació. El VIH-1, al igual que la resta de retrovirus, és únic en el sentit de què en el procés de la replicació del seu genoma intervenen tres sistemes enzimàtics: la RT vírica, l'ADN polimerasa i les ARN polimerases cel.lulars. La taxa d'incorporació de nucleòtids erronis és baixa per l'ADN polimerasa, mentre's que la RT i probablement l'ARN polimerasa cel.lular es caracteritzen per elevades taxes d'error, degut a la manca d'activitat enzimàtica 3' exonucleasa. Tot i que la taxa d'error descrita per la RT del VIH-1 és similar a la descrita per les polimerases d'altres virus ARN (10^{-4} per nucleòtid i cicle de replicació), els alts nivells de replicació vírica i el ràpid recanvi en les poblacions víriques presents en l'individu infectat, expliquen la major variabilitat genètica trobada en aquest virus en comparació amb altres virus ARN (Coffin, 1995 ; Wain-Hobson, 1996).

D'altra banda, l'elevada freqüència de recombinació homòloga característica dels retrovirus és conseqüència de la naturalesa dimèrica del genoma víric i de la necessitat que la RT té de transferir-se d'un extrem a un altre de la mol.lècula d'ARN víric durant la síntesi de l'ADN per la generació dels LTRs. El procés de recombinació requereix l'empaquetament de dos genomes vírics diferents en una mateixa partícula, formant un heterozigot (Clavel, 1989; Hu i Temin, 1990). El procés de transcripció inversa d'aquestes partícules heterozigòtiques pot produir molècules d'ADN que continguin fragments de les dues seqüències genòmiques progenitores. Fins 1994 es va considerar que la infecció simultània d'un pacient amb soques divergents del VIH-1 era altament improbable, i que la recombinació no era un mecanisme de variació important en l'evolució del virus. Durant els darrers anys, en canvi,

l'anàlisi filogenètic d'un important nombre de seqüències víriques a posat de manifest que una gran proporció d'aïllats naturals del VIH-1 són genomes "mosaic", originats per recombinació entre virus que pertanyen a diferents subtipus (recombinació intersubtipus) (Gao, 1996; Sabino, 1994; Takehisa, 1998; Takehisa, 1999). Actualment, es considera que més del 20% dels aïllats del VIH-1 són recombinants (Kampinga, 1997). La recombinació entre virus que pertanyen al mateix subtipus genètic (recombinació intrasubtipus) ha estat menys descrita (Buttò, 1997). Probablement aquest fet únicament reflexi un problema de detecció. En aquests casos, és difícil determinar si la divergència trobada entre les diferents seqüències analitzades representa soques diferents del mateix subtipus o bé l'evolució que ha patit una mateixa soca al llarg de la infecció en el pacient.

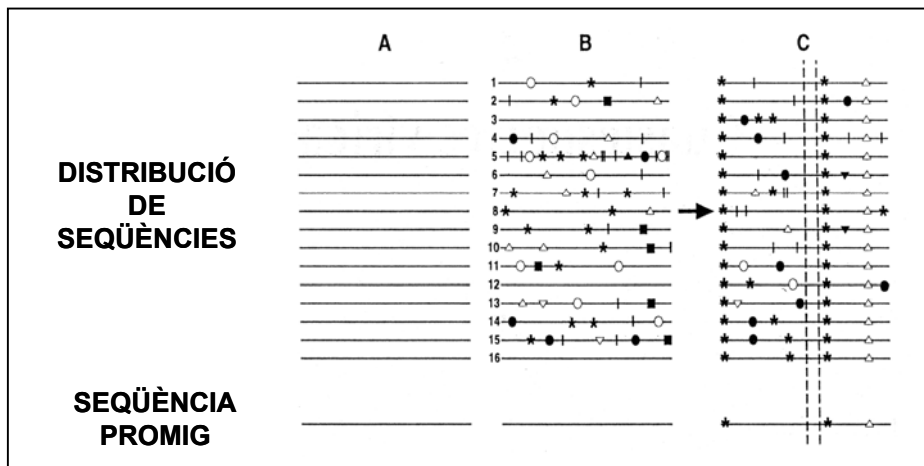


Figura 6. Variabilitat quasispècies. A nivell poblacional, un genoma viral es pot definir mitjançant una seqüència consens o promig, però en realitat està format per un espectre de mutants. És aquesta distribució de mutants la que es denomina quasispècie.

Variabilitat biològica

La variació genètica del virus té conseqüències en les propietats biològiques dels aïllats del VIH-1 obtinguts de pacients infectats. Una de les

conseqüències més importants és la seva capacitat d'infectar diferents tipus cel·lulars (tropisme cel·lular). Tot i que tots els aïllats del VIH-1 tenen la capacitat de replicar en CMSP (cèl·lules monocítiques de sang perifèrica), alguns repliquen millor en línies T transformades (virus T-tròpic), mentres que altres ho fan millor en cèl·lules monòcits-macròfags (virus M-tròpics). En general, els virus T-tròpics es caracteritzen per replicar més ràpid i a nivells alts en CMSP (aïllats "rapid-high"), així com per induir la formació de cèl·lules gegants (sincitis) en la línia cel·lular MT-2 (aïllats inductors de sinciti; IS). D'altra banda, els virus M-tròpics repliquen més tard i a nivells més baixos en CMSP (aïllats "slow-low") i no són capaços d'induir la formació de sincitis en la línia cel·lular MT-2 (aïllats no inductors de sincitis; NIS) (Asjö, 1986; Cheng-Mayer, 1988; Fenyö, 1988; Tersmette, 1988). Els virus M-tròpics NIS es troben, en general, majoritàriament tant en la primoinfecció com en el període assintomàtic de la malaltia. Un 50% dels pacients mantenen aquest fenotip al llarg de tota la infecció, mentres que en el 50% restant es produeix un canvi de fenotip que comporta l'aparició de virus T-tròpics IS més virulent. Aquest canvi de fenotip des del virus NIS a virus SI s'associa clarament a una ràpida disminució del nombre de cèl·lules T CD4 i progressió de la malaltia, conjuntament amb un menor temps de supervivència després del diagnòstic de la SIDA (Jurriaans, 1994; Lukashov i Goudsmit, 1998; Tersmette, 1988). Els estudis sobre la capacitat replicativa de clons moleculars quimèrics obtinguts a partir d'aïllats T-tròpics i M-tròpics indiquen que el tropisme cel·lular d'un aïllat resideix en el gen *env*, fonamentalment en la regió V3 de la gp 120, tot i que les regions V1 i V2 d'aquesta proteïna són també importants (Carrillo i Ratner, 1996; Groenink, 1992; Shioda, 1992; Hoffman, 2002).

La recent identificació dels correceptors cel·lulars implicats en l'entrada del virus a la cèl·lula diana (Doranz, 1996; Dragic, 1996; Feng, 1996), ha posat de manifest que la diferència del tropisme observada entre els aïllats del VIH-1 reflexa una utilització diferencial de correceptors. Mentre's que els virus M-tròpics empenen el receptor CCR5 a l'entrar a la cèl·lula, els virus T-tròpics

poden utilitzar tant el receptor CCR5 com el receptor CXCR4 (Hoffman i Doms, 1998) (Figura 7).

Els aïllats del VIH-1 es diferencien, també, per la seva diferent sensibilitat a la neutralització per part d'anticossos específics. És en la gp 120 del virus, concretament en el domini principal de neutralització del V3 i en el domini d'unió a CD4, on es localitzen els principals epítops de neutralització (Cheingsong-Popov, 1992). Generalment, els aïllats primaris són menys sensibles a la neutralització per anticossos específics que les soques de laboratori. També s'han observat diferències en la capacitat de neutralització dels anticossos dels pacients al llarg de la infecció: els anticossos obtinguts en un moment donat de la infecció, són capaços de neutralitzar més eficaçment els aïllats previs obtinguts del mateix pacient que l'aïllat present en l'individu en el moment de l'obtenció del sèrum. En general, els pacients infectats amb VIH-1 mostren una dèbil capacitat neutralitzant front a les soques autòlogues essent menor encara la seva capacitat per neutralitzar les soques heteròlogues de laboratori.

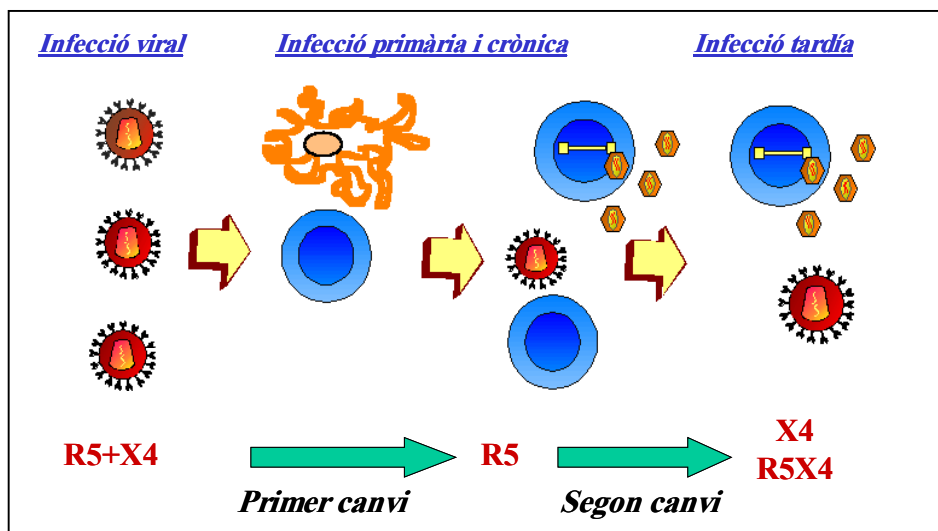


Figura 7. Canvi tropisme, evolució malaltia.

Variabilitat genètica del VIH-1 i progressió de la malaltia

El grau d'heterogeneïtat de la població vírica present en un individu infectat varia al llarg de la malaltia. Aquesta variació està relacionada amb els nivells de virus en sang, la resposta immunològica de l'hoste i la duració de la malaltia. Fet que suggereix que la transmissió constitueix un coll d'ampolla poblacional, bé perquè la infecció s'iniciï a partir d'un petit inòcul de virus o bé, per la replicació selectiva d'una o poques variants víriques (Wolinsky, 1992; Zhang, 1993; Zhu, 1993; Zhu, 1996). El període d'infecció asimptomàtica es caracteritza per una contínua evolució de les poblacions víriques, reflexe de la replicació constant del virus en l'individu infectat. Si suposem que 10^8 cèl.lules són infectades de novo cada dia la taxa d'error associada a la RT del VIH-1, és suficientment elevada com per originar amb un únic dia una població vírica que contingui totes les possibles mutacions puntuals, inclús l'1% de totes les possibles dobles mutacions (Coffin, 1995; Perelson, 1997b).

La fase asimptomàtica de la infecció representa un equilibri balancejat entre la replicació del virus i la resposta del sistema immunològic de l'hoste. Independentment de les causes i de la velocitat a la que aquest equilibri desapareixi, la fase final simptomàtica de la infecció es caracteritza per una nova homogenització de la població vírica, probablement reflexe de la replicació massiva d'una variant de major eficàcia biològica (millor adaptada al medi) i del col·lapse del sistema immunològic (Ganeshan, 1997; Shioda, 1997; Wolinsky i, 1996; Yamaguchi i Gijobori, 1997).

Existeixen diferències clares en la taxa de progressió de la malaltia entre individus infectats pel VIH-1. La majoria dels pacients sense tractament (50%), progressors típics, el seu sistema immunològic comença a debilitar-se transcorreguts 8 a 10 anys de la infecció com perquè es doni l'aparició d'infeccions oportunistes ($200 \text{ cèl.lules/mm}^3$). En un segon grup de pacients els progressors ràpids (5% dels pacients), el descens en el nombre de cèl.lules T CD4 per sota de $200 \text{ cèl.lules/mm}^3$, es produeix a una major velocitat (2 a 5 anys després de la infecció). Aquest ràpid descens va acompanyat d'elevats nivells d'ARN víric que no disminueixen substancialment després de la infecció

primària, i un elevat grau d'homogeneïtat de la quasiespècie vírica present en l'individu al llarg del temps (Delwart, 1997). Aquestes característiques són probablement el reflex d'una resposta immunològica pobre per part de l'hoste. El darrer grup d'individus infectats, progressors lents o no progressors (5% dels pacients), el seu nombre de cèl.lules T CD4 es manté a nivells normals inclús després de 10 anys de la infecció. A més a més, acostumen a presentar un nivell baix d'ARN víric en plasma, soques víriques menys patogèniques (virus NIS) i una major heterogeneïtat en la quasiespècie vírica, reflexant tot en conjunt una resposta immunològica molt activa per part de l'hoste (Levy, 1998). Resumint, les dades obtingudes a partir d'estudis longitudinals en pacients infectats amb diferents taxes de progressió de la malaltia posen de manifest que en la majoria dels casos, una major heterogeneïtat en la quasiespècie reflexa una major duració del període asimptomàtic de la malaltia (Delwart, 1997; Delwart, 1994; Ganeshan, 1997; Liu, 1997; Lukashov, 1995; Salvatori, 1997; Shioda, Wolinsky, 1996; Yamaguchi i Gjobori, 1997).

Actualment existeixen dos models que intenten explicar la variabilitat genètica present en els pacients infectats al llarg de la malaltia. El model seleccionista que defensa que el grau de variabilitat de la quasiespècie vírica està condicionat per la resposta immunològica. D'aquesta manera, quant més enèrgica sigui la resposta immunològica generada per l'individu infectat major serà l'heterogeneïtat trobada de la població vírica (Delwart, 1997; Wolinsky, 1996). El segon model apunta a què la variabilitat existent en l'individu és independent de la pressió immunològica exercida. La variabilitat en les quasiespècies està condicionada per la proliferació clonal dels limfòcits T CD4 en resposta a antígens no específics del VIH-1. En aquest cas, l'heterogeneïtat trobada reflexa l'expansió de les diferents variants víriques presents en cada cèl.lula (Wain-Hobson, 1993). Independentment del model, el que sembla irrevocable és que en la perllongada infecció per VIH-1 es produeixen perturbacions contínues de l'equilibri poblacional. Aquestes perturbacions afavoreixen la ràpida evolució del virus.

D'altra banda, la complexitat dels factors selectius, fa que a més a més l'evolució vírica sigui altament impredecible en cada pacient infectat.

Dinàmica vírica

Durant els darrers anys amb el desenvolupament de les noves tècniques de biologia molecular dissenyades per detectar l'ARN del VIH-1 a plasma i el desenvolupament de teràpies antirretrovirals potents, s'ha aconseguit aprofundir en l'estudi de la dinàmica viral i la patogènesi del VIH-1. Actualment som coneixedors de l'elevada replicació viral en tots els estadis de la malaltia, des de l'inici de la infecció fins a la mort (Ho, 1996). S'ha demostrat l'elevada dinàmica vírica durant el període d'assimptomàtic (Ho, 1995). Mitjançant diferents models matemàtics (Perelson, 1996) (Figura 9) s'ha vist que cada dia es produeix la quantitat de 10^9 virions nous amb una vida mitja en plasma de 6 hores. Els limfòcits CD4 també són destruïts en un nombre similar, essent de 1,2 dies la vida mitja dels limfòcits que repliquen activament. El cicle de vida del virus és, des del moment en que infecta una cèl.lula fins que produeixen nous virions, els quals infectaran noves cèl.lules, de 2.6 dies (Saag, 1994). El temps que el virus està dins de la cèl.lula és de 0.9 dies. En situació d'equilibri, aproximadament en 15 dies, es renova la totalitat dels limfòcits CD4 circulants. S'ha calculat que 1% del total de limfòcits CD4 són infectats de novo diàriament i destruïts per l'efecte citopàtic (Perelson, 1996).

Donat que la majoria de cèl.lules T CD4 d'un individu en un moment determinat es troben en estat de repòs, la major part de les infeccions pel VIH-1 es produeixen en cèl.lules no activades (Ostrowski M, 1998). A diferència del que succeeix en una cèl.lula activada, la infecció d'una cèl.lula en repòs, ja sigui "naïve" o de memòria, no condueix a una infecció productiva immediata degut a un bloqueig del cicle biològic previ a la integració del genoma viral en la cèl.lula hoste (Bruksinsky M, 1991; Zack, 1990). Tot i amb això, la retrotranscripció pot arribar a completar-se (Pierson, 2002) i les cèl.lules T CD4 "naïve" i memòria amb ADN viral no integrat poden representar un reservori latent (latència preintegració). Si aquestes cèl.lules són activades abans que el complex de preintegració es degradi poden donar-se els passos

que condueixen a una infecció productiva (Brukinsky M, 1991; Spina C, 1995; Zack J, 1990). Encara que la vida mitja d'aquest reservori sigui molt curta (1 a 10 dies aproximadament) (Spina C, 1995; Pierson, 2002), es calcula que la quantitat d'ADN no integrat, és d'un a dos ordres de magnitud major a la d'ADN proviral (Brukinsky M, 1991; Chun T, 1997). D'altra banda, encara que la majoria de cèl.lules activades infectades productivament moren per l'efecte citopàtic directe del virus, una petita fracció d'aquestes pot sobreviure el suficient com per esdevenir cèl.lula memòria que portarà un genoma integrat del virus (Chun T i col., 1995). Les cèl.lules T CD4 memòria amb ADN viral integrat poden representar un altre reservori latent (latència postintegració), tornant a produir virus en el cas de que es tornessin a activar per un nou contacte amb el mateix antigen (Chun T, 1998; Folks T, 1989; Moriuchi H, 2002; Moriuchi H, 2000; Pomerantz R, 1990). Un treball recentment publicat demostra que la pròpia proteïna viral gp120 és capaç d'induir l'expressió del VIH-1 a partir de cèl.lules en repòs aïllades d'individus infectats (Kkinter A, 2003). La importància d'aquesta forma de latència radica en l'elevada vida mitja de les cèl.lules memòria (i per tant del reservori), necessària per protegir a l'individu de noves infeccions per patògens amb els que previament ha estat en contacte. Estudis amb pacients amb teràpia antirretroviral han demostrat que virus competents per la replicació poden ser aïllats a partir de cèl.lules T CD4 "naïve" i de memòria de pacients tractats que han estat avirèmics durant un període de fins a 3 anys (Chun T, 1997; Finzi D, 1997; Lambotte O, 2002; Persaud D, 2000; Wong J, 1997). Les estimacions sobre la vida mitja d'aquest reservori són molt diverses i oscil·len entre 6 i 44 mesos, (Finzi D, 1997; Persaud D, 2000; Ramratnam B, 2000), sent necessària una neutralització vírica completa durant 10-60 anys per a la seva erradicació (Finzi D 1999 i Zhang L 1999).

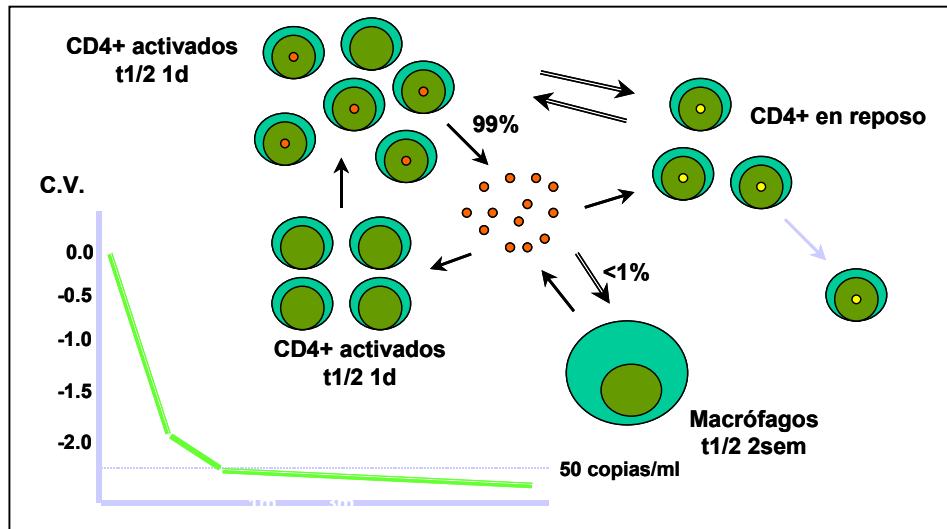


Figura 9. Dinàmica Vírica

Reservoiris vírics

La persistència de reservoiris latents del VIH-1 representa una gran barrera en l'erradicació del virus constituint una font de producció de virus quan el tractament antirretroviral s'interromp o disminueix la intensitat. Adicionalment, estudis recents han demostrat la persistència de replicació vírica en pacients amb nivells indetectables d'ARN víric en plasma (Furtado, 1999) o replicació subjacent que podrà contribuir a l'estabilitat observada del reservori latent al llarg del temps.

Existeixen dos tipus de santuaris pel VIH-1, cel.lular i anatòmic.

El santuari cel.lular inclou:

- **els limfòcits T CD4 latents amb el provirus integrat.** Estudis recents han demostrat que menys del 0.05% dels limfòcits T CD4 latents tenen el virus integrat i han estimat que el nombre total de cèl.lules en el cos que presenten un virus latent amb capacitat per replicar-se és de 1.4×10^6 (2.2×10^6 - 1.6×10^6). Tot i que el nombre és relativament petit, les cèl.lules memòria han estat considerades com a potencials fonts d'infecció vírica persistent degut a la seva llarga vida.

- **els macròfags**, el fet que la infecció pel VIH-1 en ells no sigui citopàtica, permet que els macròfags siguin una font de producció de VIH-1 durant períodes perllongats. També han estat implicats en el transport de virions a través de la barrera hematoencefàlica establint i mantenint la infecció al SNC.

Durant les fases finals de la malaltia, quan la depleció és molt important, els macròfags han estat implicats com a font de la replicació de novo del VIH-1 (Orenstein, 1997).

- **les cèl.lules dendrítiques fol·liculars (CDF)**, les quals poden atrapar les partícules víriques en la seva superfície durant un període de temps encara indeterminat (Picker i al., 1993). Encara que, paradoxalment, les CDF per se no estan infectades malgrat que es troben recobertes de virus.

- **Limfòcits T CD8**, especialment en pacients que es troben en estadis tardans de la infecció. Manca determinar la cinètica de la infecció d'aquestes cèl.lules per part del VIH-1.

- **Limfòcits B**, existeix una mínima evidència de que aquestes cèl.lules s'infectin *in vivo*. Alguns autors descriuen la recuperació de virus amb capacitat de replicació a partir d'aquestes cèl.lules quan el pacient presenta una virèmia elevada.

- **Cèl.lules NK**, estudis recents demostren que aquestes cèl.lules expresen co-receptors de CD4 i VIH-1. S'ha detectat ADN-VIH-1 d'aquest tipus de cèl.lules en pacients sotmesos a TARGA, resultats que suggereixen que aquestes cèl.lules podrien constituir un reservori del VIH-1.

En relació als reservoris anatòmics (Figura 11) els més importants són el:

Els **òrgans limfàtics**, únicament un 2% dels limfòcits estan circulant, la resta estan distribuïts en els òrgans limfàtics i teixits. De fet, la major part de la replicació viral es produeix en els òrgans limfàtics perifèrics. En pacients amb TARGA efectiu es pot detectar ARN del virus en les cèl.lules dels nòduls limfàtics, inclús quan les proves de RT-PCR són negatives en plasma, CSF i secrecions genitourinàries. Els limfòcits es desenvolupen en els òrgans

limfàtics primaris, com la melsa i la mèdulla óssia, essent aquests possibles reservoris.

El **sistema nerviós central** (SNC): Anàlisis anatomopatològics suggereixen que els macròfags i les cèl·lules de la microglia són les dianes per la replicació del VIH-1 al cervell (Kure, 1991). Diferents estudis han proposat la possibilitat que el SNC sigui un lloc de replicació vírica independent, ja que al comparar el fenotip NSI o R5 és més comú en SNC inclús en els casos en què el predominant en sang perifèrica sigui el SI o X4 (Prat, 1996). També, al comparar la virèmia entre ambdòs compartiments ens trobem diferents dinàmiques que suggereixen el SNC com a compartiment independent de replicació viral.

El **tracte genitourinari** també és un potencial reservori del VIH-1, en part per les seves adaptacions vasculares així com per la baixa penetració dels antirretrovirals. S'ha aconseguit aïllar virus de macròfags del fluït seminal d'homes infectats, així com de macròfags i limfòcits del tracte cervical en dones. S'han realitzat estudis de genotip i fenotip del virus aïllat en plasma i en secrecions genitals, els quals suggereixen una certa compartimentalització del VIH-1 a nivell de la seva replicació (Siliciano, 2002, 2003). Cosa que fa pensar que cèl·lules d'aquests compartiments actuïn com reservoris del VIH-1. En canvi, tot i les concentracions subòptimes d'antirretrovirals que es troben en aquest lloc, quan el TARGA és efectiu aconseguint una CV inferior 50 còpies/ml en plasma, la replicació també es veu suprimida en el tracte genitourinari, essent molt difícil detectar virus lliure en el fluït seminal. Es pensa que les cèl·lules infectades pel VIH-1 en estat latent d'aquest reservori tenen una vida mitja llarga.

Estudis recents amb pacients VIH-1 que presentaven nefropatia suggereixen que els ronyons poden ser també un reservori del VIH-1. El mecanisme d'infecció de les cèl·lules epitelials renals és encara incert.

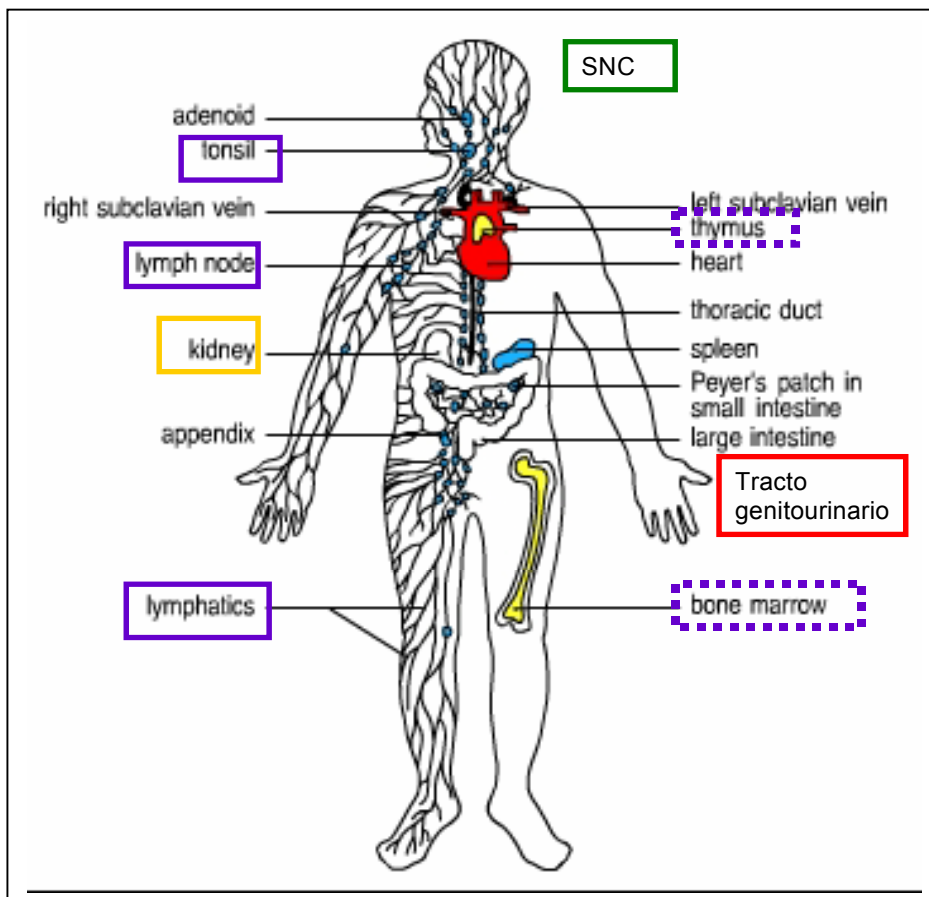


Figura 10. Reservoris Anatòmics

Implicacions Clíniques dels reservoris Vírics

Les implicacions clíniques que té la recerca actualment en el camp dels reservoris virals del VIH-1 no està completament clara. Tot i que si que existeix un consens en determinats punts:

1. Amb els règims actuals, l'erradicació de la infecció no és un objectiu raonable degut a la persistència del VIH-1 latent en les cèl·lules T CD4 infectades.

2. En els pacients que tenen una bona adherència al tractament i mantenen una supressió de la CV sostinguda, l'evolució del virus s'atura.

El reservori latent contè totes les quasiespècies virals que circulen a nivells elevats. Quan un pacient fracassa al tractament degut a la selecció d'una variant viral resistent i s'atura aquest tractament pot reemergir el virus salvatge. Aquest fet no vol dir que la variant viral resistent hagi desaparegut, està en el reservori.

HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1

Les diferents fases en les que es pot dividir la història natural de la infecció són: la *fase aguda*, que comprèn des del moment de la infecció fins a que es produeix la seroconversió; la *fase crònica*, que pot ser més o menys simptomàtica, i una *fase final*, a partir del diagnòstic de SIDA. L'aparició de la teràpia antirretroviral de gran activitat, TARGA, a l'any 1996, ha modificat de forma espectacular l'evolució natural de cadascuna d'aquestes fases.

Fase aguda

Entre la setmana 2 i 4 de l'entrada del virus en l'organisme, en més del 50% dels casos es produirà un quadre clínic d'infecció aguda o primoinfecció d'intensitat variable i caracteritzat normalment per febre, adenopaties, miàlgies i *rash* anomenat *síndrome de mononucleosis* per la seva similitud amb la mononucleosis infecciosa produïda pel virus Epstein-Barr (Schacker T, 1996). En canvi, la infecció aguda pot provocar quadres amb afectació neurològica com meningitis o mielopatia, i inclús infeccions oportunistes com a conseqüència d'un deteriorament immunològic, com la neumonia per *Pneumocystis carinii* o la esofagitis candidiàssica.

A la setmana de l'inici dels símptomes es pot detectar una intensa virèmia, entre 10^5 i 10^7 còpies/ml d'ARN del VIH-1 en plasma (Piatak M, 1993). Durant aquesta fase es produeix una disseminació amb alta replicació del virus a diferents nivells, principalment en el teixit limfàtic i sistema nerviós central. Més d'1% de limfòcits T CD4 de sang perifèrica s'infectaran durant la fase aguda, produint-se una caiguda inicial del seu nombre, que no queda clar si és deguda a la seva destrucció o a un fenomen de redistribució (Feinberg M,

1992). Transcorregudes unes 19 setmanes de la infecció – existeix en aquest sentit una àmplia variabilitat interpersonal – es desencadena una resposta immunitària específica (Koup RA, 1994) que redueix de forma espectacular la càrrega vírica plasmàtica, almenys temporalment, fins aconseguir una situació d'equilibri entre els 6 i 12 mesos i que situarà la CV plasmàtica entre 10^2 i 10^6 còpies/ml, correlacionant-se aquest nivell amb el posterior curs clínic (Schacker T, 1996).

Fase crònica.

Després d'una fase aguda de la infecció, caracteritzada per l'existència de CV plasmàtiques molt elevades (de l'ordre de 10^5 a 10^7 còpies/ml), aquestes es redueixen en aproximadament 100 vegades (Koup RA, 1994), com a conseqüència de una resposta T citotòxica, fins arribar entre 6 i 12 mesos a un equilibri dinàmic entre la producció i l'aclariment del virus. Això no exclou l'existència d'una taxa de replicació del VIH-1 extremadament alta (Ho DD, 1995) en pacients sense tractament antirretroviral. L'estimulació immunològica a través de les vacunacions (antigripal, hepatitis A o B, antineumocócica) o noves infeccions (grip, reactivacions de virus herpètics o tuberculosi) produeixen increments transitoris de la virèmia sense repercussió a llarg plaç en la progressió de la infecció (Sullivan PS, 2000).

D'altra banda, la velocitat de progressió de la infecció no és la mateixa per tots els pacients, sent el nivell de replicació viral a plasma un dels principals factors pronòstic de progressió. Durant aquest període de la infecció crònica també es poden detectar alts nivells d'ARN del VIH-1 en els ganglis limfàtics, especialment en les regions perifol·liculars dels centres germinals. Es produeix una hiperplàsia dels ganglis limfàtics, i estudis immunohistoquímics suggereixen que el VIH-1, potser unit als seus anticossos, queda atrapat en el teixit limfàtic a través de cèl·lules dendrítiques fol·liculars (Pantaleo G, 1993).

En els darrers anys s'han descrit diferents factors que alteren la història natural de l'evolució de la infecció pel VIH-1. Entre aquests es poden diferenciar els que podem definir com a factors externs, factors relacionats amb l'hoste i factors relacionats amb el virus. Entre els factors externs destaca la co-

infecció pel virus de l'hepatitis C, que ha estat clarament relacionada amb un risc elevat de progressió de la infecció pel VIH-1 (Greub G, 2000). També com a cofactor extern, la infecció per VHS-2 no ha demostrat únicament un increment de la transmissió del VIH-1, sinó que sembla incrementar la taxa de replicació d'aquest (Quinn TC, 2000). Com a factors relacionats amb l'hoste, remarcar l'existència de diferents patrons del complex major d'histocompatibilitat (HLA); existeixen dades que diferents antígens de presentació de l'HLA desenvolupen un paper important en la història natural de la infecció pel VIH-1. Els serotips HLA de classe I B27 i B57 s'han relacionat amb la progressió lenta, mentre que els B35, Cw4 i potser els al·lels B8 han estat relacionats amb una malaltia rapidament progressiva (Keet IP, 1999) sobre la importància de diferents.

En quan als correceptors del VIH-1, polimorfismes a nivell de CCR5 (especialment la mutació $\Delta 32$), així com en CCR2, i encara que menys clarament, en CXCR4, semblen retrassar la progressió de la malaltia (Michael NL, 1997).

Fase final.

La fase avançada es caracteritza per ser una fase amb un recompte de cèl·lules CD4 inferiors a 200/ul, increment en la taxa de replicació viral, descens de l'activitat dels limfòcits T citotòxics anti-VIH, destrucció de l'arquitectura limfàtica, símptomes constitucionals i desenvolupament d'infeccions oportunistes.

Nombrosos estudis han relacionat l'existència d'elevats nivells circulants en plasma de VIH-1 amb una ràpida progressió a SIDA (Mellors JV, 1996), constituint la CV plasmàtica el valor predictiu més potent en l'evolució clínica. En aquesta fase final de la infecció pel VIH-1, els limfòcits CD4 semblen seguir sent, tot i l'existència d'alguns estudis que semblen implicar també als macròfags en aquest sentit, la principal font de producció del VIH-1. Tot i disminuir de manera significativa la xifra d'aquests a nivell perifèric, la seva

distribució a nivell de teixits continua éssent suficient per mantenir la producció viral.

D'altra banda, la CV plasmàtica ha estat relacionada, en un estudi recent, amb un major risc de desenvolupar infeccions oportunistes (neumonia per *Pneumocystis carinii*, malaltia per citomegalovirus o malaltia per *Mycobacterium avium-complex*) independentment del nivell de cèl.lules CD4.

Diferents estudis han valorat el risc de mort en pacients en la fase final de la infecció pel VIH-1 (pacients en fase de SIDA), després de la introducció del TARGA. Així, en un grup de 2.118 pacients amb diagnòstic d'infecció pel VIH-1 en fase de SIDA, seguits en diferents centres d'Itàlia entre maig de l'any 1997, es va observar un descens de més del 50% en el risc de mortalitat en el 1997 comparat amb els anys previs a 1995. Aquest risc també va ser clarament menor quan es comparen els pacients tractats amb mono i biteràpia, front als tractats amb teràpia triple (descens del risc d'un 80%) (Pezzoti P, 1999).

Tot i que l'efecte del tractament antirretroviral en la mortalitat associada a SIDA és evident, no està clarament quantificat el seu efecte real. En un article publicat recentment, es critica la diferència dels resultats de les taxes de descens de la mortalitat en el TARGA front a la era pre-TARGA, observades per diferents autors i que oscil.len entre 20-30% (Michaels SH, 1999) en uns estudis, i el 50 i 62% en altres, insistint en la difícil valoració d'aquesta variable per la diversitat dels tractaments i les diferents cohorts analitzades.

PRINCIPALS MARCADORS D'EVOLUCIÓ IMMUNOLÒGICS I VIRALS DE LA INFECCIÓ

Després d'analitzar un gran nombre d'estudis de pacients infectats pel VIH-1 en els quals es coneixia la data d'infecció, es pot concloure que entre el 50-70% hauran evolucionat a SIDA als 7-10 anys (Rezza, 1989; Gatell, 1991), però hi ha grans variacions individuals, havent-se descrit pacients que han evolucionat als 6 mesos i altres que als 5-10 anys estan estables amb un sistema immunològic relativament conservat. L'existència d'una gran variabilitat

individual en la progressió de la infecció pel VIH-1 a estadis més avançats, fa que sigui de gran importància la identificació d'un marcador que tingui la capacitat de predir la progressió clínica i per tant pugui ser utilitzat independentment de la clínica en la valoració de la progressió de la malaltia, seria el que s'anomena un marcador indirecte.

Els marcadors indirectes de la infecció pel VIH-1 són índexs que es correlacionen amb el desenvolupament clínic de la SIDA. El marcador ideal ha de reunir els següents criteris: 1) permetre identificar als pacients d'alt risc de progressió, 2) ajudar a estimar el temps de duració de la malaltia, 3) predir el desenvolupament de malalties oportunistes i 4) permetre la correcta monitorització dels tractaments antirretrovirals. A més a més ha de ser fàcilment quantificable, específic, sensible, reproducible, aplicable a individus diferents i de baix cost.

Marcadors immunològics.

Limfòcits CD4+

És la cèl.lula diana de la infecció pel VIH-1. És un bon marcador ja que reflecteix l'estadi de la infecció. El nivell de limfòcits T CD4, el percentatge i el quocient CD4/CD8, són dels marcadors més emprats, no només perquè són els que millor indiquen la progressió de la infecció, sinó perquè també indiquen el moment d'inici del tractament antirretroviral i de la profilaxi primària de les malalties oportunistes. El nivell de limfòcits T CD4 és molt variable, estan sotmès a una variació diürna així com a canvis deguts a malalties intercurrents. El percentatge de limfòcits T CD4 és menys variable havent-se observat que el valor

com a marcador de risc de progressió o de resposta al tractament és comparable al del nivell absolut de limfòcits T CD4 (Stein, 1992).

En la majoria de pacients un període de temps més o menys perllongat segueix a la resolució de la infecció primària. En general, en aquest període hi ha una pèrdua de 30-60 CD4+ cèl.lules/mm³ per any, encara que en molts pacients el nombre total de CD4 poden estar estables durant varios anys seguit d'una ràpida davallada (Stein, 1992; Easterbrook, 1994). La progressió a SIDA

en 1 o 2 anys després de la infecció primària té lloc en aproximadament un 5% dels pacients, associant-se la major part de les vegades a infecció primària greu i a la transmissió de variants SI del VIH-1 (Clark, 1993; Kuritzkes, 1994).

Nombrosos estudis sobre la història natural de la infecció pel VIH-1 i estudis clínics han demostrat que el nivell de limfòcits T CD4+ és un marcador independent del risc de progressió a SIDA i mort. Els nivells de limfòcits T CD4+ proporcionen una informació inestimable sobre l'estat immunològic del pacient i és un marcador excel·lent dels riscos immediats d'infeccions oportunistes, així la pneumònia per *Pneumocystis carinii*, *Citomegalovirus* i la infecció pulmonar per *Criptococ neoformans* i *MAI* rarament s'observen en pacients amb un nombre de limfòcits T CD4+ > a 250 cèl.lules/mm³ o amb un percentatge de limfòcits T CD4+ > 20-25% (Masur, 1989; Polis, 1990; CDC, 1992). En canvi, estudis recents han demostrat que el nivell de limfòcits T CD4+ no és un marcador potent del risc de progressió clínica en estadis inicials de la malaltia i menys poderós que els nivells d'ARN del VIH-1 en plasma, com a predictor de risc de la progressió de la malaltia (Mellors, 1997).

Els nivells de limfòcits T CD4+ augmenten rapidament en resposta al tractament antirretroviral i aquest increment està directament relacionat amb la intensitat de la supressió vírica aconseguida. Algunes evidències suggereixen que el ràpid augment inicial que segueix a l'inici dels tractaments és degut a la redistribució de les cèl.lules CD4 memòria (CD45RO+). La inicial redistribució de les cèl.lules memòria esta seguida per un lent però sostingut augment de les CD4 naïves (CD45RA+62L+) el qual es creu que es degut a la producció de noves cèl.lules CD4 (Autran, 1997). Però, tot i que hi ha una evident reconstitució immunològica enfront a certs Ag (CMV, Càndides, etc) (Plana, 2000), la reconstitució de la resposta proliferativa específica en front el VIH-1 no s'ha observat fins ara (Autran, 1997; Plana, 1998).

CD8/CD38+

La infecció pel VIH-1 té dos importants efectes en el sistema immunològic, una pèrdua progressiva de limfòcits T CD4+ i una marcada activació del sistema immunològic (Levacher, 1992; Giorgi, 1993). L'activació immunològica es reflecteix per una hiperglobulinèmia (Chess, 1984), expansió dels macròfags (Bofill, 1995) i un increment en el percentatge i el nombre absolut de limfòcits CD8 activats (Giorgi, 1993). En fases inicials de la infecció el pool de limfòcits CD8 incrementa, en particular, els que expresen CD38 i HLA-DR (Yagi, 1992). CD38 i HLA-DR són marcadors d'activació dels limfòcits T. Aquests limfòcits CD8 que expresen alts nivells d'antígens d'activació com són els CD38 i HLA-DR, són predictius de la taxa de disminució de limfòcits CD4 i es correlacionen amb la persistència de replicació viral *in vivo* (Echaniz, 1993; Bofill, 1996; Giorgi, 1993; Bouscarat, 1996).

Marcadors virològics**Fenotipus víric**

Els virus VIH-1 que estan en circulació en un moment determinat en un malalt no són fenotípicament ni genotípicament homogenis. Els primers aïllats del VIH-1 descrits presentaven l'habilitat de créixer en línies cel·lulars T-limfoblàstiques produïnt un efecte citopàtic característic amb cèl·lules gegants multinucleades (sinciti) i la posterior mort cel·lular. Aquest efecte citopàtic també s'ha observat en òrgans diana per a la infecció pel VIH-1 en humans, suggerint la possibilitat d'un paper patogènic d'aquest fenomen (Barré-Sinoussi i col., 1983; Popovic i col., 1984). Els virus no formadors de sincitis (NSI) poden aïllar-se de cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (CMSP) i no presenten l'anterior efecte citopàtic. Les soques NSI poden ser detectades al llarg de tota la infecció pel VIH-1, en canvi les soques SI solen detectar-se en fases finals de la malaltia i en un 50-60% dels casos precedeixen la fase de SIDA (Termette, 1990; Koot, 1992). En malalts asimptomàtics la conversió de fenotipus NSI a SI s'ha associat amb una marcada acceleració en la disminució del CD4+ i la progressió a SIDA en un període curt de temps (Termett, 1990; Koot, 1992; Schellekens, 1992).

Càrrega vírica

La càrrega vírica ha arribat a ser el marcador més precís de risc de la progressió a SIDA (Mellors, 1995 i 1997). Hi ha diferents mètodes per valorar la càrrega vírica: cultiu víric en CMSP, cultiu víric en plasma, càrrega vírica en òrgans limfàtics mitjançant tècniques d'hibridació in situ, quantificació de l'ARN i ADN en CMSP i quantificació de l'ARN en plasma o sèrum.

ADN províric en CMSP

La detecció quantitativa de l'ADN del VIH-1 és utilitzada per determinar el nombre de cèl.lules infectades circulants, però no dóna informació sobre la proporció de cèl.lules a on el virus s'està replicant activament. El principal reservori en sang perifèrica són els limfòcits T CD4+ (Psallidopoulos, 1989; Schnittman, 1989). Hi han dades contradictòries entre l'augment de càrrega vírica en CMSP i progressió, mentre's que uns autors veuen una relació entre ambdòs paràmetres (Escaich, 1992), altres, en estudis longitudinals, troben que el nivell d'ADN províric en CMSP no canvia significativament durant la progressió de la malaltia, però el valor total d'ADN del VIH-1 apareix més alt en els malalts que desenvolupen SIDA que en els que resten asimptomàtics (Gupta, 1993). Lee i al. veuen que el nivell de CMSP infectades s'estableix en fases inicials de la malaltia. Malalts amb nivells baixos d'ADN després de la infecció semblen tenir períodes asimptomàtics més llargs que aquells amb nivells més alts (Schnittman, 1990).

Alguns autors han estudiat de quina forma es troba l'ADN en el reservori perifèric (Bukrinsky, 1991; Jurrians, 1992,1994). En malalts asimptomàtics existeix preferentment ADN no integrat, sent la font d'aquest ADN extracromosomal els limfòcits T en repòs, aquest ADN pot integrar-se després de l'activació limfocitària. En malalts amb SIDA hi ha un increment de la forma integrada versus la no integrada. Estudis recents han descrit la persistència de la replicació en limfòcits T CD4+ memòria inclús en pacients amb virèmia plasmàtica indetectable per un llarg període de temps (Chun, 1997; Zhang, 1999; Furtado, 1999).

Càrrega vírica en òrgans limfàtics

A més a més de la detecció del VIH-1 en CMSP s'ha observat que els òrgans limfàtics són el primer lloc d'establiment i propagació de la infecció pel VIH-1 al llarg del temps (Pantaleo G, 1991, 1993; Embretson, 1993). L'habilitat del VIH-1 de replicar-se en les cèl.lules diana és dependent de la seva activació, tenint en compte que en òrgans limfàtics el nombre de limfòcits T activats és elevat això fa del teixit limfàtic un reservori molt important per a la replicació del VIH-1 durant les fases inicial de la malaltia (Fox, 1991; Graziosi, 1993a). En malalts asimptomàtics es va detectar una càrrega vírica més elevada en teixit limfàtic que en CMSP. El nombre de cèl.lules que contenen ADN del VIH-1 fou 0.5 log₁₀ més alta en nòduls limfàtics que en CMSP (Pantaleo G, 1991; Tamalet, 1994). La quantitat d'ARN del VIH-1 en els centres germinals disminueix amb la progressió de la malaltia així com el nombre de cèl.lules dendrítiques fol.liculars .

Cultiu víric en plasma

El cultiu quantitatiu en plasma medeix la quantitat de virus lliure. Durant la fase aguda de la infecció es poden detectar alts nivells de virus i el pic viral coincideix amb l'aparició de la fase aguda de la malaltia (Daar, 1994; Clark, 1991). Després de la seroconversió els títols poden disminuir fins a nivells indetectables, la virèmia plasmàtica pot ser no detectable en malalts amb CD4+ >500 cel/mm³ (Saag, 1991; Katzenstein, 1992). En fases finals de la malaltia poden incrementar (Ho, 1989).

Quantificació de l'ARN del VIH-1 en plasma o sèrum

L'ARN del VIH-1 pot ser detectat en plasma o en sèrum dels malalts infectats pel VIH-1 i reflecteix el nombre total de partícules víriques circulants incloent-hi virus infectius i no infectius, considerant-se que reflecteix la càrrega vírica total, ja que la producció de tots els centres de replicació (teixit limfàtic) pot accedir fàcilment a plasma.

- *Bases moleculars de les diferents tècniques de càrrega viral.*

Actualment s'utilitzen bàsicament tres mètodes comercials per mesurar l'ARN viral (ARNv) en plasma: *HIV ARN PCR* (Amplicor VIH-1 Monitor, Roche),

branched chain DNA o *bDNA* (Quantiplex HIV RNA Assay, Chiron) i *Nucleic acid sequences-based amplification* o *NASBA* (Nuclisens, Organon Teknika). Inicialment aquestes tècniques detectaven únicament fins a 10.000 còpies/ml (de 1^{era} generació) incrementant el seu límit de sensibilitat fins a 400-500 còpies/ml (2^{ona} generació). Actualment, s'utilitzen les tècniques de 3^{era} generació, que permeten detectar entre 20 i 50 còpies/ml. Entre elles s'inclouen: Roche Ultrasensitive HIV RNA Amplicor HIV-1 Monitor versió 3.0, Bayer bDNA Quantiplex versió 3.0 i NASBA o Nuclisens versió 2.0 (Bio Merieux). La major sensibilitat de les tècniques de tercera generació o ultrasensibles s'ha aconseguit, bàsicament, incrementant el volum de mostra i centrifugant a major velocitat i durant més temps.

Durant la fase aguda de la infecció pel VIH-1 els virus repliquen a alts nivells detectant-se càrregues víriques elevades. Posteriorment, l'aparició de la resposta immunològica específica en front del VIH-1 fa que aquella disminueixi indicant la neutralització del virus per part del sistema immunològic (Clark, 1991; Graziosi, 1993b). Durant la fase asimptomàtica els nivells de càrrega vírica detectats poden ser molt variables, permetent establir diferents patrons de progressió, progressors ràpids, progressors intermitjos i progressors lents que s'establirien immediatament després de la seroconversió (Jurrians, 1994).

La càrrega vírica com a marcador de progressió

Nombrosos estudis han demostrat l'existència d'una correlació entre els nivells d'ARN del VIH-1 a plasma amb l'estadi de la malaltia. Pacients amb SIDA o amb infecció pel VIH-1 simptomàtica tenen nivells significativament més alts de càrrega vírica que aquells amb infecció asimptomàtica, encara que no existeix una correlació entre nivell d'ARN del VIH-1 i nivells de limfòcits T CD4. La càrrega vírica a plasma és un marcador poderós de progressió i mort en tots els estadis de la malaltia. Una sèrie d'estudis dels AIDS Clinical Trials Group, incloent pacients amb CD4+ entre 0-500 cel/mm³ han demostrat que l'augment del risc de progressió associat a l'augment dels nivells d'ARN del VIH-1 és independent dels limfòcits T CD4+ i del fenotipus SI.

La càrrega vírica com a marcador d'eficàcia del tractament antirretroviral.

La càrrega vírica a plasma és un bon marcador de l'eficàcia d'una teràpia antirretroviral, una disminució mantinguda confereix un benefici clínic al pacient. La relació entre canvis en la càrrega vírica i benefici del tractament ha estat analitzat en almenys sis estudis randomitzats (ACTG 116, 116B/117 i 175; VA CS298; Upjohn 017 i 021 i Delta 1). Aquests estudis han revelat que una disminució de la càrrega vírica a plasma implica una reducció significativa del risc de progressió, que la reducció en el risc de mort o progressió de la malaltia és independent de la càrrega vírica basal i dels nivells de limfòcits T CD4 i que la reducció del risc de mort o progressió de la malaltia és independent de la càrrega vírica basal i dels nivells de limfòcits T CD4 secundari al tractament. La magnitud del benefici és similar d'un estudi a l'altre. La reducció de la càrrega vírica del VIH-1 a plasma de 2 vegades ($0.3 \log_{10}$) disminueix el risc de mort o progressió aproximadament un 30% (Welles, 1996; Coombs, 1996), una disminució de 4 vegades ($0.6 \log_{10}$) disminueix el risc en un 55% i una disminució de 10 vegades ($1 \log_{10}$) disminueix el risc en un 65% (Katzenstein, 1996).

Estudis recents amb IP confirmen aquest resultat, al ACTG 320, on es compara ZDV/3TC amb ZDV/3TC/IDV (Demeter, 1998) el canvi del nivell basal fou fortament correlacionat amb la magnitud del benefici clínic. Estudis addicionals suggereixen que el grau de caiguda de la càrrega vírica per sota dels límits de detecció és predictiva de la resposta virològica a llarg termini (Monatner, 1998; Reijers, 1998).

La càrrega vírica com a marcador d'inici del tractament antirretroviral.

Fins a l'any 1996, es recomanava iniciar el tractament quan el pacient presentava un recompte limfocitari inferior a 500 limfòcits T CD4+. Amb la introducció de les noves tècniques de quantificació de l'ARN del VIH-1 a plasma, es varen qüestionar aquestes recomanacions. A partir dels resultats de Mellors i col., que varen observar que pacients amb $CD4+ > 500 \text{ cel/mm}^3$ tenien nivells elevats de càrrega vírica, es va plantejar iniciar el tractament segons els nivells de càrrega vírica i no segons els nivells de T CD4+. Com a

conseqüència dels primers estudis sobre el valor de la càrrega vírica com a marcador pronòstic i de resposta al tractament, a l'any 1996 es varen publicar les primeres recomanacions per a iniciar el tractament (Carpenter, 1996). En elles, es recomanava iniciar tractament amb CV > 30.000-50.000 còpies/ml independentment del nombre de limfòcits T CD4+. Encara que alguns autors pensaven que era millor iniciar-lo amb CV més baixes, 10.000 còpies/ml, per tal d'aconseguir més fàcilment nivells indetectables. A l'any 1997 es recomanava iniciar el tractament amb TARGA a tots els pacients amb nivells de càrrega vírica entre 5.000-10.000 còpies/ml independentment dels nivells de limfòcits T CD4+ (Carpenter, 1997) i considerar el seu inici en tots els malalts amb càrrega vírica detectable. Les noves guies de tractament publicades recentment pel GESIDA/Plan Nacional sobre el SIDA 2002 i pels IAS-USA han tornat a paràmetres més conservadors, tenint els nivells de limfòcits T CD4+, un altre cop, un paper més protagonista que el que havien tingut en les guies de l'any 1997. La recomanació es basa en retrassar el tractament en aquells pacients assintomàtics que tenen uns nivells de CD4 >350 cèl.lules/mm³.

La càrrega vírica com a marcador de canvi del tractament antirretroviral.

Les variacions de la càrrega vírica a plasma són el marcador per a valorar l'eficàcia o no d'una determinada combinació terapèutica. En línies generals, en aquells pacients que aconseguixen nivells indetectables (<500 ó 200 còpies/ml), qualsevol increment en la mateixa aconsellaria un canvi de tractament. De totes maneres, aquesta premisa s'ha de prendre amb cautela, ja que han estat descrites variacions de la càrrega vírica en front d'estímuls antigènics com poden ser les vacunacions i infeccions agudes (Staprans, 1995; Busch, 1996; Staszewski, 1998).

S'haurien de realitzar dues determinacions de la càrrega vírica, una basal i a les 4-6 setmanes d'iniciar, afegir un nou fàrmac o canviar el tractament. Un cop s'ha iniciat el tractament la càrrega vírica s'hauria de repetir a les 8 setmanes per tal de comprovar l'efectivitat del tractament. Degut a la variabilitat inter-intra assaig un augment >0.5 log₁₀ és necessari per tal de

constatar un fracàs terapèutic, essent convenient una determinació posterior per tal de confirmar-ho.

És important recordar que nivells indetectables realment significa que la càrrega vírica està per sota del límit de detecció de les tècniques que tenim actualment al nostre abast (<500-200 còpies/ml i <50-20 còpies/ml). S'ha observat en diferents estudis que el fet de tenir una resposta virològica més llarga es relaciona amb el nadir aconseguit (Demeter i col., 1998; Montaner i col., 1998; Reijers i col., 1998). Per tant l'ús de tècniques ultrasensibles a la pràctica diària ha aconseguit una millor monitorització de la resposta al tractament.

TRACTAMENT DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1/SIDA

El tractament del pacient infectat pel VIH-1 inclou els següents aspectes: a) tractament de la patologia associada, b) tractament antirretroviral, i c) altres mesures terapèutiques.

Tractament de la patologia associada

El tractament, així com la profilaxi de les infeccions oportunistes té valor significatiu per la supervivència i qualitat de vida d'aquests pacients. El TARGA ha permès eliminar determinades profilaxis. En pacients amb profilaxis primàries i secundàries contra *Pneumocystis carinii*, es poden interrompre aquestes de manera segura després que el nombre de CD4 sigui >200cèl.lules/mm³ durant més de tres mesos (Lopez Bernaldo de Quirós JC, 2001). No hem d'oblidar que més d'un 90% d'ells moren a conseqüència d'infeccions oportunistes, i un nombre molt menor per les neoplàsies associades. El deteriorament progressiu del sistema immunològic ocasionat pel VIH-1 dona lloc a que un nombrós grup de microorganismes puguin produir malalties més freqüents i amb major gravetat.

Les infeccions més greus apareixen quan l'individu arriba a un nivell de limfòcits CD4+ < 200 cèl.lules/mm³. La profilaxi de les infeccions més greus que

afecten a aquests individus ha reduït la seva prevalència, perllongant la seva supervivència i millorant la seva qualitat de vida. En canvi, la profilaxi i el tractament d'aquestes infeccions es veu limitada per les circumstàncies: toxicitat i interaccions farmacològiques (Zhang, 1998; Kaplan JE, 1995; Piscitelli, 1997). La profilaxi de les infeccions oportunistes abarca la prevenció del primer episodi (profilaxi primària), de les recurrències (profilaxi secundària), i la no exposició del pacient a nous patògens. La profilaxi primària va ser establerta a partir del 1989, quan es va demostrar que era possible disminuir la incidència de la pneumònia per *Pneumocystis carinii* (PCP) en pacients amb xifres de limfòcits CD4+ < 200 cèl.lules/mm³, mitjançant l'administració de cotrimoxazol o pentaminida (Zhang L, 1998). Des d'aleshores moltes altres infeccions s'han beneficiat d'aquesta actitud (DHHS. <http://www.hivatis.org2001>).

La majoria d'infeccions oportunistes reapareixen quan el tractament per un episodi agut és interromput. En canvi, el tractament pot mantenir-se de per vida com profilaxi secundària. Això és particularment cert en el cas d'infeccions oportunistes com la pneumònia per PCP, la encefalitis per toxoplasma, la retinitis per citomegalovirus (CMV), la criptococosi i l'infecció pel *complexe Mycobacterium avium intracelulare* (MAC) (Katlama C, 1996; Drew WL, 1995; Chaisson RE, 1994).

La prevenció de l'exposició a nous patògens és important, sobretot en el cas d'algunes infeccions que no tenen un tractament eficaç, i en les que és difícil realitzar la profilaxi amb medicaments.

Els principals factors que s'han de considerar per decidir front a quines infeccions s'ha de realitzar profilaxi primària, secundària o ambdues són el nivell d'immunosupressió del pacient, la incidència de la infecció a l'àrea de residència, l'eficàcia del fàrmac i la seva influència en la qualitat de vida del pacient (DHHS <http://www.hivatis.org2001>; Berenguer i col., Recommendations of the Group de Estudio del SIDA 2000).

Tractament antirretroviral.

S'ha aconseguit una millora en quant a la supervivència dels malalts infectats pel VIH-1, però existeixen una sèrie de circumstàncies com són: l'aparició d'efectes secundaris a mig-llarg plaç (especialment de caire metabòlic (Martínez E, 2001)), la dificultat per part del pacient de mantenir uns nivells de compliment que, perquè el tractament sigui efectiu han de ser pròxims al 100% (Patterson DL, 2000), l'emergència de variants virals resistents als fàrmacs i la necessitat de que el tractament s'ha de mantenir, de moment, de per vida (Markowitz M, 2000), fan que els reptes aconseguits no siguin del tot exitosos. A més a més, han anat apareixen al llarg dels anys una sèrie de necessitats noves, a les que s'ha de donar resposta a mesura que sigui possible: el desig de maternitat de moltes pacients infectades pel VIH; la identificació de pacients més vulnerables i amb una major dificultat d'adherència al tractament; el desig dels pacients de disposar de nous tractaments que ajudin a la simplificació de la seva presa.

Per tot això, sembla que es vulgui plantejar un tractament en termes d'individu-persona per administrar en cada cas la millor combinació antirretroviral (DHHS <http://www.hivatis.org2003>):

Pacients verges al tractament.

Les tendències actuals, tenint en compte els efectes secundaris dels fàrmacs a llarg termini i la dificultat d'una adherència estricta i d'altra banda, la possibilitat de reconstitució immune suficient com per evitar infeccions oportunistes inclús en pacients avançats, ha desplaçat el criteri d'inici del tractament des d'una indicació basada en criteris virològics a una altra basada en criteris clínics i, sobretot, immunològics, de manera que s'accepta, que en pacients asimptomàtics com a norma general (Rubio R, 2002) no està indicat el tractament en aquells pacients que tenen una xifra de limfòcits CD4 >350 cèl.lules/ul.

Existeixen grups de pacients amb algunes característiques comuns que s'han de considerar a l'iniciar el tractament antirretroviral. Aquells pacients amb comorbiditat mereixen una valoració individualitzada en funció d'interaccions

farmacocinètiques i perfils diferencials de toxicitat de fàrmacs. D'altra banda, aquells pacients amb una malaltia psiquiàtrica i/o problemàtica social, constitueixen un grup més vulnerable, amb un major risc de deixar el tractament (Chesney MA, 2000), sent fonamental, intentar estabilitzar la seva situació previament a l'inici del tractament antirretroviral i seleccionar combinacions de fàrmacs que siguin senzilles i sense interaccions amb el tractament basal del pacient. A més a més, és freqüent la presència de dones infectades pel VIH que volen tenir descendència amb el mínim risc de transmissió de la infecció: en aquesta situació i, com a principi general, s'ha de tenir en compte que, evitant alguns fàrmacs de risc teratogènic demostrat, el risc de transmissió es minimitza amb un adequat control de la mare, això és, tenint com objectiu la càrrega vírica indetectable (Iribarren JA, 2001).

Pacients pretractats.

Existeixen diferents situacions en les que es pot trobar el pacient pretractat. El fracàs virològic és relativament freqüent a la pràctica clínica (Lederberger B, 1999; Lucas GM, 1999), com a conseqüència moltes vegades, de la subòptima adherència al tractament. En aquestes situacions, algunes eines poden ser útils per guiar la pauta més adequada: l'estudi de resistències, sent la principal limitació la seva interpretació, i en algunes situacions concretes, la determinació dels nivells plasmàtics de fàrmacs (Khoo SH, 2001).

Alguns pacients, que estant en tractament antirretroviral presenten un excel·lent control virològic, es plantegen les interrupcions estructurades del tractament o si aquesta estratègia no és possible, la possibilitat de simplificar règims, que amb relativa freqüència són complexos.

MUTACIONS DE RESISTÈNCIA ALS ANTIRRETROVIRALS

A la infecció pel VIH-1, diferents variants genètiques poden coexistir en un mateix pacient. Aquesta heterogeneïtat del virus ha estat descrita amb el nom de *quasiespècies* o *polimorfisme poblacional*. S'han descrit diferències de fins a un 25% en la seqüència de nucleòtids de les diferents *quasiespècies* i s'ha estimat la

presència d' entre 5×10^5 y 5×10^{11} quasiespècies en un mateix pacient infectat (Haseltine WA, 1988; Saah MS, 1988). Aspectes de la variabilitat genètica del VIH-1 poden influir en el seu poder patogen i virulència, sent responsables de l'aparició de soques amb major capacitat replicativa i lessional o bé amb diferent tropisme cel.lular. A més a més, la variabilitat genètica del VIH-1 pot modificar la sensibilitat de determinades soques als fàrmacs antirretrovirals.

La font de la variabilitat de la població vírica en un mateix pacient és, a més a més de possibles mecanismes de recombinació genètica, l'absència de mecanismes correctors de les ADN polimerases víriques (Preston BD, 1988; Kellam P, 1995; Yusa K, 1997) conjuntament amb la plasticitat de las proteïnes virals i l' elevada cinètica de replicació del VIH-1 (Wei Xi, 1995; Ho DD, 1995). Sobre la base d' una producció diària de 10^9 virions, 10^7 - 10^8 cicles de replicació diaris, una taxa d' error de 10^{-4} - 10^{-5} per nucleòtid i cicle de replicació i un tamany del genoma de 10.000 nucleòtids, es garanteix l' existència prèvia de practicament qualsevol mutació.

S' han detectat virus portadors de mutacions de resistència als inhibidors nucleòsids (ITIAN) i no nucleòsids (ITIANN) de la transcriptasa inversa i als inhibidors de la proteasa (IP) en pacients no tractats previament (Mohri H, 1995; Nájera I, 1994). Poden estar produïdes per dos mecanismes: a) presència de polimorfismes genètics en codons crítics que redueixen l' afinitat d' un antirretroviral pel seu lloc d' unió a l' enzim diana (Nájera I, 1995), o b) transmissió d'un virus amb mutacions de resistència a partir d' un pacient exposat a tractament antirretroviral (Hecht FM, 1998; Imrie A, 1997). A Espanya la taxa de resistència a nucleòsids en els pacients *naïve* és del 12-13% (Puig T, 2000), mentre que en un estudi recent de seroconvertors va ser del 23% (Briones C, 2001). Generalment, els estudis de resistències primàries en pacients *naïve* amb infecció crònica presenten prevalències menors que quan es realitzen sobre seroconvertors recents, degut probablement a que els virus resistents han passat a ser minoria per la possible disminució de la seva eficàcia biològica i el conseqüent sobrecreixement dels virus sensibles o salvatges.

Els mutants resistents a un determinat antirretroviral es troben en baixa concentració abans de l'inici del tractament (Mohri H, 1995; Nájera I, 1994; Nájera I, 1995), probablement degut a que presenten desventatges cinètics respecte de les soques salvatges (Wei X, 1995; Coffin JM, 1995), de tal manera que si el tractament antirretroviral no assoleix una adequada activitat farmacològica (és capaç de suprimir únicament la replicació de les soques salvatges), es produirà un sobrecreixement i predomini de les variants resistents. És a dir, la pressió ambiental selectiva de la teràpia antirretroviral aporta a aquests mutants l' avantatge competitiva necessària per a que, eventualment, representin la població dominant.

S' ha demostrat que els pacients que assoleixen i mantenen nivells de càrrega vírica per sota de les 50 còpies ARN-VIH-1/ml de plasma durant un temps perllongat a conseqüència del tractament, presenten una major duració de l' eficàcia terapèutica l'evitar o enlentir l' aparició de variants resistents com conseqüència de la baixa activitat replicativa del virus i per tant de la baixa mutabilitat vírica (Kempf DJ, 1998; Gunthard H, 1998). En canvi, tot i l'optimisme que va seguir a la introducció del tractament antirretroviral d'alta eficàcia, existeixen nombroses evidències de que la replicació viral persisteix, tant a partir de reservoris latents com a partir d' escapaments de replicació en cèl.lules en les que el virus es multiplica a baix nivell (Wong JK, 1997; Finzi D, 1997).

La rapidesa amb que una població mutant substitueix a la població sensible a un fàrmac antirretroviral dependrà de dos factors: a) *el nombre de mutacions que es requereix per proporcionar un alt nivell de resistència* o barrera genètica. Amb alguns fàrmacs aquest fenomen pot ser extremadament ràpid (baixa barrera genètica), com en el cas del 3TC i la nevirapina (Richman DD, 1994; Schuurman R, 1995), en els que la mutació d' un únic nucleòtid és capaç d' induir resistència d' alt nivell, mentres que per altres com la zidovudina o els inhibidors de la proteasa es necessària l' acumulació seqüencial de múltiples mutacions en diferents posicions (alta barrera genètica) (Molla A, 1996; Boucher CA, 1992). E canvi, Staszewski (1999) han demostrat recentement que la utilització de dos fàrmacs amb baixa barrera genètica en teràpia triple (ZDV, 3TC,

EFV) no implica una major probabilitat de fracàs a conseqüència de la selecció de mutacions de resistència. *b) El cost cinètic.* El sobrecreixement de variants del VIH-1 resistents als antirretrovirals *in vivo*, és conseqüència tant d'una disminució de la susceptibilitat al fàrmac com del manteniment d'una bona capacitat de replicació (*fitness*).

En els estudis amb ritonavir (Molla A, 1996), el sobrecreixement inicial de variants amb la mutació 82 aïllada, suggereix que la supressió incompleta d'aquestes variants pre-existents seria el primer pas per la posterior selecció de variants altament resistents, portadores de mutacions múltiples adquirides seqüencialment i que no es trobaven previament en el pacient, sinó que es generarien *de novo* davant d'estats de pressió ambiental farmacològica continuada que no inhibissin completament la replicació del VIH-1. Si la població vírica predominant representa les variants millor adaptades front la pressió farmacològica, l'aparició seqüencial de les diferents mutacions observada amb ritonavir, contribuiria a la viabilitat del VIH-1, tant mitjançant la reducció de l'afinitat de l'inhibidor per l'enzim, com potenciant l'activitat replicativa de les *quasiespècies* víriques. Aquest fet podria explicar en part el perquè de l'existència de mutacions que, si bé contribueixen a incrementar els nivells de resistència als IP, no es troben localitzades en les àrees actives de l'enzim que interaccionen directament amb l'inhibidor. A més a més, l'acumulació de mutacions a la proteasa seria causa d'una disminució paulatina de la seva efectivitat, de tal manera que en situacions de mantinguda pressió ambiental farmacològica, la única via del VIH-1 per millorar la seva viabilitat seria mitjançant la generació/selecció de mutacions en les poliproteïnes precursors que, sense afectar al nivell de susceptibilitat a l'IP, permetrien una millor activitat de la proteasa mutada (Doyon L, 1996; Zhang YM, 1997).

En resum, les quasiespècies en un individu es troben sota variabilitat genètica, competició i selecció contínues. El desenvolupament de resistències farmacològiques dependrà del grau d'heterogeneïtat de la població vírica en un individu, del grau de replicació vírica durant el tractament, de la facilitat d'adquisició d'una mutació(ns) en particular, de l'efecte de les mutacions en la

susceptibilitat al fàrmac i de l'eficàcia biològica vírica. D'altra banda, altres factors també contribueixen en gran mesura al desenvolupament de resistències com la farmacocinètica i farmacodinàmica de cada fàrmac en particular. Finalment, determinats mecanismes de resistència cel·lular com la resistència a nivell dels mecanismes de fosforilació intracel·lular (Font E, 1999), en el cas dels ITIAN, o l'acció de bombes cel·lulars d'expulsió de fàrmacs (Lee CG, 1998; Schuetz JD, 1999), podrien contribuir a explicar l'existència de fracàs terapèutic en absència de mutacions en pacients amb una bona adherència al tractament.

Importància clínica de la presència de soques resistents.

El fracàs del tractament antirretroviral és el principal motiu de preocupació en el seguiment del pacient infectat pel virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH-1). Els recents avenços en teràpia antirretroviral no han aconseguit evitar, en un grup substancial de pacients, el retorn a nivells quantificables de la càrrega vírica (Ledergerber B i col., 1999). En canvi, com han tornat ha demostrar 2 assaigs clínics (Havlir DV, 2000; Descamps D, 2000), pot donar-se un fracàs virològic en teràpia TARGA sense l'emergència de mutacions de resistència a la totalitat de fàrmacs inclosos en el règim terapèutic. Diversos factors poden contribuir al fracàs terapèutic: a) falta de compliment; b) potència farmacològica limitada; c) farmacocinètica subòptima; d) activació farmacològica deficient (nucleòsids); e) deterior immunològic progressiu i, més recentment, f) resistència cel·lular basada principalment en l'existència de bombes intracel·lulars d'expulsió encarregades d'exportar fora de la cèl·lula fàrmacs que han penetrat en la mateixa (Lee C, 1998; Kim R, 1998). Les variants resistents del VIH-1 poden aparèixer com a resultat de qualsevol dels factors anteriors, però la resistència farmacològica no és un requisit necessari per l'existència de fracàs terapèutic. Aquest fet ha motivat que durant molts anys hagi estat motiu d'estudi fins a quin punt la resistència era causa de fracàs terapèutic o simplement una conseqüència de la progressió de la infecció i de la replicació vírica continua. El desenvolupament de la càrrega vírica va permetre establir la relació directa entre l'

aparició de resistències i el fracàs terapèutic (D'Aquila RT, 1995; Japour AJ, 1995), relació que actualment es troba ben establerta per pràcticament tots els antirretrovirals en ús clínic.

Impedir la progressió de la infecció i l'aparició de resistències, a través de la reducció de la càrrega vírica a nivells indetectables és el principal objectiu de la teràpia antirretroviral i la capacitat del VIH-1 per desenvolupar resistències és el principal obstacle en la seva eficàcia a llarg termini (Coffin JM, 1995). Fins al moment actual, mentre la replicació vírica plasmàtica es mantingui per sota dels nivells de detecció en les tècniques ultrasensibles (20-50 còpies d'ARN-VIH/ml plasma), no es detecta l'aparició de resistències i es limita la progressió de la malaltia i això s'ha demostrat després de més de tres anys de tractament amb teràpia triple (Finzi D, 1997; Harris M, 1997; Gulick R, 1996; Powderly WG, 1997; Carpenter CCJ, 1997; Zhang YM, 1997).

En canvi, si les concentracions assolides pels diferents fàrmacs en determinats reservoris del virus (teixit limfàtic, sistema nerviós central i tracte genital) són subòptimes, la replicació vírica continua en aquestes àrees serà causa de l'aparició de virus resistents. Així, *quasi*espècies sensibles, parcialment resistents i resistents podrien arribar a coexistir simultàniament en sang i en diferents compartiments de l'organisme humà (Wildemann B, 1993; Delassus S, 1992; Korber BTM, 1994).

S'ha demostrat que en els pacients amb teràpia triple i amb supressió mantinguda de la càrrega vírica en plasma i teixit limfàtic de fins 30 mesos, els virus aïllats l'activar els limfòcits CD4+ en repòs, principal reservori latent del virus, no són portadors de mutacions de resistència (Wong JK, 1994). D'aquestes dades sembla deduir-se que la resistència als antirretrovirals no apareixerà mentre es mantinguin concentracions farmacològiques suficients per inhibir completament l'existència de nous cicles de replicació que puguessin produir-se a partir de l'activació *in vivo* del VIH latent.

Mètodes per la detecció de resistències.

La prevenció, caracterització i maneig clínic de les resistències centralitzen gran part de l'atenció i en aquest sentit, l'interès clínic de les noves tecnologies per detectar la presència de resistència vírica als fàrmacs antirretrovirals constitueix encara una àrea que es troba en ràpid desenvolupament.

Estudis recents han demostrat la utilitat, a curt termini, dels estudis de resistències tant genotípics com fenotípics en la presa de decisions terapèutiques (Baxter JD, 2000; Durant J, 1999; Cohen C, 2000; Melnick D, 2000; Haubrich R, 2001; Meynard JL, 2000; Tural C, 2002), derivant-se en l'elaboració de recomanacions d'utilització de les citades proves per organismes oficials (Carpenter CCJ, 2000; Hirsch MS, 2000; <http://hivatis.org/trtgdlns.html>; Pozni A, 2000; <http://www.msc.es/sida/asistencia/resistencias.htm>; Gatell JM, 2001). En termes generals els estudis de resistències es recomanen davant l'inici de tractament durant la primoinfecció o seroconversió recent, davant l'inici de tractament o fracàs terapèutic en la dona embarçada, en el primer, segon i tercer fracàs terapèutic i en la vigilància epidemiològica de les mutacions de resistència.

Existeixen dos tipus d'aproximació a la detecció de resistències víriques: les proves genotípiques i les fenotípiques. Les primeres detecten mutacions en el genoma del VIH-1 associades amb l'aparició de resistències, mentre que les proves fenotípiques medeixen la concentració de fàrmac necessària per inhibir la replicació vírica en cultiu cel·lular.

Mètodes Genotípics

Els mètodes genotípics es basen en l'amplificació genètica per PCR d'aquelles regions del genoma del VIH-1 implicades en el desenvolupament de resistències (regions de la transcriptasa inversa i de la proteasa del gen *pol*) pel posterior anàlisi de la seva seqüència de nucleòtids. Aquests mètodes, pels que existeixen assaigs comercialitzats, es realitzen, sense la necessitat d'aïllar el VIH-1 en cultiu, en un curt període de temps i poseeixen la capacitat de detectar múltiples mutacions i el percentatge de representativitat d'aquestes en

el conjunt de quasiespècies d'un pacient determinat. La seqüenciació és el mètode genotípic de referència, ja que proporciona informació completa sobre la seqüència de la regió del genoma del VIH-1 que s'està analitzant, permet identificar noves mutacions causants de la resistència a un determinat fàrmac i facilita la caracterització dels diversos patrons mutacionals pels que el VIH-1 adquireix resistència als diferents antirretrovirals en el context del tractament combinat.

Les diferents tècniques són:

1. La hibridació del producte amplificat amb sondes específiques que identifiquen mutacions en posicions específiques (LiPA), el que permet una major rapidesa en la tècnica i una major sensibilitat per detectar les poblacions menors, tot i que té els inconvenients de que no es poden determinar totes les mutacions.
2. La seqüenciació emprant xips d'hibridació múltiple (per exemple, Affimetrix), no disponible en el nostre país.
3. La seqüenciació automàtica (mitjançant sistemes de seqüenciadors com els d'Applied Biosystems o Visible Genetics), que són els més utilitzats i permeten seqüenciar la totalitat o la pràctica totalitat de la TI i PR, tant a partir d'ARN plasmàtic com ADN proviral.

Mètodes Fenotípics

Els mètodes fenotípics defineixen si una soca de VIH-1 és sensible o resistent a un determinat fàrmac antirretroviral en funció de la seva capacitat de replicació front concentracions decreixents del fàrmac *in vitro*. El resultat que s'obté es coneix com concentració inhibidora del 50% o del 90% (IC₅₀ o IC₉₀), concentració del fàrmac necessària per reduir la replicació vírica en el 50% o en el 90% respectivament, i que permet comparar-la amb la que es necessitava per inhibir una soca de referència de laboratori o soques aïllades en el mateix pacient abans d'exposar-lo a tractament antirretroviral. Aquest sistema requereix aïllar el VIH-1 i quantificar el virus a partir de co-cultius amb cèl·lules mononucleades de sang perifèrica.

Un inconvenient important dels mètodes fenotípics és la possibilitat de seleccionar les soques millor adaptades al cultiu, que no tenen perquè ser representatives del conjunt de quasiespècies que circulen en un individu en un moment determinat. Intentant evitar aquest problema s'han desenvolupat mètodes que combinin les tècniques fenotípiques amb les moleculars basades en la tecnologia d' ADN recombinant (Kellam P, 1994; Shi C, 1997; Hertogs K, 1998). Consisteix en extraure l'ARN total a partir del plasma d' un pacient amb una càrrega vírica superior a les 1.000 còpies ARN-VIH-1/ml, sintetitzar el ADNc corresponent i amplificar les regions de la transcriptasa inversa i de la proteasa. Els productes amplificats són clonats en un vector VIH-1 plasmídic en el que els gens de la transcriptasa i de la proteasa han estat previament deleccionats. El virus recombinant resultant amb capacitat infecciosa serà utilitzat en les proves fenotípiques.

Tant els mètodes genotípics com l'assaig del virus recombinants presenten dues desventatges comuns importants, generalment únicament s'obtenen resultats quan es realitzen a partir de pacients amb càrrega vírica superior a les 1.000 còpies ARN-VIH-1/ml de plasma i detecten únicament quasiespècies amb una representativitat igual o superior al 20%. Així, les variants resistents a un determinat fàrmac en absència de la seva utilització terapèutica, podrien trobar-se en un percentatge inferior al mínim necessari per ser detectades pels mètodes genotípics. De tal manera que l'iniciar *de novo* el tractament amb aquest fàrmac concret, o bé al reintroduir-lo a la pauta terapèutica, seleccionaria ràpidament les variants resistents presents en el pacient. És a dir, aquestes proves únicament aporten informació sobre les resistències a la combinació terapèutica en ús.

Fenotip Virtual

L' existència en els laboratoris Virco d' una àmplia base de dades que reuneix informació fenotípica i genotípica de més de 18.000 mostres ha donat lloc al concepte de fenotip virtual (VircoGEN II) (Larder B, 1999). Una vegada obtingut el genotip viral, es busca a la base de dades amb la finalitat d'

identificar els diferents fenotips associats a aquest genotip. Els estudis de comparació entre el fenotip real i el virtual han demostrat una correlació del 80-90% (Larder B, 2000). La principal avantatge del fenotip virtual és que proporciona informació ràpida sobre la sensibilitat del VIH-1 a tots els antirretrovirals una vegada conegut el seu genotip, sense que sigui necessari realitzar cap prova fenotípica. D'altra banda, el fenotip virtual té tres inconvenients importants: a) la base de dades no inclou tots els possibles genotips, especialment aquells seleccionats per noves combinacions de fàrmacs o nous antirretrovirals; b) l'accés és limitat al ser propietat d'un únic laboratori comercial i c) no està validat clínicament, tot i que alguns estudis han demostrat ser un predictor independent d'una millor resposta virològica en pacients amb poca experiència amb antirretrovirals (Graham N, 2001; Hammer S, 2001).

Interpretació de les Proves de Resistència

Actualment, un dels principals problemes de les proves de resistència, especialment dels mètodes genotípics, és la interpretació dels resultats. Tural y col a l'estudi HAVANA han demostrat com s'obté una major resposta virològica quan el genotip és interpretat per un sistema expert, en comparació a la branca de pacients en els que el tractament era modificat exclusivament en base al genotip (Tural C, 2002). Existeixen diversos sistemes informàtics disponibles actualment per la interpretació del genotipat, en canvi, existeixen discrepàncies entre ells de fins a un 30 %, especialment pels ITIAN amb índexs de correlació que no acostumen a superar el 60%, sent per tant necessària la validació oficial d'aquests sistemes informàtics experts (Shafer RW , 2001; Schmidt B, 2001; Boulmé R, 2001).

Els estudis publicats fins ara, en els que es compara el genotip i el fenotip del VIH-1 en la mateixa mostra clínica són escassos però indiquen que aquesta correlació no és perfecta. En aquests estudis, el grau de discrepància entre el fenotip víric i el genotip oscil·la entre un 15% i un 26% (Boden D, 1999; Little SJ, 1999). En general, es tracta de virus que la seva resistència fenotípica és moderada (IC50 entre 2.5 i 10 vegades superior a la del virus control) i que no

contenen en el seu genotip ninguna de les mutacions primàries que confereixen resistència als antirretrovirals. Amb freqüència, aquests virus que presenten un genotip i fenotip discordant, contenen en el seu genoma polimorfismes en la seqüència de la transcriptasa inversa i de la proteasa. Parkin (2002) han demostrat recentment en 200 mostres una freqüència important de discordances entre els dos tipus de proves. El 75% de les mostres era discordant per un fàrmac i per 2, 3 i 4 fàrmacs la discordança va ser del 54%, 33% i 22% respectivament. Aquestes dades posseeixen una significació clínica considerable, ja que l'elecció d'una pauta terapèutica pot diferir segons el tipus de prova utilitzada. En qualsevol cas, aquestes dades confirmen la dificultat de la interpretació dels resultats dels mètodes de laboratori per la detecció de resistències del VIH-1 als antirretrovirals i reiteren la necessitat de realitzar estudis en els que se comparin els mètodes genotípics i fenotípics de forma prospectiva.

Finalment, no s'ha d'oblidar que les definicions de resistència fenotípica i genotípica s'haurien de fonamentar amb la seva relació amb l'evolució clínica i virològica dels pacients, i no, com ho fan actualment, en dades i paràmetres de laboratori. És a dir, es desconeixen els punts de tall clínics d'increments de la IC50 pels antirretrovirals, a excepció de l'abacavir (Lanier ER, 2001) i lopinavir (Kempf DL, 2001), i que és la base de les actuals dificultats en la interpretació dels resultats. D'altra banda, també és cert, que en el context de la teràpia TARGA serà molt difícil establir els punts de tall clínics per cada antirretroviral de manera individualitzada.

En resum, l'accés cada vegada més generalitzat als mètodes genotípics i, en menor grau, als mètodes fenotípics per la determinació de resistències del VIH-1 als antirretrovirals a fet que el seu ús s'hagi incorporat rapidament a la pràctica clínica. D'altra banda, la seva utilització en la presa de decisions terapèutiques ha tingut lloc abans de que s'hagin estandaritzat criteris per la interpretació dels seus resultats. Tant els mètodes genotípics com els fenotípics tenen inconvenients importants (sent el més important el de la dificultat de la interpretació dels resultats), que obliguen a que la seva utilització s'hagi de fer de moment de manera conservadora.

Com podem obtenir un benefici clínic amb un millor coneixement de la evolució viral?

Un dels exemples més il·lustratius de l'impacte clínic que ha tingut la investigació bàsica sobre virus ARN ha estat el coneixement de l'estructura en quasiespècie dels virus ARN i la seva aplicació en el disseny dels nous tractaments antirretrovirals combinats. Tot i que el fracàs de la monoteràpia antiviral, com a conseqüència del potencial adaptatiu de les quasiespècies dels virus ARN, va ser predit fa més de 10 anys, no ha estat fins els darrers anys que s'ha arribat a la conclusió que el tractament antirretroviral combinat és la millor alternativa per a suprimir la replicació viral i evitar l'aparició de virus resistents.

La monoteràpia contra el VIH-1, dirigida principalment contra la TI, ha demostrat una activitat antiviral limitada. El tractament amb ZDV, el primer fàrmac contra el VIH-1 que va ser aprovat (1987), o els seus homòlegs (altres anàlegs de nucleòsids com didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina(d4T) aconseguien reduir la virèmia plasmàtica en un curt període de temps (setmanes o mesos); en canvi, la concentració de virus en plasma tornava a ser, després de setmanes o mesos de tractament, els valors presents abans del tractament. Juntament amb aquest fracàs virològic tampoc es va observar ningun benefici clínic amb aquestes monoteràpies (Hammer SM, 1996). Quan es va analitzar el virus obtingut després de l'increment de la virèmia, es van poder identificar algunes mutacions en el gen de la TI que conferien resistència fenotípica al fàrmac emprat. Un fet molt similar va tenir lloc quan es van introduir els inhibidors de la proteasa en el 1995, els quals, administrats en monoteràpia, originaven la ràpida selecció de virus resistents (Condra JH, 1995). És fonamental assenyalar que la monoteràpia seqüencial tampoc ha resultat eficaç en el tractament del VIH-1, ja que el virus pot evolucionar successivament per esquivar cadascun dels fàrmacs utilitzats. D'aquesta manera, s'han aïllat d'un mateix pacient virus resistents a tots els fàrmacs utilitzats actualment en el tractament contra el VIH-1 (Cabana M, 1999; Shafer, 1998).

No va ser fins l'any 1995 que David Ho va dissenyar els primers tractaments combinats, que tenien com a objectiu construir una barrera genètica viral capaç de reduir o eliminar la possibilitat de que apareguessin mutants resistents a tres o quatre fàrmacs diferents (Ho, 1995).

És interessant observar que amb la pressió selectiva exercida amb els diferents antirretrovirals estan començant a aparèixer insercions i deleccions en gens com la TI i PR, lesions genètiques fins ara no trobades en pacients no tractats. És necessari assenyalar que la inserció és una lesió genètica que té lloc amb una freqüència molt baixa, fet que torna a posar de manifest no únicament la plasticitat del genoma, sinó també el gran espai de seqüències virals que poden trobar-se en un pacient infectat. Aquests resultats mostren que en abordatges terapèutics futurs no s'ha de deixar de donar importància al potencial evolutiu del virus.

Un aspecte important que en els darrers anys està guanyant interès en la clínica dels pacients infectats amb el VIH-1 és la disminució de la capacitat replicativa o eficàcia biològica (fitness viral) d'aquells virus portadors de resistències a diferents fàrmacs. Una de les conseqüències de la dinàmica de les quasiespècies dels virus ARN és la pèrdua de la capacitat replicativa de la població viral quan se la sotmet a un coll d'ampolla poblacional, és a dir, quan es redueix de forma dràstica el seu tamany (Yuste E, 2000). Quan s'exerceix la pressió selectiva per part d'un antirretroviral, es produeix la selecció d'un virus resistent i minoritari, i com a conseqüència se sotmet a la quasiespècie viral a un coll d'ampolla poblacional (Delwart, 1998; Nijhuis, 1998). La disminució de la capacitat replicativa d'un virus resistent és consistent amb el fet de que la seva freqüència sigui molt baixa en la població viral present en pacients que mai han estat tractats (Nájera, 1995). Al mateix temps, la reversió de les mutacions de resistència a la soca salvatge quan té lloc una retirada del tractament també demostra la menor capacitat replicativa d'aquests virus portadors de mutacions de resistència. A més a més, la rapidesa amb la que es produeix la reversió de les diferents mutacions de resistència seria un indicador de la influència d'una determinada mutació en la capacitat replicativa. La rellevància clínica de la

pèrdua de la capacitat replicativa del VIH-1 ve donada pel fet de què una reducció en la capacitat replicativa del virus es traduiria en un descens de la virèmia i en un increment dels limfòcits CD4. Canvis associats a un descens de la probabilitat de la progressió a desenvolupar la malaltia (SIDA) i a una millora de l'estat general del pacient infectat.

L'elevació del nombre de CD4 que té lloc després d'un potent tractament combinat comporta la restauració parcial del sistema immunològic (Autran, 1997). En canvi, tot i la millora de la resposta immunològica, quan els pacients sotmesos a TARGA interrompen el tractament, la virèmia s'eleva a les xifres prèvies a l'inici del tractament, donant-se novament un descens dels CD4. Donat que una bona resposta immunològica, preferentment citotòxica, s'associa a un millor curs de la malaltia, en l'actualitat s'està donant molta importància a totes aquelles intervencions encaminades a millorar la resposta immunològica front el VIH-1 en aquells pacients que responen adequadament al tractament antirretroviral combinat. Una estratègia que s'està explorant és la de les interrupcions estructurades del tractament (IET) (Ruiz, 2001; Haslett, 2000; Binley, 2000; Ortiz, 1999; Lisziewicz, 1997; Rosenberg, 2000). Aquestes interrupcions que poden variar des de setmanes a mesos segons diferents protocols, tenen com objectiu servir d'autovacuna. La hipòtesi és que en aquells pacients en què s'ha produït una millora dels marcadors immunològics, com conseqüència del tractament, l'alliberació d'antigen viral estimula una major resposta front al virus. Aquesta autoimmunització pot fer-se varies vegades, és a dir, es pot interrompre i reiniciar el tractament durant varios cicles.

INTERRUPCIIONS ESTRUCTURADES DEL TRACTAMENT (IET).

La interrupció estructurada del tractament com a estratègia terapèutica s'ha investigat i es continua investigant des de l'anecdòtica publicació dels articles de Franco Lori i Douglas Nixon (Lisziewicz J, 1999; Ortiz GM, 1999). Com ja diferents autors han esmentat, les interrupcions estructurades del tractament (IET) poden ésser considerades com el mètode més simple de

teràpia immuno-mediada activa (Montaner L, 2001). Estratègia que es pot considerar com una autovacunació amb un virus del propi pacient atenuat, atenuació que s'aconsegueix amb la reintroducció del TARGA. S'ha descrit un model animal amb una bona resposta virològica i una important resposta helper i CTL específica anti-VIH-1 (Lori F, 2000).

S'ha de destacar que altres objectius per la utilització de les IET que tenien menys importància al principi de la utilització d'aquesta estratègia (com pot ser l'estalvi de medicació, reducció dels efectes secundaris, etc), han passat a ocupar un primer pla a mesura que s'han anat tenint resultats dels primers estudis pilot de les IET i s'han conegut millor els efectes secundaris a llarg termini de les medicacions antirretrovirals (Martínez E, 2001). Per últim, no s'ha de confondre les IET amb les "vacances terapèutiques". Fa uns anys, un grup d'alemanys liderat per V Miller va proposar la possibilitat de realitzar interrupcions intermitents (*drug holidays*) en pacients avançats en els que el tractament havia fracassat. El motiu principal era que es pogués donar una desaparició de les quasiespècies amb mutacions, essent aquestes substituïdes per la quasiespècie salvatge un cop la pressió farmacològica hagués desaparegut. En realitat, es va veure que era així, però aquest fet no constituïa ningun benefici pel pacient i si un risc afegit de morbimortalitat degut a la conseqüent caiguda de limfòcits CD4 i gran increment de la càrrega vírica (Deeks S, 2001).

Les dificultats d'un tractament antirretroviral de gran activitat (TARGA) de per vida, ha fet que es consideri necessari provar noves estratègies terapèutiques (Pantaleo G, 1997). Concretament, i donant que hi han evidències que donen suport a la hipòtesi de que una resposta T helper (Th) y citotòxica (CTL) front el VIH-1 sostinguda pugui aconseguir un control de la replicació vírica (Rosenberg ES, 1997; Ogg GS, 1998), actualment es considera una opció combinar el TARGA amb immunoteràpies actives (vacuna terapèutica) capaces de restaurar/potenciar aquestes respostes, per investigar si això pot ajudar a controlar la replicació vírica en absència de TARGA (Autran, 2000).

A diferència del que succeeix amb la resposta immune front les infeccions oportunistes que es recupera després d'uns mesos d'instauració del TARGA (Plana M, 2000; Autran B, 1997), es va observar que la resposta Th anti-VIH-1, mesurada com resposta limfoproliferativa, disminueix de manera progressiva al instaurar-se el TARGA i tampoc es recupera després d'un any de supressió viral efectiva pel TARGA (Plana M, 1998). El TARGA continu durant 1-3 anys també fa disminuir la resposta CTL en la infecció crònica, el que té relació amb la necessitat d'un cert umbral de persistència de l'antigen per mantenir una resposta T memòria (Ogg GS, 1998). Aquestes dades van fer plantejar l'estratègia d'interrupcions transitòries del TARGA quan la virèmia està molt suprimida, per presentar-lo novament al sistema immune. S'ha de destacar que la capacitat de les IET per induir resposta immunitària de cèl.lules Th i CTL associada amb un control de la virèmia s'ha demostrat recentment en un model de macacs (Lori F, 2000).

L'objectiu principal plantejat en els primers estudis seria que es recuperés la resposta Th i CTL amb les IET. Les IET en les fases inicials de la infecció crònica, amb més d'un any de supressió de la replicació vírica pel TARGA, en certa manera poden equiparar-se a una nova reinfecció en la que s'instaura el TARGA immediatament. Aquestes dades també suggereixen que probablement les cèl.lules Th anti-VIH-1 són les que primer s'infecten durant la infecció primària pel VIH-1, ja que forçosament han de reconèixer el VIH-1 en les cèl.lules presentadores d'antigen infectades, el que comporta la seva ràpida eliminació clonal per apoptosi o la seva inactivació clonal. L'excepció a aquesta regla es donaria únicament en els individus que reben TARGA des de l'inici de la infecció aguda, o en aquells amb avantatges "idiosincràtiques" per desenvolupar una òptima resposta Th i CTL i convertir-se en progressors a llarg termini (LTNP). És doncs, molt verosímil, la hipòtesi ja apuntada per altres, de que per obtenir una resposta protectora i mantinguda de CTL anti-VIH-1 es requereixi també la presència de resposta Th anti-VIH-1 (Rosenberg ES, 1997; Kalams SA, 1999).

Aquest paper essencial d'una resposta Th per aconseguir una resposta CTL front al mateix antigen, es basa en dades experimentals recents en el sistema murí (Bennet SR, 1997). Per tant, la interrupció del tractament es veuria acompanyada d'una nova presentació d'antigen generant una resposta Th, que si fos el suficientment eficaç ajudaria a mantenir la resposta CTL. L'inici precoç del tractament durant la primoinfecció evitaria l'eliminació clonal per apoptosi o la seva inactivació clonal.