

L'any 1995 es varen adquirir coneixements trascendentals que varen fer canviar la concepció de la infecció pel virus VIH-1. Models matemàtics basats en la disminució de la virèmia plasmàtica utilitzant fàrmacs amb un gran potencial antiviral, demostraven, front la "latència clínica i virològica" prèviament reconeguda durant la fase assintomàtica de la infecció, que la replicació del VIH-1 era constant i a gran nivell al llarg de tota l'història natural de la infecció (Ho DD, 1995; Wei X, 1995), tot i el manteniment d'un pool de cèl.lules amb infecció latent que actuava com a reservori del virus en l'organisme humà. L'any 1997, assumint que el pool de cèl.lules latents estava format principalment per limfòcits CD4 i macròfags, cèl.lules de vida mitja curta, es va pronosticar que l'administració mantinguda al llarg del temps d'un tractament antirretroviral de gran activitat (TARGA) podria erradicar el VIH-1 de l'organisme en un període de 3-5 anys (Chun TW, 1997; Perelson AS, 1997). Aquesta hipòtesi va dur a plantejar que quan més precoç i potent fos el tractament antirretroviral millor. La demostració, a l'any 1999, de que el pool de cèl.lules amb latència vírica estava format, fonamentalment, per limfòcits CD4 memòria en repòs de vida mitja llarga i que aquest no disminuïa al llarg de l'història natural de la infecció (Zhang L, 1999; Finzi D, 1999, Blankson JN, 2002), va modificar el concepte d'erradicació pel de cronificació de la infecció pel VIH-1, fent èmfasi en la necessitat de mantenir el TARGA al llarg de la vida del pacient per tal d'evitar la progressió de la infecció. Ara bé, tot i que actualment no es recomana l'inici molt precoç del tractament (Guidelines for the Use of Antirretroviral Agents in HIV-1 infected adults and adolescents (NIH) Julio 2003. Disponible a: <http://hivatis.org/trtgdlns.html#Adult> 2003), el manteniment del TARGA comporta grans problemes de toxicitat (Martínez E, 2001), d'adherència (Knobel H, 1998) i finalment de fracàs del tractament per problemes de resistència farmacològica. Això comporta la necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques, com podrien ser les anomenades teràpies immunomediades, i d'entre aquestes les interrupcions estructurades del tractament (IET) o teràpia intermitent.

Una nova estratègia mereix ésser estudiada si respon a tres condicions: a) planteja solucions a un problema existent amb una millora clara respecte a l'estratègia actual; b) ofereix informació suficient i obre nous camps d'investigació, c) no és perjudicial pel pacient.

Primer, l'objectiu de les IET és, mitjançant la presentació del virus homòleg (autovacunació) en pacients amb TARGA eficaç durant llargs períodes de temps, induir una resposta immunitària amb la capacitat de neutralitzar el virus en absència de tractament, estalviant, per tant, medicació i reduint els efectes secundaris. Els estudis pilot realitzats fins a l'actualitat han presentat resultats discordants (Ruiz L, 2001; Carcelain C, 2001; Ortiz GM, 2001, Frost SDW, 2002; Fagard C, 2003) entre la presència de la resposta immunitària específica i el control de la càrrega vírica. És possible, com proposen alguns autors, que les IET suposin una expansió únicament de la resposta específica que existia abans de la realització de les IET (Ruiz L, 2001).

En segon lloc, les IET han fet possible l'inici de nous camps d'investigació, especialment el que fa referència al millor coneixement de les relacions existents entre el VIH-1 i el sistema immunitari.

En tercer lloc, els possibles efectes secundaris de les IET, com el desenvolupament de resistències farmacològiques, la disminució dels limfòcits CD4 o l'increment del reservori viral, continuen sent objecte de debat.

Així doncs, en el present treball s'han realitzat estudis, orientats en els tres aspectes anteriorment esmentats, dirigits a: a) Determinar quina és la dinàmica viral al llarg de tres protocols diferents d'IET i la seva relació amb la resposta cel·lular T VIH-1 específica; b) Estudiar l'evolució del virus al llarg de les IET i c) Determinar el risc que poden representar les IET en quant al desenvolupament de mutacions de resistència als antirretrovirals i de disminució dels limfòcits CD4.

Amb l'objectiu de determinar quina era la dinàmica vírica durant les diferents interrupcions estructurades del tractament (IET) i la seva relació amb la resposta immune cel·lular T específica anti-VIH es van estudiar tres cohorts de pacients (cohort de pacients sotmesos a IET; cohort de pacients sotmesos a

IET i immunomoduladors, la hidroxiurea; cohort de pacients sotmesos a IET i un immunomodulador, l'àcid micofenòlic).

En la cohort dels 10 pacients sotmesos a IET, després d'haver aconseguit un control de la replicació del VIH-1 transcorregut un any de TARGA, es va observar un ràpid rebrot de la càrrega vírica en la totalitat dels pacients un cop es va interrompre el tractament per primera vegada, amb un temps de duplicació assemblat al descrit previament per Ho i col, 1995 a l'estudiar la disminució de la càrrega vírica en pacients en estadis avançats de la infecció que havien iniciat tractament amb ritonavir. Aquest ràpid rebrot (observat a les 4 setmanes) va ser similar al que s'observava al interrompre el tractament antirretroviral després d'un curt període de temps de tractament (de 3 mesos) (Stellbrink HJ, 1996). Aquests resultats donen suport a la hipòtesis de que uns mesos addicionals de tractament antirretroviral i conseqüentment una marcada supressió dels nivells d'ARN del VIH-1 en plasma no redueixen el pool de cèl.lules amb infecció latent pel VIH-1 (Chun TW, 1997; Finzi D, 1997). En base al ràpid rebrot de la CV, no es pot descartar que aquest sigui el resultat de la presència d'un baix nivell, però a la vegada persistent, de replicació vírica o replicació subjacent a més a més de la reactivació del pool de cèl.lules amb infecció latent pel VIH-1 (Pantaleo G, 1997). De totes maneres, no es van observar diferències en el temps de duplicació del VIH-1 entre els pacients que en el dia 0 la CV es trobava per sota o per sobre de les 5 còpies/ml.

En els 4 dels 10 pacients, que presentaven en el dia 0 una marcada supressió de la replicació vírica (CV inferior a les 5 còpies/ml), el rebrot de la CV aconseguit al interrompre el tractament va superar el valor observat previament a l'inici del TARGA. Alguns autors han suggerit la possibilitat que aquest fet pot ser explicat per una major replicació viral deguda a l'increment de limfòcits CD4 associat al tractament (de Jong M, 1997). Si aquesta hipòtesi fos certa, l'increment de la CV per sobre del nivell basal s'hauria d'haver observat en tots aquells pacients que haguessin presentat un increment del nombre de limfòcits CD4. És important pensar en el fet que els limfòcits T citotòxics (CTL) juguen un paper important en el control de la infecció pel VIH i que s'ha

observat una disminució de la resposta CTL específica anti-VIH després de 6 mesos de tractament antirretroviral efectiu, per tant és important una replicació vírica per mantenir la resposta CTL específica anti-VIH (Ogg G, 1998). Prenent com a base aquests resultats, podem hipotetitzar que els pacients amb una baixa replicació vírica (presentaven < 5 còpies/ml durant un mínim de 8 mesos) i que adquireixen un valor de la CV en el rebrot després de la interrupció del tractament més elevat que l'observat en el moment previ d'iniciar qualsevol tractament (basal), reflexen una important davallada de la resposta CTL citotòxica específica anti-VIH.

En referència a la resposta cel.lular immuno específica, aquesta va anar augmentant a mesura que es succeïen les diferents IETs. Els pacients que van generar una resposta cel.lular immuno específica durant la segona IET la mantenien també durant la tercera. En canvi, els pacients que no van generar una resposta immuno específica durant la primera o segona IET, la van desenvolupar a la tercera interrupció (Figura 17), i això va anar acompanyat d'un increment del temps de duplicació del rebrot de la CV entre la primera i la tercera interrupció, d'una disminució de la CV per sota dels valors basals en 6 pacients després de la tercera interrupció i d'un valor d'estabilització de la CV <5000 còpies/ml després de 52 setmanes sense tractament en 4 pacients. Aquests resultats corroboren els estudis recentment publicats on es demostra que alguns pacients amb infecció crònica pel VIH-1 poden generar respostes cel.lulars CD4 i CD8 específiques anti-VIH amb les IET (Haslett PA, 2000; Binley JM, 2000; Papasavvas E, 2000; Kalams SA, 1999). En l'estudi SSITT, la atenuació de la replicació vírica es va observar en un percentatge petit de pacients, essent d'un 20%, no podent-se considerar les IET, amb aquests resultats, com una estratègia de tractament aplicable a la clínica diària (Fagard i col., 2003). Recentment s'ha descrit en diferents treballs la possible existència de CTL no funcionals per manca de resposta helper o per un mal processament i presentació del pèptid al sistema immune (Yokomaku Y, 2004; Cao J, 2003; Yang O, 2003; Geels M, 2003). Aquest fet podria explicar la manca de control de la replicació vírica tot i la detecció de resposta CTL.

Aquests resultats reforcen els obtinguts en treballs previs que mostren d'una manera similar una relació inversa entre la càrrega vírica i la magnitud de la resposta cel·lular immuno específica anti-VIH-1 en pacients amb infecció crònica i en pacients progressors lents (Rosenberg ES, 1997 ; Ogg G, 1998 ; Betts M, 1999). Es pot concloure que l'increment de la resposta cel·lular immuno específica anti-VIH-1 és capaç d'atenuar el rebrot de la càrrega vírica i disminuir el valor d'estabilització d'aquesta en pacients amb infecció crònica pel VIH-1 sotmesos a IETs. L'atenuació de la replicació vírica també es podria explicar per la re-emergència de virus de diferents reservoris, ja que diferents virus de diferents reservoris podrien tenir capacitats replicatives diferents. En canvi, en aquest supòsit la dinàmica del rebrot viral seria caòtica, sense la tendència a l'increment del temps de duplicació al llarg de les diferents IETs.

El patró de replicació viral després de les IETs en aquests pacients, sembla diferir del que es produeix en els pacients sotmesos a IET i que van iniciar tractament durant la primoinfecció pel VIH-1 (Ortiz GM, 1999; Lisiewicz J, 1998). Alguns dels pacients amb infecció aguda no presenten un rebrot de la càrrega vírica >50 còpies/ml després de la interrupció del tractament (Rosenberg ES, 2000). En aquest estudi, tots els pacients van presentar un rebrot de la càrrega vírica una vegada interromput el tractament (Figura 15). Tenint en compte, que les respostes immuno específiques són predominantment responsables del control de la replicació viral, les diferències entre els rebrots de càrrega vírica trobades entre pacients amb infecció crònica pel VIH i amb infecció aguda poden ser explicades pel grau d'immunocompetència, la diversitat de la seqüència viral i els diferents patrons d'immunitat específica pel VIH-1 després de la iniciació del TARGA. El pacients amb infecció crònica pel VIH-1 es troben molt més immunodeprimits que els que presenten una infecció primària (Oxenius A, 2000, Autran B, 2000; Plana M, 2000) i també presenten seqüències virals més diverses requerint una resposta immunològica de més ampli espectre pel control viral. El TARGA iniciat durant la primoinfecció pel VIH-1 ha de preservar millor les funcions cel·lulars T-helper específiques anti-VIH-1 i les respostes cel·lulars T CD8

(Rosenberg ES, 1997; Oxenius A, 2000), les quals poden mantenir la càrrega vírica <50 còpies/ml després de les IET en pacients amb infecció primària pel VIH-1 (Ortiz GM, 1999; Lisziewicz J, 1999).

Adicionalment, té interès destacar que el temps de duplicació va ser menor ($p= 0.08$) en aquells pacients que van presentar la mutació $\Delta 32$ del gen CCR5, podent ser una de les causes el menor nombre de correceptors CCR5 que s'expressen en les cèl.lules T CD4 en aquells pacients que presenten aquesta delecció (Cohen OJ, 1997). Fet que fa pensar en la necessitat de desenvolupar estratègies terapèutiques alternatives que interfereixin amb l'entrada del virus a la cèl.lula (Kilby J, 1998).

Existeixen diferents punts relacionats amb la seguretat del pacient a tenir en compte en les IET. Un d'ells és el desenvolupament de mutacions de resistència (Richman DD, 1999 ; Carpenter CC, 2000). De fet, tot i el rebrot de virèmia, la càrrega vírica de tots els pacients va disminuir per sota de les 20 còpies/ml després d'un mes de reintroduir el mateix tractament antirretroviral.

També es motiu de preocupació que les IET provoquin un increment dels reservoris virals durant els rebrots de la virèmia (Ramratnam B, 2000). En aquest sentit, Finzi, 1999, han demostrat que la lenta disminució del reservori latent requeriria un tractament efectiu durant un període de 10-60 anys amb una adherència completa per tal d'erradicar el VIH de l'organisme. Donat l'elevat potencial d'efectes secundaris que té el TARGA, el rigorós esquema de dosificació dels fàrmacs i l'evidència de baixos nivells de replicació del virus, tot i la màxima supressió per part del TARGA, s'ha arribat a la conclusió que l'erradicació del virus amb els règims actuals no és una possibilitat clínica realista (Silicano R, 2002; Furtado M, 1999). La combinació d'intensificació amb fàrmacs i les noves teràpies immunomediades podrien donar una estratègia alternativa per l'erradicació del virus o pel control de la infecció pel VIH-1. D'altra banda, en un estudi recent en 10 pacients sotmesos a IET durant 1 any, amb cicles de 7 dies de tractament i 7 dies sense tractament, en cap moment es va observar un increment del reservori (Dybbul M, 2001).

Probablement, l'aspecte més important en la seguretat de les IET, és la disminució del nombre de CD4 que s'observa en els pacients durant el rebrot de la càrrega vírica al interrompre el tractament. Els pacients del present estudi han mantingut, tot i la seva devallada, uns nivells de limfòcits CD4 significativament més elevats (mitja de 145×10^6 cèl.lules/l), transcorreguts 12 mesos de la interrupció del tractament, que abans d'iniciar el tractament.

Aquests resultats donen suport al concepte que es pot induir una resposta immunològica específica anti-VIH a través de les IETs. Aquesta aproximació sembla ser segura en termes de la ràpida resposta virològica després de la reintroducció del mateix tractament i de la recuperació dels paràmetres immunològics transcorreguts 6 mesos de la reintroducció del tractament.

Amb l'objectiu d'aprofundir en la dinàmica viral del rebrot, el valor d'estabilització de la CV i les respostes immunològiques específiques front al VIH-1 durant les IET, es va realitzar un segon estudi afegint un citostàtic, la hidroxiurea, a l'estratègia de les IET, amb l'hipòtesi de que el seu efecte citostàtic limitaria l'activació dels limfòcits CD4 durant el rebrot de la CV evitant, per tant, una elevada replicació viral a l'hora de preservar la resposta immuno específica. Els resultats demostren que el manteniment de la HU durant els períodes d'interrupció del tractament incrementa significativament el percentatge de pacients amb capacitat de controlar la replicació viral, després de cinc interrupcions, al llarg d'una mitja de 48 setmanes sense tractament (Figura 22).

La HU no sembla haver tingut cap efecte concret en les respostes immuno-específiques. La HU hauria actuat per altres dues vies: inhibint el virus que apareix durant l'inici del rebrot de la càrrega vírica i que s'origina a partir de reservoris, com són els limfòcits en repòs, els macròfags o les cèl.lules dendrítiques en les que el fàrmac ha demostrat, *in vitro*, ser una monoteràpia efectiva (Lori F, 1994) en l'inhibició de la transcripció inversa del VIH-1 o limitant, mitjançant el seu efecte citostàtic, la replicació del virus en els limfòcits T activats, com ja s'ha suggerit en diferents models matemàtics i estudis randomitzats controlats (Lori F, 1999). El fet que, el comparar-ho amb el grup

control, es vegi afectat el valor d'estabilització de la CV aconseguit en el darrer cicle d'IET i no el temps de duplicació inicial per la HU va a favor de la darrera hipòtesi. A més a més, el pic del rebrot de la CV de la primera, segona i tercera interrupció va ser similar en els dos grups de pacients (únicament TARGA o TARGA + HU), mentres que aquest va ser inferior en el grup d'HU durant la quarta i cinquena interrupcions, en les que es va mantenir el citostàtic. Aquest fet dóna consistència a la hipòtesi que la HU controla la replicació viral en base al seu efecte citostàtic sobre els limfòcits T CD4 activats.

És important remarcar que l'efecte de la HU no va perjudicar la resposta T-helper limfoproliferativa o la resposta CTL.

Amb els resultats obtinguts a l'estudiar aquesta cohort de 20 pacients infectats pel VIH-1 també es demostra el fet que les respostes cel·lulars immuno-específiques poden incrementar-se després de diferents cicles d'interrupció del tractament en pacients amb infecció crònica, tal com s'ha descrit en estudis posteriors (Haslett PA, 2000 ; Binley, 2000 ; Rosenberg ES, 2000). Els pacients que no van presentar respostes detectables basals o després de la primera interrupció del tractament, de manera progressiva generen respostes immunològiques cel·lulars al llarg dels diferents cicles d'interrupció del tractament (IETs). Aquestes dades es correlacionen amb un increment progressiu del temps de duplicació de la càrrega vírica durant el rebrot, però no amb la disminució del pic de la CV en els rebrots . És evident que la transitòria i incompleta recuperació de les respostes específiques pel VIH induïda en els nostres pacients per les IET (Carcelain C, 2001), és suficient per incrementar el temps de duplicació inicial del VIH-1 durant el rebrot, però aquesta és ràpidament sobrepassada pel virus sense afectar el valor màxim de la CV.

En termes de seguretat, la càrrega vírica va disminuir fins a nivells indetectables quan es va reintroduir el mateix tractament. Probablement l'efecte secundari més important va ser una disminució significativa del percentatge de limfòcits CD4 (però no dels valors absoluts) a la setmana 40 (abans de la

cinquena IET). En canvi, els CD4 no van disminuir mai per sota dels nivells basals. Conseqüentment, aquestes estratègies de tractament hauria de ser considerada exclusivament en una població seleccionada de pacients sota una estricta supervisió mèdica (Deeks S, 2001).

En un tercer estudi es va afegir un fàrmac immunosupressor, el mofetil micofenolat (MMF), a les IETs sobre la base del seu doble mecanisme d'acció. D'una banda limitant la síntesi *de novo* de nucleòtids de guanosina necessaris durant el procés de transcripció inversa, i de l'altre reduint el pool de limfòcits CD4 activats, principal cèl.lula implicada en la replicació viral.

L'administració del MMF en combinació amb el TARGA indueix un ràpid descens de la producció tant de cèl.lules T CD4 com de CD8 després de la interrupció del TARGA. A més a més, es va observar una reducció important del valor d'estabilització de la CV quan es mantenia el MMF durant l'interrupció del TARGA. En canvi, l'ús de 0.25 g BID va dividir la població en dos grups: el primer grup el constituïen aquells pacients que mantenien la capacitat d'inhibir de forma mantinguda la resposta limfoproliferativa per sobre del 60% (resposta CEM <40%) i un segon grup que mantenien la capacitat inhibidora només durant un període de 0 a 4h. El benefici virològic únicament es va observar en el primer grup.

El MMF pot inhibir la infecció del VIH-1 per un mecanisme antiviral que actua deplecionant el pool intracel.lular de trifosfat de deoxiguanosina i potenciant l'activitat de l'abacavir i altres ITIAN com ha demostrat Margolis i col en pacients que estan en un estadi avançat de la infecció (Margolis D, 2002). També s'ha suggerit que el MMF pot inhibir la replicació viral per un mecanisme immunològic capaç de reduir el pool de cèl.lules T CD4 activades (Chapuis A, 2000), principal població cel.lular amb replicació activa pel VIH-1. Aquest mecanisme immunològic ha estat difícil de diferenciar del virològic, *in vivo*, degut a que el MMF sempre ha estat utilitzat amb combinació amb el TARGA.

Els resultats demostren per primera vegada que el fet d'interrompre el TARGA i mantenir el MMF redueix de manera substancial el pool de cèl.lules CD4 activades, i això té una important correlació amb el nivell de replicació

vírica. Es va observar una disminució significativa respecte del grup control del valor d'estabilitat de la CV mentre es mantenia el MMF durant l'interrupció del TARGA. Aquest fet dona suport a la hipòtesis de que un mecanisme immunològic per si sòl es capaç de controlar tan sols parcialment la replicació vírica. Anteriorment hem descrit que el fet de mantenir la HU durant les interrupcions del tractament antirretroviral pot comportar un increment del nombre de pacients amb capacitat de controlar la seva virèmia, probablement limitant, pels seus efectes citostàtics, la replicació vírica procedent dels limfòcits T activats. Aquesta estratègia d'utilitzar fàrmacs que interfereixin en el cicle de replicació del VIH-1 actuant sobre les cèl.lules diana, i no sobre els enzims responsables de la replicació viral, ofereix l'avantatge d'evitar la selecció de resistències als antirretrovirals, i podria ser utilitzada com a estratègia complementària al TARGA.

Chapuis i col. han descrit que el MMF podria tenir un efecte sobre el pool de cèl.lules T CD4 en repòs amb infecció latent pel VIH-1. En els seus estudis van observar que en aquells pacients que rebien TARGA + MMF era més difícil aïllar el virus d'aquesta població cel.lular. Se sap que el MMF no produeix cap efecte sobre les cèl.lules en repòs. En canvi, un cop aquestes cèl.lules s'han activat, en presència del MMF, aquest pot induir apoptosi i mort cel.lular. En el present estudi no s'ha pogut demostrar un increment de l'apoptosi ni abans ni després de la interrupció del tractament en aquells pacients que presentaven una inhibició mantinguda de la resposta limfoproliferativa (resposta CEM).

A més a més, els nostres resultats suggereixen que l'associació del MMF al TARGA durant llargs períodes de temps pot tenir un efecte en el reservori viral. El fet que el temps de duplicació inicial, i no el pic de la CV, es veïès modificat afavoreix la hipòtesi que el MMF també pot actuar inhibint l'ona inicial del virus que rebrota dels reservoris.

En relació a l'efecte del MMF en el sistema immune, no vam observar diferències entre els pacients que mantenien una inhibició de la resposta CEM i els pacients del grup de TARGA o els que no van presentar una inhibició de la

resposta CEM (CD4+, CD8+ , cèl.lules T CD4 memòria i naive, cèl.lules T CD8+, CD8+CD28+ i CD8+CD38+), o amb una resposta limfoproliferativa i CTL anti-VIH-1. El MMF no va inhibir cap resposta anti-VIH-1 específica, en canvi, les diferències en el control de la CV no es poden explicar per les respostes limfoproliferatives i CTL, ja que aquestes no van canviar significativament entre el moment basal i el període després de la interrupció del TARGA, i el valor d'estabilitat de la CV no es va correlacionar amb les respostes cel.lulars immuno específiques anti-VIH-1.

Aquest resultat representen la primera demostració de que es pot controlar la replicació viral durant la interrupció del TARGA afegint MMF, encara que únicament en aquells pacients que presenten una inhibició demostrable de la resposta limfoproliferativa (resposta CEM).

Determinats factors virològics també podrien estar relacionats amb els canvis descrits de la dinàmica viral durant els diferents cicles d'IETs. Així, les fluctuacions observades en la CV plasmàtica poden estar lligades a canvis genètics i/o biològics del VIH-1 que inclús podrien comportar una variació de la cinètica de replicació del virus. No està clar si l'evolució del VIH-1 durant les IETs es dona per pressió de selecció o simplement per efectes d'atzar (Martínez-Picado J, 2002 b). La limitada resposta immune cel.lular enfront al VIH-1 detectada, en pacients amb infecció crònica pel VIH-1 sotmesos a IETs, podria ser deguda a la diversitat viral observada al llarg dels diferents rebrots de la CV (Martínez-Picado J, 2002). Així, la impossibilitat de generar una forta resposta immunològica a través de les IET en aquests pacients, pot ser degut a l'emergència de diferents variants virals en cadascuna de les interrupcions.

Diferents autors han descrit, en determinats pacients, que el virus que rebrota durant les IETs és genèticament homòleg al virus aïllat a partir dels limfòcits CD4 en repòs amb infecció latent presents abans de l'inici de les IETs (Chun ,2000; Imamichi I, 2001; Zhang LB, 2000). D'altra banda, en altres pacients, sembla que el virus del rebrot procedeixi d'altres reservoris (Chun, 2000; Zhang LB,2000), com el teixit limfàtic, el tracte genito-urinari o altres teixits (Cheng-Mayer C, 1989; Chun T, 1997; Finzi D, 1997; Koyanagi YS,

1987; Overbaugh J, , 1996, Dybul M, 2003). A més a més, la possible aparició de poblacions virals divergents durant les IETs pot aportar una idea sobre la dificultat del control de la CV per part del sistema immune. Així, en presència d'una població viral diversa i per tant molt heterogènia és requeriria també una resposta immune d'ampli espectre per poder controlar la replicació viral (Altfel M, , 2001; Rosenberg ES, 2000). De totes maneres, en un recent treball, Dybul i col (Dybul M, 2003) no han observat una correlació entre la diversitat viral i les fluctuacions significatives de la càrrega viral en plasma durant els cicles d'interrupcions del tractament.

Mitjançant la seqüenciació de la regió C2V4 del gen que codifica per les proteïnes de l'envolta del VIH-1 (per ser el més variable i el que està, a nivell d'ubicació de les proteïnes que codifica, més relacionat amb el sistema immune) es va evaluar la diversitat genètica viral al llarg dels diferents rebrots correlacionant-la amb la dinàmica de la càrrega vírica en els pacients sotmesos a IETs.

En els resultats obtinguts s'observa que si bé un nombre petit de pacients presenta una evolució de tipus linial (Figura 28), en la majoria de pacients les seqüències obtingudes a la tercera interrupció tenen una tendència a assemblar-se als virus de la primera, o inclús al virus majoritari basal (Figura 28). Això podria indicar que determinats provirus ancestrals serian reactivats com a conseqüència de les IET (Arnedo-Valero i cols., 2003). Però en cap moment aquesta falta d'evolució lineal, és causa de la manca de resposta en determinats pacients.

En aquest treball no s'ha observat una variabilitat genètica significativa entre els virus dels pacients responedors versus dels no responedors i per tant es pot concloure que la diversitat genètica, en el nostre estudi, no es la causa de la manca de neutralització de la replicació viral, en determinats pacients, per part de les respostes helper y CTL induïdes durant les IETs.

El estudi dels dos pacients infectats per virus relacionats i sotmesos a diferents pautes terapèutiques, ha permès l'oportunitat d'analitzar la influència de l'hoste en l'evolució genètica del virus.

La dinàmica vírica i dels limfòcits CD4 va ser similar en els dos pacients transcorreguts 10 anys de la infecció (Figura 31).

El gen *env* del VIH-1 acumula canvis nucleotídics en pacients no tractats a una raó d'1% per any (Shankarappa R, 1999), mentre que la raó en pacients tractats amb TARGA efectiu és de 0,05% per any, sempre i quan es pugui detectar. Com era d'esperar d'un gen estructural conservat, s'observa un elevat nivell de similitud entre les seqüències del gen *pol*. En canvi, el gen *env*, que es caracteritza per una elevada variabilitat al llarg de les diferents regions, va presentar la taxa d'evolució esperada tot i estar sotmès els virus dels dos pacients a diferents pressions tan immunològiques com farmacològiques i fisiològiques (Shankarappa R, 1999).

La diversitat intrapacient entre la basal i l'última interrupció va ser similar en els dos pacients, tot i que es va observar un increment, encara que no significatiu, d'aquesta quan es van comparar els dos punts estudiats al llarg de la fase d'estabilització de la CV després de la darrera interrupció. Fet que podria ser degut a la pressió ambiental exercida per la resposta immuno específica desenvolupada al llarg de les diferents IETs. Aquests resultats estarien en contradicció amb l'hipòtesi de que els diferents rebrots de la CV actuarien com a colls d'ampolla poblacionals induïnt una població vírica homogènia fàcilment neutralitzable per la resposta immuno específica.

Un dels clons de la mostra A2 (provirus en el moment basal) va agrupar en el mateix cluster que els clons de la mostra B2 (provirus en el moment basal), essent molt probable que aquest clon fos el causant de la infecció en el pacient B. Aquests resultats mostren que, en aquest cas, la infecció podria haver estat monoclonal (Figura 34) (Wolfs TF, 1992).

Al final de la darrera IET, el virus del pacient A va ser similar a clons d'ADN proviral detectats en el moment basal del mateix pacient, quedant demostrada la possibilitat de reemergència de provirus ancestrals al llarg de les IETs presents en el pool de limfòcits en repòs amb infecció latent (Persaud D, 2003; Wolfs TF, 1992; Zhang L, 2000; Siliciano R, 2002).

La selecció de mutacions associades amb la pèrdua de les respostes citotòxiques han estat descrites en humans amb infecció crònica pel VIH-1 (A.J.McMichael, 2001). Mutacions d'escapament de les CTL es produeixen en llocs crítics d'epítops del virus, on una substitució aminoacídica pot reduir la unió de l'epítop el HLA, disminuir el reconeixament del receptor de cèl.lules T o generar respostes CTL antagòniques (A.J.McMichael, 2001). La presència d'epítops CTL VIH específics està, generalment, inversament correlacionada amb la variabilitat de la seqüència proteïca (Yusim K, 2002), fet també observat en els nostres resultats.

Mallal SA (Moore RD, 2002) ha hipotetitzat que, així com els epítops CTL estan restringits per l'HLA, les mutacions d'escapament dels virus a les CTL seleccionades en un determinat pacient serien específiques de determinats al·lels HLA de classe I. Els mateixos autors especulen que aquests polimorfismes serien particularment evidents en el gens virals que codifiquen per proteïnes internes (com la transcriptasa inversa) i en l'envolta del VIH-1, i per tant estarien associats amb les respostes d'anticossos al VIH-1, el genotip CCR5 i CXCR4.

Contrariament a l'esmenat en l'anterior hipòtesis, els resultats presentats en el nostre treball, demostren que el mateix virus en dos sistemes immunològics diferents, transcorreguts 10 anys de la infecció, es manté estretament relacionat tot i els diferents HLA de cada pacient. Si bé no es pot descartar que la manca de diferències en l'evolució del virus d'aquests pacients podria estar relacionada amb els baixos nivells de replicació vírica i als efectes produïts per la delecció en heterozigosi de 32 pb en el gen que codifica per CCR5.

Finalment, els resultats d'aquest treball suggereixen que el mateix virus segueix un patró d'evolució similar tot i estar durant 10 anys en dos pacients diferents que han estat sotmesos a pressions farmacològiques, immunològiques i bioquímiques diferents. En aquest cas, una resposta immune efectiva a les IET depén més de les característiques del virus que de l'hoste.

Respecte de la seguretat de les IETs, ja ha estat comentat que després de les diferents interrupcions de tractament, la CV va tornar en els nivells d'indetectabilitat, en tots els pacients, un cop reintroduït el mateix TARGA i que el nivells de limfòcits CD4, tot i devallar al llarg de les IETs, aquests sempre es trobaven, en el períodes sense tractament, per damunt dels valors basals.

Si bé alguns grups d'investigadors no han detectat mutacions de resistència ni genotípiques ni fenotípiques després dels cicles d'IET (Dybul M, 2001; Papasavvas E, 2003), un important motiu de preocupació es el desenvolupament de resistències farmacològiques com a conseqüència de deixar replicar lliurement el VIH-1, be sigui per l'aparició de noves mutacions o bé per la re-emergència de mutacions pre-existents, a l'inici de les IETs, en el pool de cèl.lules amb infecció latent pel VIH-1.

Els resultats del present estudi demostren un risc significativament superior de seleccionar mutacions de resistència *de novo*, al llarg de les IETs, en règims que continguin un ITIANN quan es compara amb els règims que contenen un IP. En la majoria de pacients, aquestes mutacions als ITIANN es van seleccionar en la primera interrupció del tractament. Tanmateix no es va observar un increment del patró de mutacions de resistència durant el període d'IET.

En aquest treball no s'ha observat la selecció de mutacions de resistència als IPs al llarg de les IET en cap dels pacients. Únicament es van amplificar polimorfismes que ja s'havien detectat en les mostres basals, prèvies al tractament, i que es van mantenir durant el període de les IET.

A l'hora d'introduir un pacient en un protocol d'IET, s'han de considerar més cuidadosament aquells pacients en que el seu règim antirretroviral conté un ITIANN. Aquests fàrmacs que tenen una vida mitja llarga, podrien fer que el pacient quedés exposat a una monoteràpia amb el ITIANN si tots els fàrmacs inclosos en el tractament són interromputs al mateix temps (Ruiz L, 2001; Petrella M, 2002). Essent coneixedors d'aquest fet i observant els

resultats obtinguts, s'hauria de considerar la interrupció d'aquest fàrmacs ITIANN uns dies abans que els altres també continguts en el règim antirretroviral (Schweighardt B, 2002).

La majoria de pacients que presenten mutacions de resistència durant les IET ja les presentaven previament. La mutació més comunment detectada va ser la M184V, fet que es deu a la presència del 3TC en la majoria de les pautes terapèutiques anteriors d'aquests pacients. La selecció d'aquesta mutació es va detectar dos setmanes després de la interrupció del tractament, tot i que no ho va ser en la totalitat de les interrupcions. Aquesta detecció intermitent de la mutació M184V al llarg de les interrupcions del tractament pot ser deguda a la mostra de plasma escollida per dur a terme l'estudi. La primera CV detectable després de la interrupció del tractament moltes vegades coincideix amb el pic de la CV, a on la quasiespècie majoritària és la que té major capacitat replicativa. La mutació M184V es caracteritza per reduir l'eficàcia biològica del VIH-1. Aquest fet conjuntament amb la metodologia emprada, basada en la seqüenciació de la població majoritària, podria explicar, la detecció intermitent d'aquesta mutació. Per tant, és necessari que la determinació de les mutacions de resistència en pacients sotmesos a IET es faci abans que la càrrega vírica assoleixi el pic, degut a la interrupció del TARGA, per incrementar la possibilitat de detecció de les possibles mutacions de resistència.

D'altra banda, els 3 dels 8 pacients que presentaven la mutació M184V previament a l'inici de les IET i que no es va tornar a seleccionar en cap dels rebrots de CV, no van presentar cap diferència a nivell de la dinàmica viral respecte als pacients que sí la van seleccionar (Figura 37e, 37f, 37g). En dos casos (191HU i 199HU) la no detecció d'aquesta mutació, ni en ARN ni en ADN proviral, es podria deure a que la pauta de tractament durant el període de les IET no incloïa 3TC. El tercer pacient (248AR), el fet de no detectar la mutació ni en ARN ni en ADN proviral podria ser degut a que l'estudi es va fer sempre sobre el pic dels diferents rebrots de la CV.

En 4 pacients (168, 201, 4, i 211) la mutació M184V va ser seleccionada de nou durant els rebrots de CV al llarg de les IET. En els dos primers casos (168 i 201 del grup A) hauria estat una conseqüència del desenvolupament de resistència en el ITIANN de la combinació (efavirenz), mentre que en els dos casos restants (4 i 211 del grup B) la causa va ser deguda a un problema d'adherència al tractament.

A més a més, no es va detectar una complicació del patró de mutacions de resistència ni de polimorfismes a ninguna de les tres famílies d'antirretrovirals durant el període d'IET, amb l'excepció d'un únic pacient.

Aquests resultats suggereixen el fet que l'emergència de mutacions de resistència durant les IET no és necessàriament una conseqüència d'aquestes, i que el risc de seleccionar mutacions de resistència durant les IET és significativament superior en aquells pacients que en el seu règim tenen inclòs un antirretroviral de vida mitja llarga. Finalment, les conclusions del present treball plantejan 3 grans qüestions virològiques a contestar en futurs treballs:

A) Quin és l'origen del virus que rebrota durant les IETs? Entre els possibles reservoris es troben els virus adherits a la superfície de les cèl·lules dendrítiques fol·liculars del teixit limfàtic, que poden persistir inclús en absència de replicació subjacent, el sistema nerviós central o d'altres.

B) Quina és la dinàmica viral durant la interrupció del tractament en els compartiments extravasculares? De fet, la majoria de cèl·lules infectades es troben en el teixit limfàtic. Un rebrot de la CV en el sistema nerviós central pot desenvolupar una patologia neurològica i de la mateixa manera, un rebrot de la CV en el tracte genitourinari podria comportar un increment de la capacitat de transmissió de l'infeció pel VIH-1.

C) Com es veu afectada la dinàmica i l'evolució del VIH-1 segons els diferents protocols d'IETs? Actualment es desconeix quin és el millor protocol d'IET en termes de temps de presència o absència de tractament, nombre de cicles, CV per sobre de la que s'hauria de reintroduir el tractament, etc.

