

b. 15983912



UNIVERSIDAD  
de SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
**U**  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
BIBLIOTECA

Facultad de Biología

Departamento de Biología Celular

**Estudio de la Reconstitución Inmune Inducida por el  
Tratamiento Antirretroviral en Pacientes Infeccionados por el  
Virus de la Inmunodeficiencia Humana.  
Papel del Timo en la Repoblación de Linfocitos T Vírgenes.**

Tesis Doctoral presentada por D. Jaime Muñoz Franco  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Sevilla, 2002



TD 500.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Estudio de la Diversidad Genética en el Genoma del Tripanosoma Crucei sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- \*  Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

*P. a. [Signature]*

Firmado: *[Signature]*

Sevilla, a 28 de enero de 1990.

TD  
579

**D. Manuel Leal Noval**, Profesor Asociado del Departamento de Medicina, y **Dña. Amalia Rubio Calvo**, Profesora Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, ambos de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN QUE: **D. Jaime Muñoz Franco**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su conjunta dirección el trabajo titulado:


"ESTUDIO DE LA RECONSTITUCIÓN INMUNE INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA. PAPEL DEL TIMO EN LA REPOBLACIÓN DE LINFOCITOS T VÍRGENES", reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Sevilla, a 29 de Abril del 2002.

VºBº de los Directores


El Doctorando

**D. Manuel Leal Noval**

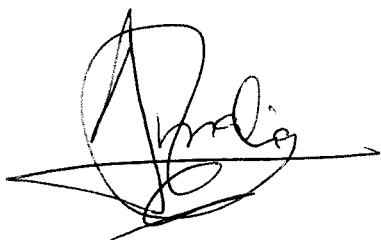


---

**Jaime Muñoz Franco**



**Dña. Amalia Rubio Calvo**



---



**Josefina Hidalgo Jiménez**, Catedrática de Biología Celular de la Universidad de Sevilla,  
como Tutora de Proyecto de Tesis

**CERTIFICA**

que **D: JAIME MUÑOZ FRANCO** ha realizado el trabajo titulado  
“ESTUDIO DE LA RECONSTITUCION INMUNE INDUCIDA  
POR EL TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL EN PACIENTES  
INFECTADOS POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA  
HUMANA. PAPEL DEL TIMO EN LA REPOBLACIÓN DE  
LINFOCITOS T VÍRGENES” bajo la dirección de los **Drs. Manuel  
Leal Noval y Amalia Rubio Calvo** y que, tras el examen del  
manuscrito correspondiente, dicho trabajo reúne los requisitos  
necesarios para su presentación en el Vicerrectorado de Tercer Ciclo,  
procediéndose al cumplimiento de los trámites correspondientes que  
culminarán en la obtención del título de Doctor.

Y para que conste y surta sus efectos, firma la presente en Sevilla, a 26 de Abril de 2002

El capítulo de agradecimientos de esta Tesis está dedicado al gran grupo de personas que de un modo directo o indirecto han contribuido a que un trabajo como este pueda salir adelante, a pesar de las limitaciones humanas del que ahora lo protagoniza. En especial quiero expresar mi gratitud a mis directores de Tesis, el Dr. Manuel Leal y la Dra. Amalia Rubio. Ellos han puesto algo de "orden en mi cabeza", enseñándome con su ejemplo, los modos y maneras de la investigación científica de calidad. Al Dr. Lissen, por su visión tan clara de que la investigación en biomedicina da sus mejores frutos cuando los "clínicos" y los "básicos" nos interesamos por los mismos problemas científicos, olvidándonos de delimitar el campo que nos corresponde exclusivamente a cada uno. Y al Dr. D. Manuel Martínez-Moya, del Servicio de Radiología, por el minucioso trabajo que realizó para poner a punto y luego utilizar la técnica de medida de volumen tímico, parte fundamental de esta Tesis.

Quiero también agradecer la colaboración que me brindaron los doctores D. José Luís Serrera y Dña. Concepción Rey del servicio de Bioquímica Clínica, D. Juan Antonio León-Leal del Servicio de pediatría, Dña. Berta Sánchez, del servicio de Inmunología, y D. Felipe Borderas, del Servicio de Anatomía Patológica, sin cuya contribución no hubiera podido realizar gran parte del trabajo aquí presentado.

En especial, agradecerlo a la Dra. Dña Carmen de la Horra Padilla, que además de haber colaborado desinteresadamente en algunas técnicas de laboratorio, me ha aguantado en casa, en una doble labor de esposa y compañera nunca suficientemente agradecida.

Quiero agradecer también el trabajo diario de todos estos años de mis compañeros de laboratorio, el Dr. D. Alejandro Vallejo, de la Unidad de Investigación, a Mercedes Olivera, Antonio Galloso, Maricarmen Mauri y Maria del Mar Rodriguez, del servicio de Bioquímica Clínica, y a Lourdes Laganda y Carmen Guzmán del servicio de Inmunología, y por último, pero no por ello menos merecido, a mis compañeros de la sufrida "profesión" de becarios, Maria Antonia Abad, Ezequiel Ruíz-Mateos, Sonia Molina y Natalia Soriano.

A todos, Muchas Gracias.

Esta tesis ha sido realizada gracias a financiaciones concedidas por:

- Junta de Andalucía (Beca 90/98)
- Fondo de Investigaciones Sanitarias (proyectos 97/0362 y 00/0521)
- Fondo para la Investigación y Prevención del SIDA en España (FIPSE 2132/00)
- Fundación Wellcome España.

En el Hospital Universitario Virgen del Rocío.

De los resultados de este trabajo se han obtenido las siguientes publicaciones:

**Franco JM**, Leon-Leal JA, Leal M, Cano-Rodriguez A, Pineda JA, Macias J, Rubio A, Rey C, Sanchez B, Lissen E 10. CD4+ and CD8+ T lymphocyte regeneration after anti-retroviral therapy in HIV-1-infected children and adult patients. *Clin Exp Immunol* 2000 119(3):493-8.

**Franco JM**, Rubio A, Rey C, Leal M, Macias J, Pineda JA, Sanchez B, Sanchez-Quijano A, Nunez-Roldan A, Lissen E 10. Reduction of immune system activation in HIV-1-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999 18(10):733-6.

**J. M. Franco**, A. Rubio, M. Martinez-Moya, M. Leal, E. Merchante, A. Sanchez-Quijano, and E. Lissen. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood*. (En prensa).

A Ignacio Muñoz Ramos, en el Recuerdo



**Indice**

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. Características generales del virus</b>	<b>3</b>
1.1 Elevada Tasa de Mutación.	3
1.2 Tropicismo.	4
1.3 Desregulación del Sistema Inmune.	5
<b>2. Patogénesis del SIDA</b>	<b>6</b>
2.1 Efecto de la infección sobre el estado de activación del sistema inmune	6
2.2 Linfopenia de linfocitos T CD4	7
2.2.1 <i>Modelo de la destrucción acelerada de las células</i>	8
2.2.2 <i>Modelo de la redistribución de linfocitos</i>	9
2.2.3 <i>Modelo del fallo regenerativo</i>	10
<b>3. Tratamiento antirretroviral de la infección</b>	<b>12</b>
<b>4. Regeneración de los linfocitos T</b>	<b>14</b>
4.1 Timopoyesis y expansión periférica	14
4.2 Modelos bifásico de repoblación de T <sub>H</sub> en el VIH	15
4.3 Origen de los linfocitos tras el HAART.	15
4.3.1 <i>Expansión periférica</i>	15
4.3.2 <i>Redistribución de células</i>	17
4.3.3 <i>Neolinfopoyesis. Papel del Timo</i>	17
<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>1 Ámbito de este estudio</b>	<b>26</b>
<b>2. Materiales y métodos comunes a todo el estudio</b>	<b>27</b>
2.1 Determinación de la carga viral VIH-1.	27
2.2 Recuento de subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica.	27
2.3 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).	27

---

2.4 Criopreservación de células.	28
2.5 Descongelación de células.	28
2.6 Citometría de flujo.	29
2.7 Extracción de ADN para PCR.	29
<b>3. Pacientes y material y métodos específicos del Objetivo 1.</b>	<b>30</b>
3.1 Selección de Pacientes.	30
3.2 Marcadores solubles de activación inmune.	31
3.3 Marcadores celulares de activación inmune.	31
<b>4. Pacientes y material y métodos específicos del Objetivo 2.</b>	<b>32</b>
4.1 Selección de Pacientes.	32
4.2 Marcadores celulares de fenotipo virgen y memoria.	33
<b>5. Pacientes y material y métodos específicos del Objetivo 3.</b>	<b>35</b>
5.1 Selección de Pacientes.	35
5.2 Marcadores celulares de fenotipo virgen y memoria.	35
5.3 Aislamiento de timocitos.	36
5.4 PCR Cuantitativa.	36
5.4.1 <i>Fundamento.</i>	36
5.4.2 <i>Detección fluorimétrica de los productos de la PCR.</i>	39
5.4.3 <i>Condiciones de PCR.</i>	41
5.4.4 <i>Oligonucleótidos y sondas.</i>	42
5.4.5 <i>Cuantificación de TRECs en PBMC de pacientes.</i>	43
<b>6. Determinación del volumen tímico.</b>	<b>45</b>
<b>7. Análisis estadístico.</b>	<b>46</b>

<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>1. Efecto del HAART sobre la activación del sistema inmune</b>	<b>48</b>
1.1 Características basales de los pacientes analizados	49
1.2 Activación basal del sistema inmune	50
1.3 Respuesta virológica y de linfocitos T CD4 al tratamiento	51
1.4 Cambios en la activación del sistema inmune tras el inicio del HAART	52
1.5 Influencia de la inmunosupresión basal sobre los marcadores de activación	53
<b>2. Repoblación linfocitaria T virgen y memoria.</b>	
<b>Efecto de la edad del paciente</b>	<b>56</b>
2.1 Expresión de marcadores de fenotipo virgen en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de pacientes infectados por VIH	57
2.2 Efecto de la congelación en la expresión de CD62L en la línea celular T Jurkat	58
2.3 Marcadores adoptados para la definición de linfocitos T virgen y memoria	60
2.4 Características basales de los pacientes analizados	62
2.5 Relación basal entre el recuento de T <sub>H</sub> totales y linfocitos T vírgenes	63
2.6 Respuesta virológica al tratamiento	64
2.7 Cambios en las subpoblaciones linfocitarias virgen y memoria de adultos	64
2.8 Cambios en las subpoblaciones linfocitarias virgen y memoria de niños	65
2.9 Heterogeneidad de la respuesta T virgen en adultos	67
<b>3. Repoblación linfocitaria T virgen y memoria. Papel del Timo</b>	<b>70</b>
3.1 Clonación de la reordenación $\delta$ Rec- $\psi$ J $\alpha$ de TRECs	71
3.2 Cuantificación de TRECs en timocitos	72
3.3 Características basales de los pacientes analizados	75
3.4 Correlación basal entre las variable relacionadas con la función tímica	76
3.5 Respuesta al tratamiento	77
3.6 Cambios en la función tímica	78

---

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
<b>1. Efectos de la terapia antirretroviral sobre la activación crónica inmune</b>	<b>83</b>
<b>2. Repoblación de linfocitos T vírgenes inducida por antirretrovirales</b>	<b>85</b>
2.1 Elección de marcadores de fenotipo virgen en linfocitos T de pacientes VIH <sup>+</sup>	86
2.2 Pérdida progresiva de linfocitos T4N y T8N en la progresión del VIH	89
2.3 Cambios en las subpoblaciones virgen y memoria con antirretrovirales	91
<b>3. Evidencias de función tímica en pacientes bajo HAART</b>	<b>94</b>
3.1 Situación basal	94
3.2 Efecto del tratamiento antirretroviral	97
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>102</b>

---

<b>ADCC</b>	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADVP</b>	Adicto a drogas por vía parenteral
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígenos
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>CDC</b>	Centro de Control de Enfermedades (Atlanta)
<b>CPT</b>	Tubo de preparación celular
<b>CT</b>	Tomografía computerizada
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Doble positiva
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamintetraacético, Ácido etilendinitrilotetraacético
<b>FACS</b>	Separador de células activado por fluorescencia
<b>FCS</b>	Suero fetal bovino
<b>FDC</b>	Célula dendrítica folicular
<b>GHVS</b>	Grupo de estudio de las hepatitis víricas y SIDA
<b>HAART</b>	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
<b>HIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>IFN</b>	Interferón
<b>LT</b>	Linfotoxina
<b>LTR</b>	Secuencia repetida larga
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>MIP-1</b>	Proteína inflamatoria de monocitos
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on activation normal T expressed and secreted</i>
<b>RTE</b>	Emigrante reciente del timo
<b>SCID-hu</b>	Inmunodeficiencia severa combinada humana
<b>SDF</b>	Factor derivado de células estromales

<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SIV</b>	Virus de la inmunodeficiencia de simio
<b>TCR</b>	Receptor de la célula T
<b>T<sub>H</sub></b>	Linfocito T colaborador
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TREC</b>	Círculo de excisión de reordenamiento del TCR
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>ZDV</b>	Zidovudina

# **Introducción**



El síndrome de inmunodeficiencia adquirida es un grave proceso caracterizado por el desarrollo de infecciones oportunistas, neoplasias malignas, y la afectación grave del sistema nervioso central (*Levi y col., 1993*). Los primeros casos documentados de SIDA se describieron en los años ochenta, y desde entonces, la importancia de este proceso para la salud pública ha ido creciendo, hasta convertirse en un grave problema mundial. En algunos países, la pandemia del SIDA ha alcanzado dimensiones catastróficas, como en África, donde se encuentra más de la mitad de la población infectada, o en Asia, donde el número de infectados está creciendo rápidamente. Se calcula que en los últimos veinte años se han infectado aproximadamente unos 60 millones de personas, de las cuales 20 millones han muerto.

El agente causal del SIDA es el VIH (*Coffin y col., 1986*). Sus principales vías de transmisión son el contacto sexual, la vía parenteral y la materno-fetal. En la mayoría de los casos, la infección provoca unos síntomas iniciales similares a los de una mononucleosis infecciosa, que se resuelven rápidamente, entrando el sujeto en una fase de latencia clínica que puede durar años, hasta el desarrollo del SIDA. Durante esta fase asintomática, el virus se replica activamente, destruyendo el sistema inmune, lo que queda de manifiesto por la progresiva reducción del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, característica de esta infección. El resultado final es la pérdida de funcionalidad del sistema inmune, y la aparición del SIDA .

Este curso letal de la infección por VIH puede ser interrumpido gracias a la disponibilidad de fármacos que inhiben la replicación del virus. La administración simultánea de varios de ellos tiene un efecto sinérgico supresor sobre la replicación viral, lo que consigue interrumpir la progresión de la inmunodeficiencia, una reconstitución parcial del sistema inmune, y un aumento drástico de la calidad y de la esperanza de vida de los pacientes. Sin embargo, y aunque las terapias actuales consiguen reducir la viremia a niveles indetectables, no son capaces de "curar", ya que ni consiguen la eliminación del virus del organismo, ni en general normalizar la funcionalidad del sistema inmune dañado. De hecho, constituye actualmente una incógnita las consecuencias que a largo plazo tendrán la inmunodeficiencia parcial a la que quedan expuestos los pacientes, que les dificulta el control inmunológico del VIH y probablemente hacerlos vulnerables a infecciones y tumores en el futuro, coincidiendo con el envejecimiento natural del sistema inmune.

## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS

El VIH es un retrovirus, y por lo tanto su genoma está codificado sobre una molécula de ARN, que debe ser retrotranscrita a ADN para expresarse en la célula huésped. Como en el resto de los retrovirus conocidos, su genoma se compone de secuencias *gag*, que codifican las proteínas estructurales del virión, secuencias *pol*, que codifican las enzimas necesarias para la integración del virus en el cromosoma de la célula, y secuencias *env*, que codifican las proteínas de la envuelta, implicadas en la fusión del virus con su célula huésped. Estas secuencias están flanqueadas por secuencias de repeticiones terminales largas, o LTR (del inglés *long terminal repeats*). Adicionalmente, existen también otros genes reguladores que controlan diversos aspectos del ciclo del virus (genes *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*), y que se encuentran codificados en distintos marcos de lectura de las secuencias *gag*, *pol* y *env*. La presencia de estos genes reguladores clasifica al VIH como un retrovirus complejo, que ha sido incluido en la familia de los lentivirus, una familia de virus que se caracterizan por producir enfermedades graves de progresión lenta. Se conocen dos variantes principales del VIH, denominadas VIH-1 y VIH-2. Genéticamente, ambas están muy relacionadas, causando un síndrome de inmunodeficiencia similar, aunque el VIH-1 es el principal responsable de la actual pandemia del SIDA. Las diferencias más relevantes entre ambos virus son que el desarrollo de la inmunodeficiencia debida a la infección por VIH-2 tiene un curso más lento, y que el VIH-2 presenta diferencias genéticas que le hacen naturalmente resistente a algunos de los antirretrovirales utilizados actualmente (*Rodes y col., 2000*).

El conocimiento de la estructura y del ciclo viral del VIH ha ayudado a comprender como el virus consigue escapar al control del sistema inmune, y como provoca su destrucción. Se puede considerar que las tres características principales que hacen al virus tan patógeno son su elevada tasa de mutación, su tropismo hacia las células del sistema inmune, y la alteración de los mecanismos de regulación del sistema inmune, que induce en provecho propio.

### 1.1 Elevada Tasa de Mutación.

La primera característica importante del VIH está relacionada con su naturaleza de retrovirus. A lo largo del ciclo vital del virus su genoma se codifica alternativamente en forma de ARN y ADN. Cada partícula libre de VIH (o virión) contiene dos cadenas idénticas de ARN, empaquetadas en un núcleo proteico rodeado por una bicapa lipídica

derivada de célula huésped. Tras la fusión del virus con la célula, el centro nucleoproteico del virus se desestructura, y el ARN del virus es retrotranscrito a ADN de doble cadena, por la acción de la enzima viral *transcriptasa inversa*, e integrado en el genoma de la célula por la enzima viral *integrasa* (incluidas ambas en el virión). Finalmente, el genoma viral completo es transcrito en una molécula de ARN que será de nuevo empaquetada en el virión, comenzando así otro ciclo infectivo. Debido a que la transcriptasa inversa viral carece de una actividad 3'→5' exonucleasa correctora de errores, la tasa de mutación característica del virus es excepcionalmente alta, del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  incorporaciones incorrectas por nucleótido copiado, lo que introduce mutaciones con mucha frecuencia. Esta alta tasa de mutación provoca que los viriones producidos presenten una gran diversidad genética, hasta el punto de que se habla del concepto de quasiespecies, en referencia al gran número de cepas distintas que pueden existir simultáneamente en un organismo (Domingo y col., 1996). Esta estrategia le da al virus una capacidad de adaptación inmensa, que le permite escapar a la presión que sobre él ejercen el sistema inmune y los fármacos antirretrovirales (Pantaleo y col., 1997).

## 1.2 Tropicismo.

La segunda de las características del VIH que le hacen altamente patogénico es su capacidad de infectar y destruir a las células del sistema inmune. El VIH es capaz de infectar y destruir linfocitos T CD4 colaboradores (o linfocitos T<sub>H</sub>, del inglés *T helper*), macrófagos y sus tipos celulares derivados de tejido (incluyendo la microglía del sistema nervioso central), y timocitos (Bonyhadi y col., 1993). La capacidad de infectar a estas células está basada en la afinidad que existe entre la molécula CD4 que expresan todas ellas y la proteína de la envuelta viral *gp120*. Sin embargo, la expresión de CD4 no basta para que la célula pueda ser infectada por el VIH. La entrada del virus en la célula requiere además la presencia de una segunda molécula que actúe de correceptor para el virus. Se han identificado varios receptores de quimioquinas que pueden actuar como correceptores para el virus. Los principales son el receptor CXCR4, que naturalmente se une a las quimioquinas SDF-1 y SDF-1 $\beta$ , y el receptor CCR5, que se une a RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . Tras la unión de la proteína *gp120* a la molécula CD4, y al correceptor de quimioquinas, se induce un cambio conformacional de la proteína *gp41*, que expone una región hidrófoba que media la fusión de las bicapas lipídicas del virus y de la célula. El uso de uno u otro correceptor depende de variaciones menores en la secuencia de la *gp120*, que aparecen como consecuencia de la alta tasa de mutación propia del virus antes comentada.

Estos cambios en la *gp120* se ha descrito que tienen un papel en la patogénesis de la enfermedad, al modificar el tropismo de las cepas de VIH.

La infección de estos tipos celulares afecta gravemente a la funcionalidad del sistema inmune, especialmente por la destrucción de linfocitos T<sub>H</sub>, que realizan una función central en la regulación de todo el sistema inmune. Adicionalmente, la infección de los timocitos induce una involución del tejido tímico (*Papiernik y col., 1992, Joshi y col., 1986*), que puede comprometer la capacidad de regeneración del sistema inmune, con potenciales implicaciones en la patogénesis de la enfermedad.

### **1.3 Desregulación del Sistema Inmune.**

La necesidad que el VIH tiene de un estado de activación celular para la expresión de sus genes es otro de los motivos por los que el VIH causa una alteración tan grave del sistema inmune. Como todos los virus, el VIH necesita usar la maquinaria de expresión génica de la célula huésped. Para ello, y una vez que el ARN viral ha sido retrotranscrito a un intermediario de ADN de doble cadena, este debe ser integrado en un cromosoma de la célula huésped. El proceso lo realiza otra de las enzimas víricas transportadas en el virión, la *integrasa*. A esta forma integrada del genoma vírico se le denomina *provirus*. Una vez integrado, la regulación de la transcripción de los genes del provirus depende de una secuencia LTR situada en 5' respecto a los genes estructurales víricos. En esta LTR se encuentran la secuencia del promotor TATA, y sitios de unión para factores de transcripción de la célula huésped, como NFκB y SP1. Estos factores de transcripción están disponibles en su forma activa en las células activadas, por lo que el inicio de la transcripción del genoma viral es dependiente de señales de activación inmune, tales como el reconocimiento del antígeno por los TCR de los linfocitos o por la presencia de citoquinas activadoras, como la interleuquina (IL)-1, IL-3, IL-6, TNF, LT, IFN-γ y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos. Por ello, y dependiendo del estado de activación de la célula huésped, el VIH puede quedar integrado en el cromosoma en estado latente hasta que la célula se activa, o bien puede iniciar un ciclo de producción de nuevos viriones si la célula ya estaba activada. Este hecho tiene implicaciones muy importantes para la erradicación del virus en pacientes bajo tratamiento antirretroviral, al constituir reservorios de virus insensibles a los antirretrovirales.

## 2. PATOGÉNESIS DEL SIDA

El VIH posee una serie de propiedades que favorecen que su replicación activa destruya el sistema inmune del huésped, provocando la aparición del SIDA. Sin embargo, en la actualidad todavía no están claro los detalles de la interrelación entre el virus y el sistema inmune que provocan la destrucción de este último. El VIH provoca la pérdida de células y el mantenimiento de unos niveles de carga viral muy elevados. Esto produce alteraciones en la homeostasia normal del sistema inmune, siendo las dos manifestaciones más importantes la disminución progresiva del número de linfocitos  $T_H$  (Levy, 1993), y la activación crónica del sistema inmune.

### 2.1 Efecto de la infección sobre el estado de activación del sistema inmune

El VIH necesita para su expresión de factores de transcripción que normalmente son funcionales solo en células activadas. Es bastante posible que el VIH favorezca un estado de activación crónica inmune para su propio beneficio, pero que sin embargo perjudica seriamente al sistema inmune. En los modelos animales de VIH se ha observado que el desarrollo o no del SIDA en primates infectados con el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV, del inglés *simian immunodeficiency virus*) depende del grado de activación crónica inducido en las diferentes especies (Gougeon y col., 1995).

La primera causa de activación inmune debida al VIH es su reconocimiento como extraño al organismo, lo que inicia una respuesta inmune para su eliminación. Esta respuesta consigue reducir las altas tasas de replicación vírica presentes en la fase de la primoinfección a valores menores, pero resulta ineficaz para su erradicación, manteniéndose entonces el SI en un estado de activación crónica. A ello contribuye que los principales lugares de producción y almacenamiento del virus son los tejidos linfoides (Pantaleo y col., 1991, Haase y col., 1996), donde el virus llega a través de varios mecanismos: inicialmente, y en el caso de que la exposición al virus se produzca en las mucosas, son las células dendríticas residentes en ellas las que transportan al virus a los ganglios linfáticos que drenan la zona expuesta (Orenstein y col., 1997). Posteriormente, el virus se extiende a través de la sangre al resto de los tejidos linfoides. A ello contribuye el que las partículas de virus del plasma son capturadas por las células dendríticas foliculares (FDC) de los tejidos linfoides. Estas células se convierten entonces en el principal reservorio de viriones, al mantenerlos unidos a su superficie formando complejos con anticuerpos y moléculas del complemento. Se cree que el VIH no se replica en las FDC,

pero que su presentación por las FDC devuelve la capacidad infectiva a los viriones inactivados por los anticuerpos neutralizantes.

El número de viriones así retenido en las FDC es extraordinariamente elevado, calculado en unos  $10^{10}$ , lo que convierte al VIH en el antígeno dominante en el sistema inmune (este número implica unos  $10^{14}$  copias de la proteína *p24*, por ejemplo). Este proceso va asociado a una activación crónica del sistema inmune, que se refleja en diversos parámetros, como la aparición de hipergammaglobulinemia; niveles elevados de marcadores solubles como la  $\beta_2$ -microglobulina, neopterina, y componentes del sistema TNF; o la expresión celular de marcadores de activación, como los niveles elevados de CD38 o de HLA-DR.

Adicionalmente, la progresiva pérdida de función inmune asociada a la infección por el VIH favorece la aparición de eventos oportunistas, que contribuyen aún más a aumentar el grado de activación inmune. El reconocimiento de un patógeno por un linfocito T puede inducir la reactivación de provirus en reposo, bien en la misma célula, o bien a través de la producción de TNF, que induce la reactivación de posibles provirus presentes en células vecinas. Por ello, la relación entre la progresión de la enfermedad y la activación del sistema inmune están íntimamente interrelacionadas .

## **2.2 Linfopenia de linfocitos T CD4**

Sin embargo, y a pesar de la activación crónica descrita anteriormente, la alteración más característica de la infección por el VIH es la progresiva desaparición de los linfocitos  $T_H$  de la sangre periférica. Se puede considerar que el recuento normal de  $T_H$  de un individuo adulto es de más de 500 células por microlitro de sangre, pero tras la infección su número comienza a descender paulatinamente, normalmente a lo largo de un periodo de años. El recuento sanguíneo de  $T_H$  es hasta ahora el marcador más fiable del grado de inmunodeficiencia de los pacientes, y cuando su número desciende por debajo de doscientas células por microlitro, se considera que existe un grave riesgo de sufrir enfermedades oportunistas y/o neoplasias. En los estadios finales de la enfermedad, cuando el SIDA se ha desarrollado, los linfocitos  $T_H$  han desaparecido prácticamente de la sangre. Esto demuestra el papel central que los CD4 juegan en la regulación de la función defensiva del sistema inmune.

Actualmente, no se conocen los mecanismos que provocan esta pérdida de linfocitos  $T_H$ , pero por analogía con otras situaciones de déficits de células sanguíneas, se puede

especular que la linfopenia puede ser causada por: i) destrucción acelerada de las células, ii) redistribución de las células desde la sangre hacia otros tejidos, o iii) producción insuficiente. Cada una de estos modelos tiene evidencias experimentales a su favor, y es posible que todas sean responsables en algún grado de la linfopenia VIH, en distintas fases de la enfermedad y en distintos enfermos, dependiendo de su edad. A continuación veremos las características más relevantes de cada modelo.

### **2.2.1 Modelo de la destrucción acelerada de las células**

La destrucción de las células por efecto de la infección es un componente fundamental de la linfopenia observada, y se produce como consecuencia de los efectos citotóxicos de la replicación viral, o debido a la acción efectora del sistema inmune que elimina específicamente a las células infectadas. Adicionalmente, también se pierden células no infectadas, como consecuencia del aumento de los niveles de apoptosis.

#### Por el efecto citopático del virus

El principal mecanismo de destrucción de los linfocitos CD4 *in vivo* en los sujetos infectados por el VIH parece ser consecuencia del efecto citopático que la replicación viral tiene sobre las células. Se han propuesto varios mecanismos de destrucción celular como consecuencia de la replicación activa del virus:

- Por la detención en la fase G2 del ciclo celular que induce la proteína viral *Vpr*, o por la acumulación de ADN viral no integrado.
- Por el secuestro de moléculas de CD4 en el retículo endoplasmático tras su interacción con la proteína viral *gp120* producida por la célula. Este mecanismo sería más efectivo en las células que expresaran mayores niveles de CD4 en su membrana, y explicaría porqué los macrófagos soportan mejor la infección por VIH, y pueden convertirse en células productoras de larga vida.
- Por la liberación de partícula víricas maduras, que afecta a la permeabilidad celular provocando lisis celular.
- En fases más avanzadas pueden producirse mecanismos adicionales de citotoxicidad, como la formación de sincitios que destruyen a los linfocitos T<sub>H</sub> vecinos al infectado. Ello es dependiente de la anteriormente comentada aparición de cepas víricas con tropismo alterado, conocidas como CXCR4, las cuales son más patógenas.

### Por una respuesta inmunológica frente al VIH

Alternativamente a la destrucción de las células por la citotoxicidad asociada a la producción del virus, las células infectadas pueden ser también destruidas por la función efectora del sistema inmune contra el VIH. En las primeras semanas de la infección por el VIH, se produce una explosión de replicación viral. El desarrollo entonces de una respuesta inmune específica contra el VIH tiene una importancia capital en el control de la progresión de la enfermedad. Esta respuesta incluye tanto las ramas de la inmunidad humoral como la celular. Así, aparecen linfocitos NK y CTL que destruyen las células infectadas, con lo que consiguen disminuir significativamente los niveles de viremia plasmática, y un aumento transitorio del recuento de T<sub>H</sub>. Paradójicamente, y a pesar del beneficio indudable en el control de la replicación vírica de esta respuesta inmune, un gran número de linfocitos T<sub>H</sub> son destruidos también por el propio sistema inmune, contribuyendo al desarrollo de la inmunodeficiencia final.

### Eliminación de células no infectadas.

Por último, existen mecanismos que pueden destruir también a células que no están infectadas. Se calcula que el total corporal de linfocitos CD4 productivamente infectados en un momento dado es de unos  $10^7$ - $10^8$ , y sin embargo la pérdida de linfocitos diaria es bastante superior al de células directamente infectadas por el virus. Esta destrucción puede ser debida a anticuerpos frente al VIH con reactividad cruzada con los T<sub>H</sub>, que pueden inducir su eliminación por mecanismos de *citotoxicidad celular mediada por anticuerpos*, o por mecanismos de apoptosis. Se ha descrito que una activación incompleta de los linfocitos T<sub>H</sub> *in vitro* sensibiliza las células, favoreciendo la apoptosis si son activadas de nuevo. *In vivo*, este mecanismo podría ocurrir como consecuencia del entrecruzamiento del marcador CD4 mediante anticuerpos autorreactivos, o por su unión a la proteína viral gp120.

### **2.2.2 Modelo de la redistribución de linfocitos**

Hemos visto previamente que el VIH es capaz de infectar y destruir a los linfocitos T<sub>H</sub>. Esto produce una reducción de su número total en el organismo del sujeto infectado, lo que se traduce en la progresiva reducción de su número en sangre periférica característica de la enfermedad. Sin embargo, la reducción en el número de T<sub>H</sub> circulantes es mayor que la pérdida real de su total corporal. El número total de linfocitos restantes en un momento dado es difícil de calcular, pero se calcula que cuando el recuento sanguíneo se ha reducido a 200 células por microlitro en el paciente infectado (aproximadamente un 20-25% de los



valores normales), el número total de linfocitos en los órganos linfoides secundarios se ha reducido en un 50% (X, Rosok y col. 1996). Por debajo de doscientos linfocitos  $T_H/\mu l$ , resulta impreciso calcular el total corporal restante, ya que la estructura tisular de los órganos linfoides está muy alterada.

El origen de esta pérdida asimétrica de células en ambos compartimentos se debe a cambios en la cinética de recirculación de los linfocitos. En un adulto normal de 30 años, se estima que el total corporal de linfocitos T CD4 es de aproximadamente unas  $2 \times 10^{11}$  células, repartidos en un equilibrio dinámico entre los tejidos linfáticos (98%) y la circulación periférica (2%). La razón de este intercambio se debe a que los linfocitos T y B utilizan la circulación periférica para trasladarse de un tejido linfático a otro, en busca del antígeno que reconocen específicamente. Se calcula que una misma célula puede recircular entre la sangre y tejidos linfoides hasta 50 veces en un día. El tiempo que los linfocitos permanecen en los ganglios linfáticos puede variar en respuesta a múltiples factores, como las infecciones y el estrés, lo que puede alterar las proporciones en equilibrio entre los dos compartimentos, y modificar drásticamente el recuento periférico sin variar el número total de células en el organismo. Por ello, cuando un linfocito  $T_H$  reconoce su antígeno específico presentado por las células APC de los ganglios linfáticos, se inicia una respuesta inmune que lo activa, quedando retenido en los ganglios, mientras que las células efectoras CD8 activadas salen a la circulación. Esto produce una inversión del cociente normal CD4/CD8.

Parece probable que la respuesta inmune a la infección por VIH provoque un fenómeno similar de retención linfática de CD4, que no se resuelve mientras esté presente el virus. Esta alteración no implica necesariamente una destrucción de células totales, pero explica parcialmente la reducción de linfocitos en sangre periférica. El análisis de los tejidos linfoides de pacientes infectados sin tratamiento ha confirmado una mayor retención de linfocitos  $T_H$

### **2.2.3 Modelo del fallo regenerativo**

Por último, existen mecanismos adicionales que contribuyen a la desaparición de linfocitos. Además de la destrucción de células maduras, y de su secuestro fuera de la circulación periférica, se postula que el virus puede afectar a los mecanismos regenerativos de linfocitos, afectando a la producción de linfocitos en el timo. El análisis de timos humanos provenientes de fetos abortados de madres seropositivas, y de biopsias de timo en niños infectados ha demostrado que el VIH es capaz de inducir una involución tímica. De

acuerdo a esto, los niños infectados por el VIH antes del nacimiento nacen con una grave alteración del sistema inmunitario, probablemente por la colonización intrauterina del timo por el VIH. *Bonyhadi y col., 1993* ha demostrado en un modelo de ratón SCID-hu que la inyección intratímica de aislados primarios de VIH permite la replicación activa del virus, por la detección del antígeno viral p24, y que ello va asociado a una deplección muy grave de la subpoblación mayoritaria de timocitos, de fenotipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP, del inglés *double positive*). Evidencias in vitro también confirman que el VIH tiene la capacidad de infectar timocitos.

Adicionalmente, otros mecanismos podrían reducir la fracción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> vírgenes, como su conversión acelerada en linfocitos memoria por efecto del estado de activación crónica inducido por el VIH.

### 3. TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE LA INFECCIÓN

El tratamiento de los pacientes infectados por el VIH tienen hoy en día como primer objetivo la inhibición de la replicación del virus. Para ello, se han desarrollado fármacos que actúan fundamentalmente sobre dos de sus enzimas específicas, la transcriptasa inversa y la proteasa virales. El primer fármaco disponible con actividad antirretroviral fue la 3'-azido-2'-3'-didesoxitimidina, conocida como AZT, o zidovudina (ZDV, *Fischl y col., 1987*). Se trata de un análogo de nucleósido, el cual actúa sobre la transcriptasa inversa viral, inhibiendo la retrotranscripción del ARN del virus en ADN de doble cadena. La ZDV es efectiva para el tratamiento del VIH-1 y del VIH-2, y su administración en solitario conseguía una reducción de la carga viral y un aumento de la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, el tratamiento basado exclusivamente en la administración de ZDV fracasa en 6-18 meses por la aparición de cepas de virus que incorporan mutaciones de resistencia. Con el desarrollo de nuevos fármacos que también inhibían la enzima transcriptasa inversa, el siguiente paso en el tratamiento del VIH fue la administración combinada de varios de ellos, con lo que la barrera genética a superar era mayor, dificultando la aparición de cepas mutantes con resistencia simultánea a los fármacos administrados. De este modo, la administración de ZDV combinada con otros análogos de nucleósidos, como la didanosina (DDI) o lamiduvina (3TC) lograba reducir la carga viral hasta dos logaritmos, pero de un modo también transitorio. Además, estos fármacos actúan solo sobre la primera fase del ciclo infectivo, y no pueden impedir la formación de nuevos viriones a partir de la reactivación de provirus integrados previamente.

El desarrollo de fármacos que actuaban sobre otra de las enzimas del virus, la proteasa, inhibe la maduración de los precursores proteicos del virus en proteínas funcionales, impidiendo así la formación de nuevos virus incluso en las células con provirus ya integrados. La combinación de análogos de nucleósidos y de inhibidores de la proteasa que comenzó en 1996 ha resultado ser un tratamiento muy efectivo, denominado HAART (del inglés *highly active antirretroviral therapy*). El HAART es capaz de reducir la replicación del virus a niveles mínimos. Con su administración, la carga viral puede hacerse indetectable en el plasma (menos de 5 copias de virus por mililitro, con las técnicas más sensibles), y reducirse hasta 2500 veces en los tejidos linfáticos. Este control de la replicación puede mantenerse durante años, aunque parece que no será posible la erradicación total del virus, por la persistencia de células infectadas con provirus no expresados. Por último, la tendencia actual de los tratamientos es la de su simplificación,

pues si bien el HAART tradicional es muy efectivo en el control de la progresión de la infección por el VIH, la complejidad de las pautas de administración y sus posibles graves efectos secundarios, como la aparición de lipodistrofia, está provocando el cambio a regímenes de “HAART simple”, el cual incorpora inhibidores de la transcriptasa inversa de un nuevo tipo, no análogos de nucleósido, en lugar de los inhibidores de la proteasa, los cuales son de más fácil administración.

En cualquier caso, los tratamientos HAART tienen un efecto muy beneficioso sobre la morbimortalidad asociada al SIDA. La desaparición de la presión del virus sobre el sistema inmune permite un cierto grado de recuperación, manifestada tanto por parámetros clínicos como biológicos. En general, esta mejoría de la función inmune es rápida y los enfermos comienzan a sentirse mejor en poco tiempo. En respuesta al HAART la activación crónica del sistema inmune se reduce, la linfopenia CD4 se corrige al menos en parte, y todo ello permite que las enfermedades oportunistas no aparezcan, y son numerosos las comunicaciones de resoluciones de enfermedades oportunistas a partir del inicio del HAART. A pesar de los indudables efectos positivos del HAART sobre la función inmune en general y sobre el recuento de  $T_H$  en particular, existe discrepancia actualmente sobre los mecanismos que regeneran el número de  $T_H$ . Existen varios modelos que explican los aumentos en el número de  $T_H$ , que discutiremos en la siguiente sección.

## 4. REGENERACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

### 4.1 Timopoyesis y expansión periférica

Los mecanismos por los que el número de linfocitos T presentes en el organismo puede ser aumentados son básicamente dos. En el primer caso, células madre de la médula ósea sufren un proceso de maduración que las transforman en linfocitos T maduros plenamente funcionales, capaces de rechazar a los agentes extraños al organismo. La impronta del reconocimiento de lo propio y de lo extraño se produce durante su diferenciación en una glándula especializada: el timo. Tras completar su diferenciación, estas células "vírgenes" abandonarán el timo y recircularán continuamente por los órganos linfoides secundarios, hasta encontrar un antígeno que puedan reconocer a través de sus receptores clonotípicos específicos, o TCR (del inglés *T cell receptor*), iniciando una respuesta inmune específica.

El segundo mecanismo de producción de linfocitos T está relacionado con este reconocimiento antigénico. Cuando un clon de linfocitos reconoce un antígeno como extraño, comienza a dividirse para aumentar su número, y así realizar más eficazmente su función efectora. A la vez, sus células inician una serie de cambios que les permitirán realizar sus funciones efectoras. Normalmente, el clon así expandido suele contraerse al agotarse la respuesta inmune que lo creó, pero conservando el suficiente número de células como para que en caso de una nueva exposición al antígeno que reconocen, la respuesta inmune ocurra rápidamente. A estas células se les denomina "memoria", y pueden ser distinguidas de las vírgenes por los marcadores de activación celular que expresan. Aunque esta expansión del tamaño de los clones ocurre normalmente en el contexto de una respuesta inmune específica, en situaciones de una reducción del número de linfocitos T en el organismo las células restantes pueden iniciar un proceso general de expansión periférica de naturaleza homeostática, no efectora, para corregir ese déficit de células. Esta expansión de los clones genera células con un fenotipo activado, característico de los linfocitos memoria.

Es importante considerar que la generación de linfocitos a través de ambos mecanismos no es equivalente, pues los linfocitos generados por diferenciación en el timo de precursores médula ósea incluyen una gran variedad de clones diferentes, mientras que la expansión periférica de linfocitos maduros no puede crear más clones de los que ya existían inicialmente en el inóculo de partida, y antes al contrario, el repertorio de las células generadas puede quedar sesgado por la presencia de antígenos que favorezcan la

expansión de unos clones sobre otros. Además, las células generadas por expansión periférica presentan defectos funcionales, y el número final que alcanzan en equilibrio es menor que en el caso de su generación por el timo.

#### **4.2 Modelos bifásico de repoblación de $T_H$ en el VIH**

Es por ello que en el análisis de la repoblación de linfocitos que se observa en los pacientes infectados por el VIH como consecuencia del inicio de la terapia antirretroviral se distinguen las poblaciones de linfocitos T vírgenes y memoria. De esta distinción ha surgido el modelo bifásico, según el cual el aumento de linfocitos  $T_H$  que se produce tras el inicio de la terapia antirretroviral presenta dos fases: durante las dos primeras semanas de tratamiento, y aproximadamente hasta el primer mes, se produce un aumento rápido y considerable de células memoria. Por otro lado, los linfocitos vírgenes tienen un aumento que se inicia más tardíamente y de menor intensidad, pero que se extiende durante un periodo de tiempo mayor, hasta más allá de un año. Esta cinética sugiere que ambas subpoblaciones tienen un origen diferente.

#### **4.3 Origen de los linfocitos tras el HAART.**

Actualmente existen tres modelos que explican el origen de las células CD4 tras el tratamiento antirretroviral de los pacientes infectados por el VIH, basados en los mecanismos expuestos anteriormente de expansión de linfocitos y en la posibilidad de que el incremento de linfocitos periféricos no refleje un aumento del total corporal, sino una redistribución desde los órganos linfoides hacia la circulación periférica.

##### ***4.3.1 Expansión periférica***

El modelo de la expansión periférica tuvo su origen en el análisis de la cinética de cambios a muy corto plazo en la sangre de la carga viral y del número de linfocitos  $T_H$  inducidos por la terapia antirretroviral. A principios de 1995 dos trabajos fundamentales en la comprensión de la dinámica del VIH y de los linfocitos  $T_H$  en la infección por VIH (*Ho y col., 1995, Wei y col., 1995*) demostraron que durante la fase de latencia clínica el virus continuaba replicándose muy activamente, y que el tratamiento antirretroviral era capaz interrumpir drásticamente la infección de nuevas células. La desaparición del virus iba asociada a un aumento del recuento de linfocitos  $T_H$ , que en algunos casos multiplicaba hasta 78 veces los recuentos basales de  $T_H$ . Esto fue interpretado como reflejo de la destrucción de células provocada por la replicación activa del virus, al mantener el sistema inmune un equilibrio dinámico entre la destrucción de células por el virus y su

regeneración homeostática. A partir de los incrementos de  $T_H$  se calculó que diariamente podrían estar destruyéndose un 5% del total de linfocitos  $T_H$ , aproximadamente  $10^9$  células/día, incluso en pacientes con un moderado grado de progresión. Sin embargo, este modelo del *High Turnover* ha sido puesto en duda por diferentes estudios que analizaban el grado de recambio celular, estimado a través de la longitud de los telómeros, o la expresión de marcadores asociados a la división celular.

Los telómeros son los extremos de los cromosomas, y están formados por secuencias de ADN repetidas, cuya longitud se acorta en aproximadamente unos 50 pares de bases (Harley y col., 1990) en cada división celular, salvo que sean regenerados por la actividad de la telomerasa, una enzima que se expresa en células germinales y transformadas. En el trabajo de Wolthers y col., 1996 se demostraba que la longitud de los telómeros en pacientes con una infección por VIH relativamente avanzada estaba acortada en los linfocitos T CD8, pero no en los CD4, y que ambos tipos celulares expresaban niveles similares de telomerasa. Ello sugería que el VIH inducía un aumento en la proliferación celular en linfocitos T CD8, pero no en los CD4, lo que contradecía el modelo del *High Turnover*.

Otras técnicas para evaluar la tasa de proliferación en células se basan en la detección de antígenos expresados exclusivamente en células en ciclo (Ki-67), o en el marcaje del ADN de las células en división (BrdU, glucosa deuterada). De nuevos se ha confirmado que las tasas de proliferación de linfocitos T CD4 y CD8 están solo moderadamente aumentadas en un factor de x2 y x6, respectivamente, en pacientes seropositivos (Sachsenberg y col., 1998, Hellerstein y col., 1999). Así, parece que existe un consenso bastante aceptado de que la tasa de recambio entre las CD4 de pacientes infectados por VIH está aumentada respecto a controles sanos, pero de un modo más modesto que el inicialmente propuesto. Actualmente se acepta una elevación en un factor de 2-3 en la tasa de proliferación en los linfocitos CD4 y CD8 (Fleury y col., 2000, Hellerstein y col., 1999), especialmente entre los CD4 memoria/efectores (McCune y col., 2000), pero también los  $T_H$  vírgenes.

Por último, el modelo de la repoblación por expansión periférica predice que mientras no se alcance el número normal de linfocitos, el HAART debe inducir un aumento en la tasa de proliferación. El análisis cuantitativo de la expresión de Ki-67 en linfocitos  $CD4^+$  de amígdalas muestra una disminución significativa a las 24 semanas de HAART, hasta valores similares a los de controles sanos (Zhang y col., 1998). La expresión de Ki-67 en

linfocitos CD4 y CD8 se redujo a las 4 semanas del HAART y se normalizó tras un año de HAART, en pacientes con inmunosupresión moderada. Los autores interpretan el aumento basal de la proliferación como indicativo de un estado de activación crónica que se resuelve con el HAART (*Hazenberg y col., 2000*).

#### **4.3.2 Redistribución de células**

En realidad, hoy se entiende que los aumentos a corto plazo (2-4 semanas) de linfocitos T<sub>H</sub> tras la terapia antirretroviral (y de otras subpoblaciones, como linfocitos CD8, B y NK) provienen de la recirculación de células atrapadas en los ganglios linfáticos, que son liberadas tras la desaparición del efecto perturbador de la replicación del VIH (*Mosier, 1995, Sprent y col., 1995*). Este modelo se ve apoyado por la rapidez con la que se produce el aumento de T<sub>H</sub> periféricos (*Pakker y col., 1998*). El modelo de recirculación de linfocitos entre la sangre y los órganos linfoides predice que solo el 2% de linfocitos se encuentran normalmente en la sangre, y que recirculan continuamente, hasta 50 veces en un día. Esto permite que se produzcan cambios muy importantes en el número de T<sub>H</sub> en la periferia sin modificar el total corporal, si se altera dicho equilibrio. La infección por VIH puede provocar un fenómeno de retención linfática de CD4, que no se resuelve mientras esté presente el virus. El HAART induce una brusca interrupción de la producción de nuevos viriones, lo que reduce la carga viral en el plasma y en los ganglios, desactivando al sistema inmune y liberando células a la circulación periférica. El análisis directo del tamaño de los ganglios apoyan este modelo: tras el HAART, se produjo una reducción del tamaño de los ganglios, que fue acompañada de una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias y de moléculas de adhesión (*Bucy y col., 1999*).

#### **4.3.3 Neolinfopoyesis. Papel del Timo**

El timo es una glándula situada en el mediastino anterior y superior, por delante de los grandes vasos que salen del corazón. Su función es la de proporcionar un ambiente adecuado al proceso de diferenciación de los linfocitos T. Para ello, las células precursoras se dirigen al timo desde la médula ósea, comenzando un proceso de diferenciación durante el cual se produce la reordenación aleatoria de los genes de los TCR, y la selección de aquellos clones con TCRs capaces de reconocer en el contexto de los MHC propios a los péptidos extraños, pero no a los propios (péptidos autorreactivos). Los estadios principales de desarrollo de los timocitos han sido definidos por la expresión de los marcadores CD3, CD4 y CD8.



El timo desarrolla su máxima actividad al final de la vida uterina y en los primeros meses de vida, generando un *pool* de linfocitos T maduros que ocupa los órganos linfoides secundarios. Tras esta "siembra" inicial de linfocitos T el timo experimenta una involución progresiva, caracterizada por una reducción en el tamaño y una substitución del estroma tímico por tejido graso, y se considera que tras la pubertad el timo ya es completamente afuncional. Esta posibilidad de prescindir de la función del timo sin más consecuencias para el sistema inmune se pone de manifiesto drásticamente en situaciones en las que es necesaria su extirpación quirúrgica, como en la cirugía cardíaca correctora, o en el tratamiento de timomas. La timentomía, incluso a los pocos meses del nacimiento, no provoca un déficit inmunitario en los sujetos, gracias a que el *pool* de linfocitos T periféricos es autosuficiente en condiciones normales, y puede mantener su número a través de mecanismos homeostáticos sin necesidad de una nueva diferenciación de células T.

La involución normal del timo parece responder a un principio de "economía doméstica", al no ser necesaria su función para mantener el tamaño del *pool* periférico de linfocitos T maduros. Sin embargo, este hecho no excluye que el timo puede ser reactivado en condiciones en las que su función vuelve a ser necesaria. Es conocido que algunos órganos involucionados en la vida adulta pueden recuperar su función cuando es necesario, como en el caso de la mielofibrosis, donde el hígado y el bazo pueden recuperar la capacidad hematopoyética que poseían en la vida fetal. En el caso del timo, parece igualmente posible su reactivación en condiciones de necesidad, como lo es el caso de la destrucción total o parcial de los linfocitos T. En este sentido, la recuperación del *pool* de linfocitos T tras la quimioterapia antitumoral es posible, aunque está relacionada con la edad del paciente, de tal modo que la recuperación de linfocitos T vírgenes ocurre principalmente en los pacientes más jóvenes, y se asocia a un incremento del volumen del timo (determinado por tomografía axial computerizada). Esta relación entre el timo y la recuperación de linfocitos vírgenes ha sido adicionalmente apoyada por la falta de producción de linfocitos T vírgenes en un paciente joven sometido a timentomía (Heitger y col., 1997), que repobló con linfocitos T<sub>H</sub> memoria exclusivamente.

La infección por el VIH es otra situación patológica de intensa deplección de células T. Es razonable suponer que una vez logrado el control de la replicación del virus, el organismo inicie los mecanismos homeostáticos necesarios para la reconstitución del sistema inmune, gravemente dañado por la infección. Entre estos mecanismos, el más

eficaz a priori debe ser la reactivación del timo, que es el mecanismo primario de producción de linfocitos T, capaz de producir un *pool* de linfocitos plenamente funcional, con un repertorio diverso. Sin embargo, es posible que el timo haya quedado irreversiblemente dañado por la acción del VIH.

Es por ello necesario que el tratamiento HAART sea capaz de inhibir la replicación del VIH también en el timo, para que este pueda regenerarse si están presentes las señales adecuadas. La recuperación de la función tímica para corregir la linfopenia tras el inicio de la terapia antirretroviral es muy evidente en los pacientes pediátricos, en los que se ha comunicado que el tratamiento HAART aumenta el número de linfocitos  $T_H$ , fundamentalmente con linfocitos  $CD45RA^+$  vírgenes (*Essajee y col., 1999*). Este aumento de linfocitos vírgenes fue mayor entre los niños de menor edad (*Cohen Stuart y col., 1998, Sleasman y col., 1999*), lo que se explica por la mayor capacidad de función tímica de los pacientes más jóvenes.

Vemos pues que la evaluación de la función tímica a través de la producción de linfocitos T vírgenes es válida, especialmente en el caso de los niños. Sin embargo, esta técnica tiene sus limitaciones, puesto que las células vírgenes pudieran ser generadas alternativamente por expansión periférica sin cambio de fenotipo, o por reversión de células memoria que expresarían de nuevo el marcador  $CD45RA$  propio de las células vírgenes.

La función tímica ha sido evaluada alternativamente analizando el volumen del timo, medido por técnicas radiodiagnósticas. En este sentido se ha comunicado que en niños el incremento de linfocitos  $T_H CD45RA^+CD62L^+$  vírgenes estuvo relacionado con aumentos de la glándula tímica medidos por resonancia magnética nuclear (*Vigano y col. 1999*). En adultos, se ha descrito que en pacientes infectados por el VIH sin tratamiento el porcentaje de sujetos con una masa tímica grande era del 50%, significativamente mayor que en los controles de igual edad no infectados. Así mismo, la masa tímica grande estaba asociada a un mayor número de  $T_H$  vírgenes (*McCune y col., 1998*). La abundancia de tejido tímico en los pacientes infectados por VIH de más edad se interpretó como una respuesta a la pérdida de linfocitos  $T_H$ , o bien a una función tímica más conservada en algunos paciente, que confería un efecto protector de supervivencia en los pacientes infectados. La relación entre el tejido tímico y la recuperación de linfocitos T vírgenes en adultos tras el HAART ha sido también investigada, aunque solo se disponía de datos del volumen tímico al final del seguimiento, lo que impidió analizar la cinética del volumen tímico tras el inicio del

HAART. En cualquier caso, se demostró que los aumentos de TH vírgenes al inicio del tratamiento eran mayores en los pacientes un mayor volumen del timo (*Smith y col., 2000*). Esta relación entre el volumen tímico y los aumentos de linfocitos vírgenes detectados tanto en niños como en adultos parecen indicar que los cambios en volumen de la glándula son funcionales, reflejo probablemente de una mayor actividad timopoyética. Sin embargo, existen autores que interpretan los cambios en el volumen del timo como una infiltración de linfocitos T maduros en el área perivascular del timo (*Haynes y col., 1999*), no relacionada con un aumento de la diferenciación tímica. Parece incluso posible que se produzcan aumentos de linfocitos TH vírgenes sin la presencia del timo, como ha sido comunicado en un paciente infectado por VIH y con timentomía, que inició un HAART.

Recientemente se ha comunicado la disponibilidad de un marcador molecular de células recién emigrada del timo (RTE, del inglés *recent thymic emigrant*), que permite cuantificar la producción de nuevos RTE de un modo más real que por la enumeración de células con fenotipo virgen. Este marcador se basa en las modificaciones que se realizan en el ADN de los timocitos durante su diferenciación intratímica, ya que para la generación de la gran diversidad de receptores TCR que constituyen el repertorio inmunológico, se debe producir una reunión aleatoria de segmentos génicos V, D y J, inicialmente separados en el cromosoma, para formar nuevas proteínas únicas de los distintos TCR. Estos segmentos son reunidos por mecanismos de corte y empalme del ADN, que tienen como subproducto la expulsión del ADN espaciador en forma de una molécula de ADN circular extracromosómica. Estos círculos de ADN así generados no realizan ninguna función en la célula, y por lo tanto no existen mecanismos para su replicación cuando la célula portadora se divide. Este hecho es el origen de las propiedades que hacen interesantes a estos TRECs para medir la función tímica, ya que al no ser replicado durante la mitosis, su número no aumenta aunque si lo haga el número de células del clon de linfocitos T, y se considera que la única fuente que puede aumentar el número de TRECs es la diferenciación intratímica de linfocitos T.

Cada posible reordenación entre segmentos genera un TREC de tamaño y secuencia característicos, por lo que existen infinidad de ellos, pero en la práctica existe un tipo particular de TREC que es especialmente abundante en los timocitos, por las características de su generación. El receptor clonotípico del linfocito T está formado por un heterodímero del que existen dos posibles variantes, el heterodímero TCR- $\alpha$ /TCR- $\beta$  o el TCR- $\gamma$ /TCR- $\delta$ , de propiedades funcionales muy diferentes. El tipo de linfocitos más común es el que

posee un TCR de tipo  $\alpha\beta$ . Se da la circunstancia de que los segmentos génicos V, D y J del TCR  $\delta$  se encuentran situados en el interior del locus que contiene los segmentos del TCR- $\alpha$ , entre los segmentos génicos  $V\alpha$  y  $J\alpha$ , y que para la adecuada reordenación del TCR- $\alpha$  el primer paso debe ser la eliminación de las secuencias del TCR- $\delta$ , por un mecanismo de corte y empalme homólogo al de recombinación de los segmentos V, D y J antes descrito. Para l

El locus TCR- $\delta$  se encuentra flanqueado por varios segmentos génicos, de los cuales dos ( $\delta$ Rec y  $\psi J\alpha$ ) son los que con más frecuencia son apareados para realizar la recombinación que expulsará el *locus* TCR- $\delta$  (hasta un 70% de los timocitos usan esta vía), . Esta reordenación no genera combinaciones funcionales de segmentos génicos, pero se piensa que prepara para la reordenación del *locus* TCR- $\alpha$ .

El punto de unión de las hebras de ADN en el TREC expulsado se denomina *signal joint*, y puede ser detectado diseñando cebadores que sobre el ADN de la línea germinal se encuentran muy alejados y en orientación no productiva, pero que tras el proceso de recombinación quedan enfrentados y próximos, lo que permite la detección de las *signal joints* generadas mediante PCR.

El análisis de los niveles de TRECs en sangre periférica ha sido empleado como marcador de función tímica por sus propiedades antes comentadas. De este estudio se ha demostrado que aunque muy reducida, la función tímica parece estar presente hasta una muy avanzada edad, habiendo sujetos de hasta 70 años con niveles de TRECs detectables en la sangre. En el contexto del VIH, se ha demostrado que en pacientes infectados y no tratados los niveles de TRECs en PBMC son significativamente menores que en controles sanos de igual edad. También se ha demostrado que la reducción de los niveles de TRECs son un marcador independiente del recuento de  $T_H$  o de la carga viral de la progresión a SIDA. Dado que los TRECs en sí mismos no realizan función alguna en las células que los portan, los datos anteriores se han interpretado como un indicativo de que el VIH afecta a la función tímica, y que ello tienen implicaciones en la progresión de la enfermedad.

Adicionalmente, se ha demostrado que la administración de terapia antirretroviral puede aumentar significativamente los niveles de TRECs, indicando que la función tímica pudiera estar implicada en la reconstitución del sistema inmune inducida por el HAART.

Sin embargo, las variaciones en el nivel de TRECs han sido adicionalmente explicadas por mecanismos distintos a los de los cambios en la función tímica por otros autores.

Modelos matemáticos del impacto que sobre los niveles de TRECs en sangre periférica tendrían los cambios en los parámetros de función tímica, tasas de mortalidad y tasas de proliferación de las células vírgenes han demostrado que la pérdida de TRECs asociada a la infección por VIH no puede ser explicada simplemente por una interrupción de la producción tímica, ya que este mecanismo tendría un efecto muy modesto en condiciones normales en la desaparición de los TRECs ya presentes en la sangre periférica. Por el contrario, los aumentos drásticos de las tasas de proliferación de los linfocitos serían muy eficaces en la reducción en la frecuencia de TRECs en PBMC, por un efecto de dilución del TREC en la población celular en expansión. Dado que una de las características de la infección por el VIH, antes comentada, es el estado de activación crónica que produce, es lógico suponer que la reducción en la frecuencia de células activadas y en las tasas de proliferación inducidas por el HAART podrían ser responsables de los aumentos de la frecuencia de TRECs observados.

# **Objetivos**

## **OBJETIVOS**

1. Analizar los efectos del HAART sobre la hiperactivación crónica del sistema inmune, producida como consecuencia de la infección por el VIH.
2. Analizar la dinámica de repoblación de linfocitos T inducida por el HAART (diferenciando las subpoblaciones virgen y memoria), así como la influencia de la edad sobre este proceso.
3. Analizar los cambios en la función tímica producidos tras el inicio del HAART, en pacientes adultos.

# **Material y Métodos**



## **1 ÁMBITO DE ESTE ESTUDIO**

Este estudio ha sido realizado en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, dentro del *Grupo para el Estudio de la Hepatitis Vírica y SIDA* (GHVS). El GHVS es un grupo multidisciplinar formado por médicos y biólogos pertenecientes a los servicios de Medicina Interna, Bioquímica Clínica y Microbiología Clínica de dicho hospital. Adicionalmente, para la realización de este estudio han colaborado los servicios de Inmunología, Pediatría y Radiología de dicho hospital.

El GHVS dispone de un servicio de consultas externas y de un área de hospitalización en el servicio de Medicina Interna, para la atención de los pacientes infectados por los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de las hepatitis. Desde 1989, los pacientes que inician tratamiento antirretroviral para el VIH son incluidos en una cohorte para su control periódico. El programa de visitas de la cohorte incluye controles en las semanas -4, 0, 4 y 12, y cada doce semanas desde entonces. En cada visita se realiza un estudio clínico, virológico e inmunológico del paciente, y se obtienen muestras biológicas, que son procesadas y conservadas en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del GHVS, para su posterior análisis. Actualmente, la cohorte incluye 350 individuos, que suman un total de aproximadamente 9000 visitas. Desde Abril de 1996, existe disponibilidad de tratamiento HAART.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS COMUNES A TODO EL ESTUDIO

### 2.1 Determinación de la carga viral VIH-1.

El número de viriones del VIH-1 presentes en la sangre de los pacientes, o carga viral, es un marcador imprescindible para evaluar tanto el riesgo de progresión a SIDA de los pacientes como la eficacia del tratamiento antirretroviral que siguen. La carga viral se determina cuantificando el ARN que constituye el genoma del virus, y se realiza de modo rutinario en el Servicio de Inmunología de nuestro hospital, utilizando métodos comerciales estandarizados. El ensayo utilizado es el "*COBAS Amplicor HIV-1 Monitor™ Test*" (Roche Molecular System, Hoffman-La Roche, Suiza). La sangre es extraída en tubos con K<sub>3</sub>-EDTA y centrifugada para separar el plasma, que es congelado hasta su determinación. Este ensayo se basa en la retrotranscripción del ARN viral y de un estándar interno al ensayo en ADN complementario, su amplificación mediante PCR, y la posterior detección del amplificado por métodos colorimétricos. El sistema se usó con un límite inferior de detección de 200 copias de ARN de VIH-1 por mililitro en los objetivos 1 y 2 de este estudio. Las determinaciones del objetivo 3 se realizaron con un límite inferior de detección de 50 copias, gracias a la adición de un paso de ultracentrifugación inicial de los sueros. La versión del ensayo disponible actualmente (v1.5) no detecta ARN del VIH-2, por lo que para los pacientes infectados por dicho virus no se dispone de datos de la carga viral.

### 2.2 Recuento de subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica.

Al igual que la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> es un parámetro imprescindible para la monitorización de los pacientes infectados por el VIH. Esta determinación se realiza de modo rutinario en el Servicio de Inmunología de nuestro hospital. Para ello, una muestra de sangre extraída en tubos con K<sub>3</sub>-EDTA es marcada con un panel de anticuerpos apropiado, dentro de las primeras 24 horas de la extracción. El recuento absoluto y porcentajes de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, linfocitos B CD19<sup>+</sup> y linfocitos NK CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> se obtiene por análisis automatizado de un volumen fijo de sangre, utilizando un citómetro de flujo *Orthocytoron Absolute* (Ortho, USA).

### 2.3 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Para la obtención de las células mononucleares de los pacientes, y hasta 1999, la sangre era extraída en tubos con heparina de sodio como anticoagulante. La sangre extraída en

tres tubos de 10 ml de capacidad cada uno fue reunida y diluida en un volumen de tampón fosfato salino (PBS, bioMérieux, Francia). La separación de las PBMC se realizó en la misma mañana de la extracción, mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, centrifugando a 1600g durante 20 minutos a 20° C. La fase conteniendo la fracción de células mononucleares fue diluida con PBS hasta un volumen final de 50 ml, y las células recuperadas por centrifugación (1600g durante 20 minutos, a 4° C). La concentración celular se determinó por tinción con solución de Turk en una cámara de recuento (HYCOR Biomedical Inc., California, USA).

A partir de 1999, la sangre fue extraída usando tubos Vacutainer® CPT™ con heparina de sodio como anticoagulante. Los tubos incluyen un gradiente de Ficoll-Hypaque y un gel separador, para el aislamiento de las PBMC en un solo paso, por centrifugación de los tubos a 1600g durante 20 minutos, a 20° C. Para cada paciente, la fase que contiene las PBMC de tres tubos de 10 ml es recuperada, y procesada a continuación del mismo modo que se describió anteriormente.

Tras el aislamiento de las PBMC por cualquiera de dichos métodos, el botón celular es resuspendido en 10 ml de RPMI 1640 suplementado con un 5% de suero fetal bovino, y mantenido a 4°C hasta su criopreservación. La viabilidad celular es periódicamente analizada en muestras escogidas al azar mediante tinción con azul tripán.

#### **2.4 Criopreservación de células.**

Para la conservación en nitrógeno líquido de células viables, estas son centrifugadas a 1600g durante 20 minutos, a 4° C, y el botón celular resultante resuspendido en suero fetal bovino 100%, a una concentración entre 10-100 millones de células/mililitro, dependiendo del total recuperado. Manteniéndolas en hielo, se añade lentamente un volumen de suero fetal bovino conteniendo un 20% de dimetil sulfóxido (Sigma, USA), y se reparten en alícuotas de 1 ml, en viales de congelación (Nunc), trasladándose al nitrógeno líquido seguidamente.

#### **2.5 Descongelación de células.**

La conservación de las células en nitrógeno líquido exige su mantenimiento en un medio con un alto porcentaje de DMSO, el cual protege de los daños asociados a la congelación. El DMSO sin embargo es tóxico, y debe ser lavado rápidamente tras la descongelación. Durante el proceso de la congelación, el DMSO penetra en las células y eleva su presión osmótica, por lo que las células pueden sufrir un choque osmótico al ser

diluidas con un medio de osmolaridad normal. En este protocolo de descongelación se usa una solución descongelante de osmolaridad normal, pero con un alto contenido en dextrano (Rubinstein y col., 1995). La solución de descongelación se compone de suero salino fisiológico suplementado con un 2.5 % (peso/volumen) de albúmina humana (Solución inyectable al 20%, Grifols® S.A., Barcelona) y 5% (peso/volumen) de Dextrano 500 (Sigma, St Louis, MO, USA). El protocolo de descongelación detallado es el siguiente:

- Descongelar rápidamente en un baño a 37° C un vial de PBMC.
- Mantener en hielo y diluir lentamente con 7 ml de solución de descongelación
- Centrifugar a 400g durante 10', a 4° C, en tubo de fondo cónico.
- Resuspender el botón celular ajustando a  $5 \times 10^6$  células/ml en tampón PBS-staining (PBS azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) 10 mM y 1% de FCS).

## 2.6 Citometría de flujo.

Para la determinación por citometría de flujo de los marcadores fenotípicos definidos en cada objetivo de este estudio, se diseñó un panel de combinaciones de anticuerpos. Cada tubo con la combinación de anticuerpos definida recibió 250.000 células, en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  de PBS-staining. Los tubos se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad y en hielo, y a continuación se incubó con 1 ml de solución lisante, durante 5 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, para la lisis de los hematíes residuales. Finalmente, las células fueron lavadas con 2 ml de PBS-staining, centrifugadas y resuspendidas en 300  $\mu\text{l}$  de PBS-staining para su análisis en un citómetro de flujo (Becton Dickinson FACSort). Para el análisis de cada tubo se adquirieron entre 5.000 y 60.000 eventos, dependiendo de la frecuencia de la subpoblación a estudiar. El análisis de los archivos generados se realizó mediante el software "WinMDI" versión 2.8.

## 2.7 Extracción de ADN para PCR.

Cuando procedía la extracción de ADN, se tomó una alícuota de células descongeladas de aproximadamente un millón de células. El resto de las células se usaron para el análisis por citometría de flujo. La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen USA), según las indicaciones del fabricante. Dicho método se basa en una lisis celular usando proteinasa K, y la posterior purificación del ADN mediante su adsorción en columnas de sílica. Una vez lavado, el ADN es eluido en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de tampón TE (x0.1).

### **3. PACIENTES Y MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL OBJETIVO 1.**

#### **3.1 Selección de Pacientes.**

El objetivo de este estudio fue analizar los efectos que el tratamiento HAART induce sobre la activación crónica del sistema inmune, en pacientes infectados por el VIH. Para ello, un grupo de pacientes se seleccionó de acuerdo a los siguientes criterios:

- No haber sido tratados previamente con fármacos antirretrovirales.
- Iniciar un tratamiento antirretroviral HAART con una duración de al menos 36 semanas.
- Ausencia de eventos oportunistas activos en el momento de inicio del tratamiento HAART.
- Cumplimiento de las dosis de antirretrovirales de al menos el 90% de las tomas (autorreferido por el paciente).
- Disponibilidad de muestras criopreservadas de suero y de PBMC al inicio y durante el seguimiento.

El periodo de inclusión de pacientes para este estudio abarcó desde Enero a Octubre de 1997. El número total de pacientes que iniciaron consecutivamente terapia antirretroviral en nuestra unidad durante ese periodo de tiempo fue de 69, de los cuales 26 cumplieron los criterios de inclusión. El tratamiento HAART seguido por los pacientes consistió en al menos dos análogos de nucleósidos y un inhibidor de la proteasa.

Las muestras de suero y PBMC se obtuvieron antes del inicio del tratamiento (semana 0) y posteriormente en las semanas 12, 24 y 36 de tratamiento. En los pacientes en los que hubo disponibilidad de muestras de suero en las semanas -4 y/o +4 de HAART, estas fueron también incluidos.

Los marcadores analizados en los pacientes fueron la concentración en suero de TNF y de la forma soluble de su receptor tipo II (sTNF-RII), así como la concentración de  $\beta_2$ -microglobulina, en todas las semanas de tratamiento con disponibilidad de muestras criopreservadas. Además, el porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup> que expresaban niveles elevados del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-DR fue analizado al inicio del tratamiento (en la semana 0, o en su defecto en la semana -4), y en las semanas 12 y 24 de tratamiento. La carga viral VIH-1 se determinó en los mismos puntos que los marcadores solubles.

### 3.2 Marcadores solubles de activación inmune.

Los sueros fueron mantenidos a  $-20^{\circ}$  C hasta la determinación de los marcadores analizados. Los niveles de TNF y del sTNF-RII se midieron mediante una técnica de inmunoensayo con amplificación enzimática, disponible comercialmente (*Biosource Europe*, Bélgica), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de  $\beta_2$ -microglobulina se midieron mediante una técnica de inmunoensayo de partículas enzimáticas (*AxSYM System*, Laboratorios Abbott, USA). Esta técnica se realizó por el Servicio de Bioquímica de nuestro hospital mediante técnicas rutinarias.

### 3.3 Marcadores celulares de activación inmune.

Para la determinación del porcentaje de linfocitos CD3 que expresaban niveles altos de HLA-DR, muestras de PBMC criopreservadas y descongeladas se marcaron con un panel de anticuerpos para citometría de flujo. El panel se diseñó para la determinación completa de los fenotipos celulares analizados en los objetivos 1 y 2 de este estudio. Los tubos de dicho panel relevantes para este objetivo son los siguientes:

Tubo 1: Control de Isotipos

Tubo 2: HLA-DR, CD3

El resto de tubos del panel se detallarán en los métodos del Objetivo 2. Para la determinación de la expresión de HLA-DR, las células fueron seleccionadas por criterios de tamaño (canal *Forward Scatter*) y complejidad (canal *Side Scatter*) típicos de linfocitos, y de expresión del marcador CD3. Sobre la población así seleccionada se calculó el porcentaje de células con niveles altos de HLA-DR.

## **4. PACIENTES Y MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL OBJETIVO 2.**

### **4.1 Selección de Pacientes.**

El objetivo de este estudio fue analizar la dinámica de repoblación de las subpoblaciones linfocitarias virgen y memoria tras el inicio del tratamiento antirretroviral, y el efecto de la edad sobre dicha repoblación, en pacientes infectados por el VIH. Para ello, se seleccionaron un grupo de niños y otro de adultos que iniciaban tratamiento antirretroviral. El grupo de pacientes adultos seleccionados para este objetivo fue el mismo que para el Objetivo 1. Por razones prácticas, la determinación de los fenotipos celulares de los dos objetivos se realizó de modo simultáneo. Las muestras seleccionadas fueron las semanas 0, 12 y 24 de tratamiento. En caso de no disponer de muestras en la semana cero, se usó la semana -4. Los tres puntos de análisis fueron denominadas como T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>

Los criterios para la inclusión en este estudio de los niños fueron los siguientes:

- No haber sido tratados previamente con fármacos antirretrovirales, o bien cambiar a un tratamiento más potente que el anterior.
- Mantener un tratamiento combinado de antirretrovirales con una duración de al menos 24 semanas.
- Ausencia de eventos oportunistas activos en el momento de inicio del tratamiento antirretroviral.
- Cumplimiento bueno de las dosis de antirretrovirales, referido por los padres/tutores del niño.
- Disponibilidad de una muestra de PBMC anterior al inicio del tratamiento y al menos otra a las 12 ó 24 semanas de tratamiento.

El periodo de inclusión para el grupo de niños de este estudio abarcó desde Enero a Octubre de 1997. Del total de 21 niños que iniciaron terapia antirretroviral durante el periodo fijado, once fueron excluidos por causa de mala adherencia al tratamiento, o por ausencia de suficientes muestras para el análisis. Debido a la dificultad de administrar tratamientos complejos a los pacientes pediátricos infectados por VIH, tanto los antirretrovirales incluidos como las fechas de toma de muestras fueron más variables que en el caso de los adultos. Así, en este estudio se incluyeron niños bajo tratamiento HAART, y también niños cuyo tratamiento consistía en un tratamiento combinado de dos análogos de nucleósidos.

Las muestras de PBMC se obtuvieron antes del inicio del tratamiento (en el mismo día de inicio o en la primera muestra anterior disponible, punto T<sub>0</sub>), y en los puntos disponibles más cercanos a las semanas 12 y 24 de tratamiento (T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> respectivamente).

A cada paciente del grupo de los adultos y del grupo de los niños se le realizó el recuento de subpoblaciones linfocitarias T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, carga viral VIH-1 plasmática, y porcentaje de linfocitos de fenotipo virgen y memoria, en los puntos definidos como T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>.

#### **4.2 Marcadores celulares de fenotipo virgen y memoria.**

Para la determinación de los porcentajes de las subpoblaciones virgen y memoria en los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, se realizó un análisis previo de los marcadores más adecuados. Para ello, doce muestras de PBMC de pacientes infectados por el VIH bajo tratamiento antirretroviral HAART y con un porcentaje de linfocitos T CD4 mayor del 20% (con el fin de facilitar el análisis de esta subpoblación) fueron descongeladas e inmediatamente marcadas con el siguiente panel de anticuerpos:

1. Control de Isotipos
2. CD45RA, CD62L, CD4
3. CD45RA, CD11a, CD4
4. CD45RA, CD45RO, CD4
5. CD45RA, CD11a, CD8

Adicionalmente, y para comprobar el efecto de la descongelación sobre el marcador CD62L en una población celular que lo expresa homogéneamente, se utilizó la línea celular T Jurkat.

Para el análisis de citometría se adquirieron 60.000 eventos, que fueron seleccionados por criterios de tamaño (canal *Forward Scatter*) y complejidad (canal *Side Scatter*), y por expresión del marcador de linaje T apropiado (CD4 o CD8, en el canal FL3).



Una vez establecidos los marcadores óptimos del fenotipo virgen y memoria en PBMC criopreservadas de pacientes infectados por el VIH, se diseñó un panel para la determinación simultánea de los fenotipos celulares analizados en los objetivos 1 y 2 de este estudio. Los tubos de dicho panel relevantes para este estudio fueron los siguientes:

1. Control de Isotipos
2. CD45RA, CD45RO, CD4
3. CD45RA, CD11a, CD8
4. CD4, CD8, CD3

El recuento absoluto de células virgen o memoria se obtuvo multiplicando el porcentaje correspondiente por el número de linfocitos CD4 o CD8, que habían sido determinados en una muestra de sangre el mismo día de la extracción. La combinación de anticuerpos del tubo número 4 se utilizó para determinar la relación CD8/CD4 en la muestra de PBMC. Dicho cociente se comparó con el cociente CD8/CD4 obtenido de la sangre total, no encontrándose diferencias significativas entre ambos.

## **5. PACIENTES Y MATERIAL Y MÉTODOS ESPECÍFICOS DEL OBJETIVO 3.**

### **5.1 Selección de Pacientes.**

El objetivo de este estudio fue analizar si tras el inicio del tratamiento HAART, puede producirse la diferenciación intratímica de linfocitos T, en pacientes adultos infectados por el VIH. Para ello, un grupo de pacientes se seleccionó de acuerdo a los siguientes criterios:

- No haber sido tratados previamente con fármacos antirretrovirales.
- Iniciar un tratamiento antirretroviral HAART con una duración de al menos 48 semanas.
- Cumplimiento de las dosis de antirretrovirales de al menos el 90% de las tomas (autorreferido por el paciente).
- Disponibilidad de suficientes muestras criopreservadas de PBMC.

El periodo de inclusión de pacientes para este estudio abarcó desde Agosto de 1998 a Diciembre de 1999. El número total de pacientes que iniciaron consecutivamente terapia antirretroviral en nuestra unidad durante ese periodo fue de 46, de los cuales 16 cumplieron los criterios de inclusión. El tratamiento HAART seguido por los pacientes consistió en al menos dos análogos de nucleósidos y, o bien un inhibidor de la proteasa, o bien un inhibidor de la retrotranscriptasa no análogo de nucleósido.

Las muestras de PBMC se obtuvieron antes del inicio del tratamiento (semana 0) y posteriormente en las semanas 12, 24, 36 y 48 de tratamiento.

A cada paciente se le realizó el recuento de subpoblaciones linfocitarias T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, carga viral VIH-1 plasmática, y porcentaje de linfocitos de fenotipo virgen y memoria, en dichas semanas. Además, se determinaron los volúmenes tímicos basales y en las semanas 12, 24 y 48 del tratamiento.

### **5.2 Marcadores celulares de fenotipo virgen y memoria.**

La determinación del porcentaje y número de linfocitos T virgen y memoria se realizó del mismo modo que en el caso del Objetivo 2. Adicionalmente, se determinó el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> en la población de PBMC, para su uso en el cálculo del número absoluto de TRECs/ $\mu$ l. Una alícuota de células se reservó para la cuantificación de TRECs en sangre por PCR.

### 5.3 Aislamiento de timocitos.

Para la construcción de la recta estándar de TRECs usada en la PCR cuantitativa se utilizó ADN extraído de timocitos, debido a la abundancia de TRECs en estas células. Para ello, se obtuvieron muestras de timo postnatal durante la cirugía correctora de pacientes con cardiopatías, como parte del material habitualmente descartado. Ninguno de los donantes estaba infectado por el VIH. Los timocitos fueron aislados por disgregación mecánica del timo a través de una malla metálica, manteniendo las células liberadas en RPMI-1640. Las células viables fueron recuperadas sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque, tal como se describió para la separación manual de PBMC. El uso de los timos obtenidos para este estudio fue aprobado por el Comité Ético de nuestro hospital. Para la cuantificación de los niveles de TRECs en las muestras de PBMC de los pacientes infectados por VIH se utilizó un único timo para todo el estudio.

### 5.4 PCR Cuantitativa.

#### 5.4.1 Fundamento.

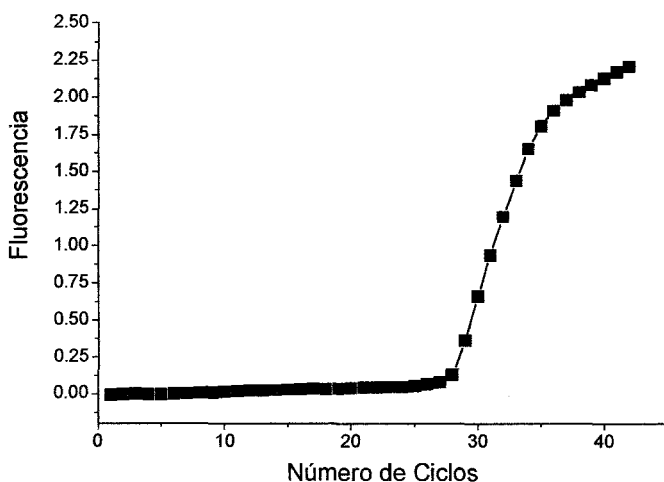
La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* desarrollada a mediados de la década de los ochenta por el grupo de Erlich (Saiki y col., 1985, Mullis y col., 1986). Esta técnica se basa en la amplificación enzimática de una secuencia de ADN cuyos extremos se definen por dos oligonucleótidos, que actúan como cebadores para la enzima ADN polimerasa que cataliza el proceso. En la PCR, la replicación del ADN se lleva a cabo en tres fases, que son: 1) desnaturalización de las hebras del ADN molde; 2) hibridación de los cebadores con las hebras separadas; y 3) elongación del cebador mediante la polimerasa de ADN. La repetición cíclica de estas tres fases permite la amplificación exponencial del ADN molde, ya que los productos de amplificación de un ciclo sirven a su vez de ADN molde para el siguiente ciclo. Según este modelo, el número de copias de secuencias de ADN molde se duplica en cada ciclo, según la fórmula  $\{1\}$ , siendo  $N_0$  el número inicial de copias y  $N_c$  la cantidad de ADN amplificado transcurridos  $c$  ciclos. De la misma fórmula se deriva que la cantidad de ADN molde inicialmente presente puede ser calculada en función del ADN amplificado al final de la PCR y del número de ciclos transcurridos. De ese modo, es posible la aplicación de la PCR para la cuantificación del número de copias de secuencias específicas de ADN.

$$N_c = N_0 \times 2^c \quad \{1\}$$

En la práctica, sin embargo, la cantidad final de ADN producido es menor que la predicha por el número de ciclos realizados, pues a partir de cierto punto la reacción de PCR pierde eficacia, y la tasa exponencial de amplificación se atenúa hasta anularse, produciéndose un efecto plató en la cantidad de ADN molde producido. Esto puede ser debido al agotamiento de los reactivos, a la inhibición por producto o a la progresiva pérdida de actividad de la enzima. Para tener en cuenta estos factores en la PCR cuantitativa, se incluye en el tubo de reacción una segunda secuencia de ADN molde de concentración conocida muy similar a la secuencia de ADN molde problema, para su coamplificación. De este modo, con la adición de un estándar interno, es posible calcular la concentración inicial a pesar de la pérdida de eficacia en los ciclos finales.

Otra posibilidad es la monitorización en tiempo real de la PCR, dado que durante los primeros ciclos de PCR la cinética de amplificación se aproxima bastante a la teórica. En la PCR cuantitativa en tiempo real se analizan solo los primeros ciclos, donde no se dan los efectos inhibitorios antes comentados. La tecnología de PCR desarrollada en el termociclador LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals) permite detectar cuantitativamente los productos de amplificación en el mismo tubo de reacción mientras se

realiza la PCR, y sin interferir en la reacción. Para ello, en cada ciclo de la PCR, la cantidad de ADN amplificado se mide por fluorescencia, generándose una curva de ADN amplificado por ciclo transcurrido.



**Figura 1. Medición de la amplificación de ADN por PCR en tiempo real.** Una muestra de ADN de timo es amplificada por PCR con cebadores para la secuencia *signal joint* de TRECs, en presencia de una sonda fluorescente específica de la secuencia amplificada. Se representa la fluorescencia medida en cada ciclo, diferenciándose tres fases: latencia, crecimiento exponencial y plató.

Dicha curva se muestra en la Figura 1, y en ella típicamente se diferencian tres regiones. En los primeros ciclos, la fluorescencia específica del amplificado es muy pequeña, por lo que la

fluorescencia total medida corresponde al “ruido de fondo” y no cambia, a pesar de que la cantidad de ADN molde amplificado si que aumenta de modo exponencial. A partir de cierto ciclo, la fluorescencia debida al ADN molde es mayoritaria, aumentando la fluorescencia total exponencialmente. En la tercera fase, la reacción de PCR ha perdido eficiencia, y la fluorescencia alcanza un plató.

Existe una relación matemática simple entre el número de ciclo en el que cada muestra alcanza un valor arbitrario de fluorescencia y su concentración inicial. En la terminología inglesa a este ciclo se le denomina *crossing point* (cP), que traduciremos como “ciclo umbral”. Se puede demostrar que el ciclo umbral de cada muestra es inversamente proporcional al logaritmo de su concentración inicial. La fórmula {2} relaciona el ciclo umbral (cP) de una muestra con su concentración inicial. En esta fórmula,  $A$  es una constante que depende de las condiciones de la PCR, y  $B$  es una constante que en condiciones de 100% de eficiencia de la PCR depende la base de los logaritmos que usemos (siendo  $B=1$  para logaritmos de base 2, y  $B=3.32$  para logaritmos en base 10). De la fórmula {2} puede derivarse la fórmula {3}, que relaciona los ciclos umbral de dos muestras X e Y diferentes.

$$cP = A - B \times \log [ADN] \quad \{2\}$$

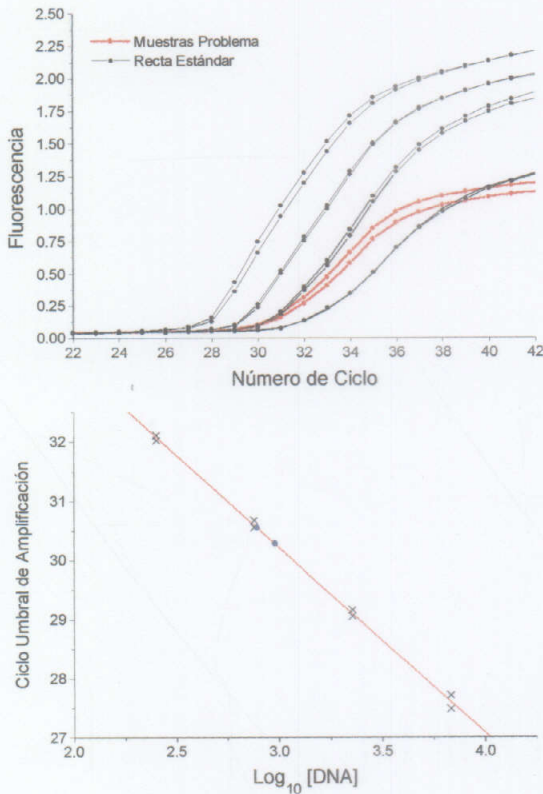
$$cP_X - 38 - cP_Y = - \log_2 \frac{[ADN_X]}{[ADN_Y]} \quad \{3\}$$

Si suponemos que la concentración inicial de ADN molde en X es mayor que en Y, entonces el número de ciclos necesarios para alcanzar el ciclo umbral es menor para la muestra X que para la Y. Según la Fórmula {3}, una concentración doble en X que en Y implica un adelanto de un ciclo para alcanzar dicho ciclo umbral. Igualmente, dos muestras con una diferencia de 3 ciclos en su ciclo umbral tienen una diferencia de concentración inicial de ocho veces ( $2^3=8$ ). Esta relación matemática simple entre el ciclo umbral de diferentes muestras permite la cuantificación de muestras problema si se incluye una recta estándar externa de concentraciones conocidas.

Para el cálculo del ciclo umbral de cada muestra problema o de referencia, existe un *software* de ajuste disponible para el LightCycler, que calcula el ciclo umbral de cada muestra (el cual puede ser un número fraccionario). En este estudio se ha utilizado el método de *Second Derivative Maximum*, que calcula el ciclo en el que la tasa de incremento de la fluorescencia es máxima. Este punto de máximo incremento de la fluorescencia coincide con el primer punto en el que la fluorescencia medida excede a la de

fondo, y se obtiene calculando el máximo de la segunda derivada de la función de ajuste a los puntos.

En la Figura 2 se muestra la aplicación de estos principios a una cuantificación



**Figura 2. Cálculo de la concentración de ADN molde mediante PCR cuantitativa.** En la gráfica superior se muestra la fluorescencia medida en cada ciclo de la PCR para los cuatro puntos de dilución seriada de la recta patrón (en negro), y una muestra problema (rojo). En la gráfica inferior se muestra el ajuste lineal entre el ciclo umbral de amplificación de la recta estándar y el logaritmo de su concentración inicial. Todos los puntos se hicieron por duplicado.

#### 5.4.2 Detección fluorimétrica de los productos de la PCR.

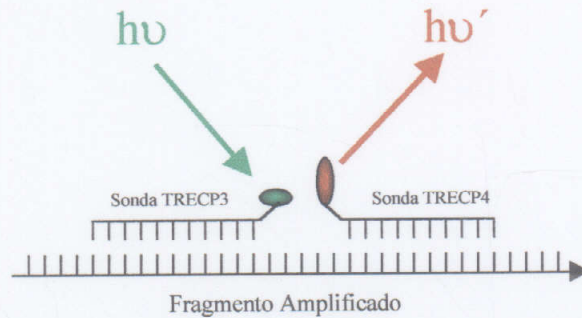
Para la monitorización en tiempo real de la progresión de la reacción de PCR, la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo debe ser determinada mediante métodos fluorimétricos, pudiendo estos ser específicos o no de la secuencia del ADN. Los métodos no específicos de secuencia se basan en el aumento de fluorescencia que experimentan algunos compuestos cuando se unen al ADN. El fluorocromo *SYBR Green I*, al igual que

representativa de las del resto de las realizadas en este trabajo. En la gráfica superior se muestra la fluorescencia medida para los cuatro puntos de una recta estándar con concentraciones conocidas de ADN molde, y una muestra problema. Puede apreciarse como las muestras de la recta patrón más diluidas necesitaron más ciclos para que la fluorescencia específica apareciera. La relación lineal entre el ciclo umbral y el logaritmo de la concentración inicial es mostrada para la recta estándar, en la gráfica inferior. A partir de la fórmula {2}, que relaciona la concentración inicial y ciclo umbral de los puntos de la recta estándar, se puede calcular la concentración inicial de ADN molde en las muestras problema.



lo hace el bromuro de etidio, tiene afinidad por el ADN de doble cadena, incrementando drásticamente su fluorescencia tras intercalarse en el surco mayor de la doble hebra. Por ello, la señal fluorescente medida es proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente. Por ello, en la definición del protocolo de PCR seguido por el termociclador LightCycler™, se incluye la medición puntual de la fluorescencia al final del periodo de extensión de cada ciclo.

Alternativamente, la secuencia de ADN amplificada se puede detectar específicamente por su secuencia, utilizando sondas de hibridación marcadas con fluorocromos. Este método es mucho más específico, pues a la especificidad de amplificación debida a la pareja de cebadores se une el reconocimiento adicional de una secuencia interna al amplificado para que se genere fluorescencia. En la Figura 3 se esquematiza el mecanismo por el



**Figura 3. Detección del ADN molde por hibridación con sonda específica.** Para la detección específica de los productos de amplificación de la PCR se utiliza un sistema de fluorescencia FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), en el que sólo se genera fluorescencia por el fluorocromo RED640 si es excitado por la fluorescencia emitida por el fluorocromo aceptor de la luz láser, lo que requiere que ambos estén muy próximos.

cual se produce fluorescencia al unirse las sondas a su secuencia diana. El sistema consiste en dos sondas marcadas con compuestos fluorescentes, uno de los cuales (donador) será excitado por el láser, para seguidamente inducir la fluorescencia en el otro (emisor). El compuesto fluorescente emisor no puede ser excitado directamente por el láser, por lo que se requiere la transferencia de energía desde otro compuesto (donador), que sí es excitable por el láser. Para que se produzca esta transferencia de energía radiante ambos fluorocromos deben estar muy próximos, lo que solo se logra cuando ambos compuestos son aproximados por la hibridación de las sondas que los transportan sobre secuencias consecutivas del ADN, presentes en el amplificado.

### 5.4.3 Condiciones de PCR.

La cuantificación de TRECs por PCR se realizó usando una modificación de una técnica descrita previamente (Douek y col., 1997), para ser adaptada a la cuantificación por *real time PCR*. En nuestra técnica la adición de un control interno de amplificación de concentración conocida es sustituida por el uso de una recta de calibración externa, realizada con concentraciones conocidas del ADN molde a amplificar. Se optimizaron dos PCR cuantitativas, para la medición de TRECs y de ADN genómico total, por amplificación del gen de la betaglobina humana. En ambas PCR, la recta estándar se construyó con al menos cuatro diluciones seriadas de ADN obtenido de los timocitos. Los puntos de la recta y de las muestras problema se midieron por duplicado en cada reacción de PCR.

#### Cuantificación de la región *signal-joint* de TRECs:

Entre 100 y 400 ng de ADN de cada muestra fueron amplificados en un volumen final de 20  $\mu$ l de tampón de reacción específico para la detección en LightCycler mediante sondas de hibridación (*LightCycler™ -DNA Master Hybridization Probes*, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), conteniendo 400 pmol/l de cada cebador (TRECQ1 y TRECQ2), 100 pmol/l de las sondas de hibridación (TRECPC3 y TRECPC4), y una concentración de Mg de 3.5 mM. Como control negativo de amplificación se uso ADN de una línea celular, que carece de TRECs (células Jurkat).

Los ciclos de PCR fueron los siguientes:

Desnaturalización (1 ciclo) 95° durante 120''

Amplificación (45 ciclos) 95° mantenidos 0''

63° mantenidos 40'' y fluorescencia en F2 y F1

72° mantenidos 40''



**Cuantificación del gen de la betaglobina:**

Entre 10 y 40 ng de ADN de cada muestra fueron amplificados en un volumen final de 20 µl de tampón de reacción específico para la detección en LightCycler mediante SYBR Green I (*LightCycler™* -, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), conteniendo 400 nmol/l de cada cebador (GH20 y PC04), usando de 3.5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ .

Los ciclos de PCR fueron los siguientes:

Desnaturalización (1 ciclo) 95° durante 60''

Amplificación (35 ciclos) 95° mantenidos 0''

60° mantenidos 15''

72° mantenidos 15'' y fluorescencia en F1

**5.4.4 Oligonucleótidos y sondas.**

Para la amplificación de las secuencias *signal-joint* presentes en los TRECs se emplearon los cebadores TRECQ1 y TRECQ2, basados en otros previamente descritos (*Verschuren y col., 1997*), pero siendo TRECQ1 modificado, eliminándose la secuencia 5'-AAA-3' de su extremo 3'. Para la amplificación del gen de la betaglobina se emplearon los cebadores PC04 y GH20 (*Saiki y col., 1985, Bauer y col., 1991*). La detección de los productos de amplificación se realizó por la fluorescencia producida tras la hibridación de las sondas TRECQ3 y TRECQ4 en el caso del amplificado derivado del TREC (diseñadas para este estudio por *TIB MOLBIOL*, Berlín, Alemania). En el caso del amplificado derivado del gen de la betaglobina, se detectó por su unión a SYBR *Green I*.

**Secuencia de los cebadores:**

TRECQ1 5'-AAA-GAG-GGC-AGC-CCT-CTC-CAA-GGC-3'

TRECQ2 5'-AGG-CTG-ATC-TTG-TCT-GAC-ATT-TGC-TCC-G-3'

PC04 5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'

GH20 5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3'

**Secuencia de las sondas de Hibridación y tipo de fluoróforo conjugado:**

TRECQ3 5'-AGG-GAT-GTG-GCA-TCA-CCT-TTG-TTG-ACA -3' (Fluoresceína en 3')

TRECQ4 5'-GGC-ACC-CCT-CTG-TTC-CCC-ACA-GGA -3' (LC-Red 640 en 5')

#### 5.4.5 Cuantificación de TRECs en PBMC de pacientes.

Para la cuantificación del número de TRECs en los PBMC de los pacientes, se diseñó una estrategia consistente en la cuantificación previa del número de TRECs en una muestra de timocitos, y la utilización posterior de estos timocitos como recta patrón para las muestras problema de los pacientes. El diseño de esta estrategia tiene la ventaja de que al existir en la recta patrón de timocitos ADN tanto genómico como de TRECs (en su forma natural, no clonada), se puede establecer un coeficiente *TRECs/genomas* que puede ser medido en idénticas condiciones tanto en la recta patrón como en las muestras problema. Sin embargo, la cuantificación con una recta patrón formada por plásmido purificados, nos da una medida de TRECs referida a nanogramos de ADN total. La medición de *TRECs/genomas*, a diferencia de la medición de *TRECs/nanogramo de ADN*, tiene en cuenta posibles efectos inhibitorios de la PCR en las muestras problemas.

La cantidad de ADN genómico total presente en las muestras problema se derivó cuantificando el número de copias del gen de la betaglobina. A la muestra de timo se le dio un cociente *TRECs/Betaglobina* arbitrario de 1, y todos los cocientes *TRECs/Betaglobina* de las muestras de los pacientes se expresaron como relativos al del timo de referencia. Dichos cocientes arbitrarios oscilaron entre  $\sim 1.6 \times 10^{-3}$  y  $\sim 0.17$  respecto a los valores de dicho timo de referencia. Dado que la concentración real de TRECs medida en el timo de referencia es de 62500 TRECs/ $10^6$  timocitos, los valores absolutos de TRECs medidos en los pacientes oscilaron entre 100-11.000 TRECs por millón de células.

Para la determinación del número absoluto de TRECs/ $10^6$  timocitos usado en ese cálculo, fue necesario clonar el fragmento de TREC que incluye la secuencia *signal-joint* amplificada por nuestra PCR. La clonación se realizó mediante PCR utilizando los cebadores TRECQ1 y TRECQ2 en las condiciones descritas previamente, a partir de ADN extraído de timocitos. Los productos de dicha PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1%, y la banda correspondiente al tamaño esperado de aproximadamente 400 pares de bases fue cortada del gel y purificada (QIAEX II *Agarose Gel Extraction Kit*, Qiagen, USA). La clonación de dicha banda purificada se realizó mediante el sistema *pGEM T-Easy Vector* (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido purificado a partir de una colonia positiva por PCR para la secuencia de *signal-joint* fue secuenciado para confirmar la identidad de la secuencia clonada (Biomedal, España). A continuación, se usó este plásmido para la cuantificación de TRECs en el timo de referencia, como se detalla en resultados.

Para la aplicación de esta estrategia, todas las semanas analizadas en cada paciente se cuantificaron simultáneamente y por duplicado en la misma reacción de PCR, incluyendo una recta estándar construida con ADN de timocitos de referencia. Se realizaron dos PCR, una específica del gen de la betaglobina y otra de los TRECs, en las condiciones descritas previamente. La conversión de la medición inicial de TRECs/ $10^6$  PBMC a la de TRECs/microlitro de sangre periférica se realizó del siguiente modo: dado que entre las PBMC las únicas células que pueden llevar TRECs son los linfocitos T  $CD3^+$  (*Zhang y col., 1999*), el porcentaje de células  $CD3^+$  presente en las PBMC fue obtenido por citometría de flujo, y la fracción de TRECs en PBMC obtenida se corrigió entonces usando dicho porcentaje. De este modo se obtiene el número de TRECs presentes por cada millón de linfocitos  $CD3^+$ . Dicha fracción se multiplicó entonces por el recuento absoluto de linfocitos  $CD3^+$  de cada paciente.

## 6. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN TÍMICO.

Los estudios de tomografía computerizada se obtuvieron con un aparato Sytec 3000 de General Electric's. La planificación de la técnica se basó en un trabajo previamente descrito (*Choyke y col, 1987*), realizando algunas modificaciones para la mejora del cálculo volumétrico. En este sentido, se realizaron cortes axiales de 5 mm de grosor y 5 mm de desplazamiento (en lugar de los clásicos 10x10 mm), con el paciente en decúbito supino y los brazos por encima de la cabeza para evitar los artefactos por endurecimiento del haz, causados por las articulaciones y estructuras óseas del hombro. Con el auxilio del topograma realizado previamente a la adquisición de los cortes, éstos se programaron en la fosa tímica, más específicamente desde las articulaciones supraclaviculares, hasta 2 cm por debajo del nivel de la carina de bifurcación bronquial, ajustando un campo de visión adaptado al morfotipo de cada paciente. El estudio fue controlado por un radiólogo, previo a la finalización del mismo, para evitar la realización de exploraciones incompletas y comprobar la idoneidad de las imágenes obtenidas de cara al postprocesado. Éste radiólogo decidía igualmente, a que paciente se la debía introducir contraste iodado intravenoso (incorporación a la técnica descrita por *Choyke y col., 1987*), tras la autorización pertinente por parte del paciente, en los casos en que este agente, la iopramina (Ultravist 300 mg, I/ml), era necesario, es decir cuando no se conseguía distinguir los límites de la glándula tímica de las estructuras cardiovasculares, en el estudio sin contraste. Se introducen unos 100 cc a 2 ml/s, con un retraso de 20 segundos, seleccionando preferentemente una vena de la flexura del codo derecho, para minimizar en lo posible los artefactos por la alta densidad del contraste en el tronco braquiocefálico izquierdo. El estudio quedaba grabado en el disco duro del ordenador y posteriormente en el disco óptico (DEC - 702 / Pioneer).

En un segundo momento se procedía al postprocesado de la imagen. Las medidas fueron realizadas por el mismo operador, que actuó desconociendo cualquier dato clínico del paciente o semana de tratamiento, en todos los pacientes. Para la realización de la medición, se practica una primera visualización de todo el estudio (sin realizar medición alguna), para determinar los cortes en los cuales encontramos la presencia de glándula tímica. Una vez hemos apreciado cual es el primer y el último corte, iniciamos el programa de medición volumétrica incluido en el software disponible en el equipo (CT Sytec software, versión 2.02), suministrándole estos datos e introduciendo el intervalo de densidad radiológica adecuado de la estructura anatómica que deseamos medir (-900 a 900 Unidades Hounsfield). Posteriormente ampliamos el área de interés en la pantalla del

monitor y procedemos a delinear con el cursor lineal, los márgenes de la glándula en cada corte, aplicando un nivel de ventana de 50 U.H. y una amplitud de ventana de 450 U.H. en todos los estudios. Finalmente el ordenador realiza el cálculo del volumen en cada corte, hallando el área delimitada por el cursor y multiplicándola por el grosor de corte practicado, para después proceder a la suma de todos ellos, suministrándonos la cifra del volumen tímico total, en centímetros cúbicos. Hay que señalar que los volúmenes del primer y último corte son reducidos a la mitad para tener en cuenta el error debido al volumen parcial del timo en estos cortes. Esta técnica, realizada con espesores de corte de 10 x 10 mm, ha sido validada previamente (*Briedman y col., Friedman y col.*), calculándosele un error de unos 3 – 5 %, siendo extremadamente reproducible.

También se le otorgó a cada estudio un índice tímico, basado en la impresión subjetiva de la densidad que presenta esta glándula, que puede variar de un paciente a otro, siguiendo los trabajos de McCune. Este valor oscila entre 0 y 5, dependiendo de la infiltración de grasa que presente el parénquima tímico: 1 – timo con gran infiltración grasa, con mínima cantidad de tejido reconocible con densidad de partes blandas; 2 – timo con importante infiltración grasa, con ligera cantidad de tejido con densidad de partes blandas, algo más evidente; 3 – timo con moderada cantidad de grasa, infiltrada entre la densidad de partes blandas; 4 – importante cantidad de tejido con densidad de partes blandas, más extensa, y ligera infiltración grasa; 5 – tejido con densidad de partes blandas con apariencia de masa, hiperplasia o timoma, sin infiltración grasa (*McCune y col, 1998*).

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los estadísticos descriptivos usados en este estudio fueron la media y el error típico de la media para las variables continuas, y la frecuencia y el porcentaje para las variables cualitativas. Para la estadística comparativa se usaron las siguientes pruebas no paramétricas: para la comparación entre los distintos valores de una variable, y según el caso, la prueba de los signos de Wilcoxon para los valores de un mismo paciente en dos momentos diferentes, o la prueba U de Mann-Whitney para comparar los valores entre dos grupos de pacientes. Las relaciones entre variables distintas se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Las relaciones se aceptaron como significativas si su probabilidad era menor de 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del paquete de *software* estadístico “*SPPS, Statistical Package for the Social Sciences*” versión 8.0, (Chicago, USA).

# **Resultados**

## **1. Efecto del HAART sobre la activación del sistema inmune**

### 1.1 Características basales de los pacientes analizados

Las características demográficas e inmunológicas de los pacientes antes del inicio del tratamiento se muestran en la Tabla 1. Todos ellos presentaron niveles de carga viral VIH-1 detectables, y un recuento medio de linfocitos T<sub>H</sub> de 341 células/ $\mu$ l. Doce de los 26 pacientes tenían menos de 200 T<sub>H</sub>/ $\mu$ l (uno de los criterios definatorios de SIDA), y cinco de ellos habían sido clasificados en la categoría C del CDC (*Centers for Disease Control*, 1993). Sin embargo, y al ser un criterio de selección, ninguno presentaba en el momento de su inclusión situaciones clínicas incluidas en dicha categoría C que pudieran contribuir a la activación del sistema inmune, objeto de este estudio. Los cinco ya clasificados en la categoría C habían resuelto sus eventos en el momento de ser incluidos. Durante el periodo de seguimiento, ninguno de los 26 pacientes desarrolló nuevas enfermedades oportunistas.

**Tabla 1. Características basales de los pacientes.**

Número de pacientes	26
Edad (años)	
Mediana [intervalo]	34 [29-65]
Nº de hombres/mujeres	17 / 9
Grupo de Riesgo (Nº)	
Homosexual	4
Heterosexual	11
ADVP	10
Desconocido	1
Carga Viral ( $\log_{10}$ [ARN VIH-1]/ml)	
Media $\pm$ e.t.m.	4.2 $\pm$ 0.17
Intervalo	2.6-5.3
Linfocitos CD4 (células/ $\mu$ l)	
Media $\pm$ e.t.m.	341 $\pm$ 60
Intervalo	1-979
Clasificación de la infección por VIH (Nº)	
SIDA	12
Estadio C del CDC <sup>a</sup>	5

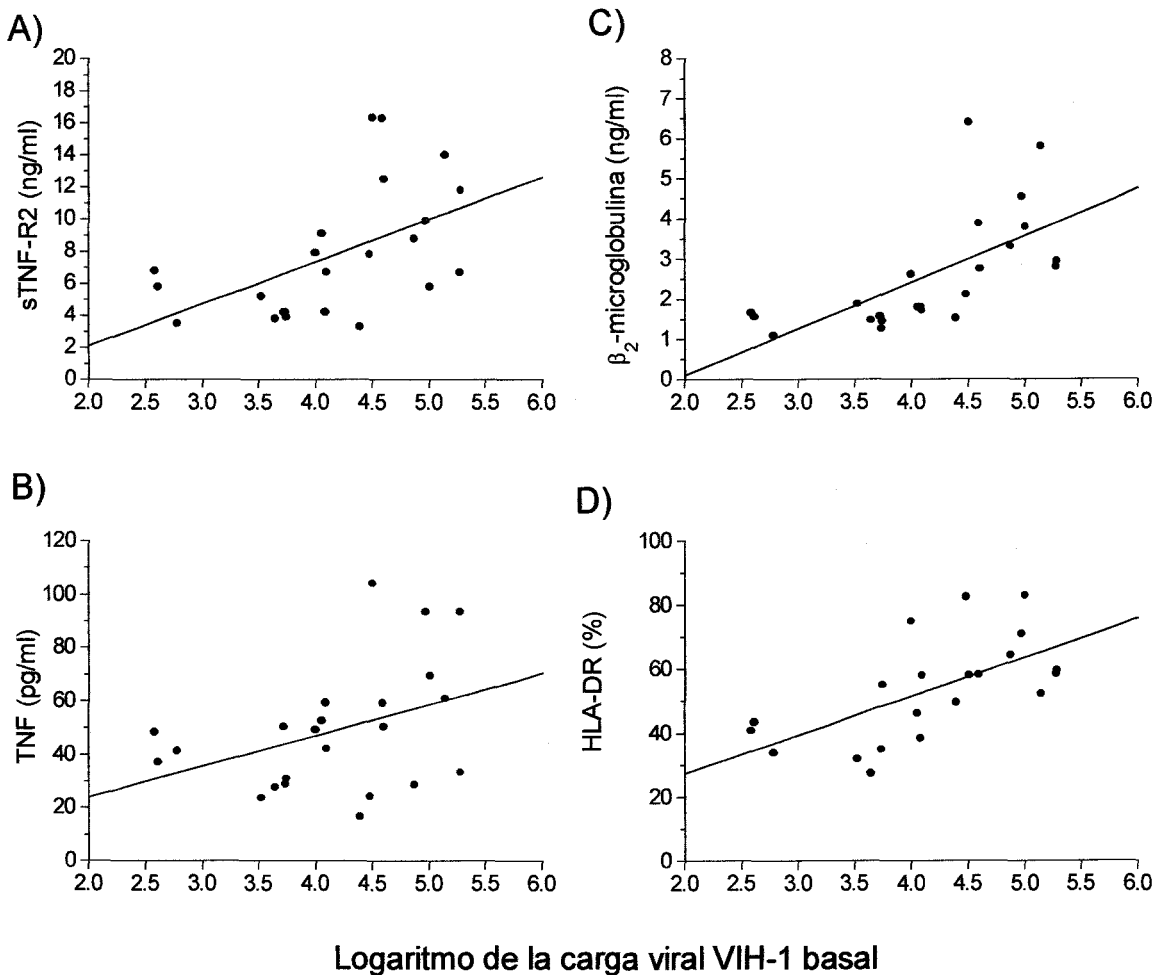
<sup>a</sup> *Centers for Disease Control* 1993.



## 1.2 Activación basal del sistema inmune

Ninguno de los pacientes incluidos en este estudio habían tenido experiencia con antirretrovirales antes del inicio del tratamiento HAART. Se pudo analizar por lo tanto los efectos de la replicación del VIH no inhibida por los fármacos antirretrovirales sobre varios parámetros de activación inmune. La Figura 4 muestra que los niveles de carga viral en suero correlacionaron significativamente con el grado de activación inmune, medido por la concentración en suero de sTNF-RII (gráfica A), TNF (gráfica B),  $\beta$ 2-microglobulina (gráfica C), y la expresión en membrana de HLA-DR en linfocitos CD3<sup>+</sup> (gráfica D).

La activación basal del sistema inmune estuvo también relacionada con el recuento de T<sub>H</sub>. Así, la activación fue mayor entre los pacientes más inmunodeprimidos, encontrándose una correlación inversa estadísticamente significativa entre el recuento de T<sub>H</sub> y los marcadores de activación analizados. De acuerdo con esta correlación inversa, se encontró que el grupo de pacientes con un recuento de T<sub>H</sub> inferior a 200 células/ $\mu$ L presentaba un nivel de activación del sistema inmune significativamente mayor que el grupo de pacientes con un recuento de T<sub>H</sub> mayor (Prueba U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4. Correlación basal entre los niveles de activación inmune y la carga viral VIH-1.** Se muestra la correlación entre los niveles basales de carga viral VIH-1 y la concentración en suero de A) sTNF-RII, B) TNF, y C)  $\beta_2$ -microglobulina; y la expresión de D) HLA-DR en linfocitos T CD3<sup>+</sup>.

### 1.3 Respuesta virológica y de linfocitos T CD4 al tratamiento

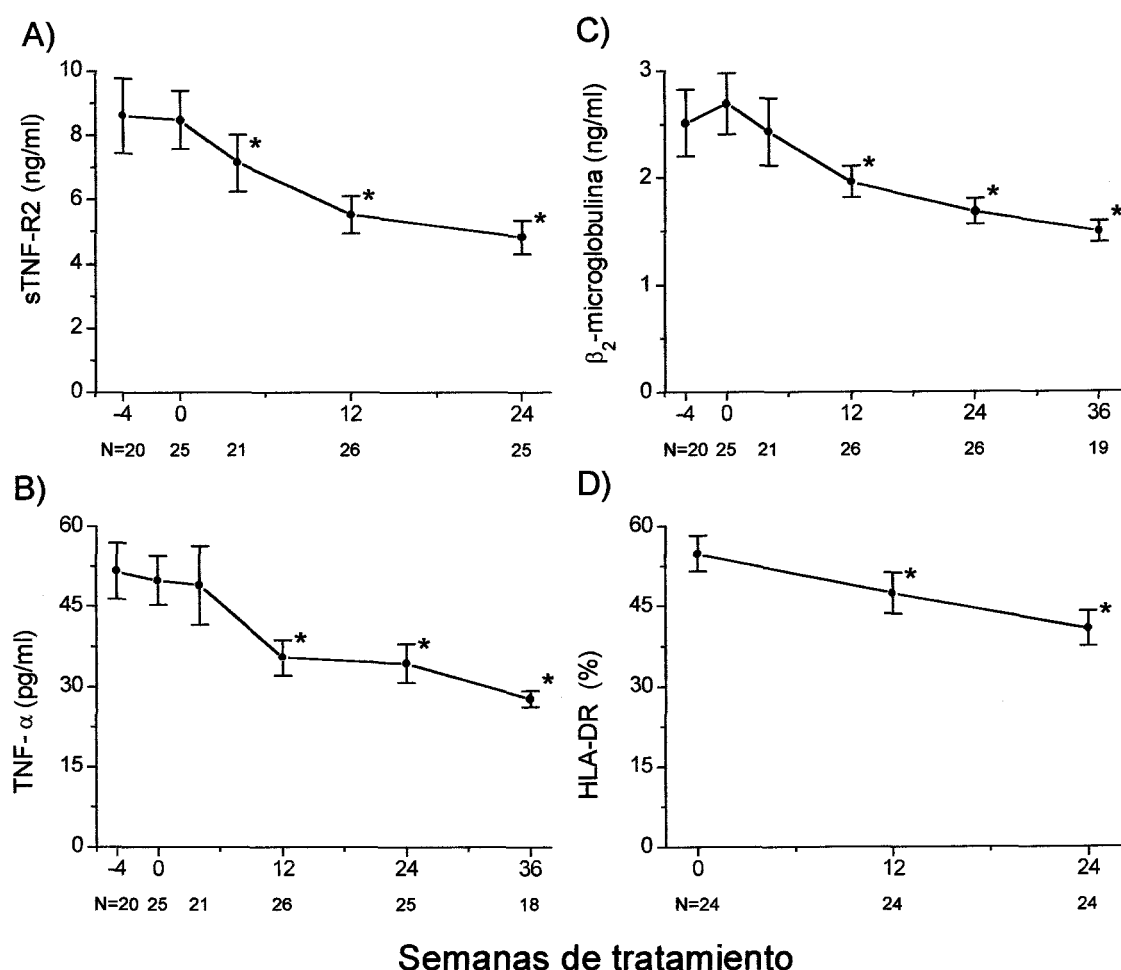
Tras el inicio del HAART, la carga viral VIH-1 disminuyó significativamente en la semana 12 a una media de  $2.01 \pm 0.16 \log_{10}$  copias/ml ( $p < 0.001$ , prueba de Wilcoxon), manteniéndose el control de la carga viral desde entonces. En las semanas 12 y 24, el 65% de los pacientes tuvieron valores indetectables de carga viral (inferiores a 200 copias/ml). Al final del seguimiento (semana 36), la carga viral media era todavía significativamente menor que antes del tratamiento ( $2.3 \pm 0.27$  copias/ml,  $p < 0.001$ , prueba de Wilcoxon), siendo indetectable en un 74% de los pacientes.

Paralelamente a la reducción de la carga viral, se produjo un aumento del número de linfocitos T<sub>H</sub> circulantes. Dichos aumentos fueron significativos respecto a los valores basales desde la semana 4 de tratamiento ( $p = 0.02$ , prueba de Wilcoxon) hasta la semana 36

( $p < 0.001$ ). El incremento neto medio de linfocitos  $T_H$ , respecto a los valores basales, fue de  $+179 \pm 52$  células por microlitro a las 36 semanas de tratamiento.

#### 1.4 Cambios en la activación del sistema inmune tras el inicio del HAART

El cambio en los niveles de activación del sistema inmune se muestra en la Figura 5. En ella se representan los valores medios de la concentración en suero de sTNF-RII (gráfica A), TNF (gráfica B),  $\beta 2$ -microglobulina (gráfica C), y la expresión en membrana de HLA-DR en linfocitos  $CD3^+$  (gráfica D). Tras el inicio del tratamiento, todos estos valores se redujeron de manera significativa. Los niveles de sTNF-RII fueron ya significativamente menores que los basales desde la semana cuatro de tratamiento ( $p = 0.048$ , prueba de Wilcoxon), y continuaron disminuyendo significativamente hasta la semana 24, último punto analizado ( $p < 0.001$ ). Los valores de  $\beta 2$ -microglobulina y HLA-DR fueron significativamente menores que los basales en la semana 12 de tratamiento ( $p < 0.001$  para ambos, prueba de Wilcoxon), y disminuyeron de nuevo significativamente en la semana 24 ( $p = 0.004$  y  $p < 0.001$ , respectivamente). Los valores de TNF fueron significativamente menores que los basales en la semana 12 de tratamiento ( $p = 0.010$ , prueba de Wilcoxon).

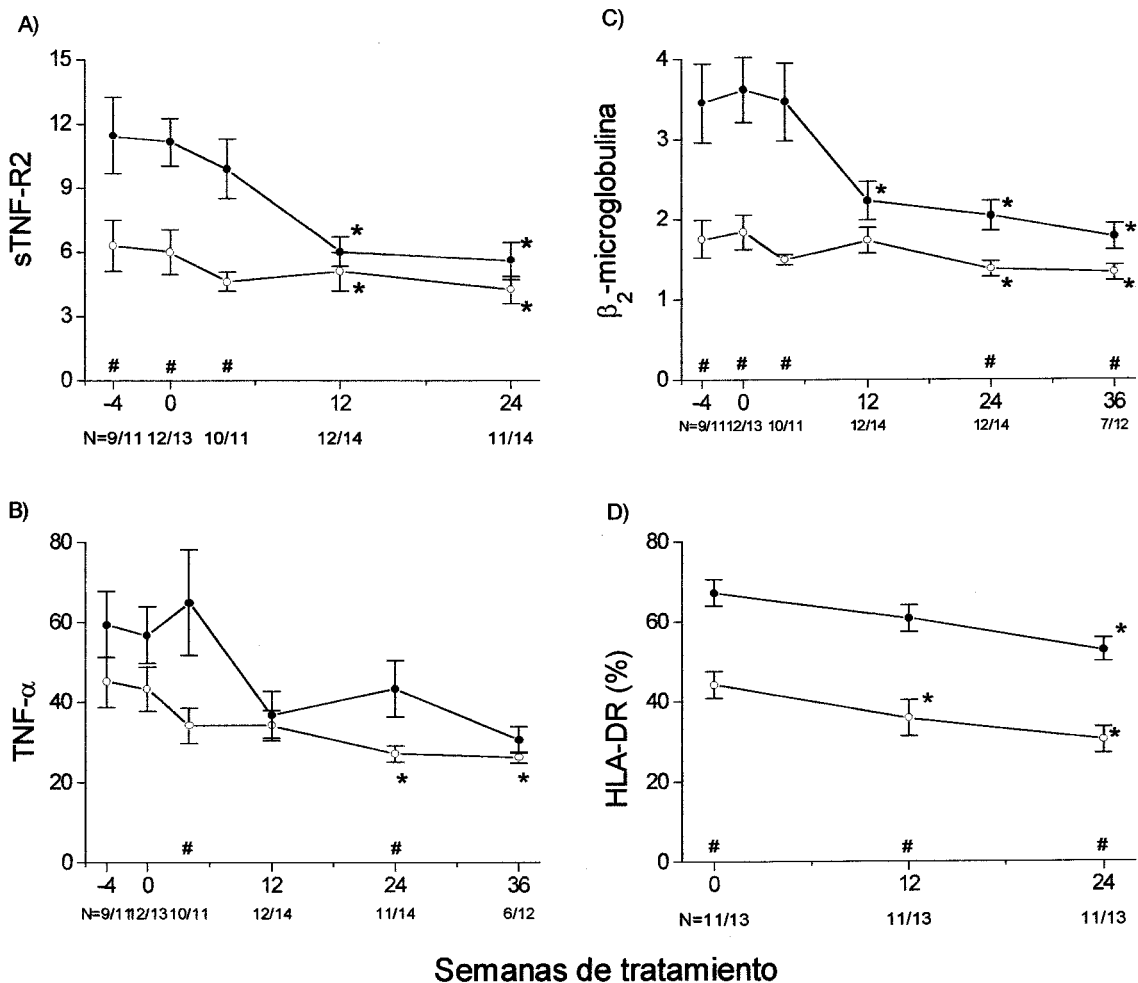


**Figura 5. Cambios en los niveles de activación inmune en pacientes que inician HAART.** Veintiséis pacientes sin experiencia previa con antirretrovirales y sin síntomas de infecciones oportunistas activas iniciaron tratamiento antirretroviral HAART. En las gráficas se muestra la concentración en suero de A) sTNF-R2, B) TNF, y C)  $\beta_2$ -microglobulina; y la expresión de D) HLA-DR en linfocitos T CD3<sup>+</sup>. Los valores representan la media  $\pm$  error típico de la media. El número de pacientes analizados en cada punto se muestra en la línea inferior. (\*) indica diferencias significativas con la semana cero ( $P < 0.05$ , Prueba de Wilcoxon).

### 1.5 Influencia de la inmunosupresión basal sobre los marcadores de activación

Con el fin de investigar si un mayor grado de inmunodeficiencia al inicio del tratamiento podría afectar a la reducción en la activación crónica basal, el grupo de 26 pacientes se dividió de acuerdo al recuento inicial de linfocitos T<sub>H</sub>, según este fuera mayor (Grupo 1) o menor (Grupo 2) de 200 céls/ $\mu$ l. El número de pacientes en cada grupo fue de 14 y 12, respectivamente.

En la Figura 6 se muestran los valores medios de sTNF-RII, TNF,  $\beta_2$ -microglobulina y expresión de HLA-DR en cada grupo. Antes del tratamiento, los pacientes más inmunodeprimidos mostraron un grado de activación del sistema inmune más alto, diferencia que fue significativa para todos los marcadores ( $p < 0.05$ , prueba de Mann-Whitney), excepto para el TNF. Sin embargo, y tras el inicio del tratamiento, se produjo una reducción de los niveles de activación de todos los parámetros en ambos grupos, que fueron todas significativas (con la excepción de los niveles de TNF en el Grupo 2). Al final del tratamiento, ya no hubo diferencias significativas entre los pacientes del Grupo 1 y 2 para los niveles de TNF y sTNF-RII, aunque la expresión de HLA-DR seguía siendo significativamente mayor en el grupo más inmunodeprimido basalmente ( $53\% \pm 3$  versus  $30\% \pm 3$ ,  $p < 0.001$ , prueba de Mann-Whitney, Figura 6).



**Figura 6. Inmunosupresión basal y cambios en los niveles de activación inmune tras inicio del HAART.** Los pacientes que iniciaron tratamiento HAART fueron estratificados en dos grupos, según el recuento basal de linfocitos T CD4 fuera menor (●) o mayor (○) de 200 células/ $\mu$ l. En las gráficas se muestra la concentración en suero de: A) sTNF-RII, B) TNF, y C)  $\beta_2$ -microglobulina; y la expresión de D) HLA-DR en linfocitos T CD3<sup>+</sup>. El número de pacientes en cada grupo (● / ○) se muestra en la línea inferior. (\*) indica diferencias significativas con la semana cero ( $P < 0.05$ , Prueba de Wilcoxon), (#) indica diferencias significativas entre ambos grupos en cada semana ( $P < 0.05$ , Prueba U de Mann-Whitney).

**2. Repoblación linfocitaria T virgen y memoria.  
Efecto de la edad del paciente.**

## 2.1 Expresión de marcadores de fenotipo virgen en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes infectados por VIH

Tradicionalmente, se ha considerado que los linfocitos T vírgenes están contenidos dentro de la subpoblación que expresa el marcador CD45RA, mientras que los memoria estarían incluidos en la subpoblación que expresa CD45RO, por lo que se ha utilizado la expresión de dichas isoformas para diferenciarlos. Sin embargo, se ha descrito que en sujetos sanos los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados pueden readquirir la expresión de CD45RA al finalizar la respuesta inmune, siendo necesario el análisis de marcadores adicionales para diferenciar entre los CD8 vírgenes y memoria.

Adicionalmente, y en el contexto del VIH, ha sido también postulado que para la definición del fenotipo virgen de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son también necesarios marcadores adicionales a CD45R (*Rabin y col., 1995, Autran y col., 1997*). Por ello, y con el objetivo de definir de un modo óptimo el fenotipo virgen y memoria en el tipo de muestra utilizados en este estudio (PBMCs de pacientes infectados por el VIH-1 y criopreservados en nitrógeno líquido), analizamos la expresión de los marcadores CD45RO, CD62L y CD11a, en linfocitos CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>.

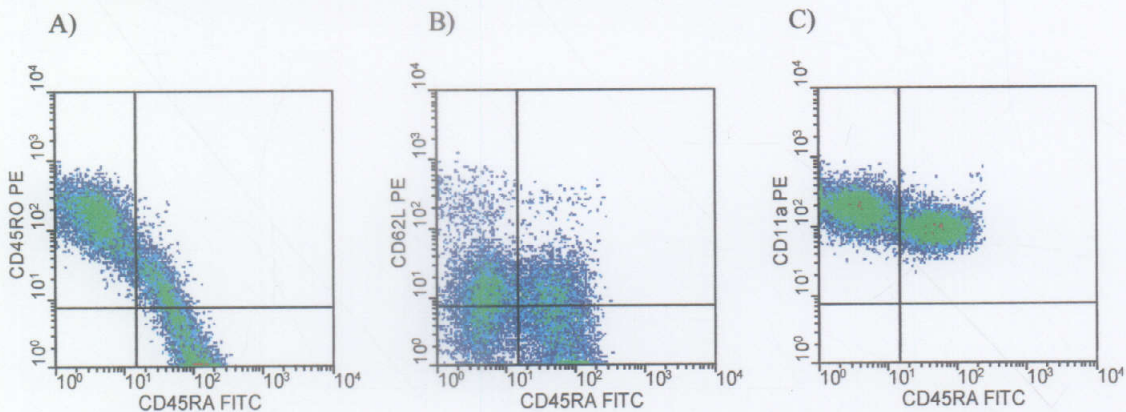
La Figura 7 muestra la expresión de CD45RO, CD11a y CD62L en relación con CD45RA en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de un paciente representativo del resto de los analizados. En general, la expresión de CD45RA típicamente definía dos poblaciones de células como CD45RA<sup>-</sup> y CD45RA<sup>+</sup>. Ambas poblaciones se han separado en los diagramas de densidad por la posición del eje vertical del cuadrante. La expresión de CD45RO en las células CD4<sup>+</sup> presentó niveles inversamente proporcionales a los de CD45RA (Figura 7A). Diferenciándose dos poblaciones principales que expresaban exclusivamente uno u otro marcador, y otra población que expresaba ambos marcadores a niveles bajos (CD45RA<sup>low</sup>CD45RO<sup>low</sup>), formando un continuo entre las dos mayoritarias. Esta población con niveles intermedios estuvo incluida dentro de los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, por lo que el porcentaje de células negativas para CD45RO entre las CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> varió entre un 6.2% y un 50.8% (mediana: 24.3%, n=12), aunque todas las células con niveles muy brillantes de CD45RA fueron CD45RO negativas.

La expresión de CD62L entre las células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> fue bimodal (Figura 7B), con un porcentaje de células CD62L<sup>+</sup> que osciló entre un 7.9% y un 48.8 % (mediana: 21.2%, n=12). Estos valores son diferentes a los descritos previamente para sujetos sanos no infectados por VIH-1 y analizados en fresco, que son casi exclusivamente CD62L<sup>+</sup>. Esta



población de linfocitos  $CD4^+CD45RA^+CD62L^-$  ha sido previamente descrita en sujetos infectados por el VIH (*Rabin y col., 1995*), y se ha considerado que estas células deben ser excluidas de la definición del fenotipo virgen. Debido a que los distintos niveles de expresión de CD45RA posibles dentro de las células  $CD45RA^+$  no discriminaban entre células CD62L positivas y negativas, como en el caso de la expresión de CD45RO, se ha sugerido que es necesario un marcador adicional a las isoformas de CD45R para definir  $CD4$  vírgenes, tales como el mismo CD62L, o alternativamente, el CD11a.

Sin embargo, los niveles de expresión de CD11a entre los linfocitos  $CD4^+CD45RA^+$  fueron homogéneos, a pesar de la expresión bimodal del CD62L en esa misma población, como se puede apreciar en un paciente representativo del resto analizado (Figuras 7B y 7C). Esta expresión diferente de dos marcadores considerados como asociados al fenotipo virgen resultó contradictoria, y nos hizo plantearnos si la pérdida de la expresión de CD62L era realmente debido a un cambio funcional en los  $T_H$ .

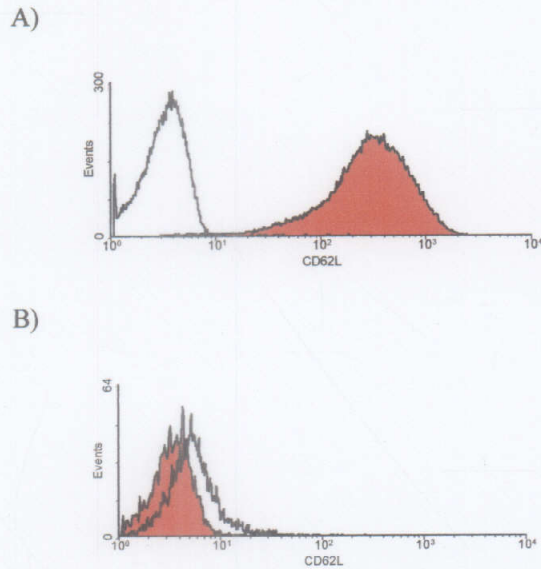


**Figura 7. Coexpresión de los marcadores CD45RO, CD62L, y CD11a con el marcador CD45RA en linfocitos T  $CD4^+$ .** Se muestran los diagramas de densidad de expresión de CD45RA frente marcadores adicionales propuestos para la definición del fenotipo virgen. Células mononucleares de pacientes infectados por el VIH criopreservadas en nitrógeno líquido fueron descongeladas e inmediatamente marcadas con un panel de anticuerpos. Los eventos presentados fueron seleccionados por su morfología de linfocito y su expresión de CD4.

## 2.2 Efecto de la congelación en la expresión de CD62L en la línea celular T Jurkat

Se ha descrito que la expresión de CD62L en PBMC de sujetos normales o en líneas celulares puede perderse en cuestión de minutos por una variedad de estímulos, tanto fisiológicos como experimentales. Esto ocurre por un fenómeno de *shedding* del marcador, que es escindido proteolíticamente de la membrana celular.

Para comprobar si la manipulación asociada a la criopreservación puede afectar a la expresión de CD62L, los niveles de CD62L fueron analizados para una línea celular T mantenida en cultivo, y para esas mismas células inmediatamente después de ser descongeladas. La Figura 8 muestra como la línea celular expresa de un modo homogéneo este marcador cuando está en cultivo, pero que el proceso de criopreservación de las células provoca la pérdida de la expresión de CD62L en todas la células.



**Figura 8. Pérdida de la expresión de CD62L tras la descongelación de la línea celular Jurkat.** La figura A muestra la expresión homogénea del marcador en células en cultivo, donde el 100% son CD62L<sup>+</sup>. Tras un ciclo de congelación en nitrógeno líquido y descongelación, la expresión del marcador se pierde totalmente, como muestra la figura inferior. Para cada caso se muestran los niveles de fluorescencia del anticuerpo de control negativo.

### 2.3 Marcadores adoptados para la definición de linfocitos T virgen y memoria

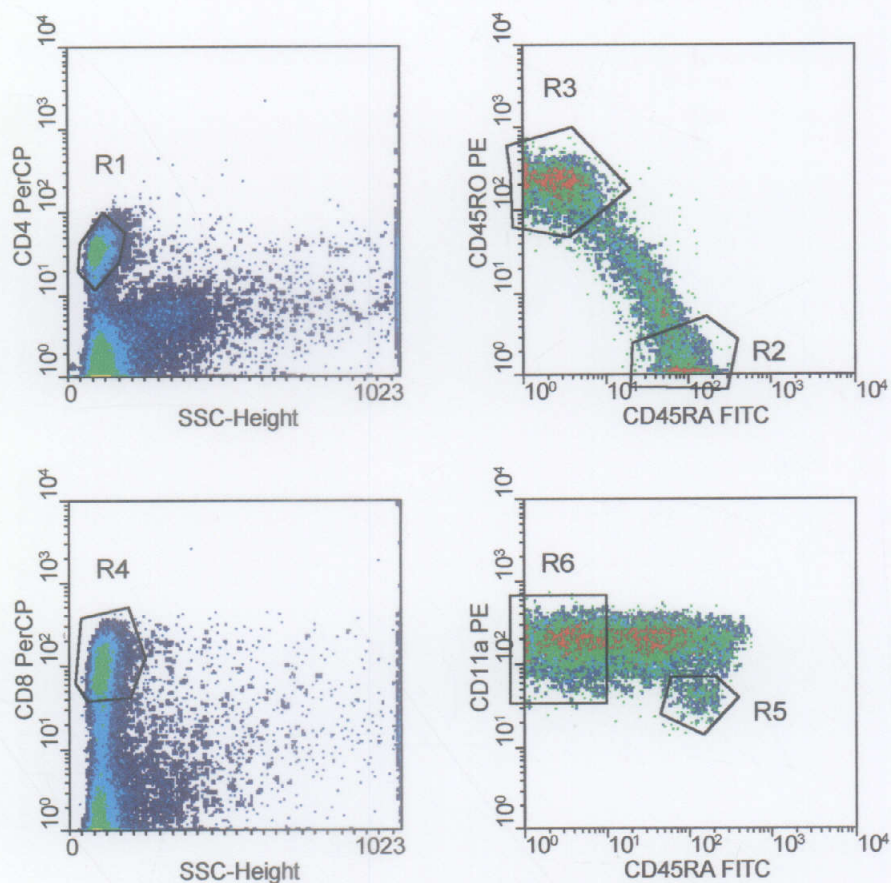
Los datos de pérdida de CD62L en la línea celular T Jurkat, y la comprobación de que en células de sangre de cordón de sujetos no infectados por VIH aparece una población  $CD4^+CD45RA^+CD62L^-$  tras ser criopreservadas (datos no mostrados), nos hizo decidimos por la definición de CD4 vírgenes utilizando la combinación CD45RA/CD45RO. Esto es debido a dudas sobre la conservación del marcador CD62L, unido a la homogénea expresión de CD11a entre las  $CD4^+CD45RA^+$ , al ser este marcador considerado equivalente a CD62L para la definición de CD4 virgen (Rabin y col. 1995). Entre los linfocitos CD8, sin embargo, si se detectó una heterogeneidad de expresión de CD11a en la subpoblación  $CD8^+CD45RA^+$ . Las células con niveles de expresión más altos ( $CD45RA^{high}$ ) mostraban una expresión bimodal de CD11a, con células  $CD11a^{high}$  y  $CD11a^{low}$ , mientras que las células con niveles menores de CD45RA eran casi exclusivamente  $CD11a^{high}$ .

Al comprobar que efectivamente existe una expresión bimodal de CD11a entre los linfocitos  $CD8^+CD45RA^{high}$ , se consideró más apropiado el uso de este marcador que el de la expresión de CD45RO en los linfocitos CD8. Así, la Tabla 2 y la Figura 9 muestra las combinaciones de anticuerpos y las regiones definidas para la enumeración de linfocitos T CD4 y CD8 virgen y memoria utilizados en este estudio.

*Tabla 2. Definición de fenotipo virgen y memoria en linfocitos T.*

CD4 virgen	$CD4^+$	$CD45RA^{high}$	$CD45RO^-$
CD4 memoria	$CD4^+$	$CD45RA^-$	$CD45RO^{high}$
CD8 virgen	$CD8^+$	$CD45RA^{high}$	$CD11a^{low}$
CD8 memoria	$CD8^+$	$CD45RA^-$	$CD11a^{high}$





**Figura 9. Definición del fenotipo virgen y memoria en linfocitos T CD4 y CD8.**

Para el cálculo del porcentaje de células virgen y memoria, los eventos fueron seleccionados en función de su morfología de linfocitos (no mostrado) y de la expresión del marcador de linaje CD4 (región R1, figura A) o CD8 (región R4, figura C). El fenotipo de las subpoblaciones CD4 virgen y memoria se muestran en la figura B (regiones R2 y R3 respectivamente). El fenotipo de las subpoblaciones CD8 virgen y memoria se muestran en la figura D (regiones R5 y R6 respectivamente).

## 2.4 Características basales de los pacientes analizados

Los pacientes adultos incluidos en este estudio fueron los mismos que los incluidos en el Objetivo 1, con la excepción de un paciente, que debido a la falta de disponibilidad de muestras suficientes no se le pudo determinar las subpoblaciones virgen y memoria. Las características basales demográficas e inmunológicas de los adultos y de los niños incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 3. Ninguno de ellos sufrió enfermedades oportunistas manifiestas al inicio del tratamiento o durante el periodo de estudio completo.

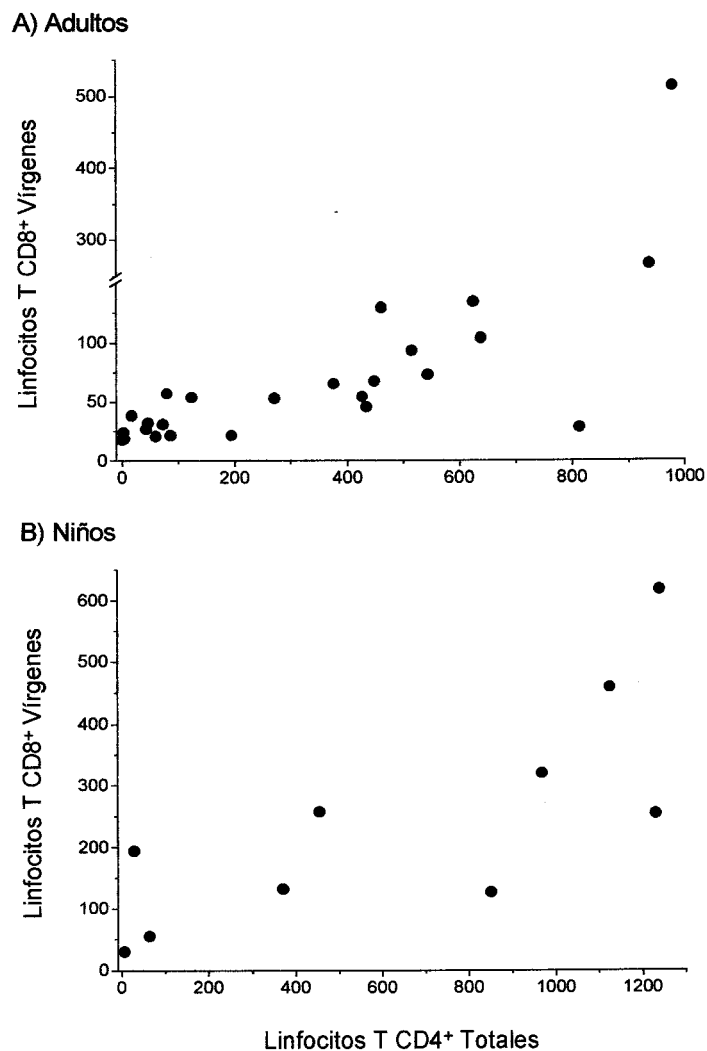
**Tabla 3.** Características basales de los pacientes.

	Adultos	Niños
Número de pacientes	25	10
Edad (años)		
Mediana [ intervalo ]	34 [ 29–65 ]	3.7 [ 0.2–10.6 ]
Nº de hombres/mujeres	16/9	6/4
Grupo de Riesgo (Nº)		
Homosexual	4	--
Heterosexual	10	--
ADVP	10	--
Desconocido	1	--
Vertical	--	10
Carga Viral ( $\log_{10}$ [ARN VIH-1])		
Media $\pm$ e.t.m. <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.4
Intervalo	2.6–5.3	2.6–6.7
Nº de linfocitos T CD4 (cél/s/ $\mu$ l)		
Media $\pm$ e.t.m.	328 $\pm$ 61	634 $\pm$ 160
Intervalo	1–979	6–1240
Clasificación de la infección por VIH (Nº)		
SIDA	12	4
Estadio C del CDC	5	3

<sup>a</sup> Error estándar de la media.

## 2.5 Relación basal entre el recuento de T<sub>H</sub> totales y linfocitos T vírgenes

Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio había sido tratado previamente con antirretrovirales, y todos presentaban niveles de carga viral detectables basalmente. Se analizó entonces la relación entre el grado de deplección de las subpoblaciones virgen y memoria de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y del total de linfocitos T<sub>H</sub>, como marcador de progresión de la enfermedad. La Figura 10 m



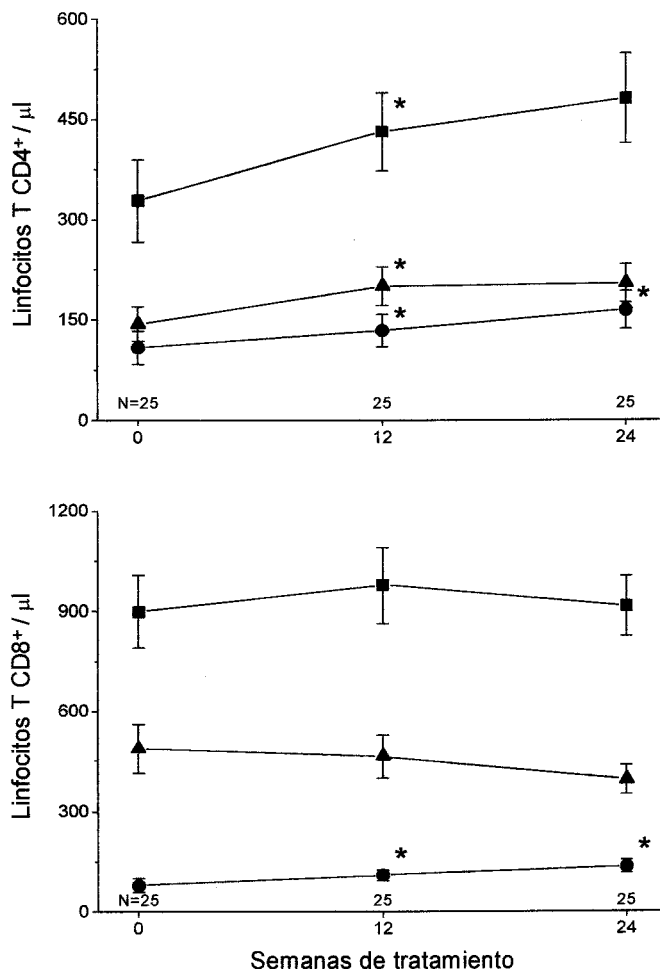
**Figura 10. Correlación basal entre linfocitos T vírgenes CD8<sup>+</sup> y linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales.** La figura muestra la correlación significativa entre el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes y el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales tanto A) para los adultos ( $p < 0.001$ , prueba de Spearman) como para B) los niños ( $p = 0.006$ ).

## 2.6 Respuesta virológica al tratamiento

En el grupo de pacientes adultos, el HAART indujo una disminución significativa de los niveles de carga viral, que se redujeron desde una media de  $4.2 \pm 0.2$  antes del inicio del tratamiento hasta niveles de  $2 \pm 0.17$  y  $2.1 \pm 0.17$   $\log_{10}$  copias/ml, en las semanas T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> ( $p < 0.001$  para ambas semanas, prueba de Wilcoxon). Durante el seguimiento, el 65% de los pacientes tuvieron valores indetectables de carga viral (inferiores a 200 copias/ml). En el grupo de los niños el tratamiento antirretroviral redujo del mismo modo la carga viral, aunque en menor medida. Así, los valores basales de  $5.3 \pm 0.42$  se redujeron a  $3.7 \pm 0.47$  en T<sub>1</sub> y  $3.7 \pm 0.49$  en T<sub>2</sub>, reducciones que fueron significativas ( $p < 0.05$ , Prueba de Wilcoxon), pero menos pronunciadas que en el caso de los adultos. Respecto al número de niños que lograron niveles indetectables de carga viral fue tan solo de tres de los diez analizados.

## 2.7 Cambios en las subpoblaciones linfocitarias virgen y memoria de adultos

Tras el inicio del tratamiento HAART, se produjo un incremento significativo en varias subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8. Tal como se aprecia en la Figura 11, las subpoblaciones CD4 virgen y memoria aumentaron de modo significativo ( $p = 0.021$  y  $p = 0.016$  respectivamente, prueba de Wilcoxon) en la semana T<sub>1</sub>, siendo el incremento neto de células memoria ( $56 \pm 21$  céls/ $\mu$ l) mayor que el de células vírgenes ( $25 \pm 10$  céls/ $\mu$ l) en esta primera fase de la repoblación. Sin embargo, los cambios posteriores en la semana T<sub>2</sub> fueron solo significativos para los linfocitos CD4 vírgenes ( $p = 0.013$  respecto a los valores en T<sub>1</sub>). Los linfocitos T CD8 vírgenes (Figura 11, inferior), aumentaron continuamente tanto en T<sub>1</sub> ( $p = 0.045$  vs T<sub>0</sub>) como en T<sub>2</sub> ( $p = 0.025$  vs T<sub>1</sub>), al igual que en el caso de los CD4 vírgenes.



**Figura 11. Cinética bifásica en la repoblación de linfocitos T en adultos que inician HAART.** La repoblación de linfocitos T vírgen y memoria fue examinada en veinticinco pacientes adultos de entre 29 y 65 años de edad que iniciaron tratamiento HAART (CD4<sup>+</sup> en la gráfica superior; CD8<sup>+</sup> en la gráfica inferior). Los valores representan la media ± el error típico de la media, para los linfocitos vírgenes (●), memorias (▲) y totales (■). El número de pacientes analizados en cada punto se muestra en la línea inferior. (\*) indica diferencias significativas con la semana cero (P<0.05, Prueba de Wilcoxon).

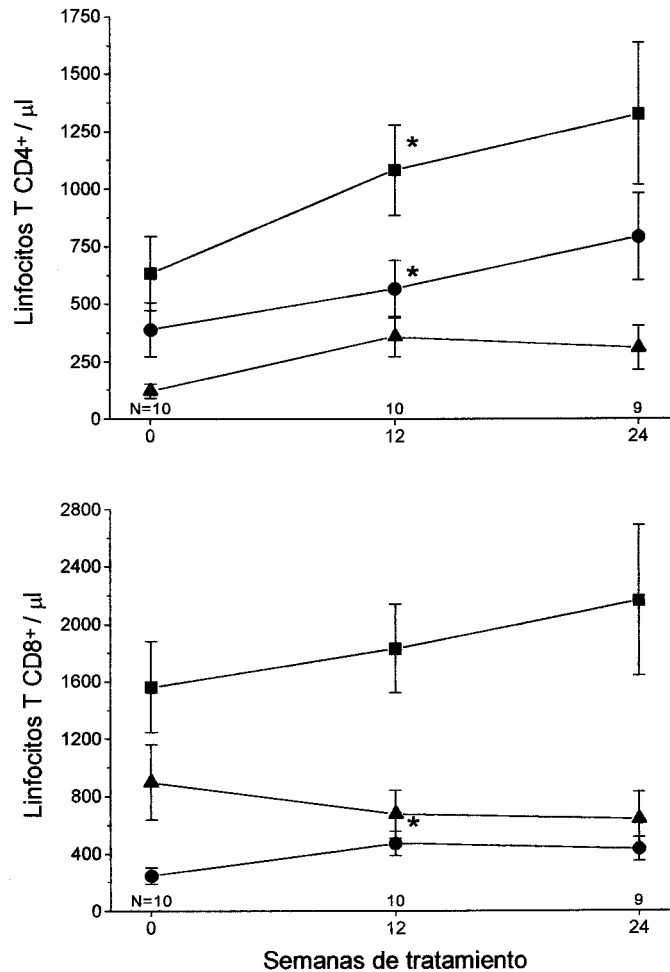
## 2.8 Cambios en las subpoblaciones linfocitarias vírgen y memoria de niños

Los efectos que sobre la carga viral circulante tuvo la terapia antirretroviral en los niños fueron menos pronunciados que en los adultos, tal como se detalló con anterioridad. Sin embargo, la respuesta de las subpoblaciones linfocitarias fue mucho más potente que en el caso de los adultos. La Figura 12 muestra los aumentos de linfocitos T CD4 totales y de sus subpoblaciones vírgen y memoria, que resultaron significativamente mayores en los



puntos  $T_1$  y  $T_2$  que en el punto  $T_0$ . Del mismo modo, la subpoblación de linfocitos T CD8 vírgenes aumentó de manera significativa, a pesar de que el número total de linfocitos T CD8, o de su subpoblación memoria, no varió significativamente durante el periodo de seguimiento. La regeneración de linfocitos T vírgenes no se vio afectada por los niveles residuales de replicación vírica, y no hubo correlación entre las ganancias netas y los valores de carga viral al final del seguimiento.

La edad de los pacientes no tuvo una relación estadísticamente significativa con el incremento de células vírgenes. No hubo correlación entre la edad de inicio de tratamiento y la mejora en el recuento obtenido (Prueba de Spearman), ni tampoco se observaron diferencias entre grupos de niños mayores o menores de tres años (Prueba U de Mann-Whitney). Todos los niños analizados tuvieron importantes aumentos de linfocitos T CD4 vírgenes en el punto  $T_1$  de tratamiento, incluyendo al niño de más edad al iniciar la terapia (11 años).



**Figura 12. Cinética de repoblación de linfocitos T en niños que inician HAART.** La repoblación de linfocitos T vírgen y memoria fue examinada en diez pacientes pediátricos infectados por el VIH de entre dos meses y once años de edad, que iniciaron tratamiento HAART (CD4<sup>+</sup> en la gráfica superior; CD8<sup>+</sup> en la gráfica inferior). Los valores representan la media ± el error típico de la media, para los linfocitos vírgenes (●), memorias (▲) y totales (■). El número de pacientes analizados en cada punto se muestra en la línea inferior. (\*) indica diferencias significativas con la semana cero (P<0.05, Prueba de Wilcoxon).

## 2.9 Heterogeneidad de la respuesta T vírgen en adultos

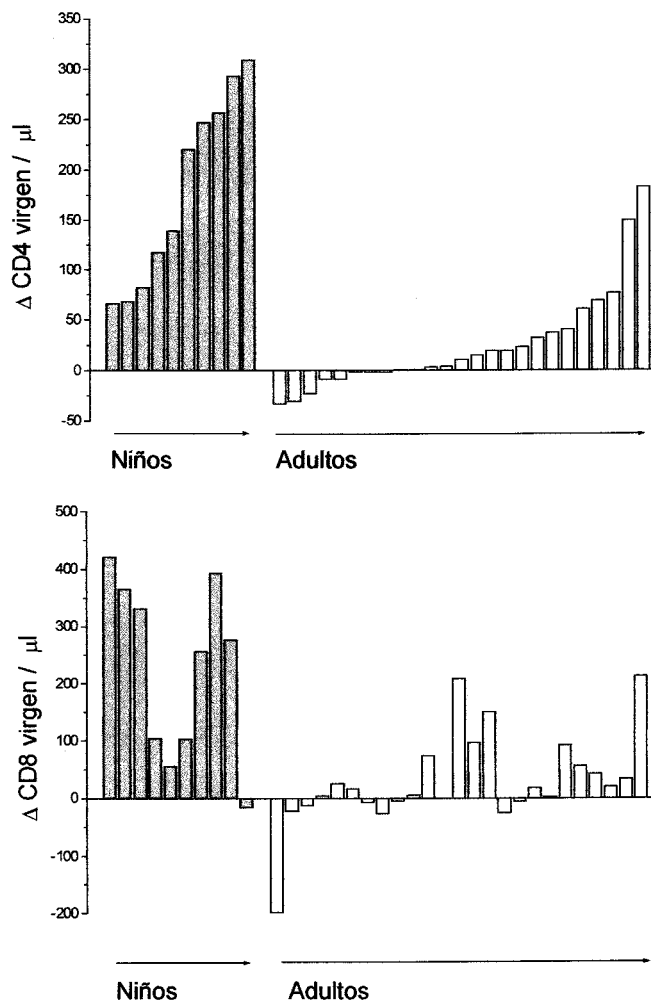
El análisis individual de cada paciente mostró que entre los adultos existía una respuesta heterogénea en la repoblación de linfocitos T vírgenes. En la Figura 13A se muestran los incrementos netos entre T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub> para los CD4 vírgenes, de niños y adultos. Considerando como criterio de repoblación un incremento neto mayor del 10% del número de linfocitos vírgenes basal, todos los niños bajo estudio repoblaron, mientras que entre los adultos, tan

solo lo hicieron trece pacientes. El resto tuvo incrementos de CD4 vírgenes que fueron negativos (n=8) o menores del 10% del valor basal (n=4). Según esto, se clasificaron los pacientes en dos grupos: Grupo A (n=13, pacientes repobladores en T<sub>1</sub>) y Grupo B (n=12, no repobladores). El análisis estadístico mostrado en la Tabla 4 muestra que ambos grupos tuvieron aumentos significativos de linfocitos T vírgenes, pero que diferían en el momento en que esto ocurría. Los pacientes del Grupo A tuvieron un aumento significativo de linfocitos vírgenes en T<sub>1</sub>, tanto CD4 como CD8, pero no aumentaron más en T<sub>2</sub>. Por el contrario, en los pacientes del Grupo B la repoblación de linfocitos vírgenes estuvo retrasada hasta la semana T<sub>2</sub>, estando compuesta de linfocitos tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>.

**Tabla 4.** Cambios en las subpoblaciones T en adultos agrupados por la respuesta CD4 virgen en T<sub>1</sub>

		Número de Células/ $\mu$ l			Prueba de Wilcoxon	
		T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> vs T <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> vs T <sub>2</sub>
Grupo A	CD4 Vírgenes	55 $\pm$ 18	111 $\pm$ 28	119 $\pm$ 30	ND <sup>a</sup>	0.507
	CD8 Vírgenes	46 $\pm$ 9	123 $\pm$ 20	142 $\pm$ 18	0.002	0.279
Grupo B	CD4 Vírgenes	166 $\pm$ 43	159 $\pm$ 40	214 $\pm$ 45	ND	0.008
	CD8 Vírgenes	116 $\pm$ 41	95 $\pm$ 27	131 $\pm$ 37	0.209	0.028

<sup>a</sup> ND, estadístico no determinado, al ser estos cambios el criterio de agrupamiento.



**Figura 13. Cambio neto individual en linfocitos T vírgenes en niños y adultos bajo HAART.** La diferencia entre el recuento en las semanas  $T_1$  y  $T_0$  para linfocitos T vírgenes ( $CD4^+$  en la gráfica superior;  $CD8^+$  en la gráfica inferior) es mostrado para los niños (barras grises,  $n=10$ ) y los adultos (barras blancas,  $n=25$ ) en estudio. Los pacientes de cada grupo fueron ordenados igualmente en ambas gráficas, según el incremento de linfocitos T  $CD4^+$  vírgenes.

**3. Repoblación linfocitaria T virgen y memoria.  
Papel del Timo.**

### 3.1 Clonación de la reordenación $\delta$ Rec- $\psi$ J $\alpha$ de TRECs

Para la medición mediante PCR cuantitativa es necesario disponer previamente de una recta patrón con concentraciones conocidas del ADN molde a amplificar, que sirva de referencia para las muestras problema. Para disponer de concentraciones conocidas de la secuencia *signal-joint* del TREC, es necesario clonarla previamente en un plásmido, y calcular el número de copias por microlitro en función del tamaño del plásmido y del ADN total presente, medido espectrofotométricamente.

Con el objetivo de clonar el fragmento de ADN que contiene la *signal joint* del TREC se realizó una PCR partiendo de ADN extraído de timocitos, usando los cebadores específicos TRECQ1 y TRECQ2 y las condiciones de PCR especificadas previamente. El producto de la amplificación fue separado sobre un gel de agarosa, identificándose una única banda de un tamaño similar al esperado (Douek y col, 1998). Dicha banda fue extraída del gel y clonada en el vector pGEM-T Easy (Promega Corp) según las indicaciones del fabricante. Se seleccionaron varias colonias transformadas con el producto de la clonación para ser secuenciadas. Una de las colonias contenía un inserto que además de los cebadores utilizados incluía las secuencias de las sondas TRECP3 y TRECP4. La comparación del locus TCR- $\delta$  (AE000661) con la secuencia insertada en el plásmido de dicha colonia permitió definir el punto de recombinación del TREC. El fragmento clonado tenía una longitud de 381 pares de bases, y estaba formado por los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 229136 a 229273 (extremo 5') y 140192 a 140434 (extremo 3') de la secuencia AE000661. En la Figura 14 se muestra la secuencia del clon, con la localización de los cebadores (TRECQ1 y TRECQ2) y las sondas de hibridación (TRECP3 y TRECP4). Dos mutaciones (C141A y T381C, según la numeración del amplificado) estuvieron presentes en las secuencias obtenidas en ambos sentidos utilizando los promotores *pUC/M13 Forward Sequencing Primer* y *pUC/M13 Reverse Sequencing Primer* del plásmido pGEM-T Easy.

```

      TRECQ1
1  aaagagggca ggcctctcca aggcaaaatg gggctcctgt ggggaacaga ggggtgcctc
   tttctcccgt cgggagaggt tccgttttac cccgaggaca ccccttgtct ccccacggag
                                     TRECQ4
61  tgtcaacaaa ggtgatgcca catccctttc aaccatgctg acacctctgg tttttgtaaa
   acagttgttt ccactacggt gtagggaaag ttggtacgac tgtggagacc aaaaacattt
      TRECQ3
121 ggtgcccact cctgtggggc acacggtgat gcataggcac ctgcaccccg tgcctaaacc
   ccacgggtga ggacaccccg tgtgccacta cgtatccgtg gacgtggggc acggatttgg
181 ctgcagctgg cacgggcctt gtctgctctt cattcacctg tctcacgagt tgcaataagt
   gacgtcgacc gtgcccggga cagacgagaa gtaagtggca agagtgtctca acggtattca
241 tcagccctcc atgtcacact gtgttttcca tcctggggag tgtttcacag ctatcccaag
   agtcgggagg tacagtgtga cacaaaaggt aggaccctc acaaagtgtc gataggggtc
301 ccccacgctg acgaatcacg gccgaaaaca cactctgatg ccagcacaga ccacggagca
   ggggtgcgac tgcttagtgc cggcttttgt gtgagactac ggtcgtgtct ggtgacctgt
361 aatgtcagac aagatcagcc c
   ttacagtctg ttctagtcgg g
                                     TRECQ2

```

**Figura 14: Secuencia flanqueante a la región *signal joint* producto de la reordenación entre la secuencia  $\delta$ Rec y el pseudogen  $\psi$ J $\alpha$ .** Una muestra de ADN de timo postnatal humano fue amplificada mediante PCR usando los cebadores TRECQ1 y TRECQ2, y posteriormente clonada en el vector pGEM-T Easy. Se indica la posición de los cebadores usados (azul), así como la de las sondas de hibridación utilizadas para la posterior detección del amplicón durante la Q-PCR (rojo). La localización del punto de recombinación se encuentra entre los nucleótidos 138 y 139 de la secuencia.

### 3.2 Cuantificación de TRECs en timocitos

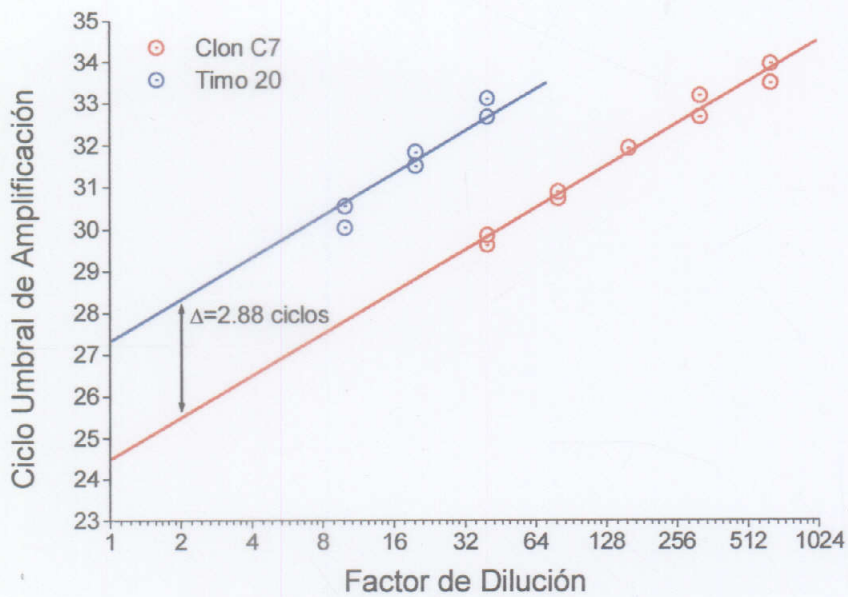
Una vez clonada la secuencia *signal-joint*, se pudo construir una recta patrón con concentraciones conocidas de dicha secuencia. Esta recta se usó para la determinación del número de TRECs por millón de células presente en una muestra de ADN extraído de timocitos, que posteriormente se usaría en la determinación de las muestras de PBMC problema.

Para ello, la concentración de ADN total del plásmido purificado, y de una extracción de ADN de timocitos, se determinaron por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm (espectrofotómetro HITACHI). La concentración de ADN total en la extracción a partir de timocitos del timo de referencia fue de 153.5 ng/ $\mu$ l, mientras que la del ADN plasmídico a partir de un cultivo de bacterias transformadas fue de 7.9 ng/ $\mu$ l. Asumiendo que el genoma de una única célula contiene aproximadamente 6.2 pg de ADN, y que el plásmido tiene un tamaño de aproximadamente 3393 pares de bases, se calcula que dichas concentraciones de ADN corresponden a  $2.46 \times 10^4$  timocitos/ $\mu$ l y  $2.26 \times 10^9$  copias del clon/ $\mu$ l en cada dilución.

Para aproximar el número de copias de plásmido al de células de ambas diluciones, el plásmido se diluyó en un factor de  $10^{-5}$ . A continuación se añadió un volumen de ADN genómico extraído a partir de una línea celular T (Jurkat), el cual carece de TRECs, para aproximar las condiciones de PCR entre la muestra de ADN del timo y del clon purificado. La dilución final así obtenida de plásmido correspondía a 1/200.000 de la original.

A continuación se realizó una PCR cuantitativa para conocer las concentraciones relativas de la secuencia *signal-joint* ente la muestra de timo y de plásmido purificado. Se utilizaron diluciones seriadas en factor de dos del ADN de timo (comenzando a partir de una dilución 1/10 inicial) y del plásmido purificado (comenzando por una dilución 1/40 de la dilución 1/200.000 antes descrita). En la Figura 15 se muestra el ciclo umbral asociado a cada muestra, así como la recta que extrapola el ciclo umbral a las diluciones 1x de ambas, (ciclo 24.449 para el clon 7, ciclo 27.285 para el timo de referencia). La diferencia entre ambas indica que la dilución 1/200.000 del plásmido purificado está aún  $2^{2.88}$  veces más concentrada que la extracción del timo de referencia, es decir, que existe una secuencia *signal joint* por cada 16 células de timo.





**Figura 15.** Cálculo de la concentración relativa de secuencias *signal-joint* de TRECs entre una muestra de ADN de timocitos y de un plásmido que contiene dichas secuencias. El ciclo umbral de amplificación de diluciones seriadas de ADN extraído de timocitos y de ADN de plásmido conteniendo la secuencia *signal-joint* del TREC se ajustan a sus rectas teóricas. Dicha recta ideal tiene una pendiente de  $m=1$  y un término independiente proporcional a la concentración original de ADN molde. La diferencia de 2.88 ciclos entre los términos independientes de ambas rectas indica que la muestra del clon se encuentra 7.36 veces más concentrada que la de timo.

### 3.3 Características basales de los pacientes analizados

El número de pacientes incluidos en este estudio fue de dieciséis, siendo sus características demográficas e inmunológicas detalladas en la Tabla 5. Uno de los pacientes estaba infectado por VIH-2, el cual no puede actualmente ser detectada por la técnicas de cuantificación de carga viral estándar. Por ello, no pudo ser controlado para los niveles de replicación vírica tras el inicio del tratamiento.

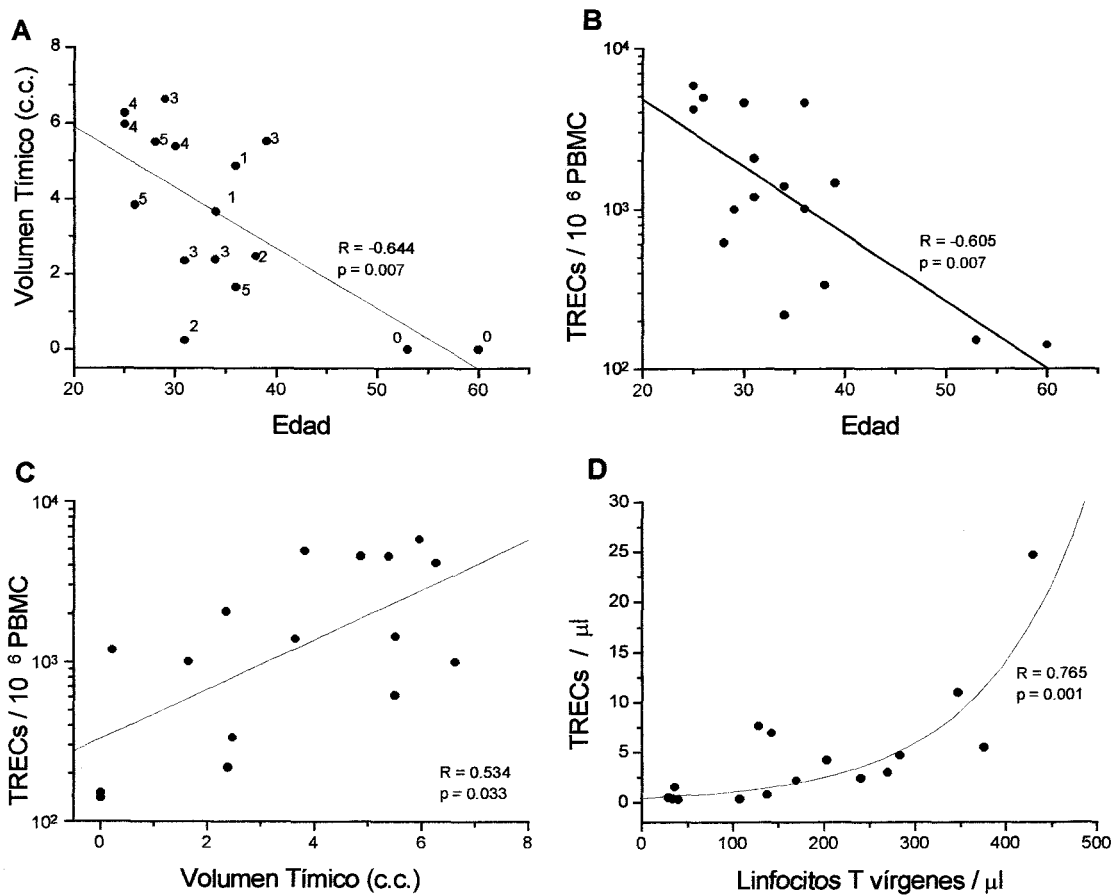
**Tabla 5.** Características basales de los pacientes.

Número de pacientes	16
Edad (años)	
Mediana [intervalo]	33 [25–60]
Nº de hombres/mujeres	13/3
Grupo de Riesgo (Nº)	
Homosexual	3
Heterosexual	6
ADVP	6
Desconocido	1
Carga Viral ( $\log_{10}$ [ARN VIH-1]/ml)	
Media $\pm$ e.t.m	4.1 $\pm$ 0.3
Intervalo	3–5.6
Nº de linfocitos T CD4 (cél/s/ $\mu$ l)	
Media $\pm$ e.t.m.	338
Intervalo	8–804
Clasificación de la infección por VIH (Nº)	
Estadio CDC *	
SIDA	6
Estadio C del CDC*	3

\* (Centers for Disease Control 1993)

### 3.4 Correlación basal entre las variable relacionadas con la función tímica

El grado de función tímica presente en un paciente debe estar relacionado con su edad, así como con el tamaño que presente dicha glándula. Del mismo modo, la presencia en sangre del producto de dicha función también debe ser un indicativo de dicha función. Los niveles de TRECs, y en menor medida, el número de linfocitos T de fenotipo virgen, son productos del timo. La Figura 16 muestra la correlación significativa que existía antes del tratamiento entre dichas variables. La edad del paciente mostró una correlación significativa con el tamaño del timo. Además, el índice de tejido tímico asignado fue mayor entre los pacientes más jóvenes. La proporción de TRECs por cada millón de PBMC estuvo relacionada directamente con el tamaño del timo, e inversamente con la edad del paciente. Los pacientes que habían desarrollado SIDA presentaron los niveles más bajos de TRECs, entre 140 y 333/10<sup>6</sup> PBMC. Por último, el número de TRECs/ $\mu$ l circulantes mostró una correlación directa significativa con el número de linfocitos T/ $\mu$ l de fenotipo virgen, tanto CD4 como CD8. Curiosamente, esta correlación estuvo mejor ajustada a una recta exponencial que lineal.



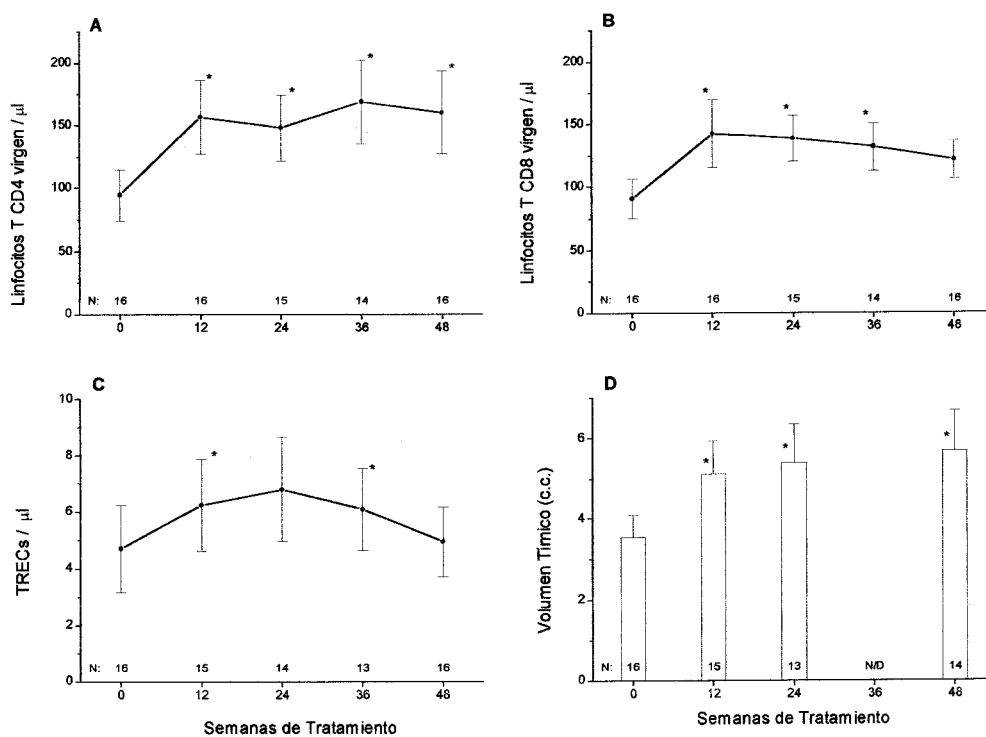
**Figura 16. Correlaciones basales entre marcadores de función tímica.** Antes del inicio del tratamiento HAART los marcadores de función tímica estuvieron correlacionados entre si. a) edad con volumen tímico, b) edad con proporción de TRECs por  $10^6$  PBMC, c) volumen tímico con proporción de TRECs por  $10^6$  PBMC, y d) recuento absoluto de linfocitos T vírgenes (tanto CD4 como CD8) y de TRECs por microlitro.

### 3.5 Respuesta al tratamiento

Tras el inicio del tratamiento, la carga viral VIH-1 se redujo entre los pacientes. La reducción media obtenida en la semana 12 fue de  $-2.53 \log_{10}$  copias/ml. Desde la semana 12, y durante todo el tratamiento, la carga viral se mantuvo controlada, estando por debajo del límite de detección de la técnica (50 copias/ml). El número de linfocitos T CD4 aumentó significativamente, desde  $338 \pm 62$  al inicio del tratamiento hasta  $469 \pm 71$  en la semana 48. Los incrementos de CD4 fueron significativos desde la semana 12 de tratamiento, respecto a los valores basales. El número de linfocitos T CD8 totales no varió significativamente durante el tratamiento, aunque los valores medios tendieron a disminuir.

### 3.6 Cambios en la función tímica

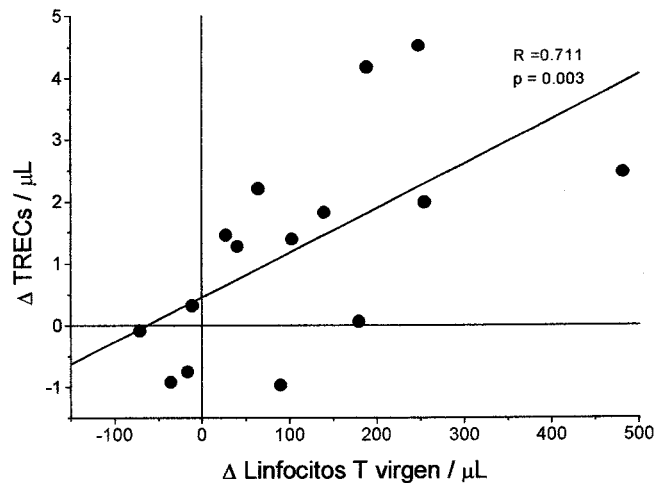
Para estudiar la cinética de cambio en los niveles de TRECs durante el tratamiento, estos fueron expresados como número absoluto por  $\mu\text{l}$ , en lugar de como porcentaje. Tras el inicio del HAART, hubo un incremento en el número de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes, volumen tímico, y recuento de TRECs/ $\mu\text{l}$ . La Figura 17 muestra la evolución de la media de dichos parámetros, siendo los aumentos significativos ya desde la semana 12 de tratamiento. El índice de tejido linfoide en el timo no vario de modo significativo entre los distintos puntos del seguimiento (Prueba de Wilcoxon)



**Figura 17. Cinética de función tímica en pacientes que inician HAART.**

El número de linfocitos T vírgenes/ $\mu\text{l}$  en las subpoblaciones a)  $\text{CD4}^+$ , b)  $\text{CD8}^+$ , número absoluto de TRECs/ $\mu\text{l}$ , y d) volumen tímico en c.c. se muestran para un grupo de dieciséis pacientes infectados por VIH antes y después de iniciar terapia antirretroviral. El número de pacientes analizados en cada punto se muestra en la línea inferior. (\*) indica diferencias significativas con la semana cero (Prueba de Wilcoxon).

El aumento neto de linfocitos T vírgenes y de TRECs/ $\mu\text{l}$  ocurrido en la semana 12, respecto a los valores basales, estuvo significativamente correlacionado de modo directo, tal como se muestra en la Figura 18. Sin embargo, los incrementos obtenidos en semanas posteriores (24, 46 y 48, respecto a los valores basales) para ambas variables ya no estuvieron correlacionados.



**Figura 18. Correlación entre el cambio neto en el número de linfocitos T vírgenes y de TRECs por microlitro de sangre periférica.** En la figura se representa los cambios significativos (Prueba de Spearman) entre las semanas 0 y 12 de tratamiento HAART. Los cambios entre la semana cero y las semanas 24, 36 ó 48 no estuvieron correlacionados.

El análisis individual de los pacientes demostró una tendencia a aumentar el número de TRECs mayor entre aquellos pacientes que previamente al tratamiento tenían los valores más bajos de TRECs/ $\mu$ l. Para analizar estadísticamente esta tendencia, los pacientes fueron divididos en dos grupos según el recuento basal de TRECs/ $\mu$ l que presentaban, escogiendo arbitrariamente como valor de corte el de la mediana del grupo, a fin de analizar dos grupos de igual tamaño. Dicha mediana correspondía a 2.6 TRECs/ $\mu$ l. Los pacientes con valores basales inferiores a la mediana fueron denominados Grupo 1, mientras que los pacientes con valores superiores a la mediana como Grupo 2.

La comparación entre ambos grupos no mostró diferencias significativas de edad entre ambos grupos, aunque de hecho los dos pacientes de más edad de la cohorte estaban incluidos en el Grupo 1, de bajo TRECs basal.

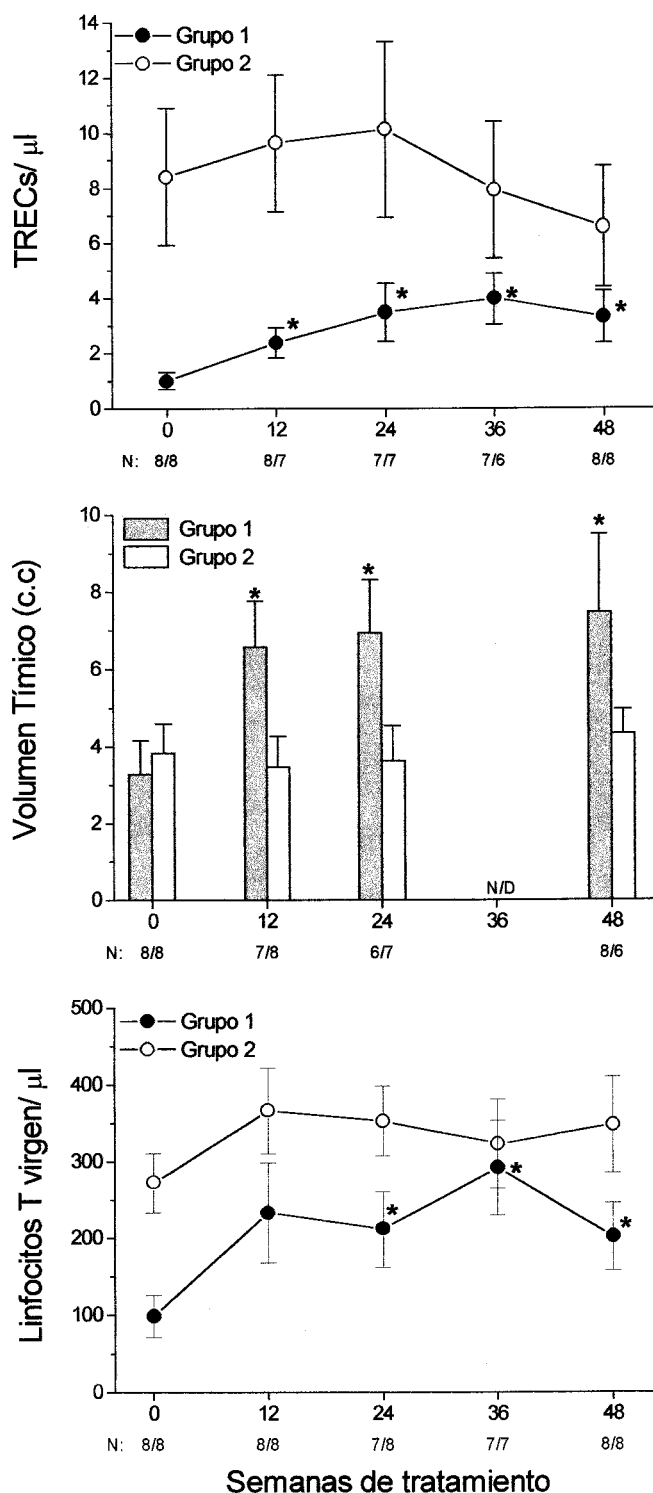
Tras el inicio del HAART, tan solo el Grupo 1, que presentaba al inicio los valores más bajos de TRECs, mostró un aumento significativo de recuento de TRECs/ $\mu$ l (gráfica A,  $p < 0.05$ , Prueba de Wilcoxon). Tras los aumentos de TRECs/ $\mu$ l en el Grupo 1 no hubo más diferencias significativas en el recuento de TRECs/ $\mu$ l entre ambos grupos a partir de la semana 12 ( $p < 0.05$ , Prueba U de Mann-Whitney). La tendencia mayor a aumentar el recuento de TRECs en el Grupo 1 se demostró igualmente al analizar la pendiente de la

recta que ajusta el número de TRECs/ $\mu\text{l}$  en cada paciente de modo individual. Dichas pendientes fueron significativamente mayores en el Grupo 1 ( $+4.3 \times 10^{-2}/\text{día}$ ) que en el Grupo 2 ( $-3.0 \times 10^{-2}/\text{día}$ , Prueba U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

El volumen tímico no fue significativamente diferente entre los pacientes del Grupo 1 y Grupo 2 antes del tratamiento. Tras el inicio del HAART, el volumen tímico se incrementó significativamente en el Grupo 1, pero no en el Grupo 2 (gráfica B). De ese modo, los volúmenes tímicos medidos en el Grupo 1 fueron significativamente más altos que los del Grupo 2, después de 24 semanas de tratamiento HAART.

El número de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes fueron ambos significativamente menores en el Grupo 1 ( $42.8 \pm 18.8$  y  $56.2 \pm 13.8$ , respectivamente) que en el Grupo 2 ( $146.4 \pm 25.8$  y  $125.7 \pm 22.4$ ) antes del tratamiento ( $p < 0.05$ , Prueba U de Mann-Whitney). El número medio de linfocitos T vírgenes (suma de los CD4 y de los CD8) mostró una tendencia similar a incrementarse en ambos grupos (gráfica C), desapareciendo las diferencias significativas presentes antes del tratamiento en el número total de linfocitos T vírgenes durante el seguimiento. Sin embargo, las diferencias respecto a los valores basales fueron significativas para el Grupo 1, pero quedaron en el límite de la significación en el Grupo 2 ( $p = 0.050$  entre el inicio y las semanas 12 ó 24, Prueba de Wilcoxon).

Resulta interesante destacar el comportamiento de los dos pacientes de más edad (tenían 53 y 50 años) de la cohorte. Estos pacientes carecían de imagen radiológica de timo antes del tratamiento, y tenían la proporción más baja de TRECs/ $\mu\text{l}$  de toda la cohorte. A pesar de la tendencia anteriormente descrita de mayor aumento de TRECs entre pacientes con menor número de ellos antes del tratamiento, estos pacientes fueron los únicos de su grupo que no aumentaron el número de linfocitos T vírgenes o de TRECs tras el HAART. Sin embargo, en uno de ellos la imagen del timo reapareció tras el HAART, mostrando un tamaño relativamente grande (13 c.c.), aunque el índice de tejido linfoide asociado (2) fue bajo.



**Figura 19. Relación ente la función tímica en respuesta al HAART y el número inicial de TRECs presentes.** El número de a) TRECs/μl, b) volumen tímico en c.c. y c) linfocitos T vírgenes/μl se muestran para el grupo de pacientes con valores basales de TRECs inferiores a la mediana (n=8, < 2.6 TRECs/μl) o superiores (n=8). Solo el Grupo 1 mostró incrementos significativos en los marcadores (p<0.05, Prueba de Wilcoxon). El número de pacientes en cada grupo es mostrado para cada punto.



## **Discusión**

## 1. EFECTOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL SOBRE LA ACTIVACIÓN CRÓNICA INMUNE

Las principales alteraciones que la infección por el VIH provoca en el sistema inmune de los sujetos infectados son la inducción de un estado de activación crónica, y la progresiva pérdida de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esta activación crónica se caracteriza por la expresión de niveles elevados de diversos marcadores, entre los que se encuentran los niveles séricos de  $\beta_2$ -microglobulina, TNF, y receptores solubles del TNF, así como la expresión de HLA-DR en los linfocitos T. En este estudio nos propusimos analizar los cambios inducidos por la terapia antirretroviral en estos marcadores, y sus relaciones con el grado de inmunodeficiencia alcanzado. Los resultados muestran que antes del inicio de la terapia antirretroviral, existía un mayor grado de activación inmune en los pacientes con mayores niveles de inmunosupresión o de carga viral en suero. Así, todos los parámetros analizados mostraron una correlación significativa con los niveles de carga viral y con el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes. Por otro lado, el grupo de pacientes con un recuento de T<sub>H</sub> inferior a 200 células/ $\mu$ l mostró unos niveles séricos  $\beta_2$ -microglobulina, TNF, sTNF-RII y expresión en membrana de HLA-DR significativamente mayores que los del resto de pacientes. Sin embargo, el HAART redujo significativamente los niveles de activación crónica aberrante asociados a la infección por el VIH, incluso en los pacientes con un mayor grado de inmunodeficiencia basal.

Un estado de activación crónica está normalmente asociado al desarrollo de una respuesta inmune activa contra antígenos reconocidos como extraños al organismo. Las causas de la activación inmune anteriormente descrita pudieran ser la replicación activa del VIH, o la presencia de diversas enfermedades oportunistas. Sin embargo, los criterios de selección de los pacientes excluyeron aquellos que presentaban infecciones oportunistas activas al inicio de este estudio, por lo que consideramos que era la presencia del VIH la causa principal de la activación crónica. A favor de ello está la correlación positiva entre la carga viral VIH-1 y el grado de activación inmune mostrada por los pacientes, para todos los marcadores analizados. Se ha demostrado que desde el inicio de la infección por el VIH, y hasta el colapso final del sistema inmune, el VIH se replica continuamente, incluso durante la fase de latencia clínica, manteniendo unos niveles de carga viral elevados. La cantidad de virus producido diariamente genera una considerable masa antigénica en los tejidos linfoides, que se calcula que es del orden de  $10^{11}$  viriones atrapados en forma de inmunocomplejos en las prolongaciones de la red de células dendríticas foliculares, lo que

convierte a los péptidos derivados del VIH en el antígeno dominante. El VIH es entonces reconocido por el sistema inmune, desarrollando respuestas humorales y celulares específicas contra el. Esta respuesta inmune anti-VIH es fundamental para la reducción de la elevada carga viral asociada a la primoinfección, pero sin embargo fracasa en su tarea de erradicar al virus, entrando el sistema en un estado de activación crónica, de efectos muy perjudiciales a largo plazo.

Tras el inicio la terapia antirretroviral HAART, se ha descrito que los niveles de carga viral en suero se reducen rápidamente (*Ho y col., 1995, Wei y col., 1995*), así como la cantidad de virus atrapada en los tejidos linfáticos (*Haase y col., 1996*). Los niveles de carga viral de los pacientes de este estudio disminuyeron de modo significativo en los dos grupos de pacientes definidos por un recuento basal mayor o menor de 200 CD4/ $\mu$ l, reducción que fue acompañada por una reducción de la activación crónica. Por ello, se puede concluir que la terapia antirretroviral HAART es capaz de disminuir significativamente los niveles de activación crónica en los pacientes infectados por VIH, incluso entre aquellos con un mayor grado de inmunodeficiencia.

Las implicaciones de esta desactivación para la clínica de los pacientes son importantes, pues la activación crónica inducida por el virus parece tener un papel activo en la patogénesis de la infección por VIH. En este sentido se ha descrito que el nivel de  $\beta$ 2-microglobulina es un marcador de progresión a SIDA tan potente como el recuento de linfocitos T CD4, e independiente de este. Esto podría ser debido a que el virus toma ventaja de la activación celular para su expresión y para establecer nuevas infecciones. El virus necesita que la célula esté activada para integrarse en el cromosoma celular, y la posterior expresión de su genoma depende de factores de transcripción que solo son plenamente funcionales en células activadas. En este sentido se ha descrito que el TNF puede favorecer la expresión del genoma viral, lo que podría provocar un fenómeno de retro-alimentación positiva con la expresión del virus. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, no se han detectado consistentemente niveles elevados de TNF en el suero en otros estudios, pero si de receptores solubles de TNF. Esta discrepancia podría ser debida a una menor estabilidad en el suero del TNF que de sus receptores solubles.

Simultáneamente a la desactivación del sistema inmune los pacientes mostraron un aumento significativo del recuento de linfocito T CD4 en sangre periférica, fenómenos que pudieran estar relacionados por dos mecanismos: entre los efectos deletéreos de la activación crónica puede estar la inducción de la apoptosis en las células. Se ha descrito un

alto grado de apoptosis en ganglios linfáticos y linfocitos de sangre periférica en pacientes infectados por VIH, que afectaba a varias subpoblaciones linfocitarias, y que pudiera estar relacionada con el grado de activación del sistema inmune. La reducción en grado de activación y apoptosis podría inducir un aumento del número de linfocitos T CD4 tras el HAART. Adicionalmente, el aumento de linfocitos tras el HAART podría ser un fenómeno de redistribución de células atrapadas en los ganglios linfáticos. Los ganglios son el lugar de inicio de la respuesta inmune específica, donde los antígenos son puestos en contacto con los linfocitos. El aumento de la activación crónica puede provocar una retención de celular que luego son liberadas al relajarse (*Bucy y col.*).

Las terapias antirretrovirales presentes con anterioridad a la disponibilidad del HAART no fueron capaces de lograr estos niveles de desactivación del sistema inmune, probablemente debido a que no eran capaces de inhibir totalmente la replicación del virus.

## **2. REPOBLACIÓN DE LINFOCITOS T VÍRGENES INDUCIDA POR ANTIRRETROVIRALES**

El objetivo de este estudio fue analizar si la función tímica contribuye a la repoblación de linfocitos T periféricos que se produce en los pacientes seropositivos que inician un tratamiento antirretroviral. Previamente, se ha demostrado que en ratones con inmunodeficiencia existen dos mecanismos de generación de linfocitos T. En los animales que poseen un timo funcional, la recuperación se produce preferentemente a través de un proceso de diferenciación tímica, que produce mayoritariamente células de fenotipo virgen. Por el contrario, en ratones que carecen del timo, la repoblación se produce por división de células maduras (proceso conocido como expansión periférica), lo que origina mayoritariamente células memoria (*Mackall y col.*). Este modelo animal de repoblación es similar a las características de la recuperación de linfocitos T tras su eliminación por quimioterapia en humanos, donde la reaparición de linfocitos T vírgenes depende de la edad, ocurriendo preferentemente en niños (*Mackall y col.*), pero no si carecen de timo (*Heitger y col., 1997*). Por ello, se puede considerar a la reaparición de linfocitos T vírgenes como un marcador de función tímica.

Nuestro primer objetivo fue definir los marcadores más adecuados para la identificación de linfocitos T virgen y memoria en los pacientes seropositivos. Tradicionalmente, se han usado las isoformas del marcador de membrana CD45R de alto (CD45RA) y bajo (CD45RO) peso molecular para definir las células T vírgenes y memoria, respectivamente.

Sin embargo, recientemente se ha postulado que este marcador por sí solo resulta insuficiente para definir los linfocitos T CD8 vírgenes en general, y los CD4 vírgenes en sujetos infectados por VIH, en particular. Según esto, para la adecuada definición del fenotipo virgen se debe incluir la expresión de marcadores adicionales, tales como CD11a o CD62L. Por ello, se realizó un estudio preliminar de la coexpresión con el marcador CD45RA de estos dos marcadores propuestos, en los linfocitos T CD4 y CD8 criopreservados de pacientes infectados por VIH.

### 2.1 Elección de marcadores de fenotipo virgen en linfocitos T de pacientes VIH<sup>+</sup>

El análisis de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> criopreservados mostró que todos los pacientes analizados presentaban una expresión bimodal de los marcadores CD62L y CD11a. De acuerdo con esto, *Okumura y col.* han demostrado que también los linfocitos CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> de donantes sanos tienen una expresión bimodal del marcador CD11a, y que la proporción relativa de las subpoblaciones CD11a<sup>low</sup> y CD11a<sup>bright</sup> varía con la edad, desde un 9% de células CD11a<sup>bright</sup> en un sujeto de 14 años hasta un 95% en otro de 79 años. En general, el porcentaje de células CD11a<sup>bright</sup> en las CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> mostró una correlación directa con la edad, que fue estadísticamente significativa. Por otro lado, *Hamann y col.* han analizado las propiedades de las células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, demostrando que existen dos subpoblaciones, una de las cuales carece de CD62L y CD27, expresa niveles altos de CD11a, posee gránulos con granzima B y perforina, así como actividad citotóxica y producción de IFN- $\gamma$  y TNF en ensayos *in vitro*. Por último, *Rabin y col.* han demostrado que las células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> son también CD11a<sup>low</sup>, y que presentan un mayor flujo de Ca<sup>++</sup>, una mayor tasa proliferación y una menor producción de ARNm de citoquinas en respuesta a la activación que la subpoblación CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. Todos estos datos estarían de acuerdo con considerar que las CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> se componen de dos poblaciones fenotípica y funcionalmente diferentes, una subpoblación CD11a<sup>low</sup> de células vírgenes, y otra de células efectoras CD11a<sup>bright</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, ambas poblaciones están presentes en los pacientes VIH analizados, por lo que es necesario el uso de un marcador adicional al CD45RA para la adecuada definición de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes.

Al igual que en el caso de los linfocitos T CD8, el criterio de coexpresión de CD45RA y CD62L en los CD4 vírgenes ha sido ampliamente incorporado para el estudio de la repoblación en pacientes seropositivos a partir de la observación de que un elevado porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> carecen de CD62L en estos individuos (*Rabin y*

col.). Los resultados de nuestro estudio confirmaron que la población  $CD4^+CD45RA^+$  de los pacientes seropositivos presentaba una expresión bimodal del CD62L. Sin embargo, la expresión de CD11a resultó ser homogénea, a diferencia del caso de los linfocitos T  $CD8^+CD45RA^+$ . Ello planteó la duda sobre la naturaleza de la población  $CD4^+CD45RA^+CD62L^-$ . En primer lugar, la existencia de una heterogeneidad funcional además de fenotípica dentro de las  $CD4^+CD45RA^+$  no ha sido aún demostrada, ni en sujetos sanos ni en infectados por VIH, hasta nuestro conocimiento. Okumura y col. demostraron que la expresión de CD11a es homogénea entre las  $CD4^+CD45RA^+$ , y que no se produce un aumento del porcentaje de células  $CD11a^{bright}$  con la edad, lo que iría en contra de una acumulación de linfocitos no vírgenes  $CD11a^{bright}$  entre las  $CD4^+CD45RA^+$ . Además, no existen análisis funcionales de las dos poblaciones  $CD4^+CD45RA^+$  definidas por la expresión de CD62L. Es por ello por lo que surgen dudas sobre la interpretación de la naturaleza de estas células  $CD4^+CD45RA^+CD62L^-$ .

Entre las causas de la falta de reconocimiento de la molécula CD62L por sus anticuerpos específicos están una carencia de dicha molécula en la membrana, como ocurre probablemente en el caso de los linfocitos T memoria  $CD4^+CD45RO^+CD62L^-$ , o bien un fenómeno de *shedding*, por el cual la porción extracelular de la proteína es escindida por una proteasa, perdiéndose así el antígeno reconocido por el anticuerpo. Este fenómeno de *shedding* ocurre naturalmente en individuos sanos como parte del proceso de extravasación de linfocitos vírgenes en las vénulas de endotelio alto. Sin embargo, la expresión de CD62L en las células vírgenes debe ser recuperada rápidamente, pues el porcentaje de células  $CD4^+CD45RA^+CD62L^-$  en donantes sanos es muy bajo. *In vitro*, este fenómeno de *shedding* puede ser provocado por una variedad de estímulos, entre los que se encuentra la activación de las células a través del complejo TCR-CD3 o por ésteres de forbol, tanto en PBMC como en la línea celular Jurkat. Por último, se ha descrito que el ATP extracelular puede inducir la pérdida del CD62L en menos de 5 minutos en PBMC. Esta pérdida de CD62L *in vitro* demostró ser reversible, recuperando las células su expresión al retirar el estímulo que provocó su pérdida.

En los resultados presentados el análisis de la expresión de CD62L en la línea celular Jurkat demostró que este marcador puede ser muy lábil, y que es alterado como consecuencia de la criopreservación de células de esta línea celular. Esto sugiere que quizás los linfocitos  $CD4^+CD45RA^+CD62L^-$  son realmente células vírgenes, a pesar de la indudable alteración inducida por el VIH en la expresión de CD62L. Autran y col. han

demostrado que antes del tratamiento antirretroviral los pacientes infectados por el VIH presentan un elevado porcentaje de linfocitos que carece de CD62L entre los CD4 vírgenes, y que el tratamiento antirretroviral "normaliza" esta situación reduciendo el porcentaje de esta población de células vírgenes alteradas, que es minoritaria en los sujetos no infectados. El resultado de esta normalización es un aumento de las células CD4 vírgenes de fenotipo CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, lo que puede ser erróneamente interpretado como una producción real de células CD4 vírgenes por el timo, cuando en realidad pudiera ser debido a una "normalización del fenotipo" de las células que carecían de CD62L. Todo ello nos hizo decidirnos por el uso de los marcadores tradicionales CD45RA/CD45RO para la definición de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes.

## 2.2 Pérdida progresiva de linfocitos T4N y T8N en la progresión del VIH

Una vez establecido el fenotipo de las células virgen y memoria en linfocitos criopreservados, se analizaron las alteraciones producidas por la infección por VIH en las subpoblaciones virgen y memoria de los linfocitos T CD4 y CD8. Para ello se analizó la relación entre el recuento de CD4 totales, como indicador de la progresión de la enfermedad, y las subpoblaciones linfocitarias en la semana cero, antes del inicio de la terapia antirretroviral.

En el grupo de los niños, se encontró que el número de linfocitos T CD4 vírgenes correlacionaba con el de CD4 totales, pero también con el recuento de linfocitos T CD8 vírgenes. Del mismo modo, en el grupo de adultos también estaba presente la correlación basal entre CD4 totales, CD4 vírgenes y CD8 vírgenes. Esta correlación entre el número de linfocitos T CD4 totales y vírgenes estaría de acuerdo con los datos publicados de un análisis transversal de pacientes sin tratamiento, que demostró una pérdida preferencial de linfocitos T CD4 vírgenes, y también CD8 vírgenes (definidos como CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), a pesar del aumento en el número total de CD8, en un grupo de niños (*Rabin y col.*) y de adultos (*Roederer y col.*). Del mismo modo, se ha descrito una reducción en el porcentaje de linfocitos CD45RA<sup>+</sup> en los linfocitos CD4 de un grupo de pacientes que tras iniciar un ensayo de eficacia de monoterapia con zidovudina con más de 500 CD4 progresaron a menos de 200 linfocitos CD4 por microlitro durante el estudio.

Esta pérdida de linfocitos T vírgenes resulta sorprendente al considerar que el VIH requiere para la infección productiva de una célula que esta se encuentre activada, lo que podría volver más susceptibles a las células CD4 memoria que a las vírgenes. Más extraña resulta la pérdida de CD8 vírgenes, que carecen del receptor de entrada del VIH. La explicación de esta pérdida pudiera ser una reducción en la producción de células vírgenes por afectación del timo, o por mecanismos que aceleren la destrucción de linfocitos vírgenes.

Respecto a la inhibición de la producción, se ha descrito que el VIH es capaz de infectar el timo e impedir así la producción de nuevos linfocitos vírgenes. *Bonyhadi* ha demostrado en un modelo de ratón SCID-hu que la inyección intratímica de aislados primarios de VIH permite la replicación activa del virus, por la detección del antígeno viral p24, y que ello va asociado a una deplección muy grave de la subpoblación mayoritaria de timocitos, de fenotipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP, del inglés *double positive*). Este modelo animal de inhibición de la función tímica por efecto del VIH está de acuerdo con los datos obtenidos del análisis de



timos humanos provenientes de fetos abortados de madres seropositivas, y de biopsias de timo en niños infectados. Sin embargo, y aunque la inhibición de la función tímica pudiera ser responsable de la progresiva pérdida de linfocitos vírgenes, sobre todo en el grupo de los niños, la simple falta de producción no puede por si sola explicar la pérdida progresiva, pues los linfocitos periféricos pueden mantenerse a si mismos sin más aportes del timo, tal como demuestra los efectos menores que tienen la timectomía en humanos, incluso en niños de corta edad. Por ello, debe existir adicionalmente un mecanismo que consuma activamente la reserva de linfocitos T vírgenes. Así, se cree que la presencia del VIH induce una conversión acelerada de linfocitos vírgenes en memoria, quizás como consecuencia del estado de activación crónica inducido por el VIH, de un modo parecido al observado en otras alteraciones del sistema inmune, de naturaleza crónica o inflamatoria.

Las consecuencias que esta afectación de la subpoblación de linfocitos T vírgenes puede tener para la historia natural de la infección por el VIH son muy variadas. En primer lugar, los linfocitos T vírgenes son necesarios para el desarrollo de nuevas respuestas inmunes. Si bien la mayoría de las enfermedades oportunistas son provocados por patógenos universales a los que el individuo ha sido ya expuesto, y que por tanto la capacidad de respuesta debe residir en linfocitos memoria, muchas otras respuestas inmunes son primarias, y dependen del mantenimiento de una suficiente diversidad del repertorio inmune para su desarrollo. El mismo VIH podría estar en este caso realizando una estrategia de evasión del sistema inmune basada en el cambio de sus determinantes antigénicos, para escapar de la potente respuesta CTL generada contra él (*Pantaleo y col., 1997*).

### 2.3 Cambios en las subpoblaciones virgen y memoria con antirretrovirales

El siguiente objetivo de este estudio fue analizar las características de la repoblación de linfocitos T en respuesta al tratamiento antirretroviral. En el caso de que esta repoblación incluyese una nueva diferenciación intratímica de células T, este proceso debería ser más evidente en los pacientes pediátricos, tal como ocurre en la recuperación del tratamiento con quimioterapia para el cáncer (*Mackall y col.*). Por ello, se analizaron las cinéticas de repoblación de linfocitos T vírgenes y memoria en un grupo de adultos y en otro de niños, en los que la función tímica debería estar más conservada.

Una posible limitación a tener en cuenta era la diversidad de los tratamientos antirretrovirales de los niños incluidos en este estudio. A diferencia de los adultos, que uniformemente iniciaron un tratamiento HAART sin haber tenido experiencia previa con antirretrovirales, algunos de los niños o bien tenía experiencia previa con antirretrovirales, o bien sus tratamientos no fueron HAART, sino terapia combinada de análogos de nucleósidos. Esto es debido a la menor disponibilidad de niños, así como a la mayor dificultad de administración de antirretrovirales a este tipo de pacientes, que impide a veces la receta de regímenes HAART. Estos tratamientos menos potentes podría afectar al efectivo control de la replicación viral, y reducir así sus posibilidades de repoblación. De hecho, el control de la carga viral fue mucho más efectivo en los adultos, presentando los niños un mayor número de casos de carga viral detectable durante el tratamiento, así como una reducción de la carga viral menor que los adultos. Sin embargo, la ganancia de CD4 fue mucho mayor en el grupo de los niños. Esta recuperación de linfocitos CD4 a pesar de un control de la carga viral incompleto ha sido observado previamente, pues se ha comunicado que un grupo de niños con fracaso en el control de la carga viral lograron de todos modos incrementos significativos de todas las subpoblaciones CD4 (*Sleasman y col.*, *Essajee y col.*). Parece pues que el control efectivo de la carga viral no es absolutamente necesario para que ocurra una repoblación de linfocitos T, al menos entre los niños. Sin embargo, y a pesar de la recuperación de linfocitos T, la replicación activa del virus en presencia de antirretrovirales puede acelerar la aparición de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales usados, lo que puede favorecer su pérdida de efectividad, con el consiguiente aumento de la carga viral y del riesgo de progresión a SIDA.

Teniendo en cuenta estas posibles limitaciones, el análisis de la repoblación de linfocitos T de niños y adultos mostró que el número de células vírgenes aumento significativamente en ambos grupos, pero con características diferentes. Así, el grupo de

niños experimentó un gran incremento de células vírgenes, tanto entre las CD4 como entre las CD8, que ocurrió homogéneamente para todos ellos en el primer punto analizado ( $T_1$ , aproximadamente 12 semanas). En el caso de los adultos, también se produjo un aumento significativo de los linfocitos vírgenes CD4 y CD8, si bien el incremento neto fue menor, y variable en el tiempo: la mitad de los pacientes presentó un aumento de células vírgenes en el primer punto analizado (definido como un incremento de al menos un 10% del valor basal), mientras que el resto retrasó la ganancia de linfocitos T vírgenes hasta el punto  $T_2$  (semana 24 del tratamiento HAART), o no aumentó en ningún punto analizado (cuatro pacientes). Por otro lado, el recuento de células memoria de adultos y niños tuvo un incremento significativo en el primer punto analizado ( $T_1$ ), sin más aumentos posteriores en  $T_2$ .

Estudios previos sobre reconstitución de linfocitos T en sangre periférica de pacientes adultos han demostrado que esta sigue una cinética bifásica, y que la repoblación inicial se debe fundamentalmente a la aparición de células memoria. Los linfocitos T memoria experimentaron un aumento rápido durante las primeras semanas, llegando posteriormente a un equilibrio, lo que se interpreta como una redistribución de linfocitos T memoria atrapados en los ganglios, liberados tras el control de la replicación viral (*Bucy y col., Connors y col.*). A favor de este modelo están los resultados de este estudio, así como los incrementos transitorios observados en otras subpoblaciones linfocitarias a priori no infectadas por el virus, como los linfocitos B o los linfocitos T CD8 memoria, descritos previamente.

Sin embargo, existe mayor discrepancia sobre el origen de los linfocitos vírgenes. Tras el tratamiento antirretroviral, la recuperación de linfocitos T CD4 vírgenes en adultos se ha descrito que ocurre de un modo más retrasado que las células memoria, y es de menor cuantía (*Aufran y col.*). Este aumento de células vírgenes se ha explicado por una producción tardía de células por el timo. Sin embargo, los cambios de células vírgenes detectado por *Aufran y col.* se evaluaron por los cambios en la expresión de CD62L en linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>RA<sup>+</sup> criopreservados, lo que a la luz de nuestros datos podría ser debido adicionalmente a la re-expresión de CD62L por células vírgenes previamente presentes, y no solo por una nueva producción de células por el timo.

Los datos de nuestro estudio estarían de acuerdo con la posibilidad de formación de las células vírgenes en el timo durante la reconstitución inmune de pacientes seropositivos. En primer lugar, el grupo de los niños mostró un incremento de células vírgenes más precoz y

de mayor intensidad que los adultos, lo que podría ser debido a un timo más conservado. El papel activo del timo en la repoblación de células vírgenes en los niños ha sido previamente establecido por el análisis de la reconstitución inmune tras la quimioterapia asociada al cáncer, y en el marco de la infección por VIH hay también algunas evidencias en este sentido. *Cohen-Stuart y col.* han demostrado recuperación de linfocitos T CD4 vírgenes en los niños, especialmente entre los de menos de tres años. Sin embargo, nosotros no hemos observado diferencias significativas en la recuperación de linfocitos entre los niños de acuerdo a esta clasificación por la edad, lo que pudiera ser debido al bajo número de pacientes analizados, o quizás a que las alteraciones en la composición de linfocitos T vírgenes y memoria de controles sanos no se inician hasta la adolescencia, por ello no debería haber efecto de la edad en niños pre-adolescentes.

De un modo similar a lo que sucede en los niños se puede asumir que la producción de células vírgenes en los adultos es indicativa de algún grado de función tímica presente. A favor de este mecanismo estarían los cambios sincronizados en las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes en los adultos. Debido a la naturaleza estocástica de la generación de las especificidades reconocidas por los TCR en el proceso de diferenciación tímica, no es posible prever si el TCR generado reconocerá moléculas CD4 o CD8 como correceptores, por lo que resulta imposible producir exclusivamente uno u otro tipo de RTE. De este modo, la generación de linfocitos T CD4 vírgenes en respuesta a la grave deplección presente basalmente debería ir acompañada de una producción similar de linfocitos T CD8 vírgenes, como así ocurre. La posibilidad de una nueva diferenciación tímica en el contexto de la inmunosupresión inducida por el VIH es muy prometedora, pues a priori una recapitulación de ontogenia del sistema inmune debería ser mucho más eficaz en la reconstitución inmune que la simple expansión periférica de linfocitos maduros, que se ha demostrado tienen limitaciones en la funcionalidad y número final de las células así generadas.

Como conclusión, los resultados de este estudio muestran que a pesar de la capacidad de infección del timo por parte del VIH, tras el inicio del tratamiento antirretroviral existen evidencias de que la repoblación de linfocitos puede incluir la diferenciación de nuevo de precursores en el timo. Esto es especialmente evidente entre los niños, que tuvieron aumentos tempranos y potentes de las subpoblaciones T vírgenes CD4 y CD8, incluso sin un total control de la carga viral. Sin embargo, también parece ser posible un cierto grado de funcionalidad tímica entre los adultos, si bien parece que puede estar retrasada o no

producirse en algunos pacientes. Esta posibilidad de un cierto grado de función tímica en los adultos debería ser estudiada con marcadores más específicos de función tímica, que la simple enumeración de linfocitos vírgenes.

### 3. EVIDENCIAS DE FUNCIÓN TÍMICA EN PACIENTES BAJO HAART

El estudio anterior sobre la función tímica en adultos mostró una heterogeneidad en la respuesta de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes en los pacientes adultos. En algunos pacientes se detectaron aumentos de linfocitos T vírgenes, lo que sugería algún grado de función tímica conservada, a pesar de estar infectados por el VIH y de la progresiva involución del timo con la edad descrita en los sujetos no infectados. El siguiente estudio se diseñó para analizar mediante marcadores adicionales a la simple enumeración de células con fenotipo de linfocito virgen la función tímica presente basalmente y su respuesta al tratamiento. Los nuevos marcadores utilizados fueron la cuantificación de círculos de excisión de reordenamiento de ADN (TRECs, del inglés *T cell rearrangement excision circles*), y el volumen de la glándula tímica, determinada por tomografía axial computerizada.

#### 3.1 Situación basal

El primer aspecto analizado fue la correlación que se daba entre los diferentes marcadores de función tímica utilizados. En la semana cero, antes del tratamiento antirretroviral, el volumen tímico, la fracción de TRECs por millón de PBMC y la edad de los sujetos correlacionaban significativamente entre sí. El análisis multivariante En un trabajo anterior, y utilizando una medida del tejido tímico basada en un índice entre 0 y 5 asignado según la cantidad observada por el radiólogo, se ha descrito que existe una relación estadísticamente significativa entre la edad de los sujetos y la cantidad de tejido tímico existente, tanto en sujetos infectados por el VIH como en controles no infectados (*McCune 1998*). Esta relación entre la masa tímica y la edad estaría de acuerdo con la progresiva involución del timo asociada a la edad tradicionalmente descrita, pero resulta sorprendente que se mantenga incluso entre los sujetos infectados por el VIH, en los que se podría pensar que el tejido tímico estaría involucionado como consecuencia de la capacidad infectiva del VIH sobre el timo (*Bonyhadi*). Sin embargo, la presencia del VIH no anuló la correlación con la edad. Por el contrario, se describió que los pacientes de más edad tenían comparativamente un índice de tejido tímico mayor que sus correspondientes controles de igual edad no infectados. Esto ha sido interpretado como un posible efecto

beneficioso de un índice de timo alto, que pudiera proteger a los individuos infectados aumentando la supervivencia.

Antes del tratamiento antirretroviral se detectó también una correlación entre los niveles de TRECs y la edad de los individuos. Estudios anteriores sobre los cambios de la proporción de TRECs por millón de células PBMC o subpoblaciones purificadas de linfocitos T han demostrado que en sujetos sanos existe una correlación significativa con la edad. Los individuos de más edad tuvieron niveles de TRECs menores, pero todavía detectables, lo que sugiere que a pesar de la involución del timo este presenta alguna funcionalidad incluso en los individuos de más edad. Sin embargo, se demostró que la infección por VIH reducía significativamente los niveles de TRECs en los sujetos infectados, respecto a controles de la misma edad. Aunque inicialmente la reducción en los niveles de TRECs se interpretó como efecto de la inhibición del VIH sobre la función tímica, el análisis de los efectos del VIH sobre la tasa de proliferación de los linfocitos sugirió que la pérdida de TRECs está más relacionada con el aumento de la proliferación celular inducido por el VIH que con una simple pérdida de la función tímica. *Hezemberg y col.* compararon los niveles de TRECs entre controles sanos, sujetos infectados por VIH, y sujetos no infectados por VIH pero con una activación crónica del sistema inmune, y encontraron una reducción comparable de TRECs en los sujetos no infectados, pero con activación crónica del SI, que en los pacientes infectados por VIH. Los modelos matemáticos presentados sugerían que una simple anulación de la producción del timo no puede reducir tan drásticamente los niveles de TRECs, mientras que un aumento en la proliferación de las células si pueda.

En este trabajo se describe adicionalmente una correlación entre volumen tímico y los TRECs basales, y entre el número de TRECs y el número de linfocitos T vírgenes. Este es el primer estudio que analiza simultáneamente la relación entre el tejido tímico y los niveles de TRECs en pacientes sin tratamiento antirretroviral. Aunque el número de pacientes analizados fue pequeño, la relación estadísticamente significativa entre ambas variables sugiere que el volumen tímico medido está relacionado con la funcionalidad de este. Cabe suponer que a pesar de los efectos de la infección VIH reduciendo el número de TRECs, algunos pacientes podrían conservar algún grado de función tímica, proporcional a su tamaño medido, que produce TRECs en respuesta a la destrucción de estos por el VIH. Aunque casi con toda seguridad no existe

lo que sugiere que dichas medidas son funcionales. Adicionalmente, se mostró una correlación significativa entre el número de linfocitos T vírgenes que conservaba el individuo y el número de células portadoras de TRECs en sangre periférica, no descrita anteriormente. Esta correlación fue directa, pero no lineal. El número de TRECs disminuía más rápidamente que el de células T vírgenes. Este menor número de TRECs en los pacientes con menos linfocitos T vírgenes ha sido descrita con otra aproximación por *Hezemberg y col.*, al demostrar que la fracción de TRECs contenida en poblaciones purificadas de células CD4+CD45RA+ es menor en aquellos sujetos infectados por VIH con un menor número total de células vírgenes por microlitro. La explicación de esta pérdida es posiblemente que la infección por VIH aumenta significativamente el grado de proliferación de los linfocitos T vírgenes, que se dividen más, y así diluyen el número de TRECs. *Haazenberg y col.* ha demostrado este aumento de la tasa de proliferación en los linfocitos vírgenes de pacientes VIH. Probablemente esta proliferación de linfocitos vírgenes se debe a un mantenimiento homeostático de su número, en respuesta a su progresiva disminución, conservando pues su fenotipo de célula virgen, a diferencia de la proliferación en respuesta a una activación inmune, que implica el cambio a un fenotipo de célula memoria/efectora.

### 3.2 Efecto del tratamiento antirretroviral

Tras el inicio de la terapia, el grupo de pacientes analizados mostró un aumento significativo de todas las variables de función tímica analizadas, tales como el número de linfocitos T vírgenes CD4 y CD8, el número de TRECs por microlitro en sangre periférica, y el volumen tímico estimado por TAC. Estos aumentos fueron significativos desde el primer punto analizado, la semana 12 de tratamiento. Uno de los pacientes estaba infectado por VIH-2. El tratamiento antirretroviral se diseñó de acuerdo a este hecho, para que fuera efectivo sobre VIH-2. Ambas infecciones están muy relacionadas, y si bien la progresión a SIDA es más lenta en los VIH-2, las alteraciones inmunes son similares, y el paciente estudiado presentaba un estadio C. Los aumentos de TRECs observados estarían de acuerdo con datos previamente publicados de incremento en la proporción de TRECs tras el inicio del HAART, pero sin las limitaciones derivadas del análisis en la fracción de células TREC<sup>+</sup> de esos estudios, que pueden ser interpretadas alternativamente por efecto de la reducción de la dilución de los TRECs por proliferación celular (*Hezenberg*).

Resultados de otros autores y de este estudio muestran que el HAART induce una desactivación generalizada del sistema inmune, lo que puede provocar la eliminación de linfocitos T activados. Estos linfocitos se ha derivado por expansión periférica de células vírgenes, y en ese proceso han perdido los TRECs por dilución. Así, la eliminación de estas células puede provocar un aumento en el porcentaje de células TREC<sup>+</sup> sin que haya necesariamente una producción real en el timo. Por el contrario, el aumento en el número absoluto de TRECs en sangre periférica indica una entrada neta de células con TRECs en la sangre periférica. En este sentido, el análisis de los incrementos de células vírgenes y TRECs en la semana 12 mostró una correlación significativa. Aunque no puede descartarse que este aumento de TRECs en sangre periférica sea debido a una redistribución de linfocitos T vírgenes TREC<sup>+</sup> atrapados en los ganglios, los aumentos simultáneos de volumen tímico detectados estarían de acuerdo con un aumento de la función tímica, que además de aumentar el tamaño del timo, produciría la salida de emigrantes recientes del timo (o RTE, del inglés *Recent Thymic Emigrants*). Adicionalmente, el mecanismo de redistribución de linfocitos T vírgenes debería ser independiente de la edad o de la existencia o no de tejido tímico antes del inicio del tratamiento, y sin embargo, los dos pacientes de más edad de la cohorte, y que carecían de silueta tímica antes del tratamiento, no aumentaron ni el número de linfocitos T vírgenes ni los TRECs durante el seguimiento.



Un análisis más detallado de las respuestas de los pacientes mostró una tendencia a aumentar los TRECs y el volumen tímico más evidente entre los que presentaban un menor número de TRECs basales. Así, al dividir los pacientes en dos grupos iguales de acuerdo a la mediana, el grupo que presentaba los valores basales de TRECs menores mostró un incremento significativo de volumen tímico y de TRECs a lo largo del seguimiento, mientras que el grupo con un recuento basal de TRECs más alto no varió significativamente esos parámetros. Resultados similares han sido comunicados por *Zhang y col.*, en un grupo más reducido de pacientes, en lo que un menor número de TRECs se relacionó con mayores aumentos tras la terapia. En este estudio se demuestra además un aumento simultáneo del timo, lo que sugiere que los aumentos de timo son funcionales, al ir acompañados de mayores niveles de TRECs.

## **Conclusiones**

De los resultados expuestos anteriormente en este trabajo se deducen las siguientes conclusiones:

- El tratamiento HAART induce una rápida reducción de la expresión de HLA-DR,  $\beta_2$ -microglobulina, TNF y sTNF-RII en sujetos infectados por el VIH, lo que indica una reducción de la activación crónica inmune asociada a dicha infección.
- Antes del tratamiento, los pacientes con SIDA presentaron mayor carga viral y mayores niveles de activación inmune que el resto de pacientes. Sin embargo, el tratamiento HAART logró una reducción significativa de dichos niveles tanto en el grupo de pacientes con SIDA como en el grupo menos inmunodeprimido.
- El uso del marcador CD62L como complementario a la expresión de las isoformas de CD45R para la definición de los linfocitos T CD4 y CD8 vírgenes no es adecuado cuando se analizan linfocitos conservados en nitrógeno líquido, por el fenómeno de *shedding* que sufre dicho marcador.
- Los linfocitos criopreservados de los pacientes infectados por el VIH mostraron un patrón de expresión normal de CD11a. La expresión bimodal de dicho marcador en los linfocitos CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> exige su determinación para diferenciar entre linfocitos T CD8 vírgenes y activados. Por el contrario, su expresión homogénea entre los CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> hace más apropiado el uso de las isoformas CD45RA y CD45RO para diferenciar entre linfocitos T CD4 vírgenes y activados/memoria.
- Las características de la repoblación de linfocitos T vírgenes CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> del grupo de niños analizados fueron diferentes de las del grupo de pacientes adultos. A pesar de que el control de la replicación viral en los niños fue menor que en los adultos, los niños presentaron un aumento neto de linfocitos T vírgenes tras el HAART mayor y homogéneamente temprano. Por el contrario, un 50% de los adultos no habían aumentado todavía el número de linfocitos T vírgenes en el primer punto analizado.
- En el grupo de adultos, los cambios en el número de linfocitos T vírgenes CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la semana 12 de tratamiento fueron coordinados, lo que sugiere un posible origen común para ambos, probablemente por diferenciación intratímica.
- Se ha puesto a punto en nuestro laboratorio la cuantificación de TRECs en sangre periférica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

- Antes del tratamiento, el volumen radiológico de timo estuvo correlacionado con los niveles de TRECs en sangre periférica, lo que sugiere que en algunos pacientes el timo podría estar contribuyendo a mantener el *pool* de linfocitos T vírgenes a pesar de la infección por el VIH. Alternativamente, la expansión periférica de linfocitos T vírgenes podría contribuir también a mantener su número, como sugiere la relación exponencial entre el número de linfocitos T vírgenes y de TRECs que existía antes del tratamiento.
- El tratamiento HAART induce un aumento del número de linfocitos T con fenotipo virgen y portadores de TRECs, así como un aumento del volumen radiológico del timo, que fue significativo desde la semana 12 de tratamiento.
- Los aumentos netos de la semana 12 de tratamiento de linfocitos T con fenotipo virgen y de TRECs en sangre periférica estuvieron correlacionados significativamente. Por otro lado, el grupo de pacientes que presentaba valores basales de TRECs por debajo de la mediana (2.92 TRECs/ $\mu$ l) tuvieron aumentos significativos de volumen tímico, linfocitos T vírgenes y recuento de TRECs en sangre periférica, mientras que el grupo de pacientes con valores basales de TRECs superiores a la mediana no tuvieron cambios significativos en dichos parámetros de función tímica. Esto sugiere que un estado de carencia de TRECs asociado a la replicación del VIH puede inducir una reactivación de la función tímica, incluso en pacientes de hasta 50 años de edad.

## **Bibliografía**

**Aukrust P**, Muller F, Lien E, Nordoy I, Liabakk NB, Kvale D, Espevik T, Froland SS. Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure. *J Infect Dis.* 1999 179(1):74-82.

**Autran B**, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science.* 1997 277(5322):112-6.

**Bauer HM**, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA.* 1991 265(4):472-7.

**Bonhoeffer S**, Mohri H, Ho D, Perelson AS. Quantification of cell turnover kinetics using 5-bromo-2'-deoxyuridine. *J Immunol.* 2000 164(10):5049-54.

**Bonyhadi ML**, Rabin L, Salimi S, Brown DA, Kosek J, McCune JM, Kaneshima H. HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature.* 1993 363(6431):728-32.

**Bucy RP**, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, Mitsuyasu RT, Kilby JM. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest.* 1999 103(10):1391-8.

**Butcher EC**, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996 Apr 5;272(5258):60-6.

**Centres for Disease Control.** 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1992 41(RR-17):1-19.

**Choyke PL**, Zeman RK, Gootenberg JE, Greenberg JN, Hoffer F, Frank JA. Thymic atrophy and regrowth in response to chemotherapy: CT evaluation. *AJR Am J Roentgenol.* 1987 149(2):269-72.

**Coffin JM.** HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 1995 267(5197):483-9.

**Cohen Stuart JW**, Slieker WA, Rijkers GT, Noest A, Boucher CA, Suur MH, de Boer R, Geelen SP, Scherpbier HJ, Hartwig NG, Hooijkaas H, Roos MT, de Graeff-Meeder B, de Groot R. Early recovery of CD4+ T lymphocytes in children on highly active antiretroviral therapy. Dutch study group for children with HIV infections. *AIDS.* 1998 12(16):2155-9.

**Cossarizza A.** T-cell repertoire and HIV infection: facts and perspectives. *AIDS*. 1997 11(9):1075-88.

**Domingo E.** Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepatitis Reviews*. 1996 2(4):247-261.  
**Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA.** Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998 396(6712):690-5.

**Essajee SM, Kim M, Gonzalez C, Rigaud M, Kaul A, Chandwani S, Hoover W, Lawrence R, Spiegel H, Pollack H, Krasinski K, Borkowsky W.** Immunologic and virologic responses to HAART in severely immunocompromised HIV-1-infected children. *AIDS*. 1999 13(18):2523-32.

**Fernandez E, Vicente A, Zapata A, Brera B, Lozano JJ, Martinez C, Toribio ML.** Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production. *Blood*. 1994 83(11):3245-54.

**Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, et al.** The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987. 317(4):185-91.

**Fleury S, de Boer RJ, Rizzardi GP, Wolthers KC, Otto SA, Welbon CC, Graziosi C, Knabenhans C, Soudeyns H, Bart PA, Gallant S, Corpataux JM, Gillet M, Meylan P, Schnyder P, Meuwly JY, Spreen W, Glauser MP, Miedema F, Pantaleo G.** Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med*. 1998 4(7):794-801.

**Frissen PH, Weverling GJ, Endert E, Jansen J, Sauerwein HP, Lange JM.** Predictive value for survival of soluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 during zidovudine-containing treatment in symptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996 12(5):482-8.

**Gea-Banacloche JC, Clifford Lane H.** Immune reconstitution in HIV infection. *AIDS*. 1999;13 Suppl A:S25-38.

**Godfried MH, van der Poll T, Jansen J, Romijin JA, Schattenkerk JK, Endert E, van Deventer SJ, Sauerwein HP.** Soluble receptors for tumour necrosis factor: a putative marker of disease progression in HIV infection. *AIDS*. 1993 7(1):33-6.

**Gorochov G**, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, Karmochkine M, Raguin G, Autran B, Debre P. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med.* 1998 4(2):215-21.

**Gowda SD**, Stein BS, Mohaghehpour N, Benike CJ, Engleman EG. Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *J Immunol.* 1989 142(3):773-80.

**Grossman Z**, Herberman RB. T-cell homeostasis in HIV infection is neither failing nor blind: modified cell counts reflect an adaptive response of the host. *Nat Med.* 1997 3(5):486-90.

**Haase AT**, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, Cavert W, Gebhard K, Staskus K, Zhang ZQ, Dailey PJ, Balfour HH Jr, Erice A, Perelson AS. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science.* 1996. 274(5289):985-9.

**Hamann D**, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med.* 1997 186(9):1407-18.

**Harley CB**, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990. 345:458-60.

**Haug CJ**, Aukrust P, Lien E, Muller F, Espevik T, Froland SS. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS: immunopathogenic significance of an activated tumor necrosis factor system and depressed serum levels of 1,25 dihydroxyvitamin D. *J Infect Dis.* 1996 173(1):259-62.

**Haynes BF**, Hale LP, Weinhold KJ, Patel DD, Liao HX, Bressler PB, Jones DM, Demarest JF, Gebhard-Mitchell K, Haase AT, Bartlett JA. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1999 103(4):453-60.

**Hazenber MD**, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol.* 2000 1(4):285-9.



**Hazenberg MD**, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, Rinke de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med.* 2000 6(9):1036-42.

**Hazenberg MD**, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood.* 2000 95(1):249-55.

**Heitger A**, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D, Niederwieser D, Fink FM. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1997 90(2):850-7.

**Hellerstein M**, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med.* 1999 5(1):83-9.

**Hellerstein MK**, McCune JM. T cell turnover in HIV-1 disease. *Immunity.* 1997 7(5):583-9.

**Hengel RL**, Jones BM, Kennedy MS, Hubbard MR, McDougal JS. Markers of lymphocyte homing distinguish CD4 T cell subsets that turn over in response to HIV-1 infection in humans. *J Immunol.* 1999 163(6):3539-48.

**Ho DD**, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995 373(6510):123-6.

**Hong R**, Santosham M, Schulte-Wissermann H, Horowitz S, Hsu SH, Winkelstein JA. Reconstitution of B and T lymphocyte function in severe combined immunodeficiency disease after transplantation with thymic epithelium. *Lancet.* 1976 2(7998):1270-2.

**Jamieson GP**, Snook MB, Thurlow PJ, Wiley JS. Extracellular ATP causes of loss of L-selectin from human lymphocytes via occupancy of P2Z purinoceptors. *J Cell Physiol.* 1996 166(3):637-42.

**Joshi VV**, Oleske JM, Saad S, Gadol C, Connor E, Bobila R, Minnefor AB. Thymus biopsy in children with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 1986. 110(9):837-42.

**Levy JA**. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*. 1993. 57(1):183-289.

**McCune JM**, Hanley MB, Cesar D, Halvorsen R, Hoh R, Schmidt D, Wieder E, Deeks S, Siler S, Neese R, Hellerstein M. Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J Clin Invest*. 2000 105(5):R1-8.

**McCune JM**, Loftus R, Schmidt DK, Carroll P, Webster D, Swor-Yim LB, Francis IR, Gross BH, Grant RM. High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection. *J Clin Invest*. 1998 101(11):2301-8.

**Michie CA**, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 1992 360(6401):264-5.

**Mohri H**, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, Ho DD. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science*. 1998 279(5354):1223-7.

**Mosier DE**. HIV results in the frame. CD4+ cell turnover. *Nature*. 1995 375(6528):193-4

**Mullis K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

**Okumura M**, Fujii Y, Takeuchi Y, Inada K, Nakahara K, Matsuda H. Age-related accumulation of LFA-1high cells in a CD8+CD45RAhigh T cell population. *Eur J Immunol*. 1993 23(5):1057-63.

**Orenstein JM**, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science*. 1997 276(5320):1857-61.

**Pakker NG**, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PT. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med*. 1998 4(2):208-14.

**Pantaleo G**, Soudeyins H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher M, Cohen OJ, Denis F, Biddison WE, Sekaly RP, Fauci AS 12. Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 94(18):9848-53.

**Pantaleo G**, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, Fauci AS. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. 88(21):9838-42.**Papiernik M**, Brossard Y, Mulliez N, Roume J, Brechot C, Barin F, Goudeau A, Bach JF, Griscelli C, Henrion R, et al. Thymic abnormalities in fetuses aborted from human immunodeficiency virus type 1 seropositive women. *Pediatrics*. 1992. 89(2):297-301.

**Picker LJ**, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selection on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol*. 1993 Feb 1;150(3):1105-21.**Rabin RL**, Roederer M, Maldonado Y, Petru A, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Altered representation of naive and memory CD8 T cell subsets in HIV-infected children. *J Clin Invest*. 1995 95(5):2054-60.

**Rodes B**, Holguin A, Soriano V, Dourana M, Mansinho K, Antunes F, Gonzalez-Lahoz J. Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*. 2000 38(4):1370-4.

**Rosok BI**, Bostad L, Voltersvik P, Bjerknes R, Olofsson J, Asjo B, Brinchmann JE. Reduced CD4 cell counts in blood do not reflect CD4 cell depletion in tonsillar tissue in asymptomatic HIV-1 infection. *AIDS*. 1996 10(10):F35-8.

**Rubinstein P**, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 92(22):10119-22.

**Sachsenberg N**, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B, Perrin L. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med*. 1998 187(8):1295-303.

**Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 230(4732):1350-4.

**Sleasman JW**, Nelson RP, Goodenow MM, Wilfret D, Hutson A, Baseler M, Zuckerman J, Pizzo PA, Mueller BU. Immunoreconstitution after ritonavir therapy in children with human immunodeficiency virus infection involves multiple lymphocyte lineages. *J Pediatr.* 1999 134(5):597-606.

**Sprent J**, Tough D. HIV results in the frame. CD4<sup>+</sup> cell turnover. *Nature.* 1995 375(6528):194

**Stein DS**, Lyles RH, Graham NM, Tassoni CJ, Margolick JB, Phair JP, Rinaldo C, Detels R, Saah A, Bilello J. Predicting clinical progression or death in subjects with early-stage human immunodeficiency virus (HIV) infection: a comparative analysis of quantification of HIV RNA, soluble tumor necrosis factor type II receptors, neopterin, and beta2-microglobulin. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis.* 1997 176(5):1161-7.

**Verschuren MC**, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, Noordzij J, van Wering ER, van Dongen JJ. Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. *J Immunol.* 1997 158(3):1208-16.

**Vigano A**, Vella S, Saresella M, Vanzulli A, Bricalli D, Di Fabio S, Ferrante P, Andreotti M, Pirillo M, Dally LG, Clerici M, Principi N. Early immune reconstitution after potent antiretroviral therapy in HIV-infected children correlates with the increase in thymus volume. *AIDS.* 2000 14(3):251-61.

**Wain-Hobson S.** AIDS. Virological mayhem. *Nature.* 1995 373(6510):102.

**Walker RE**, Carter CS, Muul L, Natarajan V, Herpin BR, Leitman SF, Klein HG, Mullen CA, Metcalf JA, Baseler M, Falloon J, Davey RT Jr, Kovacs JA, Polis MA, Masur H, Blaese RM, Lane HC. Peripheral expansion of pre-existing mature T cells is an important means of CD4<sup>+</sup> T-cell regeneration HIV-infected adults. *Nat Med.* 1998 4(7):852-6.

**Wei X**, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995 373(6510):117-22.

**Wolthers KC**, Bea G, Wisman A, Otto SA, de Roda Husman AM, Schaft N, de Wolf F, Goudsmit J, Coutinho RA, van der Zee AG, Meyaard L, Miedema F. T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4<sup>+</sup> T cell turnover. *Science.* 1996 274(5292):1543-7.

**Zhang L**, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanicolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med.* 1999 190(5):725-32.

**Zhang ZQ**, Notermans DW, Sedgewick G, Cavert W, Wietgreffe S, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Boies L, Chen Z, Jenkins M, Mills R, McDade H, Goodwin C, Schuwirth CM, Danner SA, Haase AT. Kinetics of CD4+ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95(3):1154-9.

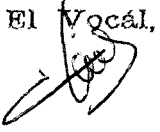
# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

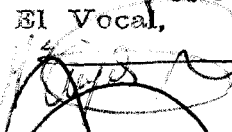
Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para leer la Tesis Doctoral de  
D. Juan José Pérez Franco.

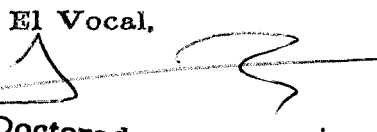
titulada Estudio de la economía social en el Tratado  
Antártico en parte referida por el org. de la actividad humana.  
Rol del Tercer e la Regla de los Derechos  
acordó otorgarle la calificación de

Sobresaliente "Cum Laude" por unanimidad.

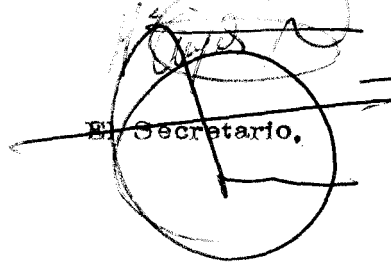
Sevilla, 14 de Julio de 2002

El Vocal,  


El Vocal,  


El Vocal,  


El Presidente  
Néstor Colaps

El Secretario,  


El Doctorado,  
