

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Utilidad de la determinación de la carga viral y marcadores
inmunológicos en tejido linfoide de pacientes con infección por
VIH-1 y respuesta discordante, así como en tratamiento
antirretroviral de alta eficacia y monoterapia.**



DAVID VINUESA GARCÍA

GRANADA, 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: David Vinuesa García

ISBN: 978-84-9125-751-6

URI: <http://hdl.handle.net/10481/43493>

El trabajo de investigación que se expone en esta Memoria Doctoral ha sido realizado en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario San Cecilio, Granada, bajo la dirección de los doctores Dr. D. Leopoldo Muñoz Medina, Dra. Dña M^a Ángeles Martínez Pérez y Dr. D. José Hernández Quero.

Directores:

L. Muñoz Medina

M^a Ángeles Martínez Pérez

J. Hernández Quero

AGRADECIMIENTOS:

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

1.-INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos de la infección por el VIH

1.2.- Características generales del VIH

1.2.1.- Estructura

1.2.2.- Ciclo Biológico

1.3.- Fármacos antirretrovirales

1.3.1.- Inhibidores de la transcriptasa inversa

1.3.1.1.- Análogos de los nucleósidos/nucleótidos

1.3.1.2.- No análogos de los nucleósidos

1.3.2.- Inhibidores de la proteasa

1.3.3.- Inhibidores de la entrada y de la fusión

1.3.4.- Inhibidores de la integrasa

1.3.5.- Efectos secundarios del tratamiento antirretroviral

1.4.- Inmunología e inmunopatogenia del VIH

1.4.1.- Generalidades de inmunología

1.4.1.1.- Órganos linfoides primarios

1.4.1.2.- Órganos linfoides secundarios

1.4.2.- Inmunopatogenia del VIH

1.4.2.1.- Interacción virus-célula.

1.4.2.2.- Interacción entre el VIH y el sistema inmune. Infección in vivo.

- Fases de la infección (temprana, crónica y tardía o acelerada)

- Mecanismos de linfocitopenia CD4

1.5.- Complicaciones actuales del VIH

1.5.1.- Eventos no SIDA

1.6.- Tipos de respuesta frente al TAR

1.7.- Simplificación del tratamiento antirretroviral con Monoterapia

2.- HIPÓTESIS

3.- OBJETIVOS.

3.1.- Objetivos principales

3.2.- Objetivos secundarios

4.- PACIENTES Y MÉTODOS.

4.1.- Población de estudio.

4.1.1.- Criterios de inclusión

4.1.2.- Criterios de exclusión

4.2.- Diseño del estudio.

4.3.- Determinaciones clínicas y de laboratorio

4.3.1.- Biopsia amigdalal

4.3.2.- Extracción analítica

4.3.3.- Procesamiento de las muestras

4.3.3.1.- Estudio virológico en tejido amigdalal

4.3.3.2.- Estudio inmunológico en tejido amigdalal

4.3.3.3.- Determinaciones analíticas en sangre periférica

a.- Estudio virológico

b.- Estudio inmunológico

- Marcadores de inflamación (IL-6)

- Marcadores de inmunoactivación (cociente CD4/CD8)

- Marcadores de traslocación bacteriana (LPS, Endocap, sCD14 y RNA 16S)

4.4.- Análisis estadístico.

4.4.1.- Estudio descriptivo

5.- RESULTADOS.

5.1.- Características de la población estudiada.

5.2.- 1ª Parte: Pacientes en monoterapia vs pacientes en triple terapia

5.2.1.- Resultados virológicos

5.2.2.- Resultados inmunológicos

5.3.- 2ª Parte: Pacientes discordantes inmunológicos frente a aquellos con buena respuesta inmunoviroológica

5.3.1.- Resultados virológicos

5.3.2.- Resultados inmunológicos

6.- DISCUSIÓN.

7.- CONCLUSIONES.

8.- BIBLIOGRAFIA.

1- INTRODUCCIÓN

1.1.- Antecedentes históricos de la infección por el VIH.

A principios del siglo XX aparecen las primeras investigaciones sobre los retrovirus, tras identificarse en animales unos agentes transmisibles capaces de inducir leucemias y tumores. Desde la década de 1970, los avances en las técnicas de cultivo de células animales y en genética molecular han contribuido enormemente al desarrollo de la virología.

En el año 1970, Temin (Temin & Mizutani, 1970) y Baltimore (Baltimore, 1970) descubrieron la transcriptasa inversa (TI) demostrando que el ciclo de vida de los retrovirus, cuyo material genético es el ácido ribonucleico (ARN), incluía una forma intermedia de ácido desoxirribonucleico (ADN) que denominaron provirus.

A final de la década de los 70 del pasado siglo, se comunicaron en Hospitales de San Francisco y Nueva York, varios casos de pacientes jóvenes, previamente sanos, con infecciones oportunistas y tumores hasta entonces únicamente descritos en pacientes trasplantados o con enfermedades oncológicas, que recibían terapia inmunosupresora (Durack, 1981; Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981). Este nuevo proceso inmunodepresor, de etiología desconocida hasta ese momento, se denominó Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En los años siguientes se constató una progresiva extensión de la enfermedad con una amplia distribución geográfica. Estos datos, junto con los estudios epidemiológicos posteriores, implicaron en la enfermedad a un agente infeccioso transmisible por productos sanguíneos, contacto sexual, uso de drogas por vía intravenosa y verticalmente de madres a hijos. Al producirse un déficit inmunitario, debido a una disminución selectiva de linfocitos CD4, la investigación se centró en la posibilidad de un retrovirus como agente causal.

El primer retrovirus humano, el virus linfotrópico-T humano de tipo I (HTLV-I), causante de la leucemia de células T del adulto fue aislado en 1980 por Poiesz (Poiesz et al., 1980). Dos años después fue descubierto el virus linfotrópico-T humano de tipo II (HTLV-II) por Kalyanaraman (Kalyanaraman et al., 1982) en un enfermo afectado de leucemia de células peludas. Ese mismo año el grupo de investigadores dirigidos por Montagnier aisló un virus linfotrópico en un ganglio de un paciente con linfadenopatías al que denominaron virus asociado a la linfadenopatía (LAV) (Barre-

Sinoussi et al., 1983). Asimismo el grupo de Robert Gallo describió otro retrovirus (Gallo et al., 1983), al que denominaron virus linfotrópico humano de células T (HTLV-III).

Posteriormente se confirmó que LAV y HTLV-III eran el mismo virus, admitiéndose una nueva denominación, la de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), para el agente causal del SIDA (Biberfeld et al., 1987), que permite diferenciarlo de otros virus parecidos que producen enfermedad en el simio o en determinados felinos y que se conocen como virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV; del inglés *simian immunodeficiency virus*) y virus de la inmunodeficiencia del felino (FIV; del inglés *feline immunodeficiency virus*) respectivamente.

En 1986, Clavel y colaboradores (Clavel et al., 1986), describieron en pacientes con SIDA en África Occidental un virus antigénicamente relacionado, que fue denominado VIH-2 para diferenciarlo del inicial que se denominó VIH-1. Desde su identificación hasta la actualidad, el VIH se ha convertido posiblemente en uno de los agentes infecciosos que se ha estudiado más rápidamente y que más trabajos ha generado en toda la historia de la Biomedicina.

1.2.- Características generales del VIH.

El VIH pertenece a la familia de *Retroviridae*, subfamilia de *Lentivirinae*. Los retrovirus constituyen una familia grande y diversa de virus ARN envueltos que están constituidos por un ARN de cadena única con dos hebras idénticas, que se copia en ADN lineal de doble cadena, para integrarse posteriormente en el genoma del hospedador. Por tanto el material genético es ARN en la partícula viral y ADN cuando se encuentra en la célula infectada. Este proceso de retrotranscripción es característico de los retrovirus, lo que les confiere el nombre; y se lleva a cabo mediante la acción de una enzima ADN polimerasa dependiente de ARN presente en el virus, la transcriptasa inversa (TI) o retrotranscriptasa (RT) que es una enzima fundamental para el virus. Los retrovirus infecciosos se agrupan en siete géneros (Coffin, 1992). Los retrovirus humanos se clasifican en tres subfamilias: *Lentivirinae*, *Oncovirinae* y *Espumavirinae* (Boller et al., 1993).

El VIH tiene una elevada tasa de mutaciones y una variabilidad e inestabilidad genéticas mucho mayores que otros virus y todos los seres vivos celulares. Esto es debido a que las enzimas que utilizan para su replicación son polimerasas sin actividad correctora, como ocurre con la TI. Este hecho, unido a las elevadísimas tasas de replicación habitualmente asociadas a los virus ARN, hace que las sucesivas generaciones virales sean cada vez más diferentes de las progenitoras desde el punto de vista genético, ya que van acumulando mutaciones que se localizan de forma aleatoria. Por tanto los nuevos virus son bastante diferentes del original, denominándose “*cuasiespecies virales*”, de forma que la población viral presente es muy heterogénea. Están sometidas además a un continuo proceso de competición y selección, predominando aquellas que tienen mejor capacidad de adaptación al medio(Coffin, 1995).

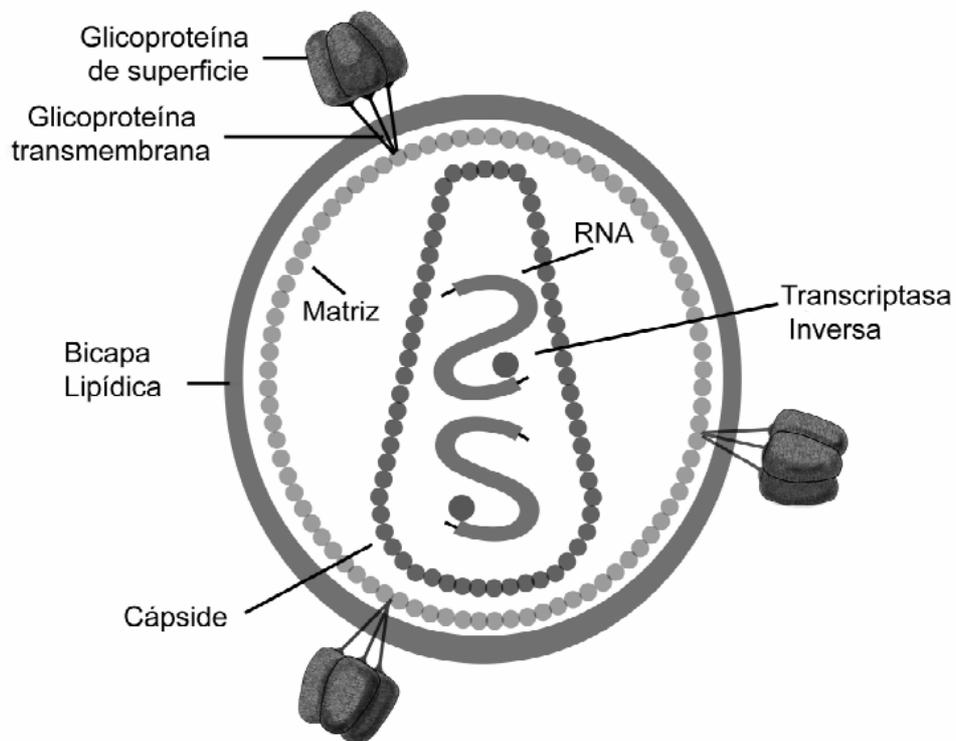
Una repercusión clínica fundamental de la alta tasa de mutación y la generación de “*cuasiespecies*”, es que capacita al VIH para reaccionar rápidamente ante presiones selectivas ejercidas tanto por el sistema inmune del individuo, como por la administración de fármacos antivirales(Perelson, Neumann, Markowitz, Leonard, & Ho, 1996). Esta capacidad adaptativa del VIH ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar terapias antivirales combinadas(Domingo et al., 2006).

1.2.1.- Estructura del VIH -1.

El virión del VIH es aproximadamente esférico y mide entre 80 y 120 nm de diámetro. Está compuesto por dos copias de ARN de cadena positiva única con un tamaño de 9.749 bases y que codifican para las proteínas virales. Las cadenas de ARN están rodeadas por una cápside cónica compuesta por 1.200 a 2.500 copias de la proteína viral de 24 kd de peso molecular (p24). Las cadenas de ARN se encuentran fuertemente asociadas a las proteínas de la nucleocápside, p6 y p7, y a las enzimas necesarias para el desarrollo del virión: transcriptasa inversa, proteasa, nucleasa e integrasa. La nucleocápside se asocia con el ARN genómico protegiéndolo de la digestión por nucleasas. La cápside está rodeada por una matriz compuesta de una asociación de la proteína viral p17 que garantiza la integridad de la partícula viral. La cápside está rodeada por una envuelta que está formada por una bicapa lipídica

originada en la célula hospedadora y se produce por la gemación de la cápside viral. Las proteínas de la envuelta viral se organizan en espículas y son estructuras formadas por tres glicoproteínas de superficie (gp120) y tres glicoproteínas transmembrana (gp41) que sujetan esta estructura al virus. Se ha estimado que el número de espículas por virión es de alrededor de 14, tanto en el VIH-1 como en el SIV. Estas estimaciones se han visto confirmadas por estudios posteriores de criomicroscopía (Zhu et al., 2006). La representación esquemática de la partícula se muestra en la **Figura 1.1**.

Figura 1.1: Representación esquemática de la estructura del VIH.

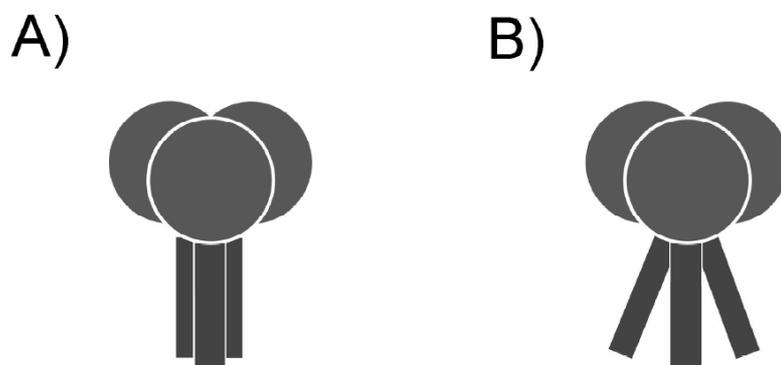


Hasta el 2006, la información estructural sobre la espícula era limitada y provenía en gran parte de análisis de cristalografía de rayos X del núcleo del monómero gp120 unido o no unido al receptor CD4, y de ciertas regiones de la gp41 en una conformación posterior a la fusión. La distribución y conformación nativa de las espículas en los viriones permanecía todavía desconocida.

Con la finalidad de definir su estructura de forma más precisa se realizaron estudios de tomografía electrónica. De este modo fue posible confirmar que la espícula

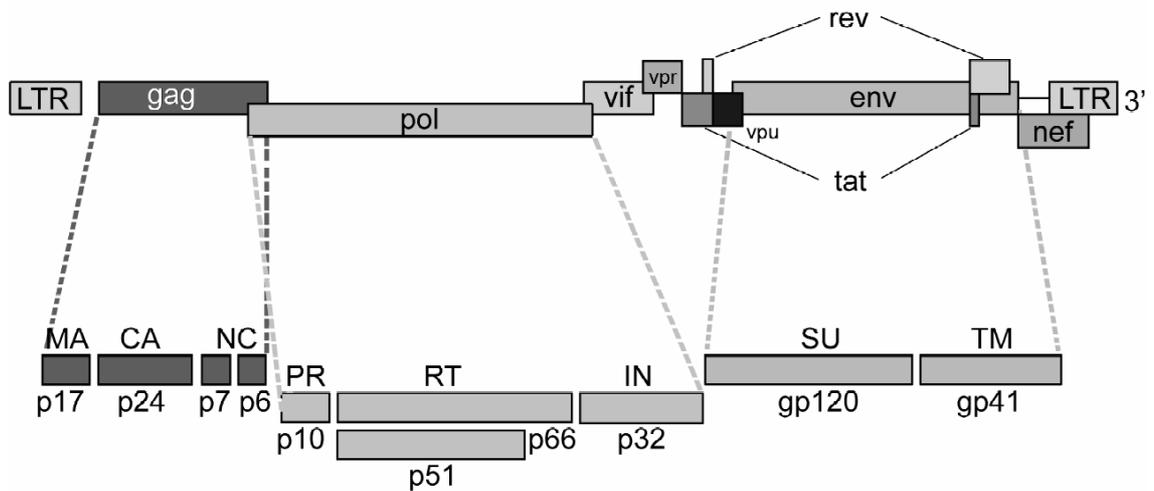
viral está compuesta por tres copias de heterodímeros de gp120-gp41 que se asocian formando un trímero. En el mismo año y con la misma técnica, se publicó un modelo de la organización de la envuelta en «champiñón» en la cual un trímero de tres moléculas de gp120 estaría unido al trímero de gp41 que se anclaría a la membrana por una única estructura (**Figura 1.2a**). Posteriormente, cuando los volúmenes de los dominios cabeza y pata fueron alineados y clasificados de forma independiente, surgió una evidencia más clara de la organización en dominios formando una cabeza trimérica y tres patas (**Figura 1.2b**). Los datos obtenidos de esta manera también demuestran la gran flexibilidad de la proteína transmembrana tanto del VIH-1 como del VIH-2. Este modelo ayuda a explicar muchas de las características biofísicas e inmunológicas únicas de la región gp41 (Zhu, Winkler, Chertova, Taylor, & Roux, 2008).

Figura 1.2: Representación esquemática de las dos estructuras propuestas para la espícula de la envuelta del VIH y el VIS. A) Estructura en «champiñón»; B) Estructura en «trípode».



El ARN genómico (**Figura 1.3**) se compone de siete elementos estructurales (LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS y INS) y nueve genes que codifican para diecinueve proteínas en total. Tres de estos genes (gag, pol y env) codifican las principales proteínas estructurales que se encuentran en todos los retrovirus mientras los seis restantes genes no estructurales codifican las proteínas reguladoras (tat y rev) y accesorias (vpu, vpr, vif y nef) y son genes únicos del VIH que controlan la capacidad para infectar las células, producir nuevas copias del virus o inducir patogénesis.

Figura 1.3. Organización genómica del VIH-1.



1.2.2.- Ciclo biológico del VIH-1.

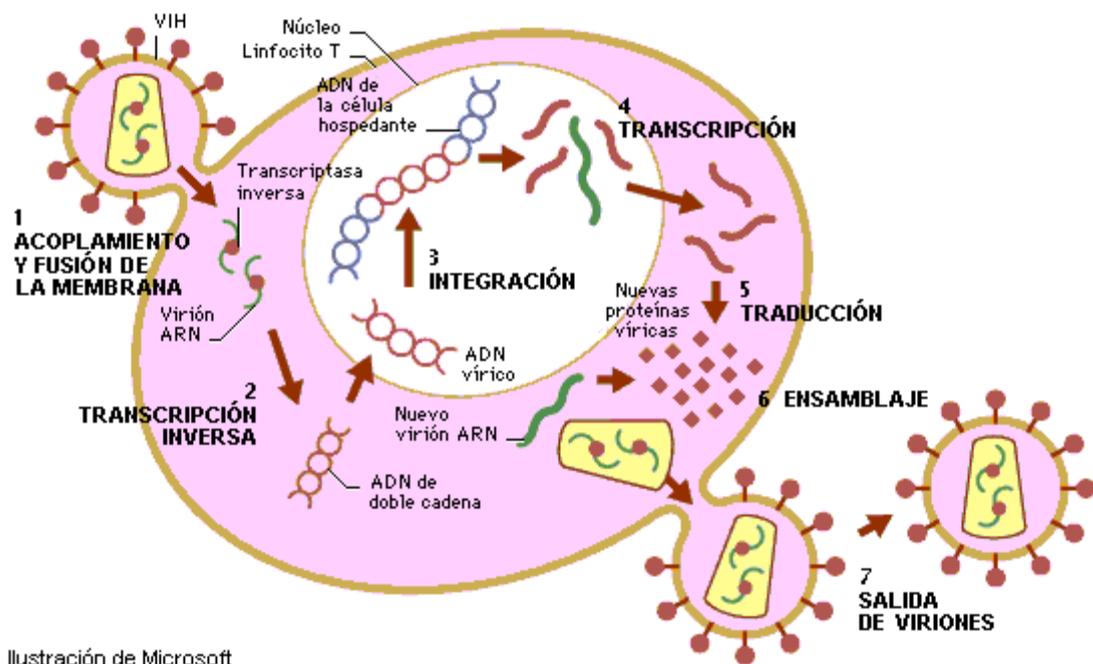
El ciclo biológico del VIH se divide en dos etapas bien diferenciadas (**Figura 1.4**): la fase temprana o preintegración, que transcurre desde la interacción del virus con la célula diana hasta la integración del ADN viral en el genoma del hospedador. Y la fase tardía o postintegración, que implica desde la transcripción del genoma proviral hasta la liberación y maduración del virión y la generación de una progenie infecciosa (Greene, 1991).

La entrada del VIH en la célula se produce mediante la interacción secuencial con dos receptores, CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 (**Figura 1.5**). Según la utilización de uno o ambos receptores el VIH se clasifica en variantes de tropismo R5, X4 o R5X4 (Arenzana-Seisdedos, 2008).

El proceso de entrada se inicia con la interacción entre la glicoproteína viral gp120 y la molécula de CD4, que se expresa preferentemente en linfocitos, macrófagos y células dendríticas. Esta interacción induce una serie de cambios conformacionales que exponen el dominio V3 y agrupan una serie de regiones adyacentes dando lugar a la formación y exposición del dominio de unión de la gp120 a los receptores de quimiocinas (Arenzana-Seisdedos, 2008; Zolla-Pazner & Cardozo, 2010). Por este motivo, la molécula de CD4 es un paso necesario para permitir la entrada viral, ya que

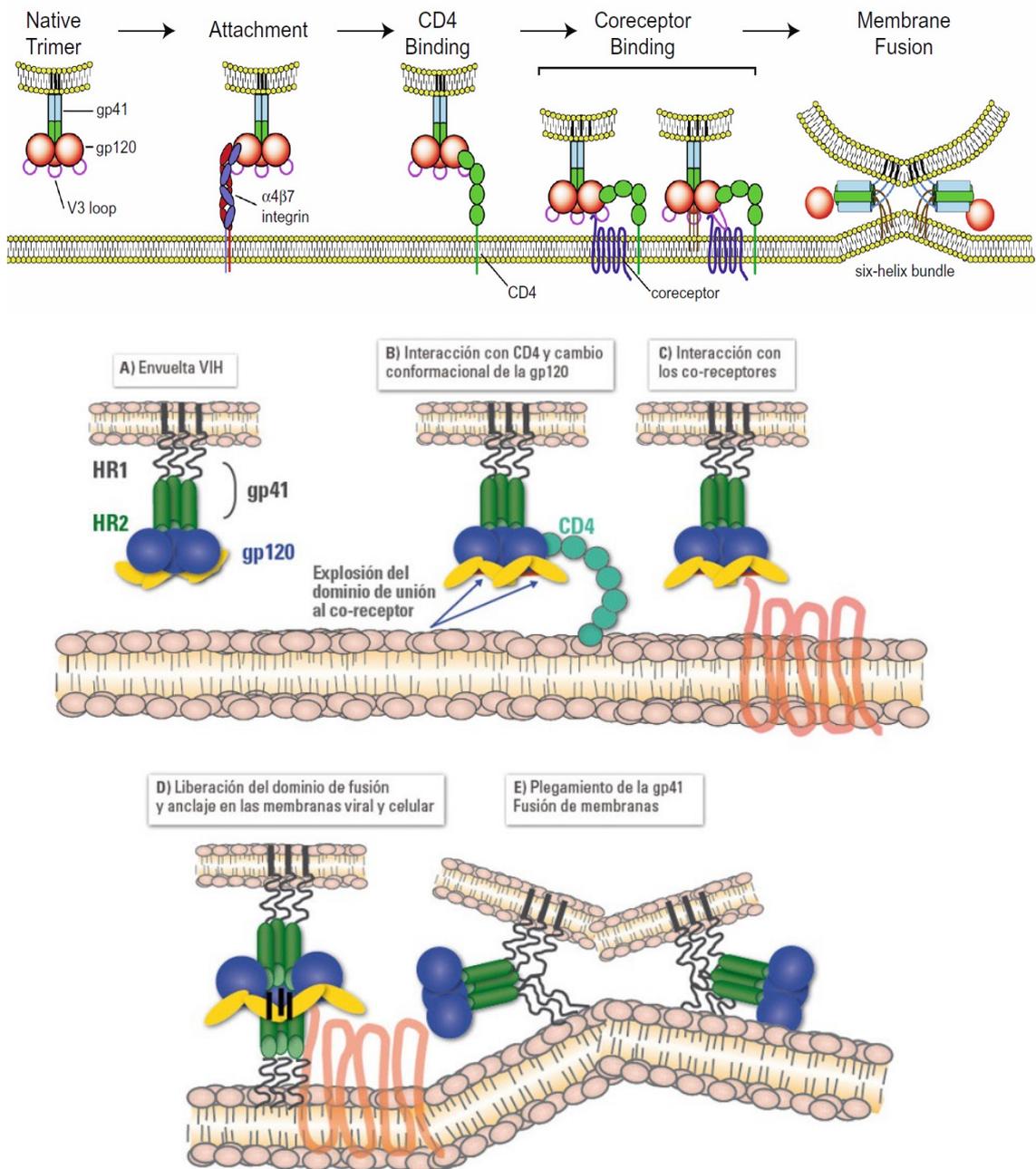
en ausencia de esta unión, la gp120 no puede unirse al correceptor. La interacción con CCR5 y/o CXCR4 induce nuevos cambios que despliegan las regiones heptaméricas de la gp41 y exponen la región N-terminal de la proteína, un dominio altamente hidrofóbico también denominado péptido de fusión, que se ancla en la membrana plasmática. Esta estructura es termodinámicamente inestable, lo que genera un movimiento de retracción a su posición inicial de los dominios heptaméricos de la gp41; y durante este proceso de cierre o plegamiento se aproximan y fusionan las membranas plasmática y viral (Gonzalez, Alvarez, & Alcami, 2010).

Figura 1.4. Ciclo Biológico del VIH.



Una vez fusionadas las membranas viral y celular, se produce la internalización de la nucleocápside y la decapsidación del genoma vírico. En este proceso, las proteínas de la cápside se desensamblan y liberan el genoma viral al citosol.

Figura 1.5: Entrada del VIH en la célula.



El proceso de síntesis de ADN a partir del ARN viral o retrotranscripción es realizado por el complejo enzimático de la transcriptasa inversa, que efectúa la síntesis de una doble hebra de ADN a partir del ARN genómico. Sin embargo, en un linfocito «en reposo» la retrotranscripción se produce de forma incompleta y es necesario «activar» la célula infectada para que finalice, ya que este proceso depende de los niveles de nucleótidos y la acción de factores celulares que se inducen en el curso de los

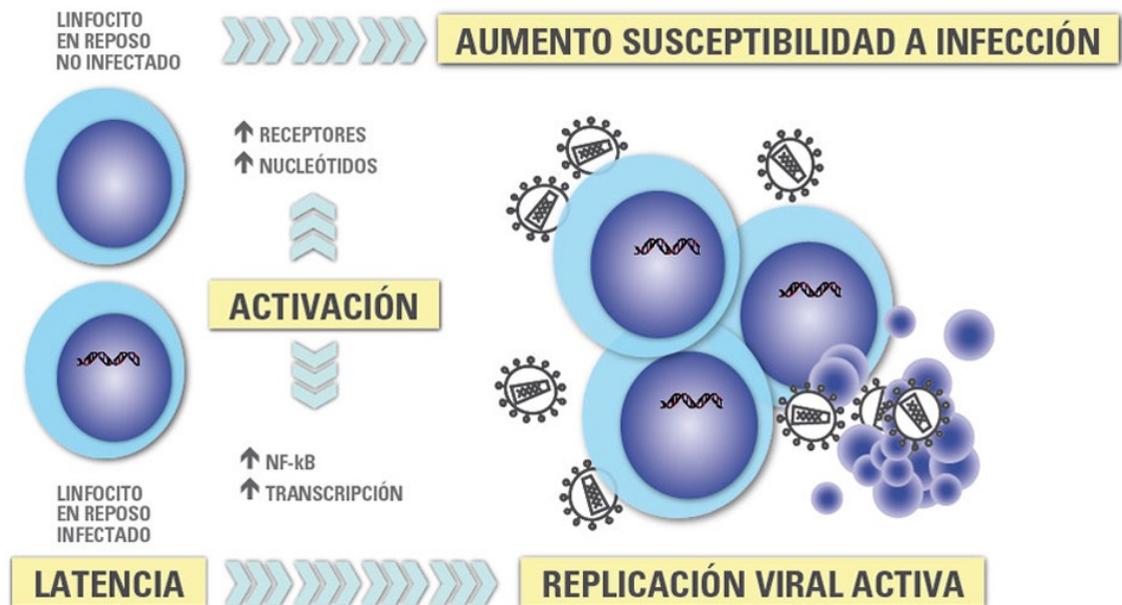
procesos de activación y proliferación celular (Coiras, Lopez-Huertas, Perez-Olmeda, & Alcami, 2009). Si la activación no se produce, el ARN y ADN incompletamente retrotranscritos son degradados entre 3 y 15 días por las nucleasas celulares.

Una vez sintetizado, el ADN proviral se acopla a una serie de factores celulares y virales (*Vpr*) formando el complejo de preintegración. Este complejo es transportado al núcleo, donde se integra en el genoma del hospedador, constituyendo la forma proviral del VIH. En teoría, la integración puede producirse en cualquier localización del genoma, pero es más frecuente en las secuencias intrónicas de genes que se expresan tanto en linfocitos en reposo como activados. Este proceso lo realiza la integrasa viral, que corta el ADN genómico y realiza la transferencia de cadena de ADN entre el virus y la célula. Este paso es muy limitante en el ciclo del virus por lo que más del 90% del ADN celular se encuentra en forma no integrada y existen pocas copias de ADN integrado por célula infectada. El ADN no integrado en su forma lineal constituye un reservorio susceptible de integración si la célula es adecuadamente activada. Sin embargo, debido a su corta semivida, estas formas no integradas no representan en la práctica un reservorio tan importante como el ADN integrado. Por el contrario, la detección de ADN no integrado constituye un marcador de replicación viral en pacientes en tratamiento antirretroviral (TAR), aunque éstos no presenten carga viral (CV) plasmática detectable.

A partir del estado de integración, el VIH puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. A partir del estado de provirus integrado, la replicación del VIH comienza mediante la transcripción del genoma viral. La parte inicial de este proceso, denominada iniciación de la transcripción, depende de numerosos factores: mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, una conformación “abierta” del ADN que, a su vez, está determinada por la acetilación y deacetilación de las histonas y la presencia de factores celulares *enhancer* y del complejo basal de transcripción. El principal factor celular que interviene en el paso de la fase de latencia viral a la de reactivación es NF- κ B, una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de múltiples genes celulares que participan en los procesos de reconocimiento y activación inmunes. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos CD4 en estado de reposo y es inducido en el curso de los procesos de

activación inmunológica, lo que explica que la replicación del VIH está estrechamente relacionada con el estado de activación de los linfocitos infectados (**Figura 1.6**). Por tanto el balance entre NF- κ B y sus proteínas inhibidoras es un elemento clave en la iniciación de la replicación del VIH a partir de su forma de provirus integrado (Coiras et al., 2009).

Figura 1.6: Activación linfocitaria y replicación viral.



Una vez iniciada la síntesis del ARN viral, la expresión de la proteína viral *Tat* aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y permite la elongación completa del ARN viral. El ARNm del VIH se sintetiza en forma de un único transcrito que debe ser transportado al citosol y procesado en ARN de distinto tamaño. Procesamiento y transporte son regulados por la proteína viral *Rev*, que tiene una localización preferentemente nuclear. *Rev* también participa en el acoplamiento de los distintos ARNm a la «maquinaria» de los ribosomas que sintetizará las proteínas virales. Una vez sintetizadas, las proteínas virales deben ser procesadas antes de ensamblarse en el retículo endoplásmico siendo esencial en este proceso la utilización de numerosas proteínas de la maquinaria celular de expresión y modificación post-transcripcional de proteínas, dando lugar a las partículas maduras. La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se producen durante el proceso de gemación

a través de la membrana celular, mediante la acción de la proteasa viral que procesa las poliproteínas gag y gag-pol y permite formar partículas virales maduras.

1.3.- Fármacos antirretrovirales.

Desde la observación de los primeros casos de SIDA a principios de los años 80 hasta el uso de un tratamiento antirretroviral realmente efectivo basado en una triple terapia pasaron casi 15 años, tiempo en el que los médicos atendían una infección progresiva y casi siempre mortal. No fue hasta 1996 cuando se empezó a utilizar lo que se denominó "highly active antiretroviral therapy (HAART)" o tratamiento antirretroviral de alta eficacia o gran actividad (TARGA) en español.

El TARGA tal y como se concibe hoy en día, supuso una revolución en el manejo de los pacientes con infección por VIH, al conseguir una impresionante disminución de la morbi-mortalidad relacionada con esta enfermedad.

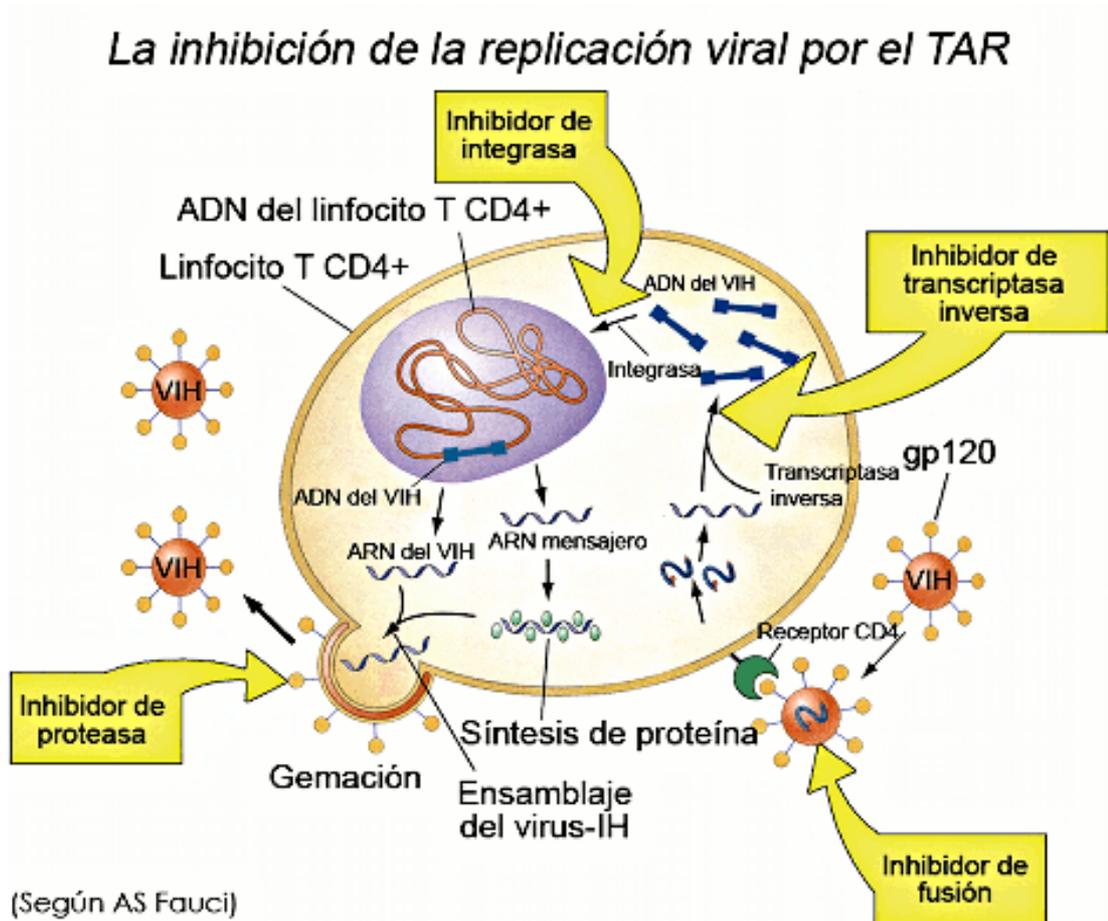
Actualmente se dispone de fármacos que actúan a diferentes niveles del ciclo replicativo del VIH (**Figura 1.7**) y se continúa trabajando en el desarrollo de nuevos fármacos frente a distintas dianas terapéuticas, ya que la erradicación completa del VIH hoy por hoy no es posible con los fármacos antirretrovirales de los que disponemos actualmente debido a que los virus se encuentran integrados en el ADN celular en estado de latencia en los linfocitos T CD4 y macrófagos, desde los estadios iniciales de la infección aguda, siendo capaces de persistir durante largo tiempo a pesar de que se logre una supresión prolongada de la replicación viral y de la viremia, como demuestran los trabajos de Chun (Chun et al., 1998) y Wong (Wong et al., 1997).

Dado que a día de hoy no es posible la erradicación del VIH, los objetivos actuales del tratamiento son: reducir la morbilidad relacionada con el VIH y prolongar la supervivencia así como mejorar la calidad de vida de los pacientes, lo que se consigue restaurando y preservando la función inmunológica al suprimir la replicación viral, con lo que se logra también el objetivo de prevenir la transmisión del VIH.

Se deben diseñar estrategias terapéuticas que eviten o retrasen la selección de mutaciones que limiten la eficacia de regímenes terapéuticos posteriores.

Como hemos señalado antes, por la elevada tasa de replicación y la capacidad de mutar, el VIH tiene una alta capacidad adaptativa, que ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar terapias antivirales combinadas, que constituyen el TARGA o HAART, el paradigma actual de tratamiento antirretroviral. Se basa en la utilización de tres fármacos activos de varias familias farmacológicas (Panel de expertos de Ge, 2015), esto supondrá una mayor potencia antiviral y una elevada barrera genética, farmacocinética y farmacodinámica que dificultará al VIH desarrollar resistencias a los fármacos antirretrovirales (Drusano et al., 1998; Hammer et al., 1997).

Figura 1.7. Mecanismo de acción de los fármacos antirretrovirales.



Los fármacos antirretrovirales aprobados hasta el momento se clasifican en cuatro grupos principales:

- Inhibidores de la TI: análogos de los nucleósidos o nucleótidos (ITIAN) y no análogos de nucleósidos (ITINAN).
- Inhibidores de la proteasa (IP).
- Inhibidores de la entrada y la fusión.
- Inhibidores de la integrasa (INI).

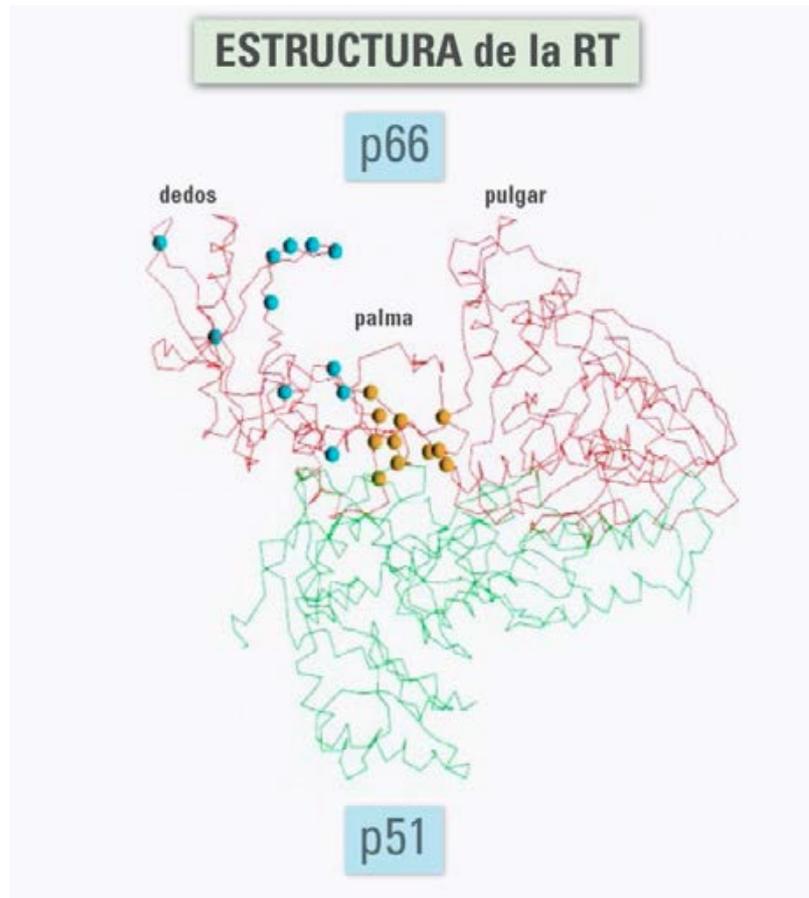
1.3.1.- Inhibidores de la transcriptasa inversa.

La TI, enzima fundamental en el ciclo biológico del VIH, es un heterodímero compuesto de dos subunidades denominadas p66 y p51. En la subunidad p66 se localiza el sitio activo de la enzima, formada por el dominio polimerasa unido al dominio RNasa H. El dominio polimerasa tiene una morfología peculiar, ya que recuerda la forma de una mano derecha, con tres subdominios denominados *fingers* (dedos), *palm* (palma), *thumb* (pulgar) (Figura 1.8). La TI sintetiza ADN y utiliza como molde ARN (actividad ADN polimerasa-ARN dependiente) o ADN (actividad ADN polimerasa-ADN dependiente), y degrada ARN cuando se encuentra formando parte del complejo ARN-ADN (actividad RNasa H).

Los inhibidores de la TI se clasifican en dos grandes grupos en base a sus características moleculares, que determinan diferentes mecanismos de actuación:

- Inhibidores de la TI Análogos de los Nucleósidos o Nucleótidos (ITIAN).
- Inhibidores de la TI No Análogos de Nucleósidos (ITINAN).

Figura 1.8: Morfología del dominio polimerasa



1.3.1.1.- Análogos de los Nucleósidos/Nucleótidos (ITIAN).

Los ITIAN son estructuralmente semejantes a los nucleósidos naturales y al igual que éstos, requieren ser trifosforilados en el citoplasma celular por una fosfoquinasa para ser biológicamente activos. Una vez fosforilados, compiten con los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) en su incorporación a la cadena de ADN sintetizada por la TI (Winter, Maeda, Mitsuya, & Zemlicka, 1996), interrumpiendo su proceso de síntesis, ya que carecen de grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar y los nuevos nucleótidos no se pueden unir a la cadena de ADN sintetizada. Bloquean la elongación de la cadena de ADN viral, impidiendo la unión de nucleósidos adicionales.

Figura 1.9: Mecanismo de acción de los ITIAN.



En este grupo se encuentran: Zidovudina (AZT), Didanosina (ddI), Zalcitabina (ddC), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC), Emtricitabina (FTC) y Abacavir (ABC).

Los inhibidores de la TI análogos de los nucleótidos actúan de forma similar a los análogos de los nucleósidos pero, al estar parcialmente fosforilados, necesitan menos fosforilaciones en el interior de la célula para ser activos.

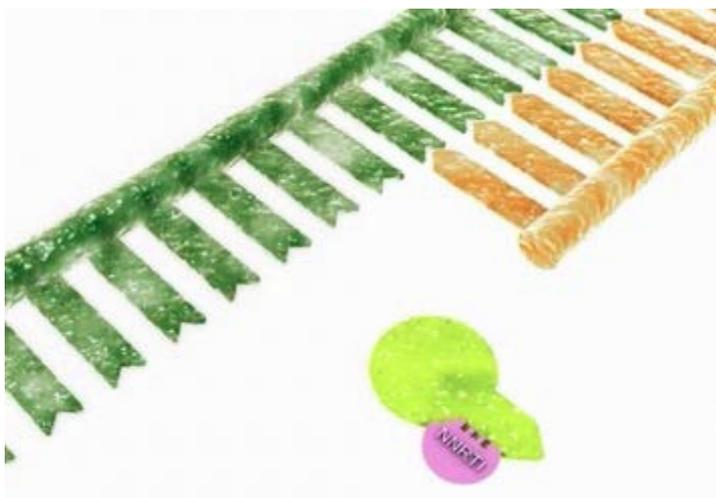
El Tenofovir (TDF) es el único representante de los inhibidores análogos de los nucleótidos.

1.3.1.2.- No Análogos de Nucleósidos (ITINAN).

Los ITINAN no se incorporan a la cadena de ADN a diferencia de los ITIAN. Se unen de forma no competitiva a un lugar cercano al centro catalítico de la enzima, una región hidrofóbica de la subunidad p66 (Spence, Kati, Anderson, & Johnson, 1995). Esta unión conduce a un cambio conformacional en la estructura de la enzima, que impide la colocación correcta del complejo molde-iniciador imposibilitando la polimerización del ADN (De Clercq, 1999). Bloquean la elongación de la cadena de ADN viral mediante el bloqueo de la TI.

A diferencia de los ITIAN, estos fármacos no necesitan metabolizarse para ser activos, pero poseen otras limitaciones; no son activos frente al VIH-2 y basta una o muy pocas mutaciones para desarrollar resistencia de alto nivel(Fonjuno et al., 2002).

Figura 1.10: Mecanismo de acción de los ITINAN.



Este grupo lo componen: Nevirapina (NVP), Efavirenz (EFV), Etravirina (ETV) y Rilpivirina (RPV)(Fernandez-Montero, Vispo, Anta, de Mendoza, & Soriano, 2012).

1.3.2. Inhibidores de la Proteasa.

La proteasa del VIH es un homodímero constituido por dos subunidades de 99 aminoácidos codificadas en el extremo 5' del gen *pol* que interaccionan con el sustrato a través de una hendidura situada en la zona de contacto entre ambas subunidades. Esta enzima actúa en la fase final del ciclo de replicación viral, participando en el procesamiento de las poliproteínas *Gag* y *Gag-Pol*.

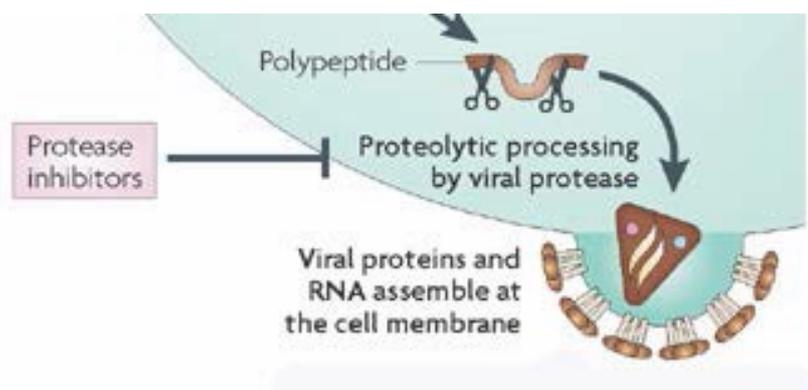
Los fármacos inhibidores de la proteasa (IPs) se unen al centro activo de esta enzima compitiendo con sus sustratos naturales (*Gag* y *Gag-Pol*) lo que resulta en la formación de partículas virales inmaduras, y por lo tanto no infecciosas (Tomasselli & Heinrikson, 2000).

Es la única familia cuya actividad afecta a múltiples pasos del ciclo replicativo del VIH. Al procesar de forma anómala algunos precursores poliproteicos, entre ellos la gp-160, que es precursora de la proteasa, la TI y la integrasa viral, afecta a los procesos de entrada, retrotranscripción e integración del ADN viral (Rabi et al., 2013). De esta forma consiguen niveles de inhibición muy elevados, una de las características que los hace candidatos ideales para la monoterapia, de la que posteriormente hablaremos de forma detenida.

Este grupo está compuesto por: Nelfinavir (NFV), Ritonavir (RTV), Indinavir (IDV), Saquinavir (SQV), Lopinavir (LPV), Fosamprenavir (FOS), Atazanavir (ATV), Tipranavir (TPV) y Darunavir (DRV).

En la actualidad se emplean solamente ATV, DRV y LPV, junto con dosis muy bajas de RTV y en el caso de DRV con Cobicistat (COB), que son potentes inhibidores de las isoenzimas 3A4 del citocromo P450 y permiten mantener niveles por encima de la IC50 del virus por periodos de tiempo prolongados, al aumentar el área bajo la curva del fármaco. Los IP administrados así se conocen como IP potenciados.

Figura 1.11: Mecanismo de acción de los IPs.



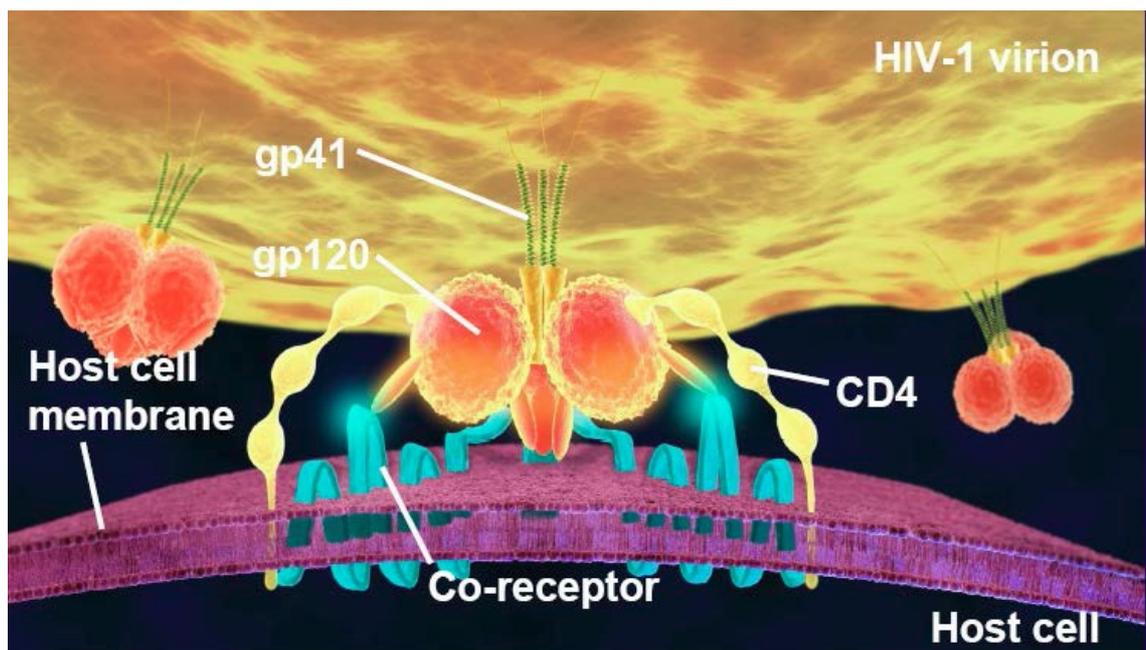
1.3.3. Inhibidores de la entrada y de la fusión.

Los inhibidores de la entrada se adhieren a las proteínas de superficie de las células T o a las proteínas de superficie del VIH. Como hemos señalado con anterioridad, para que el VIH se una y pueda entrar en las células T, las proteínas de la

capa externa del VIH deben unirse a las proteínas de superficie de las células T. Los inhibidores de la entrada evitan que este proceso ocurra. Algunos inhibidores de la entrada se adhieren a las proteínas gp120 ó gp41 de la capa externa del VIH (Berkhout, Eggink, & Sanders, 2012). Otros inhibidores utilizan la proteína CD4 ó los receptores de las quimiocinas CCR5 ó CXCR4 de la superficie de las células T (Maeda, Das, Nakata, & Mitsuya, 2012). Si los inhibidores de la entrada logran adherirse eficientemente a las proteínas, están quedan bloqueadas impidiendo al VIH unirse a la superficie de las células T y entrar en ellas.

Este grupo de antirretrovirales lo componen: Enfuvirtida (ENF, T-20) y Maraviroc (MVC).

Figura 1.12: Mecanismo de acción de los inhibidores de la entrada.

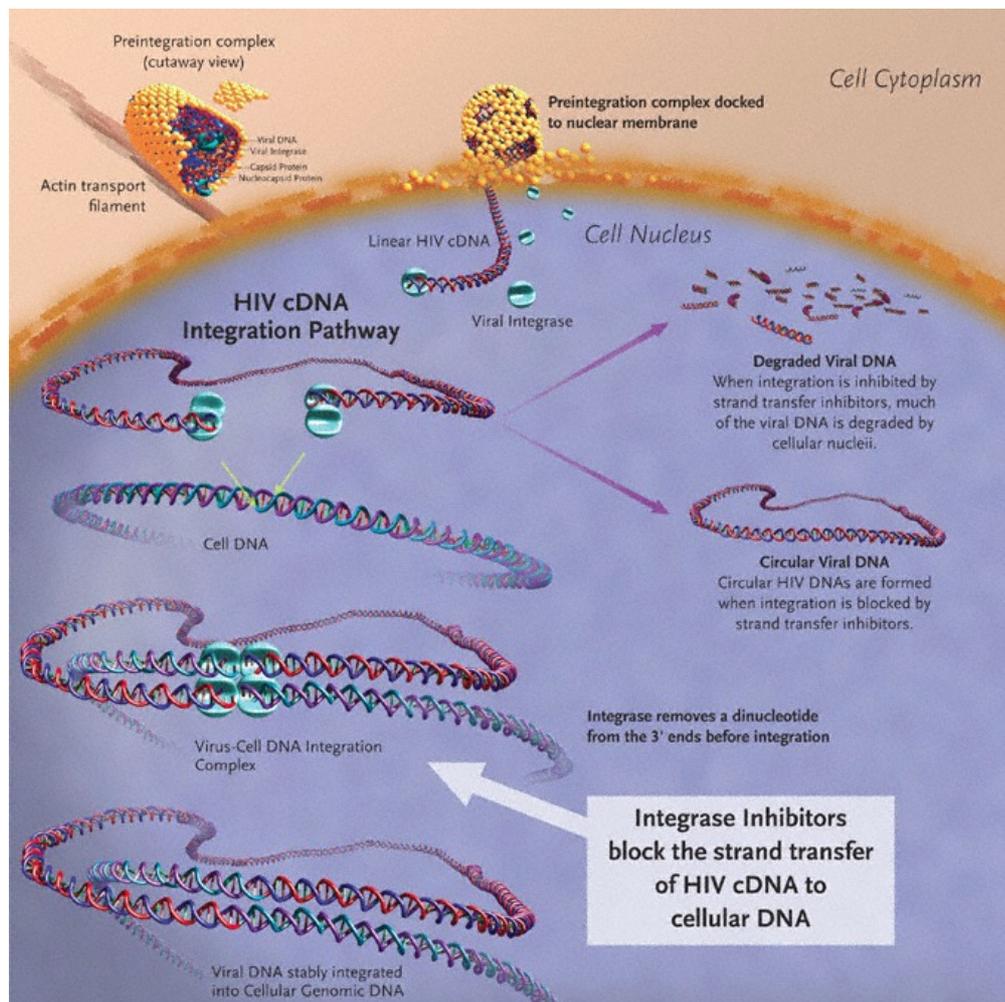


1.3.4. Inhibidores de la integrasa.

La integrasa viral dirige la integración del ADN viral en el ADN celular. Se une a secuencias situadas en los extremos del ADN del virus y media en la formación del complejo de preintegración. Identifica el punto de integración y con la escisión de dos nucleótidos en cada extremo 3' consigue integrar parte del ADN viral en el ADN del hospedador. Los fármacos de este grupo actúan inhibiendo uno de los pasos (*strand*

transfer) de la integración del ADN proviral en el ADN de la célula hospedadora (Thompson et al., 2012; Volberding & Deeks, 2010) lo que bloquea dicha integración. Hasta el momento son tres los fármacos que forman parte de este grupo; Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG) y Dolutegravir (DTG) (Quashie, Sloan, & Wainberg, 2012).

Figura 1.13: Mecanismo de acción de los INI.



1.3.5. Efectos secundarios del tratamiento antirretroviral.

La toxicidad de los primeros antirretrovirales fue una de las dificultades que los clínicos tuvieron que aprender a manejar. Los efectos secundarios del TAR se caracterizan por aparecer con una frecuencia elevada, son de una gravedad moderada y precisan de un manejo clínico complejo. La gravedad de los efectos adversos al TAR, a medio y largo plazo, es una de las principales causas de suspensión y modificación del tratamiento, habiéndose establecido que la toxicidad del TAR puede justificarse entre el

58% y el 64% de los cambios de tratamiento (d'Arminio Monforte et al., 2005; O'Brien, Clark, Besch, Myers, & Kissinger, 2003). Además se han analizado las causas de ingresos hospitalarios de los pacientes VIH encontrándose la toxicidad del TAR como responsable de un 6.4% de los mismos (Cicconi et al., 2010).

Aunque cualquiera de los fármacos utilizados puede producir toxicidad de algún tipo (cutánea, digestiva, hepática, muscular), actualmente la toxicidad de los fármacos, al menos a corto plazo, ha mejorado mucho con la aparición de las nuevas moléculas, especialmente tras la llegada de los inhibidores de la integrasa, que poseen una excelente tolerabilidad; y han ido desplazando a los fármacos más antiguos, que están dejando de utilizarse de forma progresiva. Sin embargo, todavía se desconocen los potenciales efectos secundarios de estos fármacos a más largo plazo, un aspecto importante que no suele detectarse en los ensayos clínicos, al ser estos de duración limitada. Muchos de los efectos tóxicos a largo plazo solo se han registrado en estudios observacionales, de grandes cohortes.

La importancia de la toxicidad a largo plazo es tanto mayor cuanto más elevado es el carácter irreversible de la misma. Como ejemplo paradigmático sirve el desarrollo de lipoatrofia asociada al uso de análogos timidínicos (d4T, AZT). A pesar de su buena eficacia virológica y tolerabilidad, estos fármacos han dejado de usarse por el riesgo de desarrollo de trastornos de distribución de la grasa corporal.

Los ITIAN que actualmente se utilizan (TDF, ABC, FTC y 3TC) mantienen la excelente tolerabilidad y además presentan menor toxicidad mitocondrial, aunque no por ello están exentos de producir efectos adversos a largo plazo. En concreto, un estudio de cohortes asoció ABC con un mayor riesgo de desarrollo de infarto agudo de miocardio (IAM) en pacientes con riesgo de base elevado (Group et al., 2008). Estudios de cohortes realizados posteriormente han identificado factores de confusión para esta asociación y no han podido confirmarla (Lang et al., 2010). La FDA ha presentado recientemente un metaanálisis de los ensayos clínicos realizados con ABC que demostraba que no había asociación entre este antirretroviral y el desarrollo de IAM (Ding et al., 2012). Este mismo año Young J, y colaboradores nuevamente sugieren, que la exposición acumulada a lo largo de años al ABC, podría aumentar el riesgo de padecer algún evento cardiovascular (Young et al., 2015).

Por otro lado, el TDF se ha asociado de modo consistente con una mayor afectación de la función renal y un aumento de la desmineralización ósea.

TDF ha producido una pérdida más importante de la densidad mineral ósea (DMO) que d4T o ABC en los estudios 903 (Gallant et al., 2004), ACTG 5202 (Henry, 2010) y STEAL (Martin et al., 2009).

La toxicidad renal más frecuente es la tubulopatía proximal, que puede manifestarse como glucosuria, proteinuria tubular, hipofosfatemia y elevación de la creatinina plasmática. Algunos pacientes desarrollan un síndrome de Fanconi, la FDA ha recogido 164 casos de dicho síndrome en pacientes VIH hasta el año 2006 (Gupta, 2008).

Estudios *in vitro* indican que TDF ejerce un efecto tóxico mitocondrial en las células tubulares proximales a concentraciones intracelulares altas (Vidal et al., 2006). Aunque la discontinuación de TDF es la actitud recomendada en pacientes con sospecha de toxicidad renal por este fármaco, se ha descrito que hasta el 58% de pacientes no recuperan totalmente la función renal tras la suspensión (Wever, van Agtmael, & Carr, 2010). Este hecho enfatiza la importancia del diagnóstico precoz de la nefropatía asociada a TDF.

El envejecimiento, que se acompaña de un descenso del filtrado glomerular, la presencia de otras comorbilidades y la exposición continuada a fármacos antirretrovirales incrementará la incidencia de insuficiencia renal en la población VIH positiva.

La infección por VIH es una enfermedad no curable que precisa tratamiento durante toda la vida del paciente después que se haya iniciado. Durante mucho tiempo el desarrollo de esta toxicidad a largo plazo (lipoatrofia y otras alteraciones metabólicas) condicionó el momento de inicio del TAR y aunque hoy en día esto no es así por la mejora de los fármacos antirretrovirales, la administración durante períodos de tiempo tan largos obliga a considerar y a prevenir, si es posible, la toxicidad que pueda producir; y es tanto más importante, cuanto mayor es el carácter irreversible de la misma.

Todavía no se ha determinado cual será el impacto que el envejecimiento progresivo de la población pueda tener sobre estos efectos a largo plazo. Este es el motivo por el que surgen las estrategias de simplificación, como comentaremos con posterioridad. Existen muchos efectos adversos relativamente leves, que el paciente puede tolerar y tolera en aras de la eficacia del TAR. Es importante tener en cuenta esta toxicidad y que la simplificación terapéutica elegida incida de manera positiva sobre ella y por supuesto sin perder eficacia, de esta manera, además de mejorar la calidad de vida del paciente, probablemente también mejorará la adherencia a largo plazo.

No es objetivo de esta tesis profundizar en los efectos secundarios de los fármacos, por lo que remitimos al lector a la bibliografía referenciada.

1.4.- Inmunología e inmunopatogenia del VIH

1.4.1.- Generalidades

Los órganos y tejidos del sistema linfático, se clasifican en dos grupos (órganos linfoides primarios y secundarios). Los órganos linfoides primarios proporcionan el entorno para la maduración de linfocitos y en ellos se produce la división de las células madre y su maduración en células B y T; el Timo, donde maduran los linfocitos T y la médula ósea, órgano de maduración de los linfocitos B, componen los órganos linfoides primarios.

El segundo grupo, los órganos linfoides secundarios, está compuesto por aquellos órganos que proporcionan el entorno para que los linfocitos interactúen entre sí o con las células presentadoras de antígenos (CPA) y se produzcan las respuestas inmunitarias. Comprenden los ganglios, el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y el bazo.

1.4.1.1.- Órganos linfoides primarios.

El timo está formado por dos lóbulos rodeados por cápsula de tejido conjuntivo. A su vez, los lóbulos están divididos en lobulillos separados entre sí por trabéculas de

tejido conjuntivo. Cada lobulillo tímico está relleno de células linfoides denominadas timocitos, dispuestas en una corteza de gran densidad celular y una médula de menor densidad celular. Tanto la corteza como la médula están rellenas de una red de células no linfoides que constituyen el estroma tímico y que expresan en sus superficies moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HCM) de tipo I y/o II, y participan en la maduración y selección de los timocitos hacia células T maduras. El timo de los mamíferos va involucionando con la edad, a partir de la pubertad. Es por ello que, en la vida adulta, la producción de linfocitos T en el timo decae intensamente, aunque siempre existe una actividad residual. En la fase adulta, cuando el timo ha involucionado, sigue habiendo maduración de linfocitos T en otros lugares, principalmente en el epitelio intestinal.

La médula ósea está implicada en la maduración de los linfocitos B. Los linfocitos maduros vírgenes que salen de los órganos linfoides primarios emigran a los órganos y tejidos linfoides periféricos.

1.4.1.2.- Órganos linfoides secundarios.

Los ganglios linfáticos están dispuestos a lo largo de los vasos linfáticos y dispersos por todo el organismo, tanto superficiales como profundos, usualmente en grupos. Están especialmente diseñados para retener al antígeno, bien sólo o formando parte de inmunocomplejos, para que interactúen con los linfocitos y otras células que van a iniciar la respuesta inmune específica.

El bazo es un órgano oval. La pulpa blanca consta de tejido linfático, principalmente linfocitos y macrófagos, dispuestos alrededor de ramas de la arteria esplénica. En éste, las células T y B llevan a cabo funciones inmunitarias, al tiempo que los macrófagos destruyen los patógenos provenientes de la sangre por fagocitosis.

Las mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y urogenital suponen una enorme superficie y constituyen sitios de entrada de numerosos patógenos, por lo que han desarrollado defensas inmunitarias especializadas. Desde el punto de vista histológico, éstas consisten en tejidos que van desde acúmulos dispersos de linfocitos hasta estructuras organizadas, pero nunca rodeadas de cápsula. Por ello reciben el

nombre de tejido linfoide asociado a mucosas, (MALT; del inglés *mucosa-associated lymphoid tissue*). Este conjunto de tejidos reviste una grandísima importancia, habida cuenta de la gran superficie potencial que ha de defender frente a la entrada de patógenos. Otra idea de su relevancia la suministra el hecho de que las células plasmáticas de los tejidos MALT son más numerosas que la suma de las células plasmáticas de bazo, ganglios y médula ósea. Los centros germinales de los folículos secundarios son ricos en células dendríticas (CPA). Las amígdalas palatinas son estructuras similares al ganglio linfático.

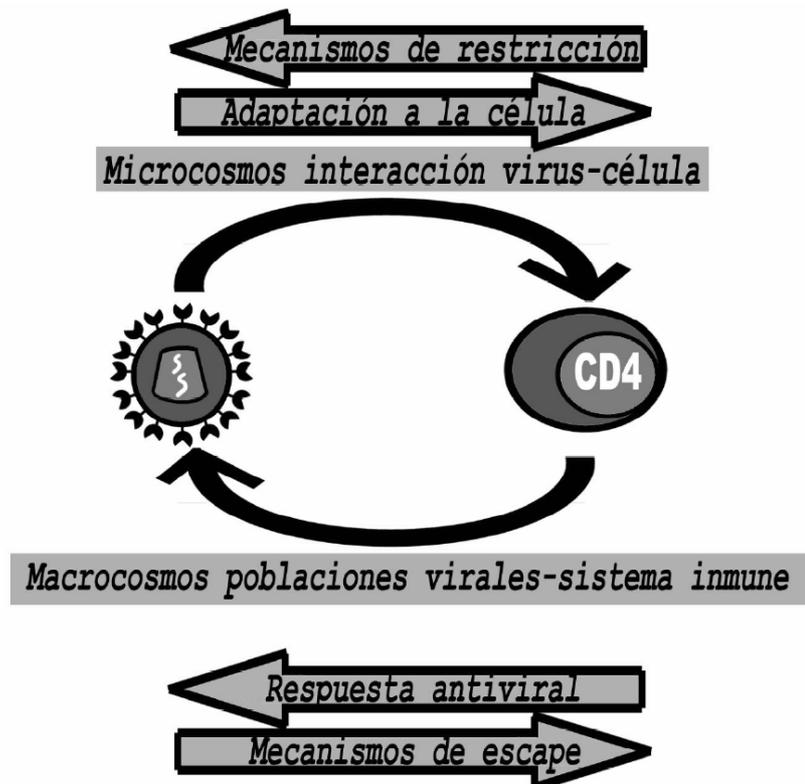
La activación, diferenciación y proliferación de las células T se produce en los órganos y tejidos linfáticos secundarios. Se conocen tres tipos de células T: colaboradoras, citotóxicas y de memoria.

1.4.2.- Inmunopatogenia del VIH.

Desde el punto de vista evolutivo podemos considerar el VIH como un lentivirus que se ha adaptado a infectar linfocitos CD4 en los que se replica con una cinética muy agresiva, situación que como hemos comentado, es poco frecuente en los lentivirus. Estas características provocan una profunda inmunosupresión en el hospedador debido tanto a la destrucción linfocitaria como a distintos mecanismos de interferencia con la función del sistema inmune.

Para analizar la inmunopatología del SIDA es necesario situar la relación entre el virus y el hospedador en un doble contexto. Por una parte se ha de considerar la interacción entre un virus y una célula; en este «microcosmos» es importante analizar y comprender los mecanismos de adaptación del virus a su célula diana: los mecanismos celulares de protección frente a la infección y cómo el VIH es capaz de sobrepasarlos. Existe un segundo nivel de complejidad en el que se enfrentan poblaciones virales formadas por miles de millones de partículas y un sistema inmunitario dotado de numerosos mecanismos de defensa y amplios repertorios de respuesta antimicrobiana. En este «macrocosmos», el VIH debe ser capaz de adaptarse mediante mecanismos de escape que le permitan eludir la respuesta inmunológica. (**Figura 1.14**)

Figura 1.14: Niveles de interacción VIH-hospedador



En los últimos años nuestra visión sobre los mecanismos inmunopatogénicos de la infección por el VIH se han modificado sobre la base de distintos descubrimientos: el papel del sistema GALT o sistema inmunitario asociado a mucosas como diana preferente de la infección por el VIH, la activación crónica del sistema inmunitario como mecanismo de inmunosupresión y la importancia de los factores del hospedador en la generación de infecciones con distinto grado de virulencia. La fisiopatología del SIDA es, por tanto, un proceso extraordinariamente complejo en el que se encuentran implicados mecanismos patogénicos muy diferentes (Douek, Roederer, & Koup, 2009).

1.4.2.1.- Factores de restricción celular y mecanismos de escape viral. Interacción virus-célula.

La replicación en este entorno celular ha supuesto para el VIH un proceso de adaptación para superar una serie de barreras que los linfocitos CD4 oponen a la replicación del VIH, entre las que destacan: la unión secuencial de distintas proteínas de membrana, como receptores virales, para penetrar en la célula; la utilización de la

maquinaria de transcripción y traducción celular reguladas por secuencias del propio genoma del VIH, y por último la capacidad para persistir de forma latente en las células diana, con capacidad de reactivarse por idénticos mecanismos a los que emplean los propios linfocitos en el curso de la respuesta inmune, y el desarrollo evolutivo de una serie de genes denominados “accesorios” para bloquear los potentes factores de restricción que la célula opone a las infecciones por retrovirus (Coiras, Lopez-Huertas, Sanchez del Cojo, Mateos, & Alcami, 2010).

La existencia, en la superficie de células dendríticas, de una serie de lectinas de tipo C denominadas DC-SIGN, L-SIGN, e ICAM-3 en la membrana de los linfocitos contribuyen a la formación de la sinapsis inmune (van Kooyk & Geijtenbeek, 2003). Además, estas proteínas unen de forma inespecífica distintos virus envueltos entre los que se encuentra el VIH. Es por la existencia de estas moléculas por lo que las células dendríticas se encuentran recubiertas de partículas virales situadas en la parte externa de su membrana, lo que facilita e incrementa enormemente la infección de los linfocitos, especialmente en los ganglios linfáticos. Es en esta «sinapsis inmunológica» donde se producen los fenómenos de infección de los linfocitos CD4 que entran en contacto con las células dendríticas. Este fenómeno, denominado *de facilitación en trans de la infección*, reviste una enorme importancia para explicar la propagación del VIH y hace de los órganos linfoides el gran reservorio donde la infección se establece y se transmite a los linfocitos CD4 (**Figura 1.15**).

Como se ha explicado con anterioridad, la infección de los linfocitos CD4 se produce mediante la interacción con dos tipos de receptores celulares: la molécula de CD4, presente en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de estirpe mononuclear-fagocítica, y los receptores de quimiocinas (Arenzana-Seisdedos & Parmentier, 2006). A pesar de que *in vitro* se ha descrito que muchos receptores de quimiocinas son capaces de actuar como correceptores del VIH *in vivo* existen únicamente dos receptores mayores, que son las moléculas CCR5 y CXCR4. El primero une hasta trece quimiocinas diferentes entre las que destacan RANTES (CCL5) y MIP-1 α /MIP-1 β (CCL4) y los virus que emplean este correceptor se conocen como cepas R5. El receptor CXCR4 tiene como ligando natural la quimiocina CXCL12, y es el principal receptor de las cepas X4. Además de los virus con un tropismo estricto por CCR5 o

CXCR4 se han descrito variantes capaces de entrar en la célula a través de múltiples correceptores (cepas de tropismo dual o ampliado, denominadas R5X4 **Figura 1.16**).

Figura 1.15: Sinapsis inmune.

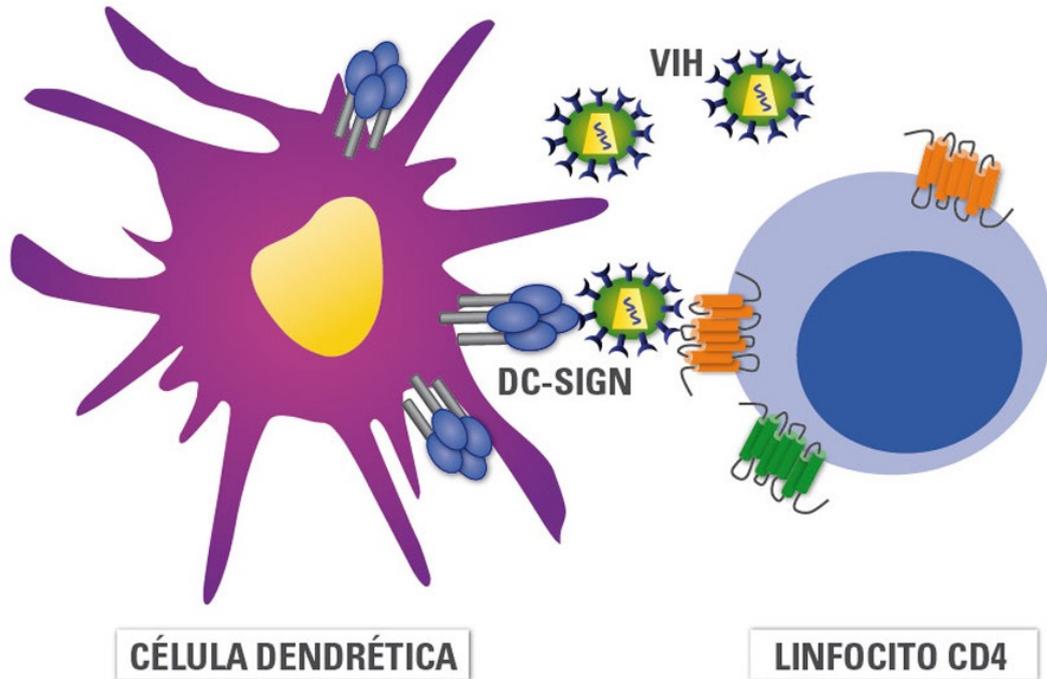
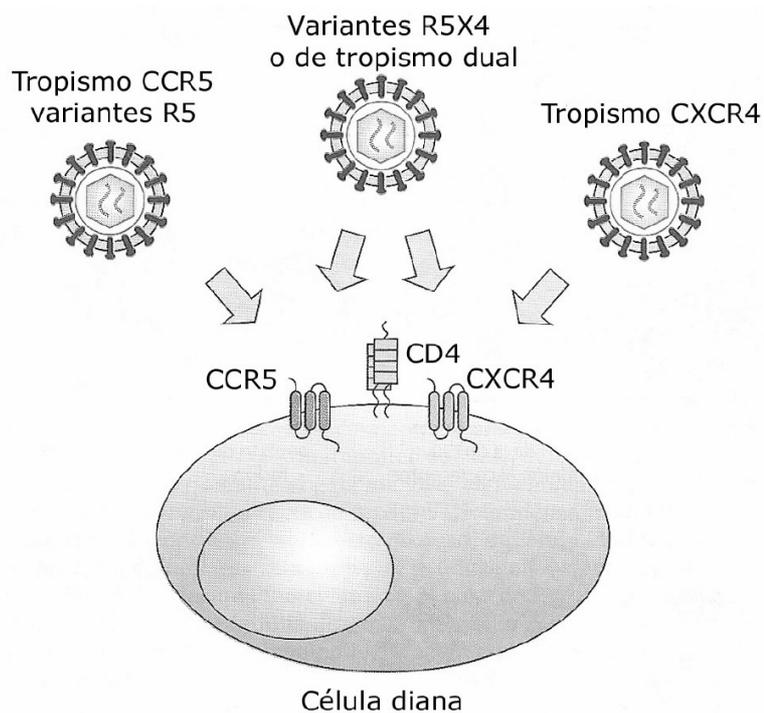


Figura 1.16: Clasificación de las células del VIH según su tropismo



Las quimiocinas que se unen a CCR5 y CXCR4, especialmente CCL4, CCL5 y CXCL12, son capaces de inhibir la infección por el VIH debido a un fenómeno de competición en la unión con sus correceptores y por la internalización de los receptores de quimiocinas tras la interacción con su ligando. Con toda probabilidad, estos fenómenos constituyen un potente mecanismo antiviral *in vivo*.

Por otra parte, la caracterización de los correceptores del VIH y sus ligandos naturales ha permitido definir una serie de variantes genéticas que se asocian con resistencia a la infección o con una progresión lenta de la enfermedad (Arenzana-Seisdedos & Parmentier, 2006). La más importante es la delección de la secuencia genética que codifica para los primeros 32 aminoácidos en CCR5 (variante delta 32) que origina un receptor defectivo. El rasgo heterocigoto para este receptor enlentece la progresión de la infección mientras que la delección homocigótica para esta variante defectiva genera un estado prácticamente absoluto de resistencia a la infección.

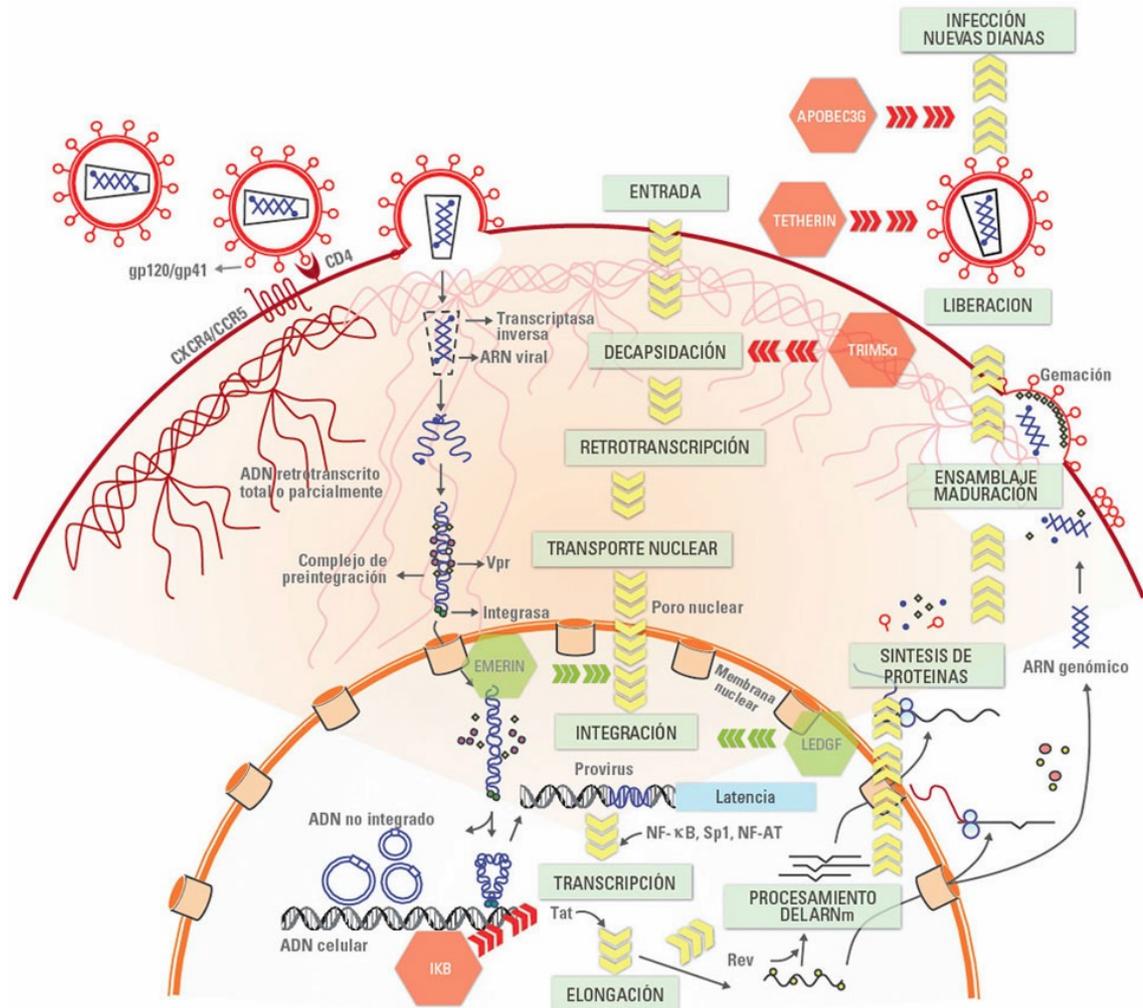
Una vez que se realiza el proceso de fusión entre las membranas viral y celular, se produce la internalización de la nucleocápside viral y la decapsidación del genoma vírico. La decapsidación es un proceso por el que las proteínas de la cápside se desensamblan y liberan el genoma viral. Este paso es inhibido por proteínas celulares que generan así un mecanismo de restricción frente a la infección por retrovirus.

Existe una maquinaria celular que se pone en marcha una vez que el genoma del VIH penetra en el citoplasma, conocida en otros modelos animales, pero que ha sido identificada para el VIH hace pocos años. La identificación de estos factores en células humanas ha supuesto un cambio en el paradigma que teníamos del ciclo viral (Mascarenhas & Musier-Forsyth, 2009). Constituye todo un sistema de factores de restricción intracelular definido apropiadamente como “inmunidad intracelular innata” y representa un poderoso mecanismo de protección frente a las infecciones por retrovirus (**Figura 1.17**).

Muchos de estos sistemas, TRIM5 α , SAMHD1, APOBEC3G y Tetherina, son regulados positivamente por el interferón de tipo I, cuya síntesis se induce cuando distintos sensores intracelulares detectan productos microbianos como el ARN o ADN

virales, restringida a determinados retrovirus. Un aspecto importante de estos sistemas es su especificidad de especie.

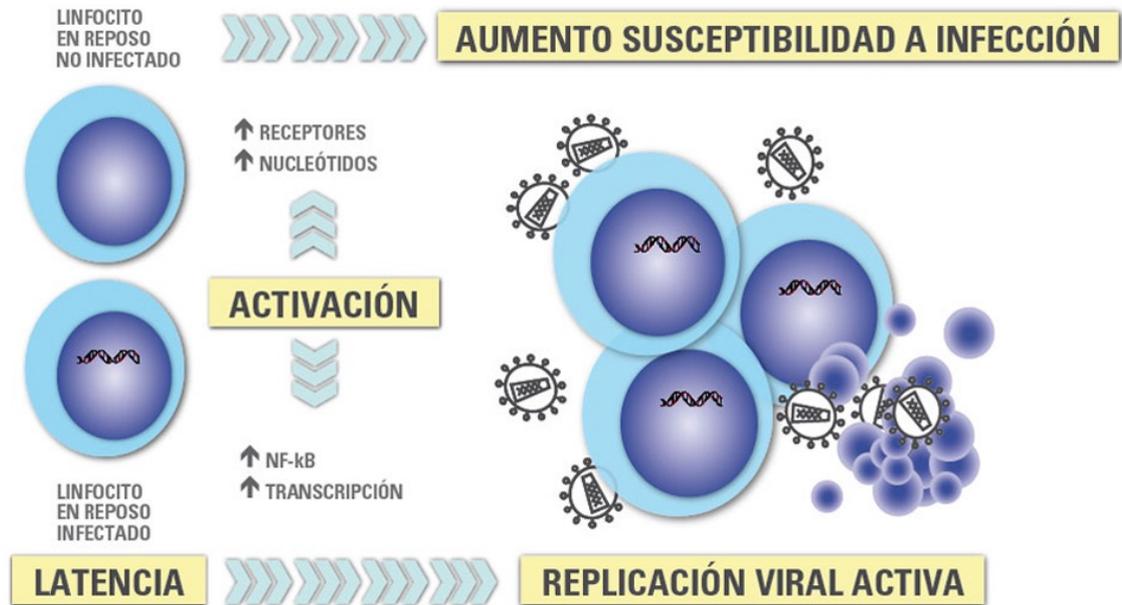
Figura 1.17: Ciclo biológico y factores de restricción celular



Desde la perspectiva del virus, superar estos obstáculos es indispensable para poder realizar su ciclo replicativo en un hospedador determinado, para lo que ha generado distintas estrategias que incluyen la mutación adaptativa para la producción de proteínas virales que inhiben los factores de restricción celular, tales como: TRIM5 α , que bloquea la decapsidación; APOBEC3G, que aumenta la tasa de mutación en el ADN retrotranscrito por la TI y es neutralizado por la proteína *Vif*; Tetherina, que impide la liberación de los viriones formados, es bloqueada por la proteína *Vpu*; SAMHD1, que depleciona de nucleótidos del citoplasma de las células dendríticas, y aún no se conoce mecanismo de neutralización por el VIH.

Por último mencionar que la latencia está relacionada con la inhibición de NF- κ B, que desaparece con la activación inmunológica.

Figura 1.18: Activación linfocitaria



Esto explica que la replicación del VIH depende absolutamente de la activación de los linfocitos infectados. La estrategia de adaptación del VIH al entorno celular de los linfocitos CD4 se basa en que la replicación viral depende de factores celulares que son inducidos solo cuando la célula es activada. De esta manera, clásicamente se ha considerado que el linfocito CD4 representa un doble nicho ecológico en el ciclo biológico del VIH: en estado de reposo celular permite la latencia viral al carecer de los factores necesarios para permitir la replicación del VIH; por el contrario, la activación celular induce en el linfocito CD4 las proteínas de la familia NF- κ B necesarias para iniciar la transcripción del genoma viral, transformándose así en una célula especialmente permisiva para la replicación del VIH.

1.4.2.2.- Interacción entre el VIH y el sistema inmune. Infección in vivo.

En cuanto a la infección “in vivo”, o interacción entre el VIH como *cuasiespecie viral* y el hospedador humano, lo nuclear es la destrucción de células del sistema inmune mediante efecto citopático o mecanismos apoptóticos; la generación de

variantes capaces de eludir la respuesta inmune, y el desgaste y envejecimiento precoz del sistema inmune mediante una sobrecarga antigénica mantenida.

La historia natural de la infección VIH puede dividirse en tres fases: fase temprana de la infección, establecimiento de una infección crónica y fase acelerada.

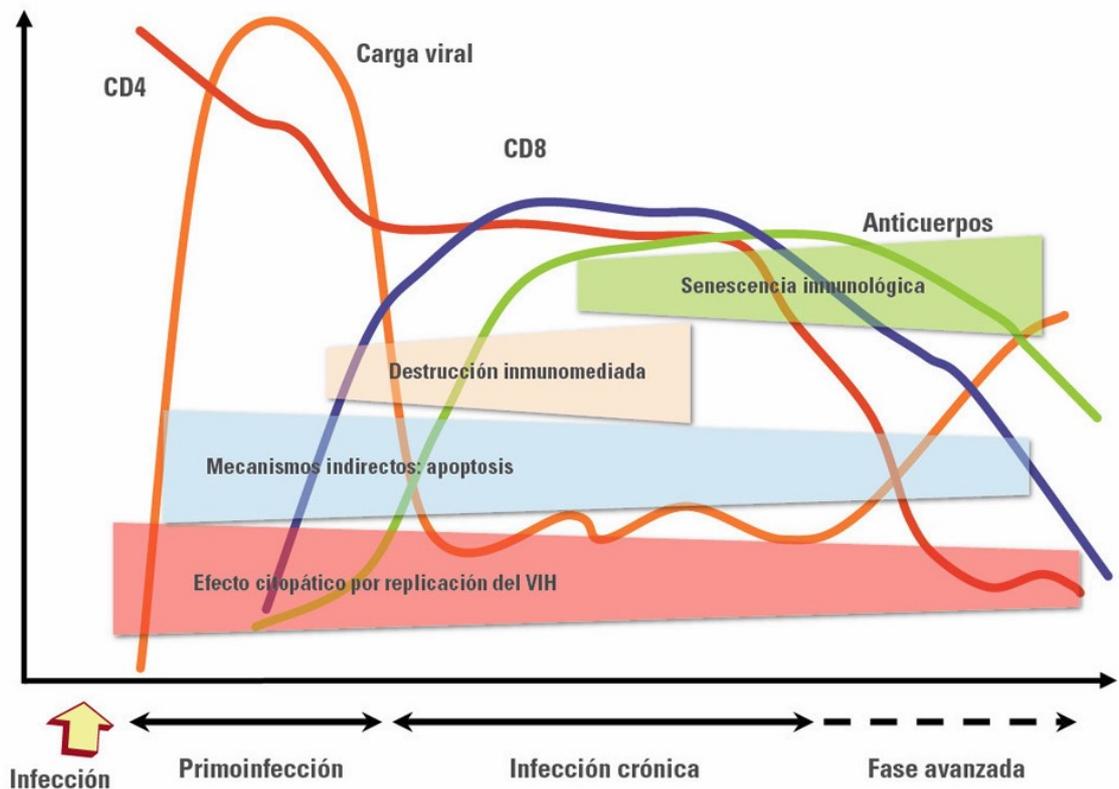
Fase temprana.

La capacidad infectiva del VIH es inferior a la de otros muchos virus, por lo que desde el punto de vista probabilístico se requieren decenas de contactos sexuales para que se produzca la transmisión entre sujetos. Este concepto se ha visto especialmente reforzado por el estudio de las variantes virales existentes en los primeros días de la infección que muestran que en la transmisión heterosexual la infección es iniciada por un número muy limitado de clones virales, probablemente una sola partícula, en el 78-90% de las ocasiones. Aunque en la transmisión por vía rectal o por vía endovenosa la infección por variantes múltiples es más frecuente (40% y 60% respectivamente), el número de clones virales fundadores es limitado (entre 2 y 5 en la mayoría de los casos), lo que muestra la resistencia natural del organismo a la infección por el VIH-1.

En la transmisión por vía sexual, las células dendríticas y linfocitos localizados en la lámina propia de las mucosas vaginal y rectal, constituyentes del sistema GALT, representan la primera diana de la infección por el VIH (Brenchley et al., 2004). En este microambiente se producen fenómenos de presentación antigénica por parte de las células especializadas (dendríticas o de Langerhans), lo que hace que los linfocitos del sistema GALT tengan un fenotipo de célula memoria activada, que crea un contexto especialmente apto para la infección por el VIH (van Kooyk & Geijtenbeek, 2003). A partir de esta primera estación se produce la replicación y diseminación local de la infección a los linfocitos circundantes y la extensión posterior a ganglios linfoides periféricos, transportado por macrófagos, células dendríticas y linfocitos infectados (Haase, 1999). La etapa estrictamente mucosa de la infección es muy breve y a las 48-72 horas es posible detectar la diseminación viral en ganglios periféricos (C. J. Miller et al., 2005). La carga viral (CV) en sangre se detecta a partir de la primera semana de la infección y aumenta exponencialmente, lo que refleja la progresión de la infección por

el VIH durante el *período ventana* en el que no existe una respuesta inmune específica frente al virus.

Figura 1.19: Evolución de la CV, CD4 y respuesta inmune en la infección por el VIH-1



En los primeros días de la infección por VIH, se produce una diseminación viral masiva en los linfocitos del sistema GALT (Brenchley, Price, & Douek, 2006). Este fenómeno origina una depleción de más del 60 % de los linfocitos CD4 del epitelio intestinal, una proporción muy superior a la observada en linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos de fenotipo memoria que expresan CCR5 son destruidos de forma preferente.

Tras este período «ventana» de 4-12 semanas, necesario para que se construya la respuesta inmune específica, se detectan tanto anticuerpos específicos como linfocitos CD8 con actividad citotóxica frente al VIH. Probablemente, ambos brazos de la inmunidad (humoral y celular) son importantes en el control de la replicación viral tras la primoinfección. Este control es el resultado del equilibrio entre dos factores: la

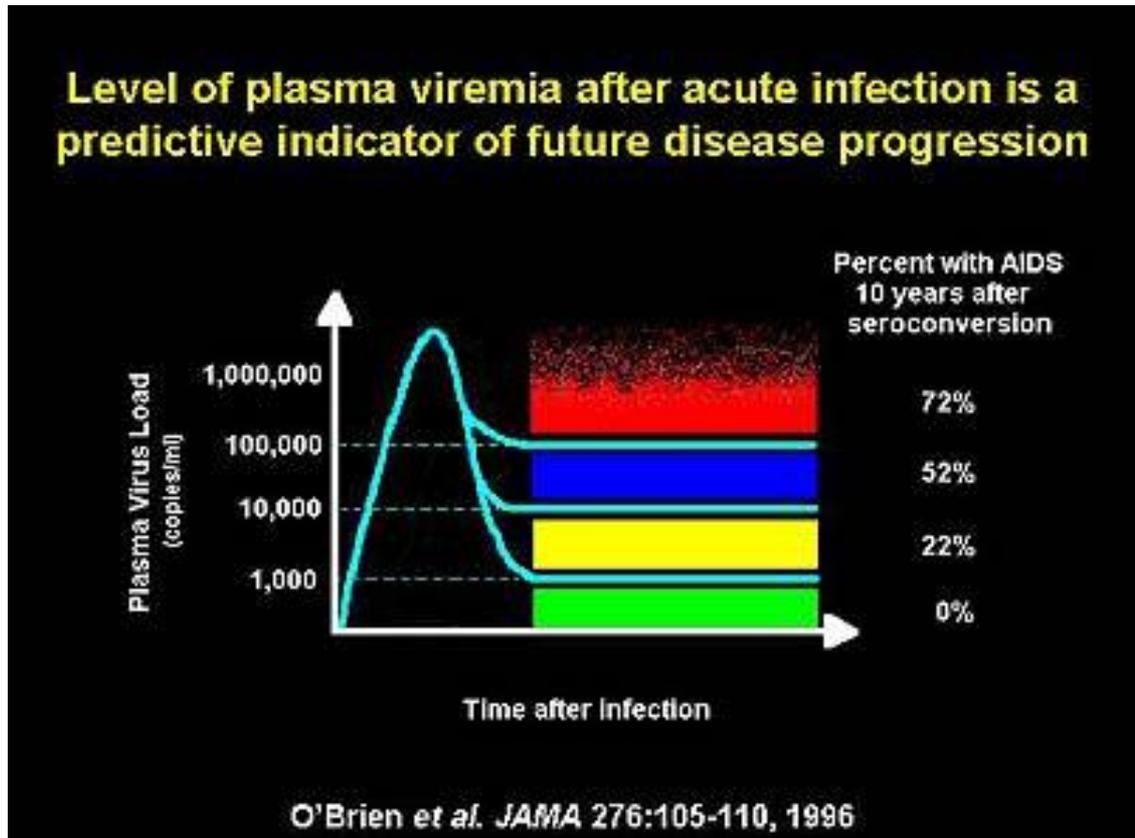
virulencia de las cepas infectantes y la intensidad de la respuesta antiviral generada por el hospedador. La resultante de estos dos factores se refleja en la carga viral basal del paciente tras la primoinfección, que constituye un dato de enorme valor pronóstico en la evolución de la infección (Mellors et al., 1996), ya que indica el equilibrio alcanzado en un sujeto determinado entre el virus y su sistema inmunitario (**Figura 1.20**). En cualquier caso, esta respuesta antiviral es incapaz de erradicar el virus, que ya se ha acantonado en las primeras horas de la infección en el organismo, y se limita a contener, aunque sea en una proporción importante, la replicación viral estableciéndose así la fase crónica de la infección.

Esta depleción de linfocitos CD4 en la lámina propia persiste en la fase crónica de la infección a pesar del tratamiento antirretroviral, lo cual indica que la destrucción del sistema GALT que se produce en la primoinfección no se recupera posteriormente (Brenchley, Price, & Douek, 2006). Este acontecimiento probablemente representa un elemento esencial en la patogenia de la infección, ya que la afectación del sistema GALT, entre otros factores, permite el paso de bacterias intestinales (translocación bacteriana incrementada) y contribuye a la activación crónica y senescencia del sistema inmunitario en la fase crónica de la infección (Brenchley et al., 2004; Mehandru et al., 2006; Mehandru et al., 2007). A partir de la infección inicial del sistema GALT, el VIH se disemina rápidamente a órganos linfoides donde establece una infección persistente con una proporción de linfocitos infectados de forma latente y otros con replicación activa.

Fase crónica de la infección

Los órganos linfoides constituyen el gran reservorio, durante toda la enfermedad, en donde se producen los fenómenos de infección y propagación del VIH. La puesta en marcha de los mecanismos de inmunidad específica consigue un control parcial de la replicación viral y provoca una caída de la viremia, que se mantiene relativamente estable durante un tiempo y que varía en cada paciente. Esta viremia basal refleja un equilibrio entre la replicación viral y el control inmunitario.

Figura 1.20: CV como predictor de la evolución de la enfermedad



La generación de una respuesta inmune por parte del hospedador es, sin embargo, incapaz de erradicar el virus que se acantona en distintos reservorios en los que replica de manera persistente, pero genera una presión inmunológica mantenida que obliga al virus a producir de manera continua variantes de escape a la presión inmune, que a su vez modifica su espectro de actividad para neutralizar las nuevas variantes virales. Esta fase de acción y adaptación por parte del virus y el sistema inmunológico caracteriza la fase crónica de la infección, en la que se mantienen durante años las respuestas celulares y humorales frente al VIH. Esta falta de atenuación de la respuesta refleja, por una parte, la intensidad y cronicidad de la replicación viral que sigue estimulando persistentemente el sistema inmunitario y, por otra, la capacidad de éste para controlar durante largos períodos la replicación masiva que se produce a lo largo de toda la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos de inmunosupresión y destrucción de los linfocitos CD4 por el VIH tienen lugar de forma persistente, lo que se traduce en una disminución del recuento en sangre periférica y, a medio plazo, conllevan una incapacidad progresiva del sistema inmunitario para contener la replicación viral. La

sobrecarga antigénica que representa la replicación viral mantenida hace que exista una activación continua del sistema inmunitario, y esto provoca alteraciones en la maduración y activación de linfocitos CD4 y CD8 y un envejecimiento precoz del sistema. Por otra parte, la emergencia de variantes virales más agresivas, aumenta la destrucción linfocitaria y desplazan el equilibrio virus-hospedador a una situación de replicación viral acelerada e inmunosupresión progresiva que caracterizan la infección avanzada. Simultáneamente, existiría un compartimiento linfocitario en que el virus permanecería en un estado de latencia absoluta, sin que en la actualidad se conozca con precisión la cinética de transición de estas células latentes al compartimiento de replicación activa (Coiras et al., 2009).

Fase acelerada o estadio de SIDA

Los estadios finales de la enfermedad se caracterizan clínicamente por la aparición de infecciones oportunistas, desde el punto de vista inmunológico por el descenso del número de linfocitos CD4 y, virológicamente, por la elevación de la carga viral. A medida que la infección progresa, el sistema inmune es destruido y se produce un aumento en la replicación viral. Esta replicación acelerada permite una mayor generación de mutantes, lo que a su vez aumenta las posibilidades de evasión viral y la generación de variantes más citopáticas. La elevación de la CV y un rápido descenso en la cifra de linfocitos CD4 son los marcadores de la replicación «salvaje» del virus, debido al escaso control de un sistema inmune progresivamente deteriorado.

En esta etapa se observa un deterioro de la respuesta humoral y celular frente al VIH: disminuyen los niveles de anticuerpos frente a p24 y otras proteínas virales, decrece la tasa de anticuerpos neutralizantes, la actividad citotóxica y el número de linfocitos CD8. La pérdida progresiva de linfocitos CD4 es el principal marcador del daño inmune pero otros parámetros, como las alteraciones de la maduración y activación de linfocitos CD4 y CD8 así como el envejecimiento precoz del sistema inmune, representan mecanismos patogénicos que se generan durante la fase crónica de la infección y que conducirán al desarrollo del SIDA. En esta fase se ha descrito la emergencia de variantes con un tropismo X4 en aproximadamente el 50 % de los pacientes (Glushakova et al., 1998). La detección de estas cepas se asocia con un rápido descenso en la cifra de linfocitos CD4 y un mal pronóstico de supervivencia.

Mecanismos de linfocitopenia CD4

La disminución de linfocitos CD4 representa el marcador más importante de la infección por el VIH y no es debido únicamente a una destrucción de las células infectadas por el virus, sino que es producido por distintos mecanismos que se exponen a continuación y se resumen en la **tabla 1**.

Tabla 1: Mecanismos de linfocitopenia CD4

Alteración en la homeostasis de los linfocitos CD4 <ul style="list-style-type: none">- Redistribución linfocitaria- Bloqueo en la regeneración linfocitaria
Destrucción de CD4 por efecto citopático directo
Mecanismos indirectos de destrucción de CD4 <ul style="list-style-type: none">- Destrucción mediante mecanismos inmunitarios- Apoptosis por proteína tóxicas del virus (gp160, Vpr, Tat)
Hiperactivación y agotamiento del sistema inmunitario <ul style="list-style-type: none">- Replicación persistente del VIH- Traslocación bacteriana- Reactivación de virus endógenos

Redistribución linfocitaria

La acumulación de partículas virales en los órganos linfoides origina un reclutamiento de linfocitos en estas zonas. Por tanto, la linfopenia CD4 no es únicamente debida a fenómenos de destrucción linfocitaria sino a un «secuestro» en los órganos linfoides. Este fenómeno se ha descrito en otras infecciones crónicas en que existe una gran sobrecarga y estimulación antigénica, como las enfermedades por parásitos. Tras el inicio del tratamiento antirretroviral se produce un rápido descenso del virus extracelular unido a la membrana de las células dendríticas ganglionares, y este proceso se asocia con un aumento en el número de linfocitos CD4 memoria en sangre periférica (Pakker et al., 1998).

Bloqueo en la regeneración linfocitaria

Cuando se inicia la reconstitución inmunológica tras el TAR, se observa un aumento en la cinética de división linfocitaria en la subpoblación CD4 respecto a los sujetos infectados sin tratamiento y a los pacientes seronegativos. Estos datos demuestran que, durante la fase crónica de la infección, existe un bloqueo de la entrada de los linfocitos CD4 en ciclo de división. Únicamente con la disminución de la CV plasmática a niveles indetectables, el sistema es capaz de entrar en ciclo de mitosis con una mayor velocidad. Estos datos apuntan a un nuevo mecanismo de disminución de CD4: el bloqueo en la activación y proliferación linfocitaria debido a la infección por el VIH. Este bloqueo puede producirse a nivel central (timo o médula ósea) o periférico (órganos linfoides) (McCune, 2001).

Destrucción de CD4 por efecto citopático directo

La destrucción de los linfocitos CD4 representa el evento más característico de la infección por el VIH (McCune, 2001). Dada la agresiva cinética de replicación viral, probablemente gran parte de esta destrucción es consecuencia directa de la replicación viral y del consiguiente efecto citopático en la célula infectada.

Esta destrucción se produce de manera preferente en linfocitos activados, que son especialmente susceptibles a la infección y replicación viral debido a las siguientes características: altos niveles del receptor CCR5 en superficie, niveles elevados de nucleótidos y ATP que permiten la retrotranscripción completa del genoma viral y su transporte al núcleo. Tienen activados también los factores de transcripción que el VIH necesita para su replicación (Coiras et al., 2009). Por este motivo la infección y destrucción de linfocitos CD4 activados es muy superior a la de linfocitos no activados o en situación de reposo inmunológico. Esto tiene dos consecuencias importantes en la patogenia de la infección. Por una parte, la mayoría de los linfocitos del sistema GALT se encuentran en estado de activación, ya que se trata de un entorno sometido a una enorme sobrecarga antigénica y esto les hace especialmente susceptibles a la infección por el VIH (Coiras et al., 2009). Como consecuencia, una gran proporción de CD4 situados en la lámina propia intestinal, que representa más del 50% de los linfocitos totales del organismo, es destruida en los primeros días de la infección (Brenchley et al.,

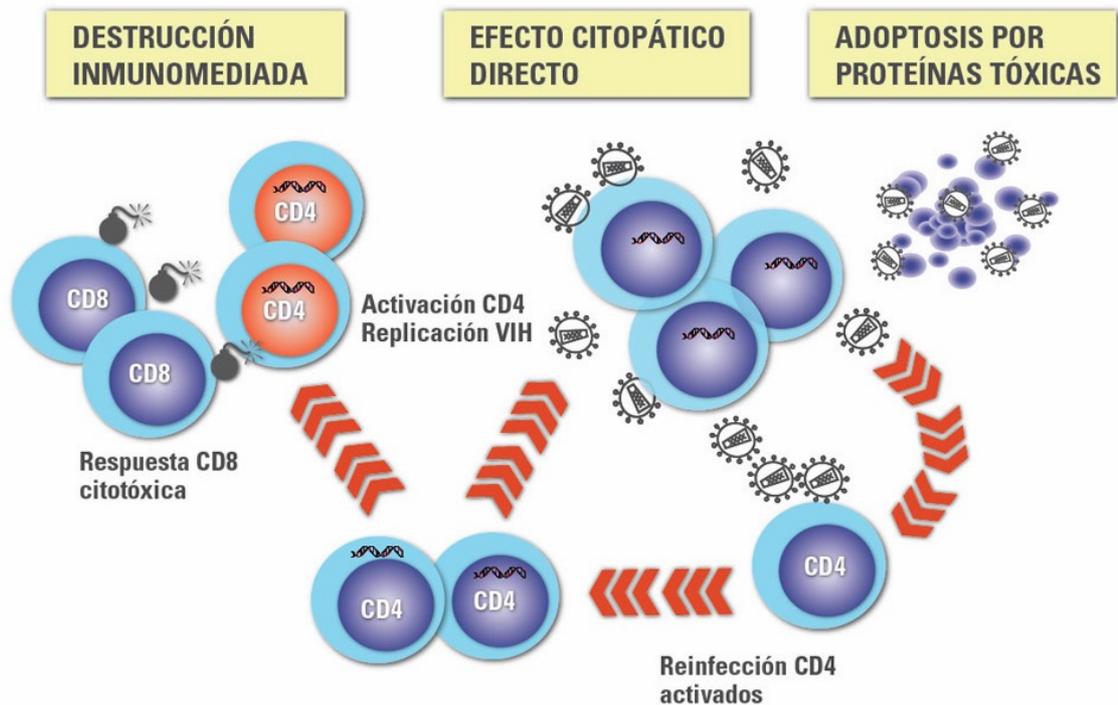
2004). La destrucción se produce, predominantemente, por efecto citopático directo del virus sobre las células infectadas, pero también por mecanismos apoptóticos inducidos por las proteínas virales, especialmente la gp160. Este mecanismo es particularmente brutal en la fase aguda de la infección, pero se mantiene a lo largo de todas las fases de ésta en que existe viremia (Brenchley et al., 2004) ya que, dado su grado de activación, son dianas preferentes de la infección. Este daño es en gran parte irreversible, e incluso en presencia de TAR no se restituye completamente (Mehandru et al., 2006), por lo que la barrera inmune, que protege al organismo del paso de gérmenes a través de la mucosa intestinal se ve profundamente dañada tras la primoinfección. Este deterioro de la inmunidad de las mucosas tiene unas consecuencias fatales para la evolución de la infección, lo que ha hecho que algunos autores califiquen a la inmunodeficiencia asociada a la infección por el VIH como resultado de una “catástrofe mucosa” (Brenchley, Price, & Douek, 2006).

Por otra parte, la puesta en marcha de una respuesta inmune específica permite un control de la replicación viral, pero paradójicamente contribuye a la destrucción de una subpoblación de linfocitos CD4 de especial importancia, los linfocitos memoria (Brenchley, Ruff, et al., 2006). Como hemos mencionado, los linfocitos activados son especialmente susceptibles a la infección por el VIH y, por tanto, en el proceso de respuesta frente al virus, los clones CD4 específicos frente al VIH son destruidos de manera preferente y esto agrava cualitativamente la inmunodeficiencia y reduce la presión sobre el virus. La disminución de los linfocitos CD4 que reconocen determinantes antigénicos frente al VIH tiene, probablemente, consecuencias muy importantes en la evolución futura de la infección, ya que genera “agujeros” en el repertorio de respuesta frente al VIH que facilita el escape del virus a la presión inmune celular.

Mecanismos indirectos de destrucción de CD4. Destrucción inmunomediada.

Los mecanismos de destrucción indirecta pueden clasificarse en aquellos mediados por la propia respuesta inmunitaria del paciente y los que son debidos al efecto «tóxico» de proteínas, que alteran las vías de transducción linfocitaria y llevan a la muerte celular.

Figura 1.21: Mecanismos de destrucción de linfocitos CD4



Los linfocitos CD4 infectados se transforman en dianas del sistema inmune y, al expresar péptidos virales en sus moléculas HLA de clase I, son susceptibles al reconocimiento y destrucción por linfocitos citotóxicos. En modelos animales se ha demostrado que la infusión de linfocitos CD4 activados frente al VIH origina una disminución del número de CD4 infectados. En pacientes con infección reciente existe una correlación entre el descenso de CD4 y la expansión de clones CD8 antivirales, lo cual sugiere que este mecanismo puede contribuir a la destrucción de CD4 (Famularo, Moretti, Marcellini, Nucera, & De Simone, 1997).

Apoptosis por proteína tóxicas del virus (gp160, Vpr, Tat)

La apoptosis o muerte celular programada constituye un mecanismo fisiológico mediante el cual la célula «se suicida» de forma controlada. Los mecanismos de apoptosis cumplen un papel muy importante en todos los sistemas de desarrollo: embriogénesis, proliferación y diferenciación hematopoyética, control de la proliferación tumoral y regulación de la activación inmunológica.

Numerosos datos experimentales apoyan la hipótesis de que el VIH puede inducir apoptosis a través de mecanismos muy diferentes: activación crónica del sistema inmune, interacción entre los receptores y la envuelta viral, efecto tóxico de las proteínas virales, aumento de la expresión de ligandos citotóxicos y síntesis de quimiocinas por linfocitos y macrófagos. Quizás la observación más importante *in vivo* es la que muestra que, en los ganglios linfáticos de pacientes infectados, existe una mayoría de células apoptóticas que no se encuentran infectadas y una minoría de células que replican activamente el virus y no presentan signos de apoptosis (Finkel et al., 1995). Estos datos, junto con numerosos resultados obtenidos *in vitro*, sugieren que la apoptosis puede ser un mecanismo indirecto complementario a la destrucción por efecto citopático directo. La muerte celular inducida por apoptosis se produce a través de dos vías: la vía extrínseca, que es activada mediante la unión en la membrana plasmática de quimiocinas de la familia del TNF- α , receptores que activan vías bioquímicas de muerte celular, y la vía intrínseca, que altera la permeabilidad mitocondrial por señales de estrés intracelular.

Distintas proteínas virales son pro-apoptóticas y actúan por mecanismos diferentes. La unión de gp120 a CD4 activa la vía CD95-CD95L y aumenta la susceptibilidad a la apoptosis mediada por Fas. Además de la gp120, se ha descrito que las proteínas reguladoras *Vpr* y *Tat* ejercen un efecto proapoptótico. La inducción de apoptosis por *Vpr* se produce a través de la vía endógena, debido a su interacción con la proteína translocadora de adenina en la membrana interna mitocondrial. Asimismo, la proteína *Tat* es una proteína proapoptótica, especialmente sobre células del sistema nervioso central. Paradójicamente *Tat* podría tener un papel antiapoptótico en linfocitos infectados, un mecanismo general en muchas infecciones virales.

Ante la infección por virus nuestras células disponen de una serie de “sensores” intracelulares que desencadenan la apoptosis como un mecanismo para evitar la replicación y propagación de los virus. Muchas familias de virus antagonizan estos “sensores” para mantener la célula viva el tiempo suficiente para permitir su propia replicación. Distintos trabajos han demostrado que la expresión intracelular de la proteína *Tat* en linfocitos aumenta su resistencia a la apoptosis y ésta podría ser una de sus funciones (Lopez-Huertas et al., 2010).

La apoptosis dependiente de caspasa-3, producida en el linfocito CD4 activado y replicando VIH es responsable de 5% de la muerte celular por este mecanismo, mientras que la piroptosis, desencadenada por la presencia de DNA deficientemente transcrito, que determina una infección abortiva en el linfocito, es responsable del 95% de esta, y está mediada por caspasa-1 (Doitsh et al., 2014)

Hiperactivación y agotamiento del sistema inmunitario

Durante la fase crónica de la infección se mantienen los mecanismos de infección y destrucción de linfocitos activados, especialmente en el sistema GALT. A su vez, la persistencia de la replicación viral origina una activación constante del sistema inmune que genera continuamente nuevas poblaciones linfoides con actividad antiviral, lo que justifica la caída relativamente lenta de los CD4, en lugar de producirse un descenso mucho más rápido de estas células, como sería esperable, teniendo en cuenta la cantidad de mecanismos de destrucción de CD4 existentes. Sin embargo, esta activación no es completamente eficaz porque cuando se analiza el sistema inmune en esta fase de la infección se observa un mal funcionamiento del mismo, que se refleja en un trastorno en la diferenciación final de linfocitos CD8 específicos frente al VIH, que carecen de la capacidad citolítica requerida (Appay & Sauce, 2008; Douek et al., 2009).

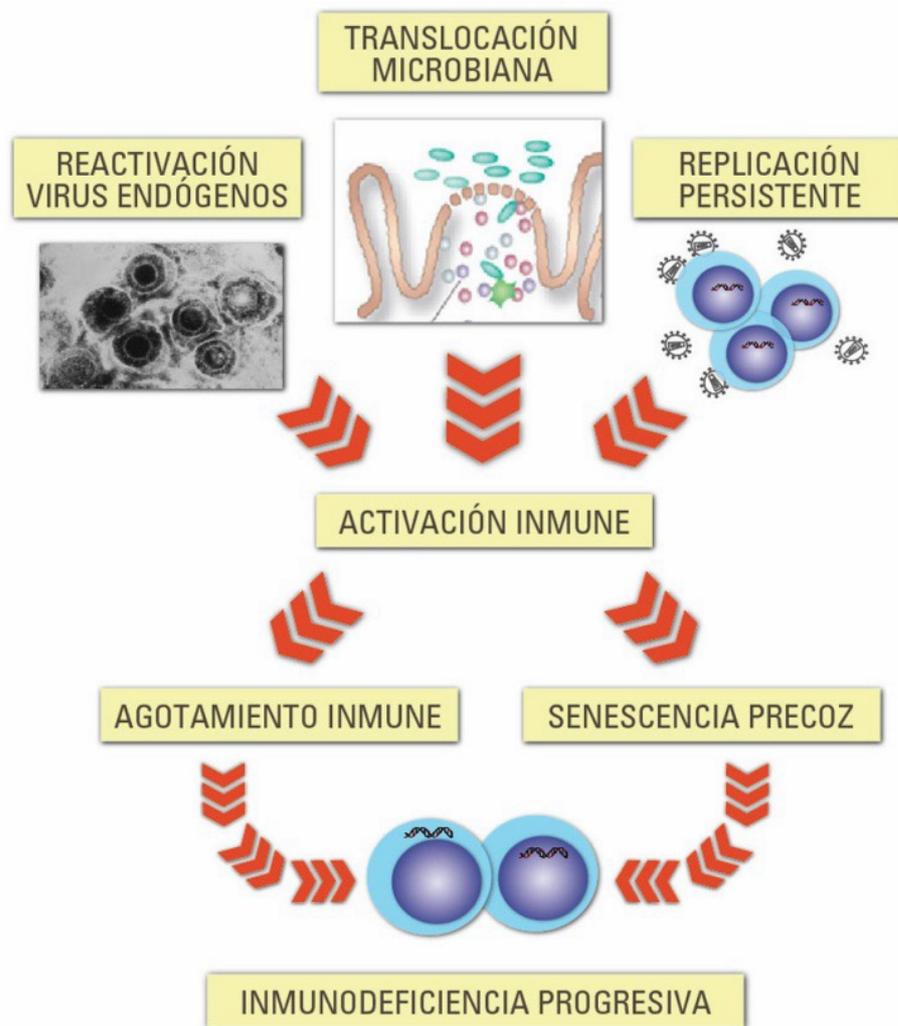
El estudio de distintos marcadores inmunológicos muestra un desequilibrio en la generación de células efectoras, el compartimento de proliferación y las células en diferenciación final. La conclusión de la mayoría de los estudios es que en la fase crónica de la infección se produce una activación permanente del sistema inmune que es incapaz de erradicar la infección y que origina un “agotamiento” o “envejecimiento” del sistema inmune. Durante años hemos considerado que la viremia VIH era la causa de esta activación constante. Sin embargo, la observación de que la activación del sistema y su senescencia persiste, aunque a menor nivel, en pacientes tratados con CV indetectable, ha llevado a proponer otras hipótesis. Dos fuentes antigénicas parecen jugar un papel esencial en la activación inmune de los pacientes en tratamiento. Por una parte, la destrucción del sistema GALT producida en la fase aguda de la infección daña de manera irreparable la barrera mucosa frente a la microbiota de la luz intestinal. Como consecuencia, se detecta en los pacientes un aumento en sangre de productos bacterianos que refleja una translocación aumentada de los mismos debido a una barrera

dañada (Brenchley, Price, Schacker, et al., 2006). Por otra parte, se ha descrito una replicación de virus endógenos, especialmente herpesvirus, que contribuirían a la activación crónica del sistema y aceleraría la progresión a SIDA (Deayton et al., 2004). **(Figura 1.22)**

Probablemente todos los mecanismos descritos participan en la disminución de linfocitos CD4, que representa el marcador esencial de la infección por VIH. Es probable que, en los estadios iniciales de la infección, cuando todavía no se ha generado una respuesta inmune, la elevada replicación del VIH origine la destrucción directa o por mecanismos de apoptosis de los linfocitos. Una vez la respuesta inmune celular se establece, a estos mecanismos se añadiría la destrucción inmunomediada de los linfocitos infectados por los clones CD8 específicos y el proceso de agotamiento inmune que sería predominante a medida que la infección progresa. El secuestro en órganos linfoides y el bloqueo tímico se produciría preferentemente en las fases de viremia elevada, ya que el control de la replicación viral se asocia con una redistribución de linfocitos memoria a sangre periférica al principio, y con un aumento diferido, en 4-12 semanas, del número de linfocitos naives portadores de TRECs, lo que indica su generación reciente por los órganos linfoides centrales.

Cada familia de virus desarrolla una serie de mecanismos de escape para evitar su eliminación por la respuesta inmune. En el caso de los lentivirus, estos mecanismos son fundamentalmente: su elevado índice de variabilidad, por la elevada tasa de error de la TI, lo que le permite encontrar agujeros en el repertorio inmunológico; el enmascaramiento de epítomos de neutralización, ocultando los dominios de interacción con la célula y exponiéndolos únicamente cuando se produce la unión a CD4; la rapidez en el establecimiento de la infección, antes de que se desencadene la respuesta inmune específica; la posibilidad de entrar rápidamente en una fase de latencia en los reservorios infectados, lo que le permite escapar a la vigilancia inmunológica, al no expresar productos virales en su membrana, persistiendo en los reservorios a pesar de una respuesta inmune específica; y la producción de proteínas que neutralizan los factores de restricción.

Figura 1.22: Mecanismos patogénicos en la fase crónica de la infección.



1.5.- Complicaciones actuales del VIH

Las infecciones oportunistas (IO) han sido la principal causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados por VIH desde la descripción de los primeros casos de SIDA en 1981. El progresivo deterioro de la inmunidad, principalmente celular pero también humoral, termina produciendo una inmunodepresión grave que da lugar en fases avanzadas de la infección a la aparición de múltiples complicaciones infecciosas por reactivación de infecciones latentes (toxoplasmosis, neumonía por *P. jirovecii*, infección por CMV, tuberculosis (TBC), leishmania, etc), o por infecciones recientes (*mycobacterium avium* complex (MAC), neumococo, TBC, etc).

El TARGA ha contribuido a cambiar de forma notable la evolución de la infección por VIH, reduciendo drásticamente la incidencia de IO, así como la morbilidad y la mortalidad asociadas. Sin embargo la prevalencia e incidencia de algunas enfermedades no asociadas a inmunodeficiencia, están aumentando en la población VIH, y en algunos casos son superiores a las observadas en la población general (Neuhaus et al., 2010). Entre estas enfermedades se encuentran la enfermedad cardiovascular (ECV), la disminución de densidad mineral ósea (DMO), las neoplasias, la enfermedad renal, la enfermedad hepática y el deterioro neurocognitivo.

1.5.1.- Eventos no SIDA

El aumento de la esperanza de vida logrado con el TAR, la toxicidad derivada de la exposición prolongada a fármacos antirretrovirales y el propio estado proinflamatorio que genera la infección crónica por VIH están ligados, en mayor o menor grado, a la aparición de muchos de estos procesos denominados “eventos no sida (ENOS)”. Estas comorbilidades de la infección por VIH podrían explicar la mayor mortalidad de las personas infectadas por el VIH en relación con la observada en la población general. El estudio SMART (Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study et al., 2006) demostró el papel directo del VIH en la aparición de muchos de estos ENOS. Este estudio comparó la administración de TAR continuo o episódico, según el recuento de linfocitos CD4, en 5.472 pacientes VIH con un recuento de linfocitos CD4 superior a 350 células/mm³ y sus resultados indicaron que la mortalidad y la incidencia de SIDA o ENOS fueron significativamente mayores en los pacientes virémicos que no recibían TAR.

Los ENOS son una patología emergente tras la generalización del TAR, pero también por el incremento de la edad de los pacientes infectados. Es por ello que la incidencia de ENOS dependa en gran medida de la cohorte estudiada, ya que el tiempo de infección por el VIH y la edad son factores que van a influir mucho en su aparición. Si analizamos la mayor cohorte española en la que se evalúan ENOS, como es la Cohorte RIS, con más de 5.000 pacientes incluidos, con una población mayoritariamente masculina, una edad media de 36 años a su entrada en la cohorte, baja tasa de coinfección por VHC y un seguimiento de más de 2 años, nos encontramos que el 54% de los eventos registrados eran ENOS. Los más frecuentes fueron eventos

psiquiátricos, hepáticos, neoplasias y enfermedades cardiovasculares (ECV), con una mortalidad por ENOS del 20,9%. Las causas más frecuentes asociadas a esta mortalidad fueron las neoplasias y la patología hepática (Masia et al., 2013). En la cohorte suiza (Weber et al., 2013) en el periodo comprendido entre 2005-2009, Weber y colaboradores demostraron, no solo que la mortalidad en países con acceso al TAR estaba disminuyendo, sino que las causas estaban cambiando, alcanzando la mortalidad por ENOS el 84%. La causa más frecuente fueron los tumores no defintorios de SIDA (TNDS). También observaron que los TNDS no solo se presentaron con mayor frecuencia que en la población general, sino que aparecieron a edades más precoces, de forma más agresiva y en localizaciones atípicas.

En todos los estudios la edad, la inmunoactivación crónica y el bajo recuento de CD4 son factores que se asocian a la presentación de ENOS.

Con algunas excepciones, la mayoría de los estudios que analizan la frecuencia de los ENOS son ensayos observacionales, de cohortes o de casos y controles. En general, estos estudios demuestran que los pacientes con infección por el VIH tienen un mayor riesgo relativo de padecer estas enfermedades que la población general. Por otra parte, estos estudios tienen importantes limitaciones, especialmente, la falta de control de algunas variables que están directamente implicadas en el desarrollo de estas enfermedades. Además, las diferencias observadas en los distintos estudios podrían estar en relación con las características de la población estudiada.

Sea cual sea la contribución relativa de cada una de las posibles causas asociadas a la mayor incidencia de ENOS, la aceleración ocasionada por el VIH del proceso natural de envejecimiento, la inmunoactivación crónica y el aumento de la edad media de nuestros pacientes aumentará considerablemente la aparición de estas comorbilidades. Su prevención, diagnóstico precoz y tratamiento constituyen un nuevo reto para los clínicos dedicados a la atención de personas infectadas por el VIH. Por este motivo, junto con la menor toxicidad a largo plazo del TAR actual, muchos autores recomiendan el inicio de TAR de forma precoz para suprimir cuanto antes la replicación viral del VIH y preservar una buena inmunidad.

1.6.- Tipos de respuesta frente al tratamiento antirretroviral

Ya en la era previa al TAR, llamó la atención el hecho de que un subgrupo de pacientes permanecía asintomático durante muchos años. Fueron inicialmente denominados supervivientes a largo plazo, y posteriormente, no progresores a largo plazo. En general, se les define como los pacientes con infección por VIH de más de 10 años de evolución, asintomáticos y con un recuento CD4 superior a 500 células/mm³ sin TAR (Migueles & Connors, 2010). Cuando se generalizó la detección de la viremia plasmática, pudo constatar que estos pacientes eran heterogéneos respecto a sus niveles de CV, que oscilaban entre la indetectabilidad y las 10.000 copias/mL. Para los pacientes con viremia indetectable (<50 copias/mL) sin tratamiento se propuso el término “controladores de élite” y para el resto el de “lentos progresores”. Se calcula que entre un 4 y un 7% de los infectados pueden ser lentos progresores y los controladores de élite suponen menos del 1% de los infectados. De entre los controladores de élite, un 10% pierde linfocitos T CD4+ en sangre periférica a pesar de mantener una viremia indetectable, lo que apoya una vez más la importancia de los mecanismos de hiperactivación inmune independientes del virus para explicar el deterioro del sistema inmunológico (Hunt et al., 2008).

La mayoría de los pacientes no pertenecen al grupo anterior y pueden comportarse frente al virus y responder al TAR de diferentes maneras. Tras iniciar tratamiento la respuesta más frecuente es la disminución progresiva de la CV hasta conseguir la indetectabilidad en 3-6 meses y un aumento gradual del recuento de linfocitos T CD4. Este incremento, si bien es variable, se considera normal cuando se sitúa en torno a 50 células/ μ l en los primeros 6 meses y en torno a 100 células/ μ l tras 12 meses de TAR. Existe otro pequeño grupo de pacientes que no consiguen ni la recuperación del sistema inmune ni una disminución de la CV del VIH, son los pacientes en **fracaso virológico**.

En ocasiones algunos pacientes en tratamiento, a pesar de no alcanzar en ningún momento la supresión de la CV plasmática del VIH, sí presentan una respuesta inmune en el rango de los pacientes con respuesta completa. Este grupo de pacientes reciben la denominación de **discordantes virológicos**. Finalmente, existe otro grupo de pacientes que se comporta de manera inversa; es decir, a pesar de conseguir una disminución del

virus en sangre periférica y presentar reiteradamente CV indetectable, (<50 copias/ml), son incapaces de restaurar su sistema inmune y mantienen cifras de CD4 similares a las que tenían antes del inicio de los antirretrovirales. A este grupo de pacientes se les conoce con el nombre de **discordantes inmunológicos** (Julg & Walker, 2009; Kelley et al., 2009). Según donde situemos el punto de corte para definir esta recuperación incompleta del sistema inmune (< 200 CD4 ó < 350 CD4), el porcentaje de individuos inmunodiscordantes varía, pudiendo llegar hasta un 30% (Drona et al., 2002). Esta diferencia en cuanto a la respuesta al tratamiento tiene importancia, ya que el riesgo de progresión a SIDA varía en función del tipo de respuesta al TAR. Los pacientes con respuesta completa, obviamente son los que presentan una mejor evolución, siendo el mayor riesgo de progresión para los pacientes en fracaso virológico. Los pacientes con respuestas discordantes se sitúan en un riesgo intermedio entre los dos grupos anteriores, pero con una mayor incidencia de mortalidad (Loutfy et al., 2010), eventos SIDA y ENOS (Buchacz et al., 2012) en el grupo de los pacientes con respuesta discordante inmunológica comparado con los pacientes con respuesta discordante virológica (Ormaasen, Bruun, Sandvik, Holberg-Petersen, & Gaarder, 2003; Piketty et al., 2001) [ENREF 89](#). De estos datos se puede deducir que el factor más importante de progresión a SIDA es la ausencia de reconstitución del sistema inmune.

En el momento actual no se conocen del todo las razones de las respuestas discordantes, especialmente, de la ausencia de recuperación del sistema inmune a pesar de una adecuada supresión de la replicación viral. Existen al menos tres factores, publicados en la literatura, que se asocian a una respuesta inmunodiscordante (Gazzola, Tincati, Bellistri, Monforte, & Marchetti, 2009): un nadir bajo, indicador de un daño más avanzado sobre el sistema inmune (Negredo et al., 2010), la edad, que se asocia a una capacidad limitada del timo para producir nuevos CD4 (Kaufmann et al., 2005) y otra infección viral crónica asociada al VIH, como el VHC o infección por CMV, por una hiperactividad crónica del sistema inmune (Marchetti et al., 2008). Sin embargo algunos pacientes con un nadir extremadamente bajo, pueden llegar a recuperar por completo su sistema inmune, sugiriendo que existen otros cofactores adicionales, no bien conocidos, que controlan este proceso (Arribas et al., 2008).

Por lo tanto, desde un punto de vista patogénico, podrían considerarse varias posibilidades para explicar este paradójico comportamiento que supone la respuesta

inmunológica discordante y en todas ellas debe involucrarse el sistema linfático, como principal reservorio viral. Buzon MJ, y colaboradores defienden que podría persistir una replicación viral de bajo nivel a pesar del TAR, bien porque los virus existentes en este lugar sean resistentes a los fármacos empleados o porque éstos no alcancen niveles supresores en el ganglio, lo que mantendría la activación crónica del sistema inmune (Buzon et al., 2010). Otra posibilidad se relacionaría con la incapacidad de restauración del sistema inmunológico en la infección VIH avanzada, donde podría estar dañada de manera irreversible la arquitectura del tejido linfoide, a nivel de la médula ósea (Moses, Nelson, & Bagby, 1998), del timo (Ruiz-Mateos et al., 2004) y/o destrucción tisular en nodulos linfáticos (Nies-Kraske et al., 2009).

Por otra parte, el daño precoz en el tejido linfoide intestinal favorece el paso de productos bacterianos al torrente sanguíneo provocando mayor activación del sistema inmune; la traslocación bacteriana podría participar en la inmunodiscordancia (Lee et al., 2009; Marchetti et al., 2008). Marchetti G, y colaboradores (Marchetti et al., 2008), entre otros autores, han confirmado niveles elevados en plasma de pacientes inmunodiscordantes (Merlini et al., 2011).

También se ha descrito que la presencia de infecciones crónicas altera el estado de activación de los CD4 y ese estado crónico de hiperactivación lleva a un agotamiento del sistema inmune y a una inmunosenescencia precoz (Peters et al., 2009). Por último podría influir el tipo de TAR. Fármacos como los IP, por su mecanismo de acción, ya comentado con anterioridad, y por la capacidad que tienen de modular los mecanismos de muerte celular tanto in vitro como in vivo (Hisatomi et al., 2008; Riddler et al., 2008), pueden tener un efecto diferencial. Negrodo E, y colaboradores muestran como algunos ITIAN a través de la toxicidad mitocondrial, bien conocida, pueden provocar un descenso significativo de los CD4 (Negredo et al., 2004). Posteriormente esto no se ha constatado in vivo y las parejas de ITIAN más utilizadas actualmente producen incrementos similares de CD4 (Smith et al., 2009).

1.7. Simplificación del tratamiento antirretroviral con monoterapia

El desarrollo del TAR, que evolucionó con el aumento de los fármacos y familias

disponibles hasta llegar a las combinaciones actuales con tres fármacos, ha permitido una disminución considerable de la mortalidad y la morbilidad en los pacientes infectados por el VIH (Palella et al., 1998). En los últimos años el TAR ha evolucionado de tal manera que, en los pacientes con VIH (Panel de expertos de Ge, 2015) se debe aspirar al objetivo de conseguir un control sostenido de la replicación viral y lograr que esté en todo momento indetectable, por lo que las pautas habituales de tres fármacos, basadas en una combinación de ITIAN con un fármaco de otra familia, siguen siendo la opción recomendada por todos los autores.

En la actualidad toda la comunidad científica admite que el TAR tiene que tomarse de forma indefinida y los ITIAN comportan toxicidad acumulada a largo plazo en un número importante de pacientes, por lo que se ha convertido en un objetivo de muchos grupos investigar nuevos tratamientos o estrategias terapéuticas que, sin sacrificar su eficacia, tengan menos toxicidad y, si fuera posible, menor coste, aspecto muy importante para la sostenibilidad de nuestro sistema sanitario.

El concepto de cambio del TAR por motivos distintos al fracaso virológico se desarrolló originalmente para simplificar las pautas antirretrovirales de los primeros IPs que, si bien cambiaron la historia de la infección por VIH, eran especialmente complejas y difíciles de tolerar. La investigación de pautas antirretrovirales más sencillas es un objetivo que beneficia a los pacientes y facilita el control para los médicos por lo que el concepto de simplificación del TAR está contemplado en la mayoría de las guías de práctica clínica, como la de GESIDA, a nivel español (Expert Panel of Ge et al., 2014), y las de la EACS, a nivel europeo (Clumeck, Pozniak, Raffi, & Committee, 2008).

Tradicionalmente estas estrategias han consistido en el cambio de familias, o en el empleo de “combos”, pero siempre manteniendo la misma base del TAR: el tratamiento combinado con tres fármacos antiretrovirales. Sin embargo, en los últimos años han comenzado a explorarse nuevas estrategias de simplificación del TAR (Achhra & Boyd, 2013) que han puesto en entredicho el paradigma, considerado absoluto, de la triple terapia frente al VIH. De hecho, se han comunicado datos recientes que sugieren que algunas combinaciones dobles (biterapias) en pacientes con CV plasmática indetectable pueden mantener la eficacia virológica a la vez que mejoran la tolerabilidad (Arribas et

al., 2015; Margolis et al., 2015; Perez-Molina et al., 2015).

Así mismo, con la aparición de nuevos IP/r, (Inhibidores de la proteasa potenciados) con gran potencia antiviral y elevada barrera genética, que remedan el objetivo pretendido con el TARGA en cuanto a potencia y barrera genética, la simplificación a una monoterapia con IP/r, desde un régimen estándar es una estrategia que puede resultar muy interesante en el tratamiento del VIH.

La monoterapia ofrece la posibilidad de utilizar un solo fármaco para controlar la infección, sin perder las ventajas de eficacia y durabilidad asociadas al TAR, con importantes beneficios como minimizar la exposición a fármacos potencialmente tóxicos, evitar el riesgo de efectos secundarios, preservar opciones futuras de tratamiento y disminuir el coste de la terapia. Esta estrategia se basa en los resultados de diversos ensayos clínicos comparativos (Arribas et al., 2010; Pulido, Arribas, et al., 2008) (fundamentalmente MONET y OK04) en los que la monoterapia con darunavir/ritonavir (DRV/r) o lopinavir/ritonavir (LPV/r) obtuvieron elevadas tasas de eficacia virológica, aunque el riesgo de fracaso virológico fue discretamente mayor que cuando el IP se asoció a dos ITIAN, si bien los pacientes recuperaron la indetectabilidad con la reintroducción de éstos, (Delgado, 2008) ya que no se producen mutaciones de resistencia, lo que podría suponer un considerable ahorro sin afectar a opciones futuras de tratamiento. Estudios de cohortes, con gran número de pacientes abalan la utilidad de la monoterapia como estrategia de simplificación, especialmente en pacientes bien seleccionados. Sin embargo en las guías europeas y españolas solo se recomiendan cuando existe toxicidad a ITIAN.

[ENREF 24](#)

La monoterapia se ha evaluado también en otras situaciones clínicas: pacientes naive (Delfraissy et al., 2008), en estrategias de inducción-mantenimiento (Cameron et al., 2008), con resultados inferiores a los del HAART por lo que no deben recomendarse.

La comunicad científica, desde una perspectiva excesivamente rigurosa, en nuestra opinión, la considera una estrategia subóptima respecto al tratamiento estándar, por las dudas que podría suscitar una supuesta pérdida de potencia antiviral y la menor penetración en determinados reservorios o santuarios, lo que ha quedado rebatido. Así,

se han ido publicando pequeños estudios con diferentes resultados, a veces incluso contradictorios, sobre una posible viremia residual en LCR (Canestri et al., 2010), en semen (Craig & Gupta, 2006; Solas et al., 2003) y en tejido linfóide, donde se especula sobre la posible existencia de replicación residual y de cómo ésta podría ser causa de un estado crónico de hiperactivación del sistema inmune, algo parecido a lo que ocurre con la translocación bacteriana como ya se ha comentado, habiéndose relacionado con un mayor riesgo de ENOS, inmunosenescencia precoz y numerosas complicaciones a largo plazo en estos pacientes.

La supresión de la CV plasmática de forma sostenida es actualmente un objetivo factible para la mayoría de pacientes tratados. La monitorización de la eficacia del TAR tanto en la práctica como en la investigación clínica, se ha realizado clásicamente con la CV en plasma y las poblaciones linfocitarias CD4 y CD8. En la mayoría de pacientes, que tienen una CV plasmática indetectable de forma sostenida y un recuento de células CD4 y CD8 relativamente estable, permiten simplificar el TAR a monoterapia con bastante seguridad.

Herramientas virológicas no estándares como la determinación de la CV plasmática ultrasensible, del DNA proviral como marcador de replicación viral en pacientes con CV suprimida en plasma, y del reservorio celular de VIH, pueden ayudar a proporcionar una mayor y mejor información sobre la eficacia antiviral de la monoterapia. De la misma manera, otras técnicas inmunológicas como la determinación del perfil inmunológico de activación (HLA-DR, CD38+) y senescencia (CD57+) en los linajes CD4 y CD8, el cociente CD4/CD8 que se ha relacionado con la inmunoactivación (Serrano-Villar et al., 2013) y con la senescencia (Sainz et al., 2013), los niveles de apoptosis (caspasa-3), y los biomarcadores de inflamación (IL-6), de translocación bacteriana (LPS, Endocap y RNA 16s) y de activación mononuclear (sCD-14) podrían proporcionar datos relevantes en relación con la inmunoactivación, lo que constituye un hecho crucial. La información preliminar de los resultados de algunos grupos que han usado estas técnicas, sugiere que estas herramientas virológicas e inmunológicas aportan información adicional que resulta útil para confirmar la eficacia de una pauta de simplificación a monoterapia. De hecho Berta Torres y colaboradores comunicaron el año pasado una mayor activación monocitaria, medida por sCD14, en un grupo de pacientes en monoterapia comparado con TAR habitual, tras un año de

seguimiento (Torres et al., 2014) alertando de nuevo en estos pacientes de un mayor riesgo a largo plazo de ENOS. Esto no concuerda con lo comunicado por otros autores como Geretti AM y cols (Geretti et al., 2013), que no encuentran diferencias en el DNA proviral entre ambos grupos o Solomon A y cols (Solomon et al., 2014), que no aprecian diferencias en la actividad ni en la longitud de la telomerasa en los pacientes en monoterapia. Tampoco coincide con lo que nos muestra la experiencia clínica disponible a más de tres años ya en estos pacientes (Arribas et al., 2012; Pulido, Delgado, et al., 2008).

La monoterapia es una estrategia segura y efectiva a corto y medio plazo, con buenos resultados en pacientes bien seleccionados, pero para afrontar su efectividad a largo plazo y despejar definitivamente las dudas, debemos responder si la monoterapia con IP potenciados se comporta como el HAART desde el punto de vista inmunoviroológico, midiendo la replicación viral por técnicas ultrasensibles, el DNA proviral y la inmunoactivación en sangre periférica y en reservorios entre los cuales, el sistema linfático es uno de los principales. Por esta razón las amígdalas palatinas, como representante de éste, son excelentes candidatas para poder estudiar el sistema linfático, ya que son fácilmente accesibles y pueden ser biopsiadas sin excesiva morbilidad.

2. Hipótesis

1. La monoterapia con IPs potenciados tiene suficiente potencia antiviral y alta barrera genética, como para que puedan ser propuestos como tratamiento de simplificación en los pacientes con infección VIH, aceptando que en los reservorios, como el ganglio linfático, se comportan igual que la triple terapia desde el punto de vista inmunoviroológico.
2. La existencia de discordancia inmunológica puede explicarse por una mayor replicación viral en los reservorios y una diferente respuesta del sistema inmune, tanto en el ganglio linfático como en sangre periférica.

3- Objetivos

3.1.- Objetivos principales

1. Determinar si existen diferencias virológicas y/o inmunológicas entre pacientes con infección VIH en tratamiento con monoterapia y pacientes en tratamiento con triple terapia, en tejido linfoide amigdalario y sangre periférica.
2. Determinar si existen diferencias virológicas y/o inmunológicas en el tejido linfoide de pacientes con infección VIH y respuesta discordante inmunológica al tratamiento antirretroviral.

3.1.- Objetivos secundarios

1. Determinar si existen diferencias en los parámetros de inmunoactivación y translocación bacteriana entre los pacientes en monoterapia y los pacientes en triterapia.
2. Determinar si existen diferencias en los parámetros de inmunoactivación y translocación bacteriana entre los pacientes con respuesta discordante y respuesta concordante

4. Métodos

4.1.- Población de estudio.

Se incluyeron pacientes con infección crónica por VIH atendidos en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico San Cecilio de Granada durante los años 2012 y 2013, que aceptaron la realización de una biopsia de amígdala y podían incluirse en alguno de los siguientes grupos:

- 1) Pacientes en monoterapia con un IP/r y con un buen control inmunoviroológico que cumplían los criterios de simplificación a monoterapia establecidos por las últimas guías de GESIDA.
- 2) Pacientes en TAR convencional (triterapia).
- 3) Pacientes discordantes inmunológicos

Además cumplían los siguientes criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

4.1.1.- Criterios de inclusión

- Infección VIH documentada.
- Pacientes mayores de 18 años que firmaron un consentimiento informado.
- Pacientes en triple terapia o en monoterapia estable durante al menos 24 meses.
- Pacientes con CV indetectable al menos en dos determinaciones durante los últimos 12 meses y en el momento de ser incluido en el estudio.
- Buena adherencia a la consulta.

4.1.2.- Criterios de exclusión

- Negativa o incapacidad para la firma del consentimiento informado o revocación del mismo.
- Pacientes con CV detectable en los últimos 12 meses o con mal control inmunoviroológico.
- Tratamiento con agentes inmunomoduladores en el último año.

- Pacientes sin opción de TARGA por multirresistencias.
- Pacientes con infección definitiva de SIDA en la valoración.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Alteraciones clínicamente significativas de la función renal, cardíaca, pulmonar, tiroidea, neurológica, existencia de enfermedad psiquiátrica, o alteración de las pruebas de coagulación.
- Pacientes con alguna enfermedad autoinmune.

4.2.- Diseño del estudio

Estudio prospectivo, transversal y unicéntrico. El periodo de inclusión se extendió desde Octubre del 2012 a Octubre 2013. El estudio fue aprobado por el comité de ética del hospital.

Por las características del estudio, y la ausencia de datos sobre muchas de las variables objeto de valoración, no se pudo calcular el tamaño muestral. Se decidió incluir un número de pacientes similar a los incluidos en los escasos estudios que han utilizado biopsias de ganglio para el estudio de las características inmunoviroológicas de pacientes con infección por el VIH.

En todos los pacientes se registraron las siguientes variables demográficas, clínicas e inmunoviroológicas durante la entrevista personal en la consulta y la historia clínica electrónica: edad, sexo, estadio CDC, comorbilidad, mecanismo de transmisión del VIH, TAR previo y actual, si eran fumadores, otras infecciones crónicas como VHC, VHB o CMV, CD4 y CD8 en el momento de la inclusión, nadir de CD4, tiempo de indetectabilidad, tiempo de evolución de la enfermedad y líneas de TAR previo.

4.3.- Determinaciones clínicas y de laboratorio.

4.3.1.- Biopsia amigdalal.

A todos los pacientes, tras firmar del consentimiento y previo estudio de coagulación, se les realizó una biopsia de amígdala palatina, mediante técnica estándar.

Para su realización se colocó al paciente en sedestación en un sillón reclinable y con el cuello en posición neutra; se retiraron todos los elementos no fijos de ortodoncia o prótesis del paciente. Con la boca abierta y con la ayuda de un depresor se anestesió localmente la zona con xilocaina al 10% en spray. Tras esperar unos minutos se procedió a la toma de dos fragmentos de tejido, con una pinza recta de 0.7mm x 0.3mm (Pinzas de biopsia Karl-Storz- Endoskope®). Uno de ellos fue lavado en condiciones de esterilidad y tras ser pesado en una balanza de precisión, se envió al Servicio de Microbiología para su procesamiento y estudio virológico (CV-VIH por técnica estándar y ultrasensible y ADN proviral). El segundo fragmento, fue enviado al servicio de Anatomía Patológica, donde se incluyó en parafina para su posterior estudio inmunológico (HLA-DR, CD38, Ki67, CD57, CD3, CD4, CD8, cociente CD4/CD8, CD30 y PD-1).

Durante la prueba y los 30 minutos posteriores el paciente permaneció en observación para detectar la aparición de alguna complicación que no sucedió en ningún paciente.

4.3.2.- Extracción analítica.

En el momento de la biopsia se realizó una extracción de sangre a todos los pacientes, que se procesó simultáneamente a la biopsia en el servicio de Microbiología, para estudio virológico (CV-VIH por técnica estándar y ultrasensible y DNA proviral). Otra alícuota de la muestra se reservó para la realización de marcadores de inflamación (IL-6), de inmunoactivación (cociente CD4/CD8), de activación monocitaria (sCD14) y de traslocación bacteriana (LPS, endocab, RNA 16s).

4.3.3.- Procesamiento de las muestras.

4.3.3.1.- Estudio virológico en tejido amigdalár:

Tras el pesado de la muestra en balanza de precisión se congeló la muestra -70°C en buffer de lisis ATL, que contiene clorhidrato de guanidina, hasta el momento de la purificación de ácidos nucleicos (180µl de buffer para 25 mg de tejido). La extracción

del ARN se efectuó utilizando dos métodos, uno para la posterior determinación de CV de VIH y otro para la amplificación del gen pol, para la realización del test de resistencia genotípica.

El tubo conteniendo el tejido y buffer de lisis se descongela y se somete a la acción de proteinasa K para llevar a cabo la digestión del mismo (20µl de enzima para 25 mg de tejido). Esta enzima actúa a 56°C, el tiempo de lisis fue mayor de 12 horas (overnight). Tanto el buffer ATL como la proteinasa K son provistos por el kit QIAamp DNA mini kit (Quiagen). Una vez digerido el tejido, la solución homogénea fue dividida en partes iguales para continuar con la extracción mediante ambos métodos mencionados:

- a.- Extracción COBAS *AMPLICOR*TM HIV-1 MONITOR (HIS) “Ultrasensible” para la posterior determinación de carga viral de VIH.
- b.- Continuación de la extracción de ARN mediante el kit QIAamp DNA mini kit (Quiagen) para la posterior amplificación del gen pol.
- c.- Determinación de la CV mediante la técnica de COBAS *AMPLICOR*TM HIV-1 MONITOR (Roche), que permite detectar hasta 20 copias/ml.

4.3.3.2.- Estudio inmunológico en tejido amigdalares:

Uno de los fragmentos de biopsia fue incluido durante 24 horas en formol. Tras la fijación, se procedió a la inclusión en parafina para estudio inmunológico. Se estudiaron las diferentes subpoblaciones linfocitarias: CD3, CD30, CD4, CD8; Ki67 (como marcador de replicación celular), HLA-DR y CD38 (como marcadores de inmunoadactivación), CD57 (como marcador de inmunosenescencia), la molécula de muerte programada 1 (PD-1) como marcador de agotamiento o cansancio del sistema inmune. El PD-1 es una molécula de coestimulación que da una señal inhibidora; es un importante regulador negativo de la activación de las células T y participa en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Okazaki & Honjo, 2006; Parry et al., 2005). Se descubrió en 1992, por su alta expresión durante la apoptosis (Ishida, Agata, Shibahara, & Honjo, 1992) y se expresa en células T y B activadas. El nivel de expresión del PD-1 en las células T es un marcador útil para establecer el grado de agotamiento o cansancio celular, con una clara correlación entre la expresión de PD-1 y

la progresión de diferentes infecciones virales crónicas (Brenchley, Price, Schacker, et al., 2006). Posteriormente se calculó también el cociente CD4/CD8.

La cuantificación celular se llevó a cabo por dos observadores expertos. Se determinaron subpoblaciones linfocitarias mediante anticuerpos monoclonales específicos, con procedimientos inmunohistoquímicos de alta sensibilidad, que emplean polímeros marcados con peroxidasa.

4.3.3.3.- Estudio virológico en sangre periférica.

Unos minutos antes de la realización de la biopsia amigdalara se realizó una extracción analítica al paciente. A cada paciente se le extrajo un tubo de bioquímica y dos de hemograma, posteriormente se procedió a centrifugar la bioquímica y uno de los tubos de hemograma, para obtener suero, plasma, y sangre total, que se enviaron a microbiología para estudio virológico.

Se realizó la determinación de la carga viral mediante la técnica de COBAS *AMPLICOR*TM HIV-1 MONITOR (Roche), que permite detectar hasta 20 copias/ml y medición ultrasensible que permite detectar < 5 copias/ml. Se realizó también determinación semi-cuantitativa de HIV-1 DNA PCR a tiempo real mediante HIV DNA Cell test kit (ANRS).

4.3.3.4.- Estudio inmunológico en sangre periférica:

La muestra extraída también se envió al laboratorio de inmunología, para la determinación de los marcadores de inflamación (IL-6), inmunoactivación (cociente CD4/CD8), activación monocitaria (sCD14) y traslocación bacteriana (LPS, Endocap, y RNA 16s).

Marcadores de inflamación:

Como marcador de inflamación se utilizó la interleukina 6 (IL-6), por el método Human IL-6 ELISA kit (Thermo scientific). Todas las muestras se realizaron por duplicado. Tras preparar todos los reactivos, que tienen que estar a temperatura ambiente, se diluyeron 30ml del buffer en 870ml de agua ultrapura, posteriormente se

añadieron 240µl de standard diluent a cada tubo. Se reconstituyó standard con 1ml de agua ultrapura y se añadieron 160µl al primer tubo, haciendo posteriormente diluciones seriadas estableciéndose la siguiente curva patrón:

CURVA PATRÓN

1° tubo: 240 µl de Standard diluent que contenía cada tubo + 160µl de Standar reconstituido **(400 pg/ml)**

2° tubo: 240 µl de Standard diluent + 160µl del tubo 1 **(160pg/ml)**

3° tubo: 240 µl de Standard diluent + 160µl del tubo 2 **(64pg/ml)**

4° tubo: 240 µl de Standard diluent + 160µl del tubo 3 **(25.6 pg/ml)**

5° tubo: 240 µl de Standard diluent + 160µl del tubo 4 **(10,24 pg/ml)**

6° tubo: Blanco (Solo tiene 160µl de Standard diluent) **(0 pg/ml)**

A continuación se mezclaron Streptavidin-HRP dilution buffer (12mL) + concentrate (30µL). Se retiraron las tiras de la microplaca y se devolvieron a la bolsa de aluminio que contenía el papel desecante. TMB sustrato: se añadieron 50µl de Biotinilated Antibody Reagent a cada pocillo y 50µl de Standars control o muestra por pocillo. Posteriormente se pipetearon 50µl en cada pocillo. Suero o plasma requirieron, al menos, diluirlas 10 veces en el Standard diluent, y cubrir con la tira adhesiva que suministra el kit. Posteriormente se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se aspiró cada pocillo y se realizaron hasta 3 lavados llenando cada pocillo con tampón de lavado (400µl) ya que la eliminación completa del líquido en cada paso es esencial para un buen rendimiento. Después se añadieron 100µl de Streptavidin-HRP Solution a cada pocillo y se cubrió con una nueva tira adhesiva. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se repitió la aspiración / lavado y se añadieron 100µl de solución de sustrato TMB a cada pocillo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, (protegido de la luz). Por último se añadieron 100µl de solución de parada a cada pocillo y se mezcló bien. La absorbancia de cada pocillo se determinó a los 30 minutos, usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm y 550 nm.

Marcadores de Inmunoactivación:

La inmunoactivación ha demostrado ser predictor de progresión de enfermedad en la infección por el VIH; es además una de las causas subyacentes de inmunosenescencia

y envejecimiento prematuro en estos pacientes. Como marcador de inmunoactivación se realizó el cociente CD4/CD8. La inversión del cociente CD4/CD8 (< 1) es un marcador subrogado de inmunosenescencia y es un predictor independiente de mortalidad en la población general (Wikby et al., 2005; Wikby, Johansson, Ferguson, & Olsson, 1994). Ya antes de la introducción del HAART en 1996, el cociente CD4/CD8 se identificó también como predictor de progresión del VIH (Taylor, Fahey, Detels, & Giorgi, 1989). Tras el inicio del TAR, lo habitual es que los pacientes VIH normalicen este cociente, pero es frecuente observar como determinados pacientes, a pesar de una buena respuesta al TAR, nunca logran normalizarlo. El significado clínico de esto, aún no se conoce pero el descenso del cociente CD4/CD8 en el paciente VIH, se ha relacionado con una mayor inmunoactivación (Serrano-Villar et al., 2013) y senescencia (Sainz et al., 2013; Serrano-Villar, Moreno, et al., 2014), con mayor frecuencia de eventos no SIDA (Serrano-Villar, Perez-Elias, et al., 2014) y mayor mortalidad (Serrano-Villar, Sainz, et al., 2014). La determinación de subpoblaciones linfocitarias se hizo en el laboratorio de inmunología de nuestro hospital.

Marcadores de traslocación bacteriana:

La traslocación bacteriana es uno de los mecanismos que se ha propuesto como causante de la inmunoactivación crónica en el VIH y existen varios métodos de medida bien establecidos en la literatura (Abad-Fernandez et al., 2013). Como marcadores de traslocación bacteriana se usaron LPS, sCD14, Endocap y RNA 16s.

Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un componente de la pared bacteriana de los bacilos gram negativos, que se encuentra elevado en la traslocación bacteriana probablemente por el daño que se produce a nivel intestinal en el tejido MALT en el paciente VIH. Se ha descrito como marcador de la progresión del VIH y marcador negativo de la restauración del sistema inmune (Vassallo, Mercie, Cottalorda, Ticchioni, & Dellamonica, 2012). Persiste elevado incluso en pacientes con CV controlada.

Se utilizó el método QCL-1000 Chromogenic LAL (120 test kit)(Lonza). La dilución realizada: 1:5 y todas las muestras se hicieron por duplicado. Se disolvió la

endotoxina estándar de control (CSE) con 1 ml de agua de pureza analítica para LAL (LRW) y se mezcló en el agitador (Vortex®) durante 15 minutos. Se preparó una solución que contenía 1 EU/ml teniendo en cuenta la potencia de la endotoxina identificada en el certificado de análisis (CoA). La potencia de nuestro kit fue de 37 EU/ml, por lo que $100\mu\text{l}$ de endotoxina Stok (37EU/ml) + 3,6 ml de LRW = 1EU/ML. Se estableció la curva patrón desde 1EU/ml hasta 0 EU/ml. Se marcaron los tubos con las distintas concentraciones y se añadió la cantidad de LRW y endotoxina correspondiente a cada uno.

CURVA PATRÓN:

Tubo 1: Stock propio 1EU/ml

Tubo 2: 0,5 ml de LRW + 0,5 ml del stock propio del tubo 1

Tubo 3: 1,5 ml de LRW + 0,5 ml del stock propio del tubo 1

Tubo 4: 0,9 ml de LRW + 0,1 ml del stock propio del tubo 1

Tubo 5: Blanco, solo LRW

Posteriormente cuando la microplaca alcanzó una temperatura de 37°C en el adaptador de bloque térmico, se pusieron 50 μl del LRW blanco, estándares de endotoxina, muestras del producto, controles positivos, etc. en los pocillos adecuados de la microplaca (siempre por duplicado). Inmediatamente antes de su uso, se reconstituyó el LAL y se removió la preparación con suavidad. Luego se vertió el LAL en un depósito de reactivos y se mezcló con suavidad. A tiempo cero (T=0), con una pipeta de ocho canales se colocaron 50 μl de LAL en los pocillos adecuados de la microplaca. Se retiró la microplaca del adaptador de bloque térmico y se mezcló. Se incubó la preparación durante 10 minutos. Se reconstituyó el vial de sustrato cromogénico con 6,5 ml de LRW. Tras 10 minutos, se colocaron 100 μl de solución de sustrato cromogénico de la misma manera que antes y se mezcló y se incubó la preparación durante 6 minutos.

A T= 16 minutos se colocaron 100 μl de reactivo de parada (SDS al 10%) de la misma manera, se retiró la microplaca del adaptador de bloque térmico y se leyó la absorbancia de la microplaca a 405-410 nm.

sCD14

Como marcador de activación monocitaria y de traslocación bacteriana se utilizó también el sCD14 por el método Human sCD14 Quantikine ELISA kit 96 test (R&D Systems). El sCD14 es una proteína que expresan los monocitos activados, se relaciona también con la activación de quimiocinas y se encuentra elevado en la traslocación bacteriana (Marchetti, Tincati, & Silvestri, 2013) porque es un marcador de la respuesta innata que induce el LPS. Ha sido descrito por Sandler NG, y colaboradores como predictor de mortalidad en la infección por VIH (Sandler et al., 2011).

La dilución que se utilizó fue: 1:200. Todas las muestras se realizaron por duplicado. Tras preparar todos los reactivos, que tienen que estar a temperatura ambiente, se diluyeron 20 mL del buffer en 500 mL de agua destilada. La solución sustrato se preparó al menos 15 minutos antes de ser usada. Se mezclaron reagents A y B, protegidos de la luz y se añadieron 200µL a cada pocillo. Se retiraron las tiras de la microplaca y se devolvieron a la bolsa de aluminio que contenía el papel desecante. Se añadieron 100µl de RD1W diluyente de ensayo a cada pocillo y posteriormente 100µl de Standard, control o muestra por pocillo.

Como diluyente calibrador se usó RD5P (1x): 20 mL RD5P (5x) + 80 mL agua bidestilada y tras reconstituir sCD14 standard con 5ml de RD5P (1x) y 15 minutos de agitación suave se estableció la siguiente curva patrón:

CURVA PATRÓN

1° tubo: 500µl de Diluyente calibrador que contenía cada tubo + 500µl de Standard reconstituido **(8000 pg/ml)**

2° tubo: 500 µl de Standard diluent + 500µl del tubo 1 **(4000pg/ml)**

3° tubo: 500 µl de Standard diluent + 500µl del tubo 2 **(2000pg/ml)**

4° tubo: 500 µl de Standard diluent + 500µl del tubo 3 **(1000pg/ml)**

5° tubo: 500 µl de Standard diluent + 500µl del tubo 4 **(500 pg/ml)**

6° tubo: 500 µl de Standard diluent + 500µl del tubo 5 **(250 pg/ml)**

7° tubo: Blanco (Solo tenía 160µl de diluyente calibrador RD5P (1x) **(0 pg/ml)**)

La muestra (suero) se diluyó 200 veces en la solución de calibrado RD5P (1x) --> 10µL muestra + 1990 µL del diluyente de calibrado RD5P (1x) y se cubrió con la tira adhesiva suministrada. Después se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente.

Se aspiró cada pocillo y se realizaron hasta cuatro lavados. Cada lavado se realizó llenando cada pocillo con tampón de lavado (400 µL) ya que la eliminación completa del líquido en cada paso es esencial para un buen rendimiento. Después se añadieron 200µl de sCD14 conjugado a cada pocillo y se cubrió con una nueva tira adhesiva. Posteriormente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se repitió la aspiración / lavado y se añadieron 200µl de solución de sustrato a cada pocillo. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (protegido de la luz). Por último se añadieron 50µl de solución de parada a cada pocillo y se mezcló bien. La densidad óptica de cada pocillo se determinó a los 30 minutos, usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

Endocap

El Endocap es un anticuerpo que neutraliza la actividad de LPS y sus efectos (Marchetti et al., 2013). Puede ser IgG, IgM e IgA y también está elevado en la traslocación bacteriana cuando están elevados los niveles de LPS. Se realizó por el método Endocap ELISA kit HK504 (Hycult biotech). Se utilizó una dilución: 1:100 de los sueros problema para cuantificar, en nuestro caso, la IgM. Todas las muestras se realizaron por duplicado. Tras la preparación de todos los reactivos a temperatura ambiente y en condiciones de esterilidad, se mezclaron 20 ml del Dilution Buffer A (5x) con 70 ml de agua destilada y se homogeneizó la solución. Después se añadieron 10 ml de Dilution Buffer B (10x). Se determinó el número de pocillos a utilizar y se estableció la curva patrón (3.5MMU/ml hasta 0 MMU/ml).

Después se añadieron 225µl del estándar reconstituido al primer tubo, y a partir de ahí se realizaron diluciones seriadas (Figura 2).

CURVA PATRÓN

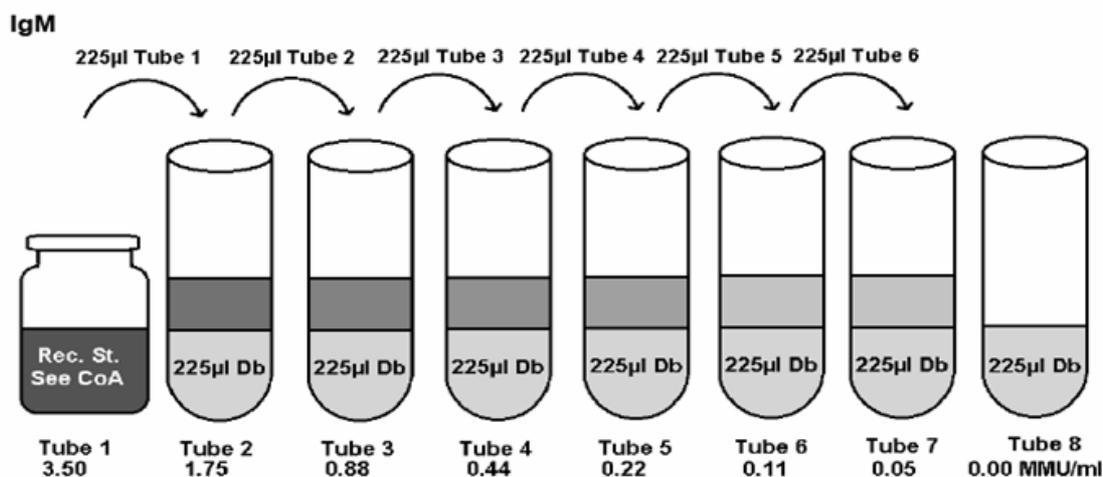


Figure 2

Después se alicuotaron 100µl por duplicado de las muestras patrón y las muestras o controles en los pocillos apropiados. Sin tocar la cara o la parte interior de los pocillos, se cubrió y se eliminó cualquier burbuja de aire. Posteriormente se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C. Se lavó la placa 4 veces con tampón de lavado usando un lavador de placas y se vació por inversión de la placa y sacudido del contenido. Se añadieron 200µl de tampón de lavado a cada pocillo, y tras esperar 20 segundos se vació el pocillo como se ha descrito previamente. El proceso de lavado se repitió tres veces y se añadieron 100µl del conjugado diluido apropiado a cada pocillo utilizando el mismo orden de pipeteado que se usó con anterioridad y se cubrió la placa e incubarla durante 1 hora a 37 °C. Luego se repitió el procedimiento de lavado y se añadieron 100µl de sustrato TMB a cada pocillo. Se cubrió la placa con papel de aluminio y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente sin exponer las tiras a la luz solar directamente. Por último se añadieron 100µl de solución de parada y tras golpear suavemente la bandeja para eliminar las burbujas de aire atrapadas en los pocillos se leyó la placa 30 minutos después de la adición de solución de parada a 450 nm utilizando un lector de placas.

Cuantificación de la carga bacteriana en plasma mediante PCR cuantitativo de rDNA 16S

La extracción de ADN se realizó empleando el kit QIAmpDNA blood mini kit (Qiagen, Basel, Switzerland) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se partió de 1ml de plasma que fue centrifugado a 6000 x g (8000 rpm) durante 10 minutos, siguiendo posteriormente para el aislamiento de DNA genómico, el siguiente protocolo:

- Se centrifugó de nuevo el producto bacteriano durante 10 minutos a 5000 x g (7500 rpm). Posteriormente se introdujo en 180µl de la solución enzimática apropiada (20mg/ml lisozima o 200µg/ml de lisostafina; 20 mM Tris-HCl. pH 8.0, 2mM EDTA; 1,2% Triton).
- Se incubó al menos 30 minutos a 37° y se añadieron 20µl de proteinasa K y 200µ de dilución buffer AL, y se mezcló en el agitador (Vortex®) durante 15 minutos. Se incubó nuevamente a 56° durante 30 minutos y luego 15 minutos a 95° (un tiempo mayor de 15 minutos a 95° puede degradar el DNA).
- Posteriormente se centrifugó unos pocos segundos y se siguió el protocolo para purificación de ADN de tejidos, añadiendo 200µl de etanol (96-100%) a la muestra y mezclando en el agitador (Vortex®) durante 15 segundos. Una vez mezclados, brevemente, se centrifugó el tubo para eliminar las gotas del interior. Es esencial que la muestra, la solución buffer AL y el etanol se mezclen a fondo para obtener una solución homogénea.
- Puede formarse un precipitado con la adición del etanol. Es esencial añadir todo el precipitado a la columna de centrifugación QIAamp Mini. Este precipitado no interfiere con el procedimiento QIAamp o con cualquier otro procedimiento posterior.
- Se añadió cuidadosamente la mezcla obtenida en el paso anterior (incluyendo el precipitado) a la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de recogida de 2ml, sin mojar el borde. Se cerró la tapa y se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recogida de 2ml limpio y se desechó el tubo que contenía el filtrado. Se cerró cada columna de centrifugación para evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación.

- Es esencial añadir todo el precipitado a la columna de centrifugación QIAamp Mini y se centrifugó a 6000 x g. En aquellos casos en que la solución no pasó completamente a través de la membrana, se centrifugó de nuevo a mayor velocidad hasta que se consiguió.

El ADN extraído se cuantificó espectrofotométricamente mediante Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y fluorométricamente mediante Qubit (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Para la cuantificación de la carga bacteriana se utilizó PCR a tiempo real del gen del ARN ribosómico 16S empleando un sistema 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), adaptando las condiciones descritas por Yang y cols (Yang et al., 2002). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l, con 10 μ L de TaqMan Genotyping Master Mix (Biorad-Hercules, CA, EE.UU.), 325 nM de cada cebador, 375 nM de sonda Taqman y 0.2 ng de ADN molde. Las secuencias de los cebadores fueron 908F, 5'-AAACTCAAAGGAATTGACGGGG-3', 1096R, 5'-GGGTTGCGCTCGTTRYGG -3' y como sonda T1052F, FAM-GCATGGYTGTCGTCAGCTCGTG-BHQ1; siendo el tamaño del fragmento amplificado de 208 pares de bases en *Escherichia coli*. Los cebadores fueron optimizados y validados utilizando "RDP probe mach" (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>). Las condiciones de PCR fueron las siguientes, una etapa inicial de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La curva estándar se obtuvo por diluciones seriadas de ADN de plásmido conteniendo una copia del gen del rRNA 16S de *E. coli*.

4.4.- Análisis estadístico

La normalidad de cada una de las variables se determinó empleando el test de Shapiro Wilk. Los valores de las variables cuantitativas, al no ajustarse a una distribución normal, fueron expresados siempre como mediana y rango (valores mínimo y máximo). El tratamiento estadístico de los datos cuantitativos se llevó a cabo comparándolos mediante la comparación de medias empleando el test t de Student o, en el caso de las variables de distribución no normal, el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Los valores de las variables cualitativas fueron expresados como frecuencias y porcentajes, realizándose la comparación de las mismas mediante la prueba Chi-cuadrado y coeficiente de Pearson. El test exacto de Fisher lo aplicamos en aquellos casos en los que la frecuencia esperada fue menor de cinco.

El nivel de significación estadística fijado en nuestro trabajo fue una p menor de 0,05. Los datos y el análisis estadístico fue llevado a cabo haciendo uso del programa IBM-SPSS Statistics versión 20.0.

5.- Resultados

5.1.- Características de la población estudiada.

Se incluyeron un total de 41 pacientes; 16 de ellos pertenecían al grupo de triple terapia (9 en tratamiento con Atripla® (Efavirenz + entricitavina+ tenofovir) y los otros 7 tomaban dos ITIAN junto a un tercer fármaco de otra familia), 15 estaban en tratamiento con monoterapia (9 con DRV/r y 6 con LPV/r) y 10 pacientes eran discordantes inmunológicos (de los cuales 7 tomaban un IP acompañado de otros 2 fármacos que no siempre fueron una pareja de ITIAN). Todos ellos cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Dado que el grupo de pacientes discordantes inmunológicos presentaron características algo diferentes a los otros dos grupos, se decidió mostrar los resultados en dos partes. En un primer momento se compararon los pacientes en monoterapia frente a los pacientes en triple terapia; y en un segundo lugar, se compararon los pacientes discordantes inmunológicos frente a los otros dos grupos (pacientes en triple terapia y pacientes en monoterapia), todos pacientes que presentaban una buena respuesta inmunoviroológica o respuesta concordante.

5.2.- Estudio de los pacientes en triterapia y los pacientes en monoterapia.

5.2.1.- Características basales de los pacientes en triple terapia y monoterapia.

Se incluyeron un total de 31 pacientes, 22 varones (71%) y 9 mujeres (29%): 16 pacientes estaban con triple terapia (51,6%) y 15 pacientes (48,4%) con monoterapia. La edad media global de los pacientes fue de 42,5 años. La mediana de CD4 en el momento actual era de 707 células y el nadir de CD4 de 223 células. Todos los pacientes tenían CV plasmática indetectable (< de 20 copias/mL) en la actual visita y la mediana de tiempo que los pacientes llevaban indetectables era de 4 años en ambos grupos.

En cuanto al mecanismo de transmisión, el 83,9% de los pacientes habían adquirido la enfermedad por vía sexual; 48,4% por vía heterosexual y 35,5% por vía homosexual, mientras que eran UDVP algo menos del 10%.

No se detectaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas, especialmente en aquellas que podrían ser un factor que influyera en el estado de inflamación o inmunosupresión, como la edad, el tiempo de indetectabilidad, los años de evolución del VIH y la presencia de alguna otra infección crónica.

Las características epidemiológicas, demográficas, inmunoviroológicas y estadio clínico se representan en la tabla 2.

Tabla 2: Características basales de los pacientes incluidos.

	Triple terapia (n=16)	Monoterapia (n=15)	p
Edad	44 (25-53)	41,2 (24-57)	ns
Sexo Varón (n, %)	12 (75%)	10 (67%)	ns
Estadio CDC (n, %)			ns
A	9 (56)	8 (53)	
B	3 (19)	1 (7)	
C	4 (25)	6 (40)	
VHC (n, %)	3 (20)	1 (6)	ns
CD4 actual	629 (395-1169)	717 (322-1040)	ns
Nadir CD4	225 (37-387)	228 (9-452)	ns
Mecanismo de transmisión (n,%)			ns
UDVP	1 (6)	2 (13)	
HMX	10 (63)	8 (54)	
HTX	5 (31)	5 (33)	
Tiempo de evolución VIH (años)	11 (4-19)	12 (2-22)	ns
Tiempo de indetectabilidad (años)	4 (4,2)	4 (4)	ns

Datos expresados en mediana (rango), salvo que se indique lo contrario. (UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; HMX: Homosexual. HTX: heterosexual, ns: no significativo)

5.2.2.- Resultados virológicos

Cuando se midió la CV plasmática por técnicas ultrasensibles, en el grupo de triple terapia, de los 16 pacientes, 11 (69%) presentaban CV en cero copias (indetectable), mientras que en los otros 5 pacientes, la CV se encontraba entre 0 y 20

copias. En el grupo de monoterapia de los 15 pacientes, 12 pacientes (80%) estaban con CV-VIH de cero copias (indetectable) mientras que sólo 3 presentaban entre 0 y 20 copias; sin diferencias significativas entre ambos grupos.

Al medir la CV en tejido linfoide; 7 pacientes (23%) presentaron CV detectable en tejido linfoide, 4 en el grupo de triple terapia (25%) y 3 en el grupo de monoterapia (20%) ($p= 0,976$; RR: 1,067, I95% IC 0,73-1,559). Se realizó ADN proviral en sangre a todos los pacientes; y en tejido amigdalario a 30 de los 31 pacientes (96,8%), (en un solo caso no pudo realizarse por problemas con la muestra). De los 30 pacientes, presentaban ADN proviral detectable en tejido linfoide 10 pacientes (33,3%), 7 en el grupo de triple terapia y 3 en el grupo de monoterapia. Los resultados del estudio desde un punto de vista virológico, tanto en tejido amigdalario como en sangre periférica, comparando ambos grupos, se muestran en la tabla 3.

5.2.3.- Resultados inmunológicos

Se hizo estudio inmunológico en tejido linfoide de 22 pacientes: 12 pacientes en el grupo de triple terapia y 10 pacientes del grupo de monoterapia (9 muestras no pudieron procesarse, por no ser adecuadas para el estudio anatomopatológico). No se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos CD8, ni de linfocitos CD30. Los resultados fueron también similares en cuanto al Ki-67, marcador de proliferación y recambio celular (Sachsenberg et al., 1998; Tenner-Racz et al., 1998), así como en el recuento de PD-1, usado como marcador de inmunoactivación, de mayor replicación viral y de agotamiento del sistema inmune y por tanto mayor progresión de la enfermedad en pacientes con respuesta concordante (Hatano et al., 2013) y también en discordantes (Grabmeier-Pfistershammer, Steinberger, Rieger, Leitner, & Kohrgruber, 2011).

Únicamente se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos CD4 y en el cociente CD4/CD8, con un número más elevado de linfocitos CD4 en el grupo de monoterapia y dicho cociente mayor también en el mismo grupo. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 3: Resultados virológicos en tejido amigdalario y en PBMC.

	Triple terapia (n=16)	Monoterapia (n=15)	p
Peso de la biopsia (mg)	17 (36)	23 (26)	ns
CV VIH en amígdala (SI) (n,%)	4 (25)	3 (20)	ns
CV VIH en amígdala (Log 10)	0 (0-2,95)	0 (0-3,35)	ns
ADN proviral en amígdala (n,%)			ns
Detectable	7/16 (43,75)	3/14 (21,43)	
Indetectable	9/16 (56,25)	11/14 (78,57)	
ADN proviral en ganglio (Log 10)	0 (0-4,29)	0 (0-4,21)	ns
ADN proviral en ganglio (copias/mL)	0 (0-16000)	0 (0-19500)	ns
Carga viral VIH en SP			ns
< 20 copias/mL	5	3	
0 copias/mL	11	12	
ADN proviral PBMC (copias/mL)	383 (1490)	258 (712)	ns
ADN proviral PBMC (Log 10)	2,61 (2,52-3,17)	2,58 (0-2,98)	ns

Los datos se expresan en mediana (rango), a menos que se especifique de otro modo. PBMC: Células mononucleares de sangre periférica; ns: no significativo.

Tabla 4: Estudio inmunológico en tejido linfoide.

	Triple terapia (n=16)	Monoterapia (n=15)	p
Ki-67	1283 (612,9-3806,4)	1924,6 (661,2-4422,5)	ns
CD4	3403 (564-5709)	4341 (2870-8241)	0,024
CD8	3051 (779-4129)	3306 (1367-5483)	ns
CD30	132,2 (10,7-370,9)	135,4 (67,7-322,5)	ns
PD-1	367,7 (80,65-1354)	564,5 (193,5-1629)	ns
CD4/CD8	1,02 (0,18-1,68)	1,8 (0,69-3,03)	0,017

Los datos se expresan en mediana (rango), a menos que se especifique de otro modo. ns: no significativa

En cuanto a los resultados inmunológicos en sangre periférica, tampoco se encontraron diferencias en los parámetros analizados. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Resultados de inflamación, activación y traslocación bacteriana en sangre periférica.

	Triple terapia (n=16)	Monoterapia (n=15)	p
IL-6 (pg/mL)	13,05 (2-37,4)	3,8 (0-13,6)	0,001
CD4/CD8	0,71 (0,19-1,8)	0,86 (0,4-1,57)	ns
sCD14			
LPS (pg/mL)	0,179 (0,05-0,45)	0,174 (0,1-0,38)	ns
Endocap tipo IgM (MMU/mL)	70,97 (7,85-169,6)	51,31 (7,77-154,96)	ns
RNA 16s (Log 10)	3,771	3,808	ns

Los datos se expresan en mediana (rango), a menos que se especifique de otro modo. En RNA 16s se hace una comparación de medias, ns: no significativa

5.3.- Estudio de los pacientes discordantes inmunológicos frente a aquellos con respuesta concordante.

5.3.1.- Características basales de los pacientes discordantes y concordantes.

Se incluyeron 10 pacientes discordantes, de los cuales 9 eran varones (90%), la media de edad era de 44 años y todos ellos tenían también $CV < 20$ copias/mL. Se compararon con los 31 pacientes con respuesta concordante (15 en monoterapia y 16 en triple terapia). Se encontraron diferencias significativas, lógicas por otra parte, en el nadir de CD4 (31 células vs 228 células) y en el recuento actual de CD4 (mediana de 235 células en el grupo de discordantes frente a 698 células en el grupo concordante). Se encontraron también diferencias en el tipo de paciente; en el grupo con respuesta discordante, eran pacientes con una enfermedad con más tiempo de evolución, mayor frecuencia de estadio C de la CDC y el 80% estaban coinfectados por el VHC, frente al 22,6% de coinfección en el grupo con respuesta concordante, probablemente por la mayor frecuencia de UDVP como mecanismo de transmisión.

Las características epidemiológicas, demográficas, inmunoviroológicas y estadio clínico se representa en la tabla 6.

Tabla 6: Respuesta discordante frente a respuesta concordante. Características basales.

	Respuesta Concordante (n=31)	Respuesta Discordante (n=10)	p
Edad	43 (24-57)	44 (38-53)	ns
Sexo Varón (n, %)	22 (71%)	9 (90%)	ns
Estadio C de la CDC (n, %)	7 (22,6%)	8 (80%)	0,011
Coinfección VHC (n, %)	4 (12,9)	7(70)	< 0,001
CD4 actual	698 (322-1169)	235 (144-321)	< 0,001
Nadir CD4	228 (9-452)	31 (1-160)	< 0,001
Mecanismo de transmission (n,%)			0,035
UDVP	3 (10)	4 (40)	
HMX	11 (35,5)	5 (50)	
HTX	15 48,4)	1 (10)	
Tiempo de evolución del VIH (años)	12 (2-22)	20 (5-27)	0,011
Tiempo de indetectabilidad (años)	4 (1,2-5)	3,5 (1,5-5)	ns

Datos expresados en mediana (rango), excepto cuando se indique de otro modo. (UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral; HMX: Homosexual. HTX: heterosexual; ns: no significativo)

5.3.2.- Resultados virológicos

Desde el punto de vista virológico no se encontraron diferencias con significación estadística en la CV plasmática ultrasensible. Presentaron CV-VIH de cero copias (indetectabilidad) el 74,2 % de los pacientes con respuesta concordante (23 de 31), mientras que el resto de los pacientes de este grupo, tuvieron entre 0 y 20 copias. Con respecto a los pacientes con respuesta discordante, el 70% (7 de 10) tuvieron CV-VIH de cero copias (indetectables), y los otros 3 tuvieron entre 0 y 20 copias/mL.

Por otra parte mientras que en el grupo con respuesta concordante se detectó RNA-VIH en amígdala de 7 pacientes (22,6%), en el grupo de discordantes el 90% presentaba detectable el RNA-VIH (9 de 10) con diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,001$).

El ADN proviral en tejido linfóide y en sangre periférica no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, pero aunque no existían diferencias significativas, presentaban ADN proviral en amígdala el 30% (9 de 30) de los pacientes con respuesta concordante con una mediana de 0 copias/mL, mientras que en los pacientes discordantes había ADN proviral en el 60% (6 de 10) con una mediana de 100 copias/mL. En PBMC los porcentajes eran del 70,97% en los pacientes con respuesta concordante y del 60% en los discordantes. Los datos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Resultados virológicos en tejido amigdalario y en PBMC. Respuesta discordante vs respuesta concordante.

	Respuesta concordante (n=31)	Respuesta discordante (n=10)	p
Peso de la biopsia (mg)	19 (10-47)	18 (8-27)	ns
CV VIH en amígdala (Log 10)	0 (0-3,35)	3,1 (0-4,11)	0,002
CV en amígdala (n,%)			< 0,001
Detectable	7/31 (22,6)	9/10 (90)	
Indetectable	24/31 (73,4)	1/10 (10)	
ADN proviral amígdala (Log 10)	0 (0-4,29)	2 (0-2,68)	ns
ADN proviral amígdala (copias/mL)	0 (0-19500)	100 (0-484)	ns
Carga viral VIH en SP			ns
< 20 copias/mL	8	3	
0 copias/mL	23	7	
ADN proviral PBMC (Log 10)	2,6 (0-3,17)	1,83 (0-6,06)	ns
ADN proviral PBMC (copias/mL)	306 (0-1490)	35 (0-116000)	ns

Los datos se expresan en mediana (rango), a menos que se especifique de otro modo. SP: sangre periférica; PBMC: células monocíticas en sangre periférica; ns: no significativo.

5.3.3.- Resultados inmunológicos

No se detectaron diferencias significativas en los resultados inmunológicos en el tejido linfóide. Los resultados se muestran en la tabla 8.

En cuanto a los resultados inmunológicos en sangre periférica, comparando estos dos grupos, si que se observan diferencias estadísticamente significativas en los datos de inflamación medidos por la IL-6 y en datos de inmunoactivación, medidos por el

cociente CD4/CD8, con significación estadística; pero no apreciamos diferencias en los parámetros que se usaron para medir la traslocación bacteriana (LPS, Endocap y RNA 16s). Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 8: Respuesta discordante frente a respuesta concordante. Resultados inmunológicos en amígdala.

	Respuesta concordante	Respuesta discordante	p
Ki-67	1533 (612,9-4422)	1733,8 (1470-3412)	ns
CD4	3725 (564-8241)	4435 (1370-6967)	ns
CD8	3074 (779-5483)	3596 (2231-5667)	ns
CD30	133,8 (10,7-370,9)	145,1 (26,8-612,9)	ns
PD-1	481,8 (80,6-1629)	951 (107-1596)	ns
CD4/CD8	1,29 (0,18-3,03)	1,1 (0,61-1,97)	ns

Los datos se expresan en mediana (rango), a menos que se especifique de otro modo. ns: no significativo.

Tabla 9: Resultados de inflamación, traslocación bacteriana y activación en sangre periférica.

	Respuesta concordante (n=31)	Respuesta discordante (n=10)	p
IL-6 (pg/mL)	8,05 (0-37,4)	16,2 (4,9-68,40)	0,004
CD4/CD8	0,72 (0,19-1,8)	0,37 (0,15-0,82)	< 0,05
sCD14			
LPS (pg/mL)	0,174 (0,054-0,454)	0,169 (0,095-0,814)	ns
Endocap tipo IgM (MMU/mL)	54,36 (7,77-169,63)	34,70 (13,6-97,85)	ns
RNA 16s (Log 10)	3,791	3,933	ns

Los datos se expresan en mediana (rango), a menos que se especifique de otro modo. En RNA 16s se hace una comparación de medias, ns: no significativa

6. Discusi3n

6.1.- Valoración de los resultados obtenidos en pacientes en triterapia y los pacientes en monoterapia

No existieron diferencias significativas en las variables cualitativas y cuantitativas asociadas con la respuesta al tratamiento antirretroviral, peor evolución clínica o un mayor grado de inmunoactivación, entre los grupos de monoterapia y triterapia, lo que nos permitió establecer las comparaciones virológicas, inmunológicas y de inmunoactivación definidas en los objetivos de esta tesis doctoral.

La estrategia de simplificación a monoterapia, se ha relacionado en algunos trabajos, con la existencia de una viremia de bajo nivel o con la existencia de “blips” con una mayor frecuencia que en los pacientes en triple terapia (Lambert-Niclot et al., 2011). Aunque el significado real de este hallazgo y sus consecuencias no están todavía del todo claras, si es cierto que han generado dudas acerca de esta estrategia de simplificación. Por otro lado, el origen de estos “blips” o de esta viremia residual de bajo nivel, tampoco es del todo conocida, y entre las diferentes hipótesis que se han postulado se encuentra la existencia de una replicación residual en el tejido linfoide, o en algún otro reservorio viral, en los pacientes en monoterapia.

Siempre de acuerdo a esta hipótesis, esta mayor replicación en reservorios sería debida a una supuesta pérdida de potencia supresora de la monoterapia, lo que llevaría al paciente a presentar un mayor riesgo de fracaso virológico (Doyle & Geretti, 2012).

En consonancia con esta hipótesis, Raboud JM, y colaboradores (Raboud et al., 2002) afirmaron que la mayor presencia de “blips” se relacionó con una mayor tasa de fracaso virológico. Sin embargo, no todos los autores han encontrado los mismos resultados. Así, Mira JA, y colaboradores (Mira et al., 2002) comunicaron justo lo contrario ese mismo año, demostrando que la existencia de “blips” no se relacionó en su estudio con una mayor tasa de fracaso virológico. Posteriormente, otros autores han demostrado que es una estrategia segura, que los “blips” no comportan un mayor riesgo de fracaso virológico y que no hipotecan opciones futuras de tratamiento (Arribas, Doroana, Turner, Vandekerckhove, & Streinu-Cercel, 2013).

En nuestra propia cohorte no hemos encontrado una mayor tasa de fracaso virológico en los pacientes en monoterapia (Pasquau et al., 2014). Recientemente se han comunicado los resultados de un estudio observacional, retrospectivo que se llevó a cabo en 10 hospitales andaluces, incluido el nuestro, en el que se incluyeron más de 600 pacientes en tratamiento con DRV/r en monoterapia, con un seguimiento de al menos 12 meses. En este estudio, en el 18,5% de los pacientes se utilizó la monoterapia por efectos adversos a otros fármacos, pero en más del 80% se utilizó sólo como estrategia de simplificación y observamos una tasa de fracaso virológico en menos del 5% de los pacientes. Además se realizó genotipado de resistencias en los fracasos, sin encontrar mutaciones en ningún paciente. Solamente el 2,6% de los que estaban en monoterapia abandonaron por efectos adversos. Por tanto en la práctica clínica diaria, se confirman los datos de los ensayos clínicos; la monoterapia fue una estrategia de simplificación segura, bien tolerada y con baja tasa de fracasos, y como se demuestra con los datos de este estudio, la hipótesis de una supuesta menor potencia supresora en el ganglio de la monoterapia, no se sustenta.

A pesar de que los pacientes de nuestro estudio mantuvieron una CV-VIH < 20 copias/mL en sangre periférica durante una mediana de 4 años, más del 25% presentaron CV detectable en tejido linfoide, pero con independencia del grupo de tratamiento.

Los reservorios virales son lugares donde el virus se encuentra de forma latente y puede causar rebotes de viremia cuando disminuye la presión del TAR (Horiike et al., 2012), La erradicación del VIH no es posible con los tratamientos actuales pues el virus integrado en el ADN celular es el principal obstáculo para conseguirlo, junto con la existencia de reservorios virales.

Se ha descrito que el tejido linfoide es el principal reservorio de nuestro organismo, por lo que es más frecuente encontrar replicación residual en éste que en otros lugares, que también se consideran santuarios, como los fluidos genitales o el líquido cefalorraquídeo (Gunthard et al., 2001), por eso decidimos tomar biopsias de una de las zonas de tejido linfoide más accesibles de nuestro organismo para realizar el estudio: el tejido amigdalario.

Nuestros datos, por tanto, son consistentes con los publicados previamente por otros autores (Garcia et al., 2000; Lafeuillade et al., 1998) y sustentan la hipótesis ampliamente defendida de persistencia de una replicación viral en reservorios a pesar de una respuesta viral en sangre periférica completa y una buena evolución clínica, pero que esta replicación residual existe independientemente del grupo de tratamiento y aparece tanto en los pacientes en triple terapia como en los que pertenecen al grupo de monoterapia.

La CV-VIH en plasma se relaciona desde el inicio de la epidemia por el VIH con infección no controlada (Re, Vitone, Bon, Schiavone, & Gibellini, 2006), sin embargo, los pacientes con carga viral indetectable mantienen ADN proviral en células T CD4 memoria en reposo, monocitos y macrófagos, que se correlaciona con el tamaño del reservorio viral (Chun et al., 2011).

En nuestro estudio se realizó ADN proviral en 30 de los 31 pacientes incluidos en los dos grupos que se están comparando. Tuvieron ADN proviral detectable en tejido linfoide 10 pacientes, y cuando se estratificó por grupos de tratamiento, se encontró que la mayor parte correspondieron a pacientes en tratamiento con triple terapia (7/16 vs 3/14, $p=0,195$), diferencia que si bien no fue significativa, orienta a que la ausencia de significación podría estar en el contexto de una falta de tamaño muestral.

Nuestros resultados deben ser interpretados con cautela ya que se han evaluado un escaso número de pacientes, sin embargo, Lambert-Niclot y colaboradores, y Geretti AM, y colaboradores, describieron resultados similares a los nuestros, lo que confiere robustez a los hallazgos obtenidos. Lambert-Niclot y colaboradores, cuantificaron el ADN proviral en muestras sanguíneas de 160 pacientes incluidos en el estudio MONOI-ARNS 136 y encontraron que a pesar de un aumento en la viremia intermitente en los pacientes que estaban en monoterapia con un IP potenciado comparados con los pacientes con triple terapia, éstos presentaron variaciones similares de ADN proviral con respecto al grupo de triple terapia (Lambert-Niclot et al., 2012). De hecho la variación fue menor en los pacientes en monoterapia ($0.35 \log \text{ copias}/10^6 \text{ leucocitos}$ vs. $0.51 \log \text{ copias}/10^6 \text{ leucocitos}$ para monoterapia y triple terapia respectivamente).

Por otra parte Geretti AM, y colaboradores, comunicaron en un subestudio del Monet (Arribas et al., 2010) que el ADN proviral en sangre periférica permaneció estable durante las 144 semanas de seguimiento y no mostró diferencias entre los pacientes con monoterapia vs triple terapia, siempre que los pacientes no presentaran replicación viral (Geretti et al., 2013). En ambos grupos, el ADN proviral, solo se relacionó con el nadir de CD4 y con presentar CV detectable.

En la misma línea, Nicastrì y colaboradores comunicaron que los pacientes en tratamiento con IP potenciados presentaban menores niveles de ADN proviral comparados con los que estaban en tratamiento con ITINAN (Nicastrì et al., 2008), lo que podría sugerir que los IP potenciados podrían tener una acción más potente a nivel de los reservorios. Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el que se produciría esta mayor actividad, entre las teorías postuladas para explicarlo estaría la inhibición que producen los IPs en múltiples pasos en el ciclo vital del VIH.

Tradicionalmente la actividad de los IPs se consideró limitada a la inhibición de la escisión de las poliproteínas virales en sus productos, impidiendo, por tanto la maduración del virus y terminando el ciclo del VIH (Moyle & Gazzard, 1996). Sin embargo, en la actualidad se sabe que la inhibición producida por los IPs va más allá de la mera inhibición de la proteasa viral, interactuando en múltiples pasos del ciclo viral (Rabi et al., 2013):

- Muchos de los viriones defectuosos producidos por la actuación del IP son incapaces de completar el ciclo vital del VIH, pero otros muchos sí son capaces de continuarlo, produciéndose el ensamblaje y envoltura posterior, siendo capaces de interactuar con otras células. Sin embargo, la ausencia de escisión de la gp160 provoca que muchos de estos viriones no sean capaces de entrar en la célula, no siendo capaces de infectarla.
- Otros muchos viriones, a pesar de la alteración producida por la actuación del IP sobre la gp160 sí son capaces de entrar en un nuevo linfocito, continuando el ciclo vital. Sin embargo, como el IP también actúa inhibiendo la escisión de la poliproteína gag-pol, a pesar de haber sido capaz de entrar en el linfocito, no

será capaz de comenzar la transcripción inversa (la transcriptasa inversa se genera a partir de esta poliproteína gag-pol).

- Finalmente, los escasos viriones que han sido capaces de completar la entrada y la transcripción son incapaces de continuar su ciclo vital, puesto que estos viriones son incapaces de integrarse en el genoma celular ya que, al igual que sucedía con la TI, la integrasa se genera también desde la poliproteína gag-pol.

Es por ello que, a pesar de existir un aumento de los “blips” o episodios transitorios de viremia, muchos autores no han encontrado un aumento en los reservorios virales de los pacientes en monoterapia con IPs (Torres-Cornejo et al., 2014), por lo que se trataría, de acuerdo con esta hipótesis, de virus defectivos.

Creemos que nuestro estudio pone de manifiesto la seguridad de la monoterapia ya que no sólo no encontramos diferencias en cuanto a la replicación viral, independientemente del grupo de tratamiento al que pertenecían nuestros pacientes (triterapia o monoterapia), sino que incluso encontramos ADN proviral con mayor frecuencia en el grupo de pacientes en triple terapia, resultados cuya significación no está clara y que deben ser interpretados con cautela, porque el número de pacientes incluidos en nuestro trabajo es pequeño y no permite extraer conclusiones definitivas; por lo que harían falta estudios posteriores con una muestra más amplia que confirmaran estos resultados.

En el estudio de los parámetros inmunológicos en el ganglio linfático encontramos, como hallazgo más significativo, un aumento del recuento de linfocitos CD4 y del cociente CD4/CD8 en los pacientes en monoterapia en comparación con los pacientes en triterapia (4341 células vs 3403 células, $p= 0.024$ y 1.8 vs 1.02 , $p=0.017$, respectivamente).

Algunos autores han realizado determinaciones de linfocitos CD4 y cociente CD4/CD8 en biopsias de ganglio linfático, no en tejido amigdalario, pero creemos que los resultados son extrapolables a los que hemos obtenido nosotros procedentes de muestras de amígdala palatina dado que, por una parte, la amígdala sería un representante válido de los acontecimientos que suceden en el ganglio linfático, y por otra parte, existen

resultados previos de otro grupo que también estudió el reservorio viral y diferentes parámetros inmunológicos mediante biopsia de amígdala y que encontró datos similares a los descritos en ganglio linfático; una mayor fibrosis y una peor recuperación de la arquitectura normal del tejido linfoide, en pacientes con VIH. Esta mayor fibrosis estaría mediada por un mayor depósito de colágeno y, a pesar de un buen control inmunoviroológico tras el TAR, la arquitectura normal del tejido linfoide no se llegaría a recuperar, presumiblemente, debido a la existencia de una mayor inflamación y una mayor inmunoadactivación (Diaz et al., 2011). Este grupo encontró fundamentalmente tres factores que empeoraban esta fibrosis y que impedían la normal recuperación del sistema inmune: la edad, la existencia de CV-VIH detectable en tejido linfoide y estar en TAR con un régimen constituido sin IP, lo que sugeriría que el IP es un factor protector frente a la fibrosis y podría favorecer una mayor recuperación inmunológica (Diaz et al., 2010).

Si bien no es posible conocer con certeza los motivos de esta disminución de la fibrosis, entre las posibles hipótesis estarían las ya comentadas sobre una mayor potencia de estos fármacos a nivel del reservorio y/o un mejor control de la replicación viral, pero también un posible efecto antiapoptótico sobre el que han especulado algunos autores (Pilon et al., 2002) y/o una regulación del equilibrio entre las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP del inglés matrix metalloproteases) y sus inhibidores que daría lugar a una menor disposición de colágeno en la matriz (Diaz et al., 2011).

Estos hechos podrían justificar el hallazgo de un mayor recuento de linfocitos CD4 en ganglio linfático de los pacientes en tratamiento con monoterapia frente a los tratados con triterapia comunicados por algunos autores (Diaz et al., 2010) y que concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, donde los pacientes en tratamiento con una monoterapia con un IP tuvieron, significativamente, un mayor recuento de linfocitos CD4 en ganglio linfático y un mayor cociente CD4/CD8.

Dado que los pacientes en el grupo de tratamiento con triterapia podían recibir tratamiento tanto con IPs o con ITINAN, decidimos realizar un subestudio de estos pacientes, incluyendo en un mismo grupo a todos los pacientes en tratamiento con IPs, independiente de si se encontraban recibiendo este tratamiento en monoterapia o como

parte de una triple terapia. Los resultados confirmaron un mayor recuento de linfocitos CD4 (4627 vs 2951, $p= 0.02$) y del cociente CD4/CD8 (1,6 vs 0,9, $p= 0,018$) en los pacientes que recibían un IP.

De nuevo, y al igual que con los resultados obtenidos en cuanto a los parámetros virológicos, es necesario resaltar que éstos resultados viene derivados del análisis de unos datos con un bajo tamaño muestral, por lo que a la espera de estudios con muestras mayores, deben ser interpretados con cierta cautela.

Finalmente realizamos una comparación de marcadores de inflamación e inmunoactivación entre los pacientes que recibieron monoterapia y aquellos que recibieron triterapia.

Como se ha señalado previamente, una de las mayores dudas que suscita la monoterapia radica en la posible existencia de una mayor inflamación que se asociaría a una mayor incidencia de ENOS y, por tanto, contraindicaría su empleo por la toxicidad a largo plazo.

En nuestro estudio no encontramos diferencias en cuanto a la mayoría de los parámetros utilizados para medir el grado de inflamación sistémica, translocación bacteriana e inmunoactivación. Los valores de LPS, endoCab, sCD14 y los niveles de RNA16S en sangre no presentaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes. Sin embargo, si se observaron diferencias en los valores de la IL-6, siendo mucho menores en los pacientes en monoterapia (3,8 pg/mL vs 13,5 pg/mL; $p= 0,001$).

Estos resultados son parcialmente concordantes con otros muchos publicados con anterioridad. Estébanez y colaboradores (Estebanez et al., 2014) compararon los valores de proteína C reactiva, IL-6, fibrinógeno y dímero D de 72 pacientes en monoterapia con IP con los de 74 pacientes en tratamiento con un IP y dos análogos, sin encontrar diferencias significativas entre los dos grupos. Del mismo modo Arenas-Pinto y colaboradores (Arenas-Pinto et al., 2015) compararon los valores de la proteína C reactiva ultrasensible, IL-6, IL-8, sCD14 y de la proteína amiloide sérica A de 25 pacientes con monoterapia y 56 pacientes con triple terapia, de nuevo sin encontrar diferencias significativas entre los dos grupos.

Con posterioridad se han evaluado marcadores de inflamación en un ensayo prospectivo que aleatorizó a 234 pacientes a recibir tratamiento con tenofovir/emtricitabina más ATV/r (68 pacientes), raltegravir (82 pacientes) o Darunavir/r (84 pacientes). Se determinaron una multitud de marcadores de actividad entre los que se incluyeron IL-6, IL-2, sCD14, sCD13, proteína C reactiva ultrasensible, y dímero D. Existieron diferencias en algunos de los parámetros en función del grupo de tratamiento y el marcador elegido, pero en ningún caso un grupo concreto de tratamiento se asoció con un descenso o aumento de todos los marcadores, mostrando una clara ausencia de relación entre inflamación o activación inmune en función de la existencia de un tratamiento con inhibidor de la proteasa o raltegravir (Kelesidis et al., 2015).

Nuestros datos son consistentes con los estos estudios previos a excepción de la existencia de una marcada diferencia en cuanto a los valores de IL-6. La explicación de este hecho podría ser casual, es decir, un hallazgo sin ninguna trascendencia y explicable dentro de la variabilidad de resultados descritos con este marcador en los distintos estudios que lo han evaluado ya que de los artículos comentados previamente, sólo el de Kelesidis T y colaboradores (Kelesidis et al., 2015) encontró diferencias en la IL-6 en el grupo de pacientes en tratamiento con raltegravir.

Sin embargo también podría existir una relación causal entre la existencia del tratamiento con IPs y un menor valor de IL-6. Bien por el propio efecto de inhibición de proteasas, o bien por una inhibición directa de la producción de IL-6, como el que se ha observado con saquinavir, con el que se ha demostrado un beneficio en enfermedades de naturaleza desconocida como el síndrome nefrótico resistente a esteroides (Coppo et al., 2012) o en la hipertensión pulmonar primaria (Li et al., 2015). A la luz de estos conocimientos, es posible que los hallazgos encontrados en nuestro estudio puedan estar en el contexto de esa posible inhibición producida por los IPs en la producción de la IL-6, mediada por el bloqueo de la señal TLR4 (Gero et al., 2013). Esta inhibición de la producción de IL-6, si bien es común para los IPs, no es idéntica para todos ellos, presentando saquinavir la mayor potencia inhibitoria (Li et al., 2015).

La existencia de diferentes IPs en los distintos estudios que han evaluado el grado de inflamación y de activación inmune, y la presencia de IPs formando de parte de muchos esquemas de triterapia en aquellos estudios que han comparado monoterapia con triterapia, podrían justificar la ausencia de diferencias en cuanto a la IL-6.

En cualquier caso, y consistente con la limitación inherente al bajo tamaño muestral, los resultados han de interpretarse con cautela, no pudiendo confirmar la existencia de este supuesto efecto inhibitor de la producción de IL-6.

Sin embargo, creemos que lo que si se demuestra con nuestro estudio es que no existen diferencias significativas en cuanto al grado de inflamación e inmunoactivación entre los pacientes con monoterapia y triterapia.

Por último es necesario señalar la ausencia de diferencias en cuanto a la translocación bacteriana. Tanto los pacientes en monoterapia como los pacientes en triterapia mostraron valores muy similares de LPS, endoCap y rRNA 16S, sin diferencias significativas. Este hallazgo sugiere que tampoco a este nivel la monoterapia conlleva un riesgo en comparación a la triterapia.

La interpretación de los valores de rRNA 16S y otros marcadores de translocación bacteriana es compleja en los pacientes con infección VIH ya que desde el inicio de la infección se producen enormes alteraciones en el intestino que se asocian con un aumento de la translocación bacteriana, alteraciones que no llegan a desaparecer en ningún momento a lo largo de toda la vida del individuo (Dinh et al., 2015).

De nuevo, nos encontramos con datos dispares en la literatura médica. Torres y colaboradores (Torres et al., 2014), en un estudio transversal que comparó los valores de diferentes marcadores de translocación bacteriana e inmunoactivación (sCD14, LPS, LBP e IL-6) en pacientes en monoterapia con IPs (40 pacientes) y pacientes en triterapia (20 pacientes) encontraron que los pacientes en monoterapia presentaron un mayor grado de viremia de bajo grado, lo que se asoció de manera significativa con un mayor valor de todos los parámetros de translocación bacteriana y de inmunoactivación.

Por el contrario, BenMarzouk-Hidalgo y colaboradores (BenMarzouk-Hidalgo et al., 2015), en un interesantísimo estudio compararon los valores de sCD14, LPS y 16S rDNA en 71 pacientes en triterapia, que cambiaron su tratamiento a una monoterapia con IPs. A lo largo de 24 meses los autores realizaron mediciones de estos parámetros no encontrando diferencias en ninguno de estos marcadores, concluyendo que la translocación bacteriana no presenta un papel pivotal en la activación de los linfocitos T, al menos en los pacientes que tengan supresión viral mantenida. En esta misma línea, Falcon-Neyra L y colaboradores (Falcon-Neyra et al., 2015) no encontraron diferencias en los valores de LPS, 16S rDNA y sCD14 en 10 niños que se encontraron recibiendo una triterapia y 5 pacientes que recibieron una monoterapia con IP.

Una posible explicación a esta discrepancia en los resultados comunicados por los diferentes autores, especialmente en lo que respecta al 16S rDNA podría ser la ausencia de reproducibilidad y certeza de este marcador. Svard y colaboradores (Svard, Sonnerborg, Vondracek, Molling, & Nowak, 2014) demostraron la ausencia de correlación entre el 16S rDNA y otros marcadores habituales de translocación bacteriana como el sCD14, o el LPS en pacientes con carga viral indetectable. Más aún, estos autores no encontraron diferencias en los valores del 16S rDNA de pacientes con infección VIH con supresión viral completa y pacientes sin infección VIH. Es posible que las diferencias detectadas por algunos autores en cuanto al 16S rDNA pudieran estar en el contexto de otros parámetros diferentes al hecho de encontrarse en monoterapia o en triterapia, siendo más consistentes, por tanto, los resultados que han comunicado un comportamiento similar de éste y otros parámetros en pacientes VIH en tratamiento con monoterapia y en pacientes en triterapia.

Nuestros resultados serían compatibles con los publicados por estos últimos autores, contribuyendo a aumentar los datos que sustentan que tanto la translocación bacteriana como otros marcadores de inmunoactivación no son diferentes entre los pacientes que reciben monoterapia y aquellos que reciben triterapia.

6.2.- Valoración de los resultados obtenidos en pacientes discordantes inmunológicos y los pacientes con respuesta concordante

La segunda parte de nuestro trabajo comparó un pequeño grupo de pacientes con respuesta discordante, frente a pacientes con buena respuesta inmunoviológica (respuesta concordante), independientemente de que se encontrasen en monoterapia o en triple terapia.

Existen varios factores predictores bien establecidos en la literatura, que se han relacionado con presentar una respuesta inmunodiscordante, como la edad (Viard et al., 2001), que disminuye la capacidad de recuperación del sistema inmune, el nadir de CD4 y un estadio CDC avanzado (Florence et al., 2003), y la presencia, con mayor frecuencia de alguna otra infección viral crónica concomitante (Miller, Haley, Koziel, & Rowley, 2005), que podrían comportar una mayor inactivación y por tanto peor recuperación del sistema inmune.

En nuestro estudio encontramos diferencias significativas entre los pacientes con respuesta concordante y aquellos con respuesta discordante en cuanto al nadir de CD4, el estadio CDC, los años de evolución de la enfermedad, el mecanismo de transmisión (mayor frecuencia de UDVP) y la coinfección por VHC; todos factores de riesgo descritos en la literatura para presentar una respuesta discordante inmunológica, pudiendo considerar nuestra muestra como un grupo representativo de esta población.

Es importante conocer los mecanismos que subyacen en la discordancia inmunológica, para poder diseñar estrategias terapéuticas que produzcan una recuperación inmunológica completa, ya que los pacientes discordantes inmunológicos presentan un mayor riesgo de padecer enfermedades defintorias de SIDA (Nicastri et al., 2005; Tan et al., 2008), así como eventos no SIDA (Gutierrez et al., 2008; Pacheco et al., 2015), además de una mayor mortalidad (Moore et al., 2005).

A pesar de la gran eficacia del TAR actual, numerosos estudios han mostrado que el VIH puede persistir a través de una replicación residual en plasma (Hatano et al., 2010; Palmer et al., 2008) o en determinados tejidos (Chun et al., 2008; Yukl et al., 2010). Esto podría explicarse por varios mecanismos como la latencia del VIH, la falta

de eficacia de determinados tratamientos en los reservorios y la persistencia de la inmunoactivación.

Ostrowski SR y colaboradores propusieron la existencia de una replicación viral de muy bajo nivel, no detectable en plasma por las técnicas comerciales disponibles en ese momento, o bien la existencia de replicación en algún reservorio, que impediría la recuperación completa del sistema inmune como causa de la discordancia inmunológica (Ostrowski et al., 2005).

Esta hipótesis fue confirmada posteriormente, al menos parcialmente, por Chun y colaboradores, quienes demostraron la existencia de replicación viral en tejido linfóide intestinal en pacientes con buena respuesta al TAR a pesar de llevar varios años con CV-VIH suprimida en sangre periférica (Chun et al., 2008).

En nuestro grupo, utilizando técnicas ultrasensibles que detectan entre 0 y 5 copias de ARN-VIH, no encontramos diferencias de replicación en sangre periférica, entre los pacientes discordantes y aquellos con respuesta concordante, pero cuando analizamos CV-VIH en el tejido linfóide, como reservorio viral, sí que encontramos una mayor frecuencia de replicación viral en el grupo de pacientes discordantes ($p < 0.001$), lo que apoyaría la existencia de replicación en reservorio como causa fundamental de la discordancia inmunológica y confirmando así una de las hipótesis de nuestro estudio, esto es, que la discordancia inmunológica no es debida a diferencias en la replicación viral en sangre periférica, sino a la existencia de una mayor replicación viral en los reservorios.

Nuestros resultados sobre una mayor replicación viral en ganglio estarían en consonancia con lo publicado en la literatura por otros autores (Hatano et al., 2013), que llevaron a cabo un estudio con 190 pacientes en el que midieron, al igual que hemos hecho nosotros, ARN-VIH por técnicas ultrasensibles y ADN proviral, intentando correlacionar estos valores con marcadores de inmunoactivación. Posteriormente hicieron un segundo análisis comparando los pacientes inmunodiscordantes, con aquellos que presentaron una respuesta inmune completa, y observaron que no había diferencias entre ambos grupos, en el ARN medido por técnicas ultrasensibles. Por el

contrario sí encontraron relación en el ADN proviral, siendo mayor en el grupo con discordancia inmunológica.

Geretti AM, y colaboradores, en un subestudio del estudio Monet (Geretti et al., 2013), encontraron que el ADN proviral se relacionó especialmente con el nadir de CD4 y con la existencia de CV-VIH detectable, por lo que en nuestro trabajo, esperábamos encontrar mayor cantidad de ADN proviral en el grupo de discordantes, al presentar un nadir más bajo y una mayor replicación en tejido amigdalario. Sin embargo no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el ADN proviral, ni en PBMC ni en tejido linfoide, aunque creemos muy importante señalar que el porcentaje de pacientes con ADN proviral detectable en ganglio entre los pacientes discordantes fue superior (30 vs 50%, $p=0,251$), con una mediana también mayor en este mismo grupo (100 copias/mL vs 0 copias/mL), lo que sugiere, una vez más, que el escaso tamaño muestral podría haber condicionado el no encontrar significación estadística en estas diferencias.

Nuestros resultados son diferentes a los comunicados por Hatano H, y colaboradores, que encontraron un mayor porcentaje de ADN proviral en el grupo de pacientes discordantes (Hatano et al., 2013). Nosotros creemos que los IPs tendrían un efecto confusor en cuanto a la existencia de replicación viral en ganglio. Dado que en el estudio de Hatano no se especifica el tratamiento de los diferentes grupos, es posible que hubiese el mismo porcentaje de pacientes con IPs, por lo que el supuesto efecto de éstos sobre la replicación viral se vería mitigada por las diferencias que determinan la discordancia inmunológica. En nuestro estudio existe una tendencia a un mayor nivel de ADN proviral en los pacientes discordantes, aunque de manera no significativa, lo que podría explicarse porque la mayoría de nuestros pacientes discordantes se encontraban recibiendo un IP. Esto estaría en consonancia con los resultados comunicados por Nicastri E, y colaboradores que encontraron menores niveles de ADN proviral en los pacientes cuyo esquema de tratamiento contenía un IP (Nicastri et al., 2008), lo que estaría justificado por lo comentado con anterioridad, pues la actividad de los IPs va más allá de la mera inhibición de la proteasa viral, interactuando en múltiples pasos del ciclo viral (Rabi et al., 2013), por lo que creemos que el elevado porcentaje de pacientes en tratamiento con IPs en el grupo de pacientes discordantes (70%) condicionó de

manera decisiva la incapacidad para encontrar diferencias significativas entre los grupos de pacientes con respuesta discordante y aquellos con respuesta concordante.

Con posterioridad, de manera análoga al estudio realizado con los pacientes en triterapia y monoterapia, tras realizar el estudio de las características virológicas de los pacientes discordantes y concordantes, nos centramos en la valoración de los distintos parámetros inmunológicos en el ganglio linfático.

En este caso no encontramos diferencias en ninguno de los parámetros analizados, lo que hemos de admitir que llama poderosamente la atención, puesto que debido a la existencia de una mayor replicación viral en el ganglio de los pacientes discordantes, era esperable encontrar diferencias en los parámetros inmunológicos en este grupo de pacientes. Sin embargo, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística, queremos resaltar que sí existieron diferencias, especialmente en cuanto al valor del PD1, siendo muy superiores sus valores en el grupo de pacientes discordantes que en el grupo de pacientes con respuesta concordante (951 vs 481, $p=0,28$).

Como se ha comentado con anterioridad, la expresión de PD-1 es un marcador de inmunoactivación, de mayor replicación viral y de agotamiento del sistema inmune (Grabmeier-Pfistershammer et al., 2011; Hatano et al., 2013), por lo que una mayor expresión en los linfocitos de los pacientes con respuesta discordante, como la que hemos encontrado en nuestro estudio, sería lo esperable y, por tanto, creemos que los resultados obtenidos son concordantes con lo publicado hasta la fecha. Es por ello que creemos que la falta de significación se debe al bajo tamaño muestral de nuestro estudio.

Por otro lado tampoco detectamos diferencias en otros marcadores inmunológicos en ganglio linfático como el recuento de linfocitos CD4 y cociente CD4/CD8. La explicación a este hallazgo sólo se puede realizar desde la especulación.

Es conocido que el PD-1 es un marcador de fracaso en la reconstitución inmune, pudiendo ser el único marcador alterado en pacientes con respuesta inmunológica discordante y respuesta virológica completa, por lo que ha sido considerado por algunos autores como el marcador más importante de inmunodiscoedancia (Grabmeier-

Pfistershammer et al., 2011). Desde esta perspectiva, es posible que la ausencia de diferencias en el resto de parámetros inmunológicos sea el resultado de ese carácter único del PD-1, pudiendo considerar la similitud en el resto de las variables inmunológicas entre los pacientes discordantes y los pacientes con respuesta concordante como un resultado plausible.

Por otro lado, y de acuerdo a lo comentado con anterioridad, el tratamiento con IPs se asocia con un aumento del recuento de linfocitos CD4 en ganglio linfático mediante la disminución de la fibrosis en ganglio (Diaz et al., 2010; Diaz et al., 2011), un efecto antiapoptótico (Pilon et al., 2002) y/o la inhibición en múltiples puntos del ciclo viral del VIH producido por los IPs (Rabi et al., 2013). La mayoría de los pacientes discordantes (7/10) se encontraban recibiendo un IP dentro del esquema TARGA, por lo que este hecho podría haber influenciado el resultado obtenido, máxime si tenemos en cuenta que la mitad de los pacientes concordantes no tenían un IP en su esquema de tratamiento (todos pacientes en triterapia, excepto 2, se encontraban con esquemas TARGA sin IPs) y que entre los pacientes concordantes existieron diferencias significativas entre aquellos que recibieron un IP y los que no.

Para comprobar esta teoría realizamos un sub estudio comparando los valores de los linfocitos CD4 y el cociente CD4/CD8 en amígdala entre los pacientes discordantes en tratamiento con IPs y aquellos sin IPs. Los valores mostraron una gran diferencia tanto en el recuento CD4 (5741 células vs vs 3145 células para pacientes con IPs vs pacientes sin IPs) como en el cociente CD4/CD8 (1,71 vs 0,84 para pacientes con IPs vs pacientes sin IPs). Sin embargo, al igual que sucedió con los resultados de la muestra global sin alcanzar diferencias significativas, mediado casi con total seguridad, por el escaso número de pacientes (4 vs 2 para pacientes con IPs vs pacientes sin IPs). Creemos que estos datos sugieren que la presencia de un IP formando parte del esquema de tratamiento TARGA en la mayoría de los pacientes discordantes podría justificar que no hayamos encontrado diferencias significativas en cuanto al recuento de linfocitos CD4 y el cociente CD4/CD8 en amígdala, y dando aún más robustez a la posibilidad de un posible papel de los IPs en la recuperación inmunológica.

Por último nos propusimos valorar los diferentes parámetros de inmunoactivación y translocación bacteriana entre los pacientes con respuesta discordante y aquellos con

respuesta discordante. Del mismo modo que en la comparación entre los pacientes en triterapia y los pacientes en monoterapia no encontramos diferencias significativas en la mayoría ninguno de los parámetros analizados, sCD14, LPS, endoCap y RNA 16S, a excepción de en la IL-6 y el cociente CD4/CD8 en sangre periférica.

Antes de comenzar con el estudio detallado de los resultados, esperábamos encontrar grandes diferencias en cuanto a todos o la mayoría de estos parámetros de inmunoactivación, motivado por el déficit inmunológico que presentan los pacientes con respuesta discordante inmunológica. Sin embargo, tras valorar los resultados obtenidos en los pacientes en triterapia y aquellos en monoterapia, en los que no encontramos diferencias significativas, mediado por el bajo tamaño muestral, pero sobre todo por la falta de reproducibilidad de estos marcadores de inmunoactivación, especialmente en cuanto al RNA16S (Svard et al., 2014).

Por el contrario, la existencia de diferencias en el recuento de linfocitos CD4 y del cociente CD4/CD8 en sangre periférica eran esperables por la propia definición de inmunodiscordancia virológica por lo que no creemos que deban ser analizados en detalle. Con respecto a la existencia de valores significativamente superiores de IL-6 en los pacientes discordantes creemos que su explicación es multifactorial. La existencia de valores elevados de IL-6 se ha correlacionado con la coinfección por el VHC, la adicción de drogas por vía parenteral, consumo de tabaco y alcohol y tiempo de evolución de la infección por el VIH, características todas presentes con mayor frecuencia entre nuestros pacientes discordantes, creemos que, a pesar de encontrarse la mayoría de estos pacientes en tratamiento con un IP, factor que podría originar una inhibición de la IL-6 por los mecanismos anteriormente explicados, el hallazgo de diferencias entre estos dos grupos (discordantes y concordantes) es fácilmente explicable.

7. Conclusiones

1. La monoterapia no condiciona mayor nivel de la replicación viral residual ni de ADN proviral en amígdala ni en sangre periférica.
2. La monoterapia no comporta una mayor inmunoadactivación mediada por los marcadores empleados de manera habitual (LPS, sCD14, RNA 16S).
3. La monoterapia se asoció con un mayor recuento de linfocitos CD4 y un mayor cociente CD4/CD8 en amígdala.
4. Los pacientes discordantes presentan una mayor carga viral VIH en amígdala palatina.
5. Los pacientes discordantes no mostraron diferencias en cuanto a la inmunohistoquímica en amígdala, pero si un mayor grado de inflamación sistémica.

8. Bibliografía

- Abad-Fernandez, M., Vallejo, A., Hernandez-Novoa, B., Diaz, L., Gutierrez, C., Madrid, N., . . . Moreno, S. (2013). Correlation between different methods to measure microbial translocation and its association with immune activation in long-term suppressed HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *64*(2), 149-153. doi:10.1097/QAI.0b013e31829a2f12
- Achhra, A. C., & Boyd, M. A. (2013). Antiretroviral regimens sparing agents from the nucleoside(tide) reverse transcriptase inhibitor class: a review of the recent literature. *AIDS Res Ther*, *10*(1), 33. doi:10.1186/1742-6405-10-33
- Appay, V., & Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*, *214*(2), 231-241. doi:10.1002/path.2276
- Arenas-Pinto, A., Milinkovic, A., Peppas, D., McKendry, A., Maini, M., & Gilson, R. (2015). Systemic inflammation and residual viraemia in HIV-positive adults on protease inhibitor monotherapy: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, *15*, 138. doi:10.1186/s12879-015-0889-9
- Arenzana-Seisdedos, F. (2008). [Viral entry as therapeutic target. Current situation of entry inhibitors]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *26 Suppl 11*, 5-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133215>
- Arenzana-Seisdedos, F., & Parmentier, M. (2006). Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin Immunol*, *18*(6), 387-403. doi:10.1016/j.smim.2006.07.007
- Arribas, J. R., Clumeck, N., Nelson, M., Hill, A., van Delft, Y., & Moecklinghoff, C. (2012). The MONET trial: week 144 analysis of the efficacy of darunavir/ritonavir (DRV/r) monotherapy versus DRV/r plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors, for patients with viral load < 50 HIV-1 RNA copies/mL at baseline. *HIV Med*, *13*(7), 398-405. doi:10.1111/j.1468-1293.2012.00989.x
- Arribas, J. R., Doroana, M., Turner, D., Vandekerckhove, L., & Streinu-Cercel, A. (2013). Boosted protease inhibitor monotherapy in HIV-infected adults: outputs from a pan-European expert panel meeting. *AIDS Res Ther*, *10*(1), 3. doi:10.1186/1742-6405-10-3
- Arribas, J. R., Girard, P. M., Landman, R., Pich, J., Mallolas, J., Martinez-Rebollar, M., . . . Group, O. R.-E. S. (2015). Dual treatment with lopinavir-ritonavir plus lamivudine versus triple treatment with lopinavir-ritonavir plus lamivudine or emtricitabine and a second nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor for maintenance of HIV-1 viral suppression (OLE): a randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*, *15*(7), 785-792. doi:10.1016/S1473-3099(15)00096-1
- Arribas, J. R., Horban, A., Gerstoft, J., Fatkenheuer, G., Nelson, M., Clumeck, N., . . . Moecklinghoff, C. (2010). The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS*, *24*(2), 223-230. doi:10.1097/QAD.0b013e3283348944
- Arribas, J. R., Pozniak, A. L., Gallant, J. E., DeJesus, E., Gazzard, B., Campo, R. E., . . . Cheng, A. K. (2008). Tenofovir disoproxil fumarate, emtricitabine, and efavirenz compared with zidovudine/lamivudine and efavirenz in treatment-naive patients: 144-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *47*(1), 74-78. doi:10.1097/QAI.0b013e31815acab8
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, *226*(5252), 1209-1211. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4316300>
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*(4599), 868-871. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183>

- BenMarzouk-Hidalgo, O. J., Torres-Cornejo, A., Gutierrez-Valencia, A., Ruiz-Valderas, R., Viciano, P., & Lopez-Cortes, L. F. (2015). Differential effects of viremia and microbial translocation on immune activation in HIV-infected patients throughout ritonavir-boosted darunavir monotherapy. *Medicine (Baltimore)*, *94*(17), e781. doi:10.1097/MD.0000000000000781
- Berkhout, B., Eggink, D., & Sanders, R. W. (2012). Is there a future for antiviral fusion inhibitors? *Curr Opin Virol*, *2*(1), 50-59. doi:10.1016/j.coviro.2012.01.002
- Biberfeld, G., Brown, F., Esparza, J., Essex, M., Gallo, R. C., Montagnier, L., . . . Schild, G. (1987). WHO Working Group on Characterization of HIV-Related Retroviruses: criteria for characterization and proposal for a nomenclature system. *AIDS*, *1*(3), 189-190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3126760>
- Boller, K., Konig, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Lower, R., Lower, J., & Kurth, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology*, *196*(1), 349-353. doi:10.1006/viro.1993.1487
- Brenchley, J. M., Price, D. A., & Douek, D. C. (2006). HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol*, *7*(3), 235-239. doi:10.1038/ni1316
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., . . . Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, *12*(12), 1365-1371. doi:10.1038/nm1511
- Brenchley, J. M., Ruff, L. E., Casazza, J. P., Koup, R. A., Price, D. A., & Douek, D. C. (2006). Preferential infection shortens the life span of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells in vivo. *J Virol*, *80*(14), 6801-6809. doi:10.1128/JVI.00070-06
- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., . . . Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, *200*(6), 749-759. doi:10.1084/jem.20040874
- Buchacz, K., Armon, C., Palella, F. J., Baker, R. K., Tedaldi, E., Durham, M. D., & Brooks, J. T. (2012). CD4 Cell Counts at HIV Diagnosis among HIV Outpatient Study Participants, 2000-2009. *AIDS Res Treat*, *2012*, 869841. doi:10.1155/2012/869841
- Buzon, M. J., Massanella, M., Llibre, J. M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M. C., . . . Martinez-Picado, J. (2010). HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*, *16*(4), 460-465. doi:10.1038/nm.2111
- Cameron, D. W., da Silva, B. A., Arribas, J. R., Myers, R. A., Bellos, N. C., Gilmore, N., . . . Hanna, G. J. (2008). A 96-week comparison of lopinavir-ritonavir combination therapy followed by lopinavir-ritonavir monotherapy versus efavirenz combination therapy. *J Infect Dis*, *198*(2), 234-240. doi:10.1086/589622
- Canestri, A., Lescure, F. X., Jaureguiberry, S., Moulignier, A., Amiel, C., Marcelin, A. G., . . . Katlama, C. (2010). Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, *50*(5), 773-778. doi:10.1086/650538
- Chun, T. W., Engel, D., Berrey, M. M., Shea, T., Corey, L., & Fauci, A. S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(15), 8869-8873. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671771>
- Chun, T. W., Murray, D., Justement, J. S., Hallahan, C. W., Moir, S., Kovacs, C., & Fauci, A. S. (2011). Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *204*(1), 135-138. doi:10.1093/infdis/jir208

- Chun, T. W., Nickle, D. C., Justement, J. S., Meyers, J. H., Roby, G., Hallahan, C. W., . . . Fauci, A. S. (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *197*(5), 714-720. doi:10.1086/527324
- Cicconi, P., Cozzi-Lepri, A., Castagna, A., Trecarichi, E. M., Antinori, A., Gatti, F., . . . Group, I. C. F. S. (2010). Insights into reasons for discontinuation according to year of starting first regimen of highly active antiretroviral therapy in a cohort of antiretroviral-naive patients. *HIV Med*, *11*(2), 104-113. doi:10.1111/j.1468-1293.2009.00750.x
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., . . . et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, *233*(4761), 343-346. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425430>
- Clumeck, N., Pozniak, A., Raffi, F., & Committee, E. E. (2008). European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV Med*, *9*(2), 65-71. doi:10.1111/j.1468-1293.2007.00533.x
- Coffin, J. M. (1992). Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, *176*, 143-164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1600751>
- Coffin, J. M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, *267*(5197), 483-489. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824947>
- Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Perez-Olmeda, M., & Alcamí, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol*, *7*(11), 798-812. doi:10.1038/nrmicro2223
- Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Sanchez del Cojo, M., Mateos, E., & Alcamí, J. (2010). Dual role of host cell factors in HIV-1 replication: restriction and enhancement of the viral cycle. *AIDS Rev*, *12*(2), 103-112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571604>
- Coppo, R., Camilla, R., Porcellini, M. G., Peruzzi, L., Gianoglio, B., Amore, A., . . . Tovo, P. A. (2012). Saquinavir in steroid-dependent and -resistant nephrotic syndrome: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant*, *27*(5), 1902-1910. doi:10.1093/ndt/gfs035
- Craigo, J. K., & Gupta, P. (2006). HIV-1 in genital compartments: vexing viral reservoirs. *Curr Opin HIV AIDS*, *1*(2), 97-102. doi:10.1097/01.COH.0000200507.27578.26
- d'Arminio Monforte, A., Cozzi-Lepri, A., Phillips, A., De Luca, A., Murri, R., Mussini, C., . . . Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients Study, G. (2005). Interruption of highly active antiretroviral therapy in HIV clinical practice: results from the Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *38*(4), 407-416. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764957>
- De Clercq, E. (1999). Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Farmaco*, *54*(1-2), 26-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321027>
- Deayton, J. R., Prof Sabin, C. A., Johnson, M. A., Emery, V. C., Wilson, P., & Griffiths, P. D. (2004). Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet*, *363*(9427), 2116-2121. doi:10.1016/S0140-6736(04)16500-8
- Delfraissy, J. F., Flandre, P., Delaugerre, C., Ghosn, J., Horban, A., Girard, P. M., . . . Chauvin, J. P. (2008). Lopinavir/ritonavir monotherapy or plus zidovudine and lamivudine in antiretroviral-naive HIV-infected patients. *AIDS*, *22*(3), 385-393. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f3f16d

- Delgado, R. (2008). [Lopinavir/ritonavir monotherapy for the treatment of HIV-1 infection: the emergence of resistance]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26 Suppl 16, 34-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19572443>
- Diaz, A., Alos, L., Leon, A., Mozos, A., Caballero, M., Martinez, A., . . . Study Group of Lymphoid Tissue immunopathogenesis in, H. I. V. i. (2010). Factors associated with collagen deposition in lymphoid tissue in long-term treated HIV-infected patients. *AIDS*, 24(13), 2029-2039. doi:10.1097/QAD.0b013e32833c3268
- Diaz, A., Garcia, F., Mozos, A., Caballero, M., Leon, A., Martinez, A., . . . Alos, L. (2011). Lymphoid tissue collagen deposition in HIV-infected patients correlates with the imbalance between matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Infect Dis*, 203(6), 810-813. doi:10.1093/infdis/jiq129
- Ding, X., Andraca-Carrera, E., Cooper, C., Miele, P., Kornegay, C., Soukup, M., & Marcus, K. A. (2012). No association of abacavir use with myocardial infarction: findings of an FDA meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 61(4), 441-447. doi:10.1097/QAI.0b013e31826f993c
- Dinh, D. M., Volpe, G. E., Duffalo, C., Bhalchandra, S., Tai, A. K., Kane, A. V., . . . Ward, H. D. (2015). Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*, 211(1), 19-27. doi:10.1093/infdis/jiu409
- Doitsh, G., Galloway, N. L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., . . . Greene, W. C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 505(7484), 509-514. doi:10.1038/nature12940
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J., & Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 51-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568896>
- Douek, D. C., Roederer, M., & Koup, R. A. (2009). Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*, 60, 471-484. doi:10.1146/annurev.med.60.041807.123549
- Doyle, T., & Geretti, A. M. (2012). Low-level viraemia on HAART: significance and management. *Curr Opin Infect Dis*, 25(1), 17-25. doi:10.1097/QCO.0b013e32834ef5d9
- Dronda, F., Moreno, S., Moreno, A., Casado, J. L., Perez-Elias, M. J., & Antela, A. (2002). Long-term outcomes among antiretroviral-naïve human immunodeficiency virus-infected patients with small increases in CD4+ cell counts after successful virologic suppression. *Clin Infect Dis*, 35(8), 1005-1009. doi:10.1086/342695
- Drusano, G. L., Bilello, J. A., Stein, D. S., Nessly, M., Meibohm, A., Emini, E. A., . . . Holder, D. J. (1998). Factors influencing the emergence of resistance to indinavir: role of virologic, immunologic, and pharmacologic variables. *J Infect Dis*, 178(2), 360-367. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697715>
- Durack, D. T. (1981). Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N Engl J Med*, 305(24), 1465-1467. doi:10.1056/NEJM198112103052408
- Estebanez, M., Stella-Ascariz, N., Mingorance, J., Perez-Valero, I., Bernardino, J. I., Zamora, F. X., . . . Arribas, J. R. (2014). Inflammatory, procoagulant markers and HIV residual viremia in patients receiving protease inhibitor monotherapy or triple drug therapy: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, 14, 379. doi:10.1186/1471-2334-14-379
- Expert Panel of Ge, S., the National Aids, P., Berenguer, J., Polo, R., Lozano, F., Lopez Aldeguer, J., . . . Rivero, A. (2014). Executive summary of the GeSIDA/National AIDS Plan consensus document on antiretroviral therapy in adults infected by the human immunodeficiency virus (updated January 2014). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32(7), 447-458. doi:10.1016/j.eimc.2014.02.018
- Falcon-Neyra, L., Benmarzouk-Hidalgo, O. J., Madrid, L., Noguera-Julian, A., Fortuny, C., Neth, O., & Lopez-Cortes, L. (2015). No differences of immune activation and microbial

translocation among HIV-infected children receiving combined antiretroviral therapy or protease inhibitor monotherapy. *Medicine (Baltimore)*, 94(11), e521.

doi:10.1097/MD.0000000000000521

- Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S., Nucera, E., & De Simone, C. (1997). CD8 lymphocytes in HIV infection: helpful and harmful. *J Clin Lab Immunol*, 49(1), 15-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9819670>
- Fernandez-Montero, J. V., Vispo, E., Anta, L., de Mendoza, C., & Soriano, V. (2012). Rilpivirine: a next-generation non-nucleoside analogue for the treatment of HIV infection. *Expert Opin Pharmacother*, 13(7), 1007-1014. doi:10.1517/14656566.2012.667802
- Finkel, T. H., Tudor-Williams, G., Banda, N. K., Cotton, M. F., Curiel, T., Monks, C., . . . Kupfer, A. (1995). Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med*, 1(2), 129-134. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585008>
- Florence, E., Lundgren, J., Dreezen, C., Fisher, M., Kirk, O., Blaxhult, A., . . . Euro, S. S. G. (2003). Factors associated with a reduced CD4 lymphocyte count response to HAART despite full viral suppression in the EuroSIDA study. *HIV Med*, 4(3), 255-262. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859325>
- Fonjungo, P. N., Mpoudi, E. N., Torimiro, J. N., Alemnji, G. A., Eno, L. T., Lyonga, E. J., . . . Pieniazek, D. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 group m protease in cameroon: genetic diversity and protease inhibitor mutational features. *J Clin Microbiol*, 40(3), 837-845. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11880402>
- Gallant, J. E., Staszewski, S., Pozniak, A. L., DeJesus, E., Suleiman, J. M., Miller, M. D., . . . Study, G. (2004). Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a 3-year randomized trial. *JAMA*, 292(2), 191-201. doi:10.1001/jama.292.2.191
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., . . . Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 865-867. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601823>
- Garcia, F., Vidal, C., Plana, M., Cruceta, A., Gallart, M. T., Pumarola, T., . . . Gatell, J. M. (2000). Residual low-level viral replication could explain discrepancies between viral load and CD4+ cell response in human immunodeficiency virus-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 30(2), 392-394. doi:10.1086/313660
- Gazzola, L., Tincati, C., Bellistri, G. M., Monforte, A., & Marchetti, G. (2009). The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *Clin Infect Dis*, 48(3), 328-337. doi:10.1086/595851
- Geretti, A. M., Arribas, J. R., Lathouwers, E., Foster, G. M., Yakoob, R., Kinloch, S., . . . Moecklinghoff, C. (2013). Dynamics of cellular HIV-1 DNA levels over 144 weeks of darunavir/ritonavir monotherapy versus triple therapy in the MONET trial. *HIV Clin Trials*, 14(1), 45-50. doi:10.1410/hct1401-45 10.1310/hct1401-45
- Gero, D., Szoleczky, P., Modis, K., Pribis, J. P., Al-Abed, Y., Yang, H., . . . Szabo, C. (2013). Identification of pharmacological modulators of HMGB1-induced inflammatory response by cell-based screening. *PLoS One*, 8(6), e65994. doi:10.1371/journal.pone.0065994
- Glushakova, S., Grivel, J. C., Fitzgerald, W., Sylwester, A., Zimmerberg, J., & Margolis, L. B. (1998). Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nat Med*, 4(3), 346-349. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500611>

- Gonzalez, N., Alvarez, A., & Alcamí, J. (2010). Broadly neutralizing antibodies and their significance for HIV-1 vaccines. *Curr HIV Res*, 8(8), 602-612. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054253>
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305(24), 1425-1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401
- Grabmeier-Pfistershammer, K., Steinberger, P., Rieger, A., Leitner, J., & Kohrgruber, N. (2011). Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 56(2), 118-124. doi:10.1097/QAI.0b013e3181fbab9f
- Greene, W. C. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 324(5), 308-317. doi:10.1056/NEJM199101313240506
- Group, D. A. D. S., Sabin, C. A., Worm, S. W., Weber, R., Reiss, P., El-Sadr, W., . . . Lundgren, J. D. (2008). Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet*, 371(9622), 1417-1426. doi:10.1016/S0140-6736(08)60423-7
- Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Fiscus, S., Zhang, Z. Q., Eron, J., Mellors, J., . . . Wong, J. K. (2001). Residual human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis*, 183(9), 1318-1327. doi:10.1086/319864
- Gupta, S. K. (2008). Tenofovir-associated Fanconi syndrome: review of the FDA adverse event reporting system. *AIDS Patient Care STDS*, 22(2), 99-103. doi:10.1089/apc.2007.0052
- Gutierrez, F., Padilla, S., Masia, M., Iribarren, J. A., Moreno, S., Viciano, P., . . . Co, R. M. (2008). Patients' characteristics and clinical implications of suboptimal CD4 T-cell gains after 1 year of successful antiretroviral therapy. *Curr HIV Res*, 6(2), 100-107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336257>
- Haase, A. T. (1999). Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol*, 17, 625-656. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.625
- Hammer, S. M., Squires, K. E., Hughes, M. D., Grimes, J. M., Demeter, L. M., Currier, J. S., . . . Fischl, M. A. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med*, 337(11), 725-733. doi:10.1056/NEJM199709113371101
- Hatano, H., Delwart, E. L., Norris, P. J., Lee, T. H., Neilands, T. B., Kelley, C. F., . . . Deeks, S. G. (2010). Evidence of persistent low-level viremia in long-term HAART-suppressed, HIV-infected individuals. *AIDS*, 24(16), 2535-2539. doi:10.1097/QAD.0b013e32833dba03
- Hatano, H., Jain, V., Hunt, P. W., Lee, T. H., Sinclair, E., Do, T. D., . . . Deeks, S. G. (2013). Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis*, 208(1), 50-56. doi:10.1093/infdis/jis630
- Henry, K. (2010). Report from the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. More data and answers from ACTG 5202. *J Watch AIDS Clin Care*, 22(4), 30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480928>
- Hisatomi, T., Nakazawa, T., Noda, K., Almulki, L., Miyahara, S., Nakao, S., . . . Miller, J. W. (2008). HIV protease inhibitors provide neuroprotection through inhibition of

mitochondrial apoptosis in mice. *J Clin Invest*, 118(6), 2025-2038.
doi:10.1172/JCI34267

- Horiike, M., Iwami, S., Kodama, M., Sato, A., Watanabe, Y., Yasui, M., . . . Igarashi, T. (2012). Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology*, 423(2), 107-118. doi:10.1016/j.virol.2011.11.024
- Hunt, P. W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J. M., Roland, M., Page-Shafer, K., . . . Deeks, S. G. (2008). Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis*, 197(1), 126-133. doi:10.1086/524143
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 11(11), 3887-3895. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396582>
- Julg, B., & Walker, B. D. (2009). The paradox of incomplete CD4+ cell count restoration despite successful antiretroviral treatment and the need to start highly active antiretroviral therapy early. *Clin Infect Dis*, 48(6), 795-797. doi:10.1086/597094
- Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D., & Gallo, R. C. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 218(4572), 571-573. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6981847>
- Kaufmann, G. R., Furrer, H., Ledergerber, B., Perrin, L., Opravil, M., Vernazza, P., . . . Swiss, H. I. V. C. S. (2005). Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, 41(3), 361-372. doi:10.1086/431484
- Kelesidis, T., Tran, T. T., Stein, J. H., Brown, T. T., Moser, C., Ribaldo, H. J., . . . McComsey, G. A. (2015). Changes in Inflammation and Immune Activation With Atazanavir-, Raltegravir-, Darunavir-Based Initial Antiviral Therapy: ACTG 5260s. *Clin Infect Dis*, 61(4), 651-660. doi:10.1093/cid/civ327
- Kelley, C. F., Kitchen, C. M., Hunt, P. W., Rodriguez, B., Hecht, F. M., Kitahata, M., . . . Deeks, S. G. (2009). Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin Infect Dis*, 48(6), 787-794. doi:10.1086/597093
- Lefeuvre, A., Chollet, L., Hittinger, G., Profizi, N., Costes, O., & Poggi, C. (1998). Residual human immunodeficiency virus type 1 RNA in lymphoid tissue of patients with sustained plasma RNA of <200 copies/mL. *J Infect Dis*, 177(1), 235-238. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9419197>
- Lambert-Niclot, S., Flandre, P., Valantin, M. A., Peytavin, G., Duvivier, C., Haim-Boukobza, S., . . . Marcelin, A. G. (2011). Factors associated with virological failure in HIV-1-infected patients receiving darunavir/ritonavir monotherapy. *J Infect Dis*, 204(8), 1211-1216. doi:10.1093/infdis/jir518
- Lambert-Niclot, S., Flandre, P., Valantin, M. A., Soulie, C., Fourati, S., Wirden, M., . . . Marcelin, A. G. (2012). Similar evolution of cellular HIV-1 DNA level in darunavir/ritonavir monotherapy versus triple therapy in MONOI-ANRS136 trial over 96 weeks. *PLoS One*, 7(7), e41390. doi:10.1371/journal.pone.0041390
- Lang, S., Mary-Krause, M., Cotte, L., Gilquin, J., Partisani, M., Simon, A., . . . Clinical Epidemiology Group of the French Hospital Database on, H. I. V. (2010). Impact of individual antiretroviral drugs on the risk of myocardial infarction in human immunodeficiency virus-infected patients: a case-control study nested within the French Hospital Database on HIV ANRS cohort CO4. *Arch Intern Med*, 170(14), 1228-1238. doi:10.1001/archinternmed.2010.197

- Lee, P. I., Ciccone, E. J., Read, S. W., Asher, A., Pitts, R., Douek, D. C., . . . Sereti, I. (2009). Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis*, *199*(11), 1664-1670. doi:10.1086/598953
- Li, Y., Li, X. H., Yu, Z. X., Cai, J. J., Billiar, T. R., Chen, A. F., . . . Yuan, H. (2015). HIV protease inhibitors in pulmonary hypertension: rationale and design of a pilot trial in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*, *5*(3), 538-546. doi:10.1086/682426
- Lopez-Huertas, M. R., Callejas, S., Abia, D., Mateos, E., Dopazo, A., Alcamí, J., & Coiras, M. (2010). Modifications in host cell cytoskeleton structure and function mediated by intracellular HIV-1 Tat protein are greatly dependent on the second coding exon. *Nucleic Acids Res*, *38*(10), 3287-3307. doi:10.1093/nar/gkq037
- Loutfy, M. R., Genebat, M., Moore, D., Raboud, J., Chan, K., Antoniou, T., . . . Collaboration, C. (2010). A CD4+ cell count <200 cells per cubic millimeter at 2 years after initiation of combination antiretroviral therapy is associated with increased mortality in HIV-infected individuals with viral suppression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *55*(4), 451-459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21105259>
- Maeda, K., Das, D., Nakata, H., & Mitsuya, H. (2012). CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges. *Expert Opin Emerg Drugs*, *17*(2), 135-145. doi:10.1517/14728214.2012.673584
- Marchetti, G., Bellistri, G. M., Borghi, E., Tincati, C., Ferramosca, S., La Francesca, M., . . . Monforte, A. D. (2008). Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, *22*(15), 2035-2038. doi:10.1097/QAD.0b013e3283112d29
- Marchetti, G., Tincati, C., & Silvestri, G. (2013). Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin Microbiol Rev*, *26*(1), 2-18. doi:10.1128/CMR.00050-12
- Margolis, D. A., Brinson, C. C., Smith, G. H., de Vente, J., Hagins, D. P., Eron, J. J., . . . Team, L. A. I. S. (2015). Cabotegravir plus rilpivirine, once a day, after induction with cabotegravir plus nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (LATTE): a randomised, phase 2b, dose-ranging trial. *Lancet Infect Dis*. doi:10.1016/S1473-3099(15)00152-8
- Martin, A., Bloch, M., Amin, J., Baker, D., Cooper, D. A., Emery, S., & Carr, A. (2009). Simplification of antiretroviral therapy with tenofovir-emtricitabine or abacavir-Lamivudine: a randomized, 96-week trial. *Clin Infect Dis*, *49*(10), 1591-1601. doi:10.1086/644769
- Mascarenhas, A. P., & Musier-Forsyth, K. (2009). The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *FEBS J*, *276*(21), 6118-6127. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07315.x
- Masia, M., Padilla, S., Alvarez, D., Lopez, J. C., Santos, I., Soriano, V., . . . CoRis. (2013). Risk, predictors, and mortality associated with non-AIDS events in newly diagnosed HIV-infected patients: role of antiretroviral therapy. *AIDS*, *27*(2), 181-189. doi:10.1097/QAD.0b013e32835a1156
- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., . . . Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*, *305*(24), 1431-1438. doi:10.1056/NEJM198112103052402
- McCune, J. M. (2001). The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*, *410*(6831), 974-979. doi:10.1038/35073648
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Jean-Pierre, P., Manuelli, V., Lopez, P., . . . Markowitz, M. (2006). Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged

treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med*, 3(12), e484.
doi:10.1371/journal.pmed.0030484

- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Manuelli, V., Jean-Pierre, P., Lopez, P., . . . Markowitz, M. (2007). Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 81(2), 599-612. doi:10.1128/JVI.01739-06
- Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., & Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, 272(5265), 1167-1170. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638160>
- Merlini, E., Bai, F., Bellistri, G. M., Tincati, C., d'Arminio Monforte, A., & Marchetti, G. (2011). Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One*, 6(4), e18580. doi:10.1371/journal.pone.0018580
- Migueles, S. A., & Connors, M. (2010). Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *JAMA*, 304(2), 194-201. doi:10.1001/jama.2010.925
- Miller, C. J., Li, Q., Abel, K., Kim, E. Y., Ma, Z. M., Wietgreffe, S., . . . Haase, A. T. (2005). Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 79(14), 9217-9227. doi:10.1128/JVI.79.14.9217-9227.2005
- Miller, M. F., Haley, C., Koziel, M. J., & Rowley, C. F. (2005). Impact of hepatitis C virus on immune restoration in HIV-infected patients who start highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, 41(5), 713-720. doi:10.1086/432618
- Mira, J. A., Macias, J., Nogales, C., Fernandez-Rivera, J., Garcia-Garcia, J. A., Ramos, A., & Pineda, J. A. (2002). Transient rebounds of low-level viraemia among HIV-infected patients under HAART are not associated with virological or immunological failure. *Antivir Ther*, 7(4), 251-256. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553479>
- Moore, D. M., Hogg, R. S., Yip, B., Wood, E., Tyndall, M., Braitstein, P., & Montaner, J. S. (2005). Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 40(3), 288-293. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249702>
- Moses, A., Nelson, J., & Bagby, G. C., Jr. (1998). The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood*, 91(5), 1479-1495. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9473211>
- Moyle, G., & Gazzard, B. (1996). Current knowledge and future prospects for the use of HIV protease inhibitors. *Drugs*, 51(5), 701-712. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861542>
- Negredo, E., Massanella, M., Puig, J., Perez-Alvarez, N., Gallego-Escuredo, J. M., Villarroya, J., . . . Blanco, J. (2010). Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. *Clin Infect Dis*, 50(9), 1300-1308. doi:10.1086/651689
- Negredo, E., Molto, J., Burger, D., Viciano, P., Ribera, E., Paredes, R., . . . Clotet, B. (2004). Unexpected CD4 cell count decline in patients receiving didanosine and tenofovir-based regimens despite undetectable viral load. *AIDS*, 18(3), 459-463. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090798>
- Neuhaus, J., Angus, B., Kowalska, J. D., La Rosa, A., Sampson, J., Wentworth, D., . . . groups, E. s. (2010). Risk of all-cause mortality associated with nonfatal AIDS and

- serious non-AIDS events among adults infected with HIV. *AIDS*, 24(5), 697-706. doi:10.1097/QAD.0b013e3283365356
- Nicastri, E., Chiesi, A., Angeletti, C., Sarmati, L., Palmisano, L., Geraci, A., . . . Italian Antiretroviral Treatment, G. (2005). Clinical outcome after 4 years follow-up of HIV-seropositive subjects with incomplete virologic or immunologic response to HAART. *J Med Virol*, 76(2), 153-160. doi:10.1002/jmv.20352
 - Nicastri, E., Palmisano, L., Sarmati, L., D'Ettoire, G., Parisi, S., Andreotti, M., . . . Andreoni, M. (2008). HIV-1 residual viremia and proviral DNA in patients with suppressed plasma viral load (<400 HIV-RNA cp/ml) during different antiretroviral regimens. *Curr HIV Res*, 6(3), 261-266. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473790>
 - Nies-Kraske, E., Schacker, T. W., Condoluci, D., Orenstein, J., Brenchley, J., Fox, C., . . . Dybul, M. (2009). Evaluation of the pathogenesis of decreasing CD4(+) T cell counts in human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving successfully suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 199(11), 1648-1656. doi:10.1086/598980
 - O'Brien, M. E., Clark, R. A., Besch, C. L., Myers, L., & Kissinger, P. (2003). Patterns and correlates of discontinuation of the initial HAART regimen in an urban outpatient cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 34(4), 407-414. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615659>
 - Okazaki, T., & Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol*, 27(4), 195-201. doi:10.1016/j.it.2006.02.001
 - Ormaasen, V., Bruun, J. N., Sandvik, L., Holberg-Petersen, M., & Gaarder, P. I. (2003). Prognostic value of changes in CD4 count and HIV RNA during the first six months on highly active antiretroviral therapy in chronic human immunodeficiency virus infection. *Scand J Infect Dis*, 35(6-7), 383-388. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12953949>
 - Ostrowski, S. R., Katzenstein, T. L., Thim, P. T., Pedersen, B. K., Gerstoft, J., & Ullum, H. (2005). Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 191(3), 348-357. doi:10.1086/427340
 - Pacheco, Y. M., Jarrin, I., Rosado, I., Campins, A. A., Berenguer, J., Iribarren, J. A., . . . CoRIS. (2015). Increased risk of non-AIDS-related events in HIV subjects with persistent low CD4 counts despite cART in the CoRIS cohort. *Antiviral Res*, 117, 69-74. doi:10.1016/j.antiviral.2015.03.002
 - Pakker, N. G., Notermans, D. W., de Boer, R. J., Roos, M. T., de Wolf, F., Hill, A., . . . Schellekens, P. T. (1998). Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med*, 4(2), 208-214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461195>
 - Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., . . . Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*, 338(13), 853-860. doi:10.1056/NEJM199803263381301
 - Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G. J., Brun, S. C., . . . King, M. S. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(10), 3879-3884. doi:10.1073/pnas.0800050105
 - Panel de expertos de Ge, S. y. P. N. s. e. S. E. a. f. t. n. (2015). [GESIDA/National AIDS Plan: Consensus document on antiretroviral therapy in adults infected by the human

- immunodeficiency virus (Updated January 2015)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33(8), 543 e541-543 e543. doi:10.1016/j.eimc.2015.03.016
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., . . . Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25(21), 9543-9553. doi:10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005
 - Pasquau, J., Lopez-Cortes, L., Mayorga, M. I., Viciano, P., Del Mar Arenas, M., Rios, M. J., . . . Hidalgo-Tenorio, C. (2014). Monotherapy with darunavir/ritonavir is effective and safe in clinical practice. *J Int AIDS Soc*, 17(4 Suppl 3), 19813. doi:10.7448/IAS.17.4.19813
 - Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271(5255), 1582-1586. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599114>
 - Perez-Molina, J. A., Rubio, R., Rivero, A., Pasquau, J., Suarez-Lozano, I., Riera, M., . . . Group, G. S. (2015). Dual treatment with atazanavir-ritonavir plus lamivudine versus triple treatment with atazanavir-ritonavir plus two nucleos(t)ides in virologically stable patients with HIV-1 (SALT): 48 week results from a randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis*, 15(7), 775-784. doi:10.1016/S1473-3099(15)00097-3
 - Peters, L., Mocroft, A., Soriano, V., Rockstroh, J. K., Losso, M., Valerio, L., . . . Euro, S. S. G. (2009). Hepatitis C virus coinfection does not influence the CD4 cell recovery in HIV-1-infected patients with maximum virologic suppression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 50(5), 457-463. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360931>
 - Piketty, C., Weiss, L., Thomas, F., Mohamed, A. S., Belec, L., & Kazatchkine, M. D. (2001). Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen. *J Infect Dis*, 183(9), 1328-1335. doi:10.1086/319861
 - Pilon, A. A., Lum, J. J., Sanchez-Dardon, J., Phenix, B. N., Douglas, R., & Badley, A. D. (2002). Induction of apoptosis by a nonnucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(8), 2687-2691. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121958>
 - Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., & Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(12), 7415-7419. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261256>
 - Pulido, F., Arribas, J. R., Delgado, R., Cabrero, E., Gonzalez-Garcia, J., Perez-Elias, M. J., . . . Group, O. K. S. (2008). Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and two nucleosides for maintenance therapy of HIV. *AIDS*, 22(2), F1-9. doi:10.1097/QAD.0b013e3282f4243b
 - Pulido, F., Delgado, R., Perez-Valero, I., Gonzalez-Garcia, J., Miralles, P., Arranz, A., . . . Arribas, J. R. (2008). Long-term (4 years) efficacy of lopinavir/ritonavir monotherapy for maintenance of HIV suppression. *J Antimicrob Chemother*, 61(6), 1359-1361. doi:10.1093/jac/dkn103
 - Quashie, P. K., Sloan, R. D., & Wainberg, M. A. (2012). Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase. *BMC Med*, 10, 34. doi:10.1186/1741-7015-10-34
 - Rabi, S. A., Laird, G. M., Durand, C. M., Laskey, S., Shan, L., Bailey, J. R., . . . Siliciano, R. F. (2013). Multi-step inhibition explains HIV-1 protease inhibitor pharmacodynamics and resistance. *J Clin Invest*, 123(9), 3848-3860. doi:10.1172/JCI67399
 - Raboud, J. M., Rae, S., Woods, R., Harris, M., Montaner, J. S., Incas, & Groups, A. S. (2002). Consecutive rebounds in plasma viral load are associated with virological

- failure at 52 weeks among HIV-infected patients. *AIDS*, 16(12), 1627-1632. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172084>
- Re, M. C., Vitone, F., Bon, I., Schiavone, P., & Gibellini, D. (2006). Meaning of DNA detection during the follow-up of HIV-1 infected patients: a brief review. *New Microbiol*, 29(2), 81-88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16841548>
 - Riddler, S. A., Haubrich, R., DiRienzo, A. G., Peeples, L., Powderly, W. G., Klingman, K. L., . . . Team, A. C. T. G. S. A. (2008). Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 358(20), 2095-2106. doi:10.1056/NEJMoa074609
 - Ruiz-Mateos, E., Rubio, A., Vallejo, A., De la Rosa, R., Sanchez-Quijano, A., Lissen, E., & Leal, M. (2004). Thymic volume is associated independently with the magnitude of short- and long-term repopulation of CD4+ T cells in HIV-infected adults after highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin Exp Immunol*, 136(3), 501-506. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02474.x
 - Sachsenberg, N., Perelson, A. S., Yerly, S., Schockmel, G. A., Leduc, D., Hirschel, B., & Perrin, L. (1998). Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med*, 187(8), 1295-1303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547340>
 - Sainz, T., Serrano-Villar, S., Diaz, L., Gonzalez Tome, M. I., Gurbindo, M. D., de Jose, M. I., . . . Munoz-Fernandez, M. A. (2013). The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS*, 27(9), 1513-1516. doi:10.1097/QAD.0b013e32835faa72
 - Sandler, N. G., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M. C., Nixon, D. E., . . . Group, I. S. S. (2011). Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*, 203(6), 780-790. doi:10.1093/infdis/jiq118
 - Serrano-Villar, S., Gutierrez, C., Vallejo, A., Hernandez-Novoa, B., Diaz, L., Abad Fernandez, M., . . . Moreno, S. (2013). The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects is independently associated with T-cell activation despite long-term viral suppression. *J Infect*, 66(1), 57-66. doi:10.1016/j.jinf.2012.09.013
 - Serrano-Villar, S., Moreno, S., Fuentes-Ferrer, M., Sanchez-Marcos, C., Avila, M., Sainz, T., . . . Estrada, V. (2014). The CD4:CD8 ratio is associated with markers of age-associated disease in virally suppressed HIV-infected patients with immunological recovery. *HIV Med*, 15(1), 40-49. doi:10.1111/hiv.12081
 - Serrano-Villar, S., Perez-Elias, M. J., Dronza, F., Casado, J. L., Moreno, A., Royuela, A., . . . Moreno, S. (2014). Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio. *PLoS One*, 9(1), e85798. doi:10.1371/journal.pone.0085798
 - Serrano-Villar, S., Sainz, T., Lee, S. A., Hunt, P. W., Sinclair, E., Shacklett, B. L., . . . Deeks, S. G. (2014). HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog*, 10(5), e1004078. doi:10.1371/journal.ppat.1004078
 - Smith, K. Y., Patel, P., Fine, D., Bellos, N., Sloan, L., Lackey, P., . . . Team, H. S. (2009). Randomized, double-blind, placebo-matched, multicenter trial of abacavir/lamivudine or tenofovir/emtricitabine with lopinavir/ritonavir for initial HIV treatment. *AIDS*, 23(12), 1547-1556. doi:10.1097/QAD.0b013e32832cbcc2
 - Solas, C., Lafeuillade, A., Halfon, P., Chadapaud, S., Hittinger, G., & Lacarelle, B. (2003). Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(1), 238-243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499197>

- Solomon, A., Tennakoon, S., Leeansyah, E., Arribas, J., Hill, A., Van Delft, Y., . . . Lewin, S. R. (2014). No difference in the rate of change in telomere length or telomerase activity in HIV-infected patients after three years of darunavir/ritonavir with and without nucleoside analogues in the MONET trial. *PLoS One*, *9*(11), e109718. doi:10.1371/journal.pone.0109718
- Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S., & Johnson, K. A. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*, *267*(5200), 988-993. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532321>
- Strategies for Management of Antiretroviral Therapy Study, G., El-Sadr, W. M., Lundgren, J., Neaton, J. D., Gordin, F., Abrams, D., . . . Rappoport, C. (2006). CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med*, *355*(22), 2283-2296. doi:10.1056/NEJMoa062360
- Svard, J., Sonnerborg, A., Vondracek, M., Molling, P., & Nowak, P. (2014). On the usefulness of circulating bacterial 16S rDNA as a marker of microbial translocation in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *66*(4), e87-89. doi:10.1097/QAI.0000000000000188
- Tan, R., Westfall, A. O., Willig, J. H., Mugavero, M. J., Saag, M. S., Kaslow, R. A., & Kempf, M. C. (2008). Clinical outcome of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *47*(5), 553-558. doi:10.1097/QAI.0b013e31816856c5
- Taylor, J. M., Fahey, J. L., Detels, R., & Giorgi, J. V. (1989). CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *2*(2), 114-124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2495346>
- Temin, H. M., & Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, *226*(5252), 1211-1213. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4316301>
- Tenner-Racz, K., Stellbrink, H. J., van Lunzen, J., Schneider, C., Jacobs, J. P., Raschdorff, B., . . . Racz, P. (1998). The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J Exp Med*, *187*(6), 949-959. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500797>
- Thompson, M. A., Aberg, J. A., Hoy, J. F., Telenti, A., Benson, C., Cahn, P., . . . Volberding, P. A. (2012). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA*, *308*(4), 387-402. doi:10.1001/jama.2012.7961
- Tomasselli, A. G., & Heinrikson, R. L. (2000). Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. *Biochim Biophys Acta*, *1477*(1-2), 189-214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708858>
- Torres, B., Guardo, A. C., Leal, L., Leon, A., Lucero, C., Alvarez-Martinez, M. J., . . . Garcia, F. (2014). Protease inhibitor monotherapy is associated with a higher level of monocyte activation, bacterial translocation and inflammation. *J Int AIDS Soc*, *17*, 19246. doi:10.7448/IAS.17.1.19246
- Torres-Cornejo, A., Benmarzouk-Hidalgo, O. J., Gutierrez-Valencia, A., Perez-Romero, P., Martin-Pena, R., Ruiz-Valderas, R., . . . Lopez-Cortes, L. F. (2014). Cellular HIV reservoir replenishment is not affected by blip or intermittent viremia episodes during darunavir/ritonavir monotherapy. *AIDS*, *28*(2), 201-208. doi:10.1097/QAD.0000000000000060
- van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, *3*(9), 697-709. doi:10.1038/nri1182

- Vassallo, M., Mercie, P., Cottalorda, J., Ticchioni, M., & Dellamonica, P. (2012). The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology*, *9*, 174. doi:10.1186/1743-422X-9-174
- Viard, J. P., Mocroft, A., Chiesi, A., Kirk, O., Roge, B., Panos, G., . . . Euro, S. S. G. (2001). Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J Infect Dis*, *183*(8), 1290-1294. doi:10.1086/319678
- Vidal, F., Domingo, J. C., Guallar, J., Saumoy, M., Cordobilla, B., Sanchez de la Rosa, R., . . . Domingo, P. (2006). In vitro cytotoxicity and mitochondrial toxicity of tenofovir alone and in combination with other antiretrovirals in human renal proximal tubule cells. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(11), 3824-3832. doi:10.1128/AAC.00437-06
- Volberding, P. A., & Deeks, S. G. (2010). Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *Lancet*, *376*(9734), 49-62. doi:10.1016/S0140-6736(10)60676-9
- Weber, R., Ruppik, M., Rickenbach, M., Spoerri, A., Furrer, H., Battegay, M., . . . Swiss, H. I. V. C. S. (2013). Decreasing mortality and changing patterns of causes of death in the Swiss HIV Cohort Study. *HIV Med*, *14*(4), 195-207. doi:10.1111/j.1468-1293.2012.01051.x
- Wever, K., van Agtmael, M. A., & Carr, A. (2010). Incomplete reversibility of tenofovir-related renal toxicity in HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *55*(1), 78-81. doi:10.1097/QAI.0b013e3181d05579
- Wikby, A., Ferguson, F., Forsey, R., Thompson, J., Strindhall, J., Lofgren, S., . . . Johansson, B. (2005). An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *60*(5), 556-565. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972602>
- Wikby, A., Johansson, B., Ferguson, F., & Olsson, J. (1994). Age-related changes in immune parameters in a very old population of Swedish people: a longitudinal study. *Exp Gerontol*, *29*(5), 531-541. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7828662>
- Winter, H., Maeda, Y., Mitsuya, H., & Zemlicka, J. (1996). Phosphodiester amidates of allenic nucleoside analogues: anti-HIV activity and possible mechanism of action. *J Med Chem*, *39*(17), 3300-3306. doi:10.1021/jm960330n
- Wong, J. K., Hezareh, M., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Spina, C. A., & Richman, D. D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, *278*(5341), 1291-1295. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360926>
- Yang, S., Lin, S., Kelen, G. D., Quinn, T. C., Dick, J. D., Gaydos, C. A., & Rothman, R. E. (2002). Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*, *40*(9), 3449-3454. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202592>
- Young, J., Xiao, Y., Moodie, E. E., Abrahamowicz, M., Klein, M. B., Bernasconi, E., . . . Swiss, H. I. V. C. S. (2015). Effect of Cumulating Exposure to Abacavir on the Risk of Cardiovascular Disease Events in Patients From the Swiss HIV Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *69*(4), 413-421. doi:10.1097/QAI.0000000000000662
- Yukl, S. A., Gianella, S., Sinclair, E., Epling, L., Li, Q., Duan, L., . . . Wong, J. K. (2010). Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, *202*(10), 1553-1561. doi:10.1086/656722
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., . . . Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*, *441*(7095), 847-852. doi:10.1038/nature04817

- Zhu, P., Winkler, H., Chertova, E., Taylor, K. A., & Roux, K. H. (2008). Cryoelectron tomography of HIV-1 envelope spikes: further evidence for tripod-like legs. *PLoS Pathog*, 4(11), e1000203. doi:10.1371/journal.ppat.1000203
- Zolla-Pazner, S., & Cardozo, T. (2010). Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 10(7), 527-535. doi:10.1038/nri2801