



Estudi de l'evolució de l'envolta del VIH-1 en pacients infectats sotmesos a vacunació terapèutica amb virus autòleg inactivat

Meritxell Guilà Matarin

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

**DEPARTAMENT D'ANATOMIA PATOLÒGICA,
FARMACOLOGIA I MICROBIOLOGIA**

**ESTUDI DE L'EVOLUCIÓ DE L'ENVOLTA DEL VIH-1
EN PACIENTS INFECTATS SOTMESOS A VACUNACIÓ
TERAPÈUTICA AMB VIRUS AUTÒLEG INACTIVAT**

Tesi Doctoral presentada per

Meritxell Guilà Matarin

Per optar al grau de
Doctora en Bioquímica per la Universitat de Barcelona

Directors de la tesi:

Dra Cristina Gil Roda
Dr Tomàs Pumarola Suñé

Barcelona, Abril 2011



La Doctora CRISTINA GIL RODA, investigadora del Grup de Malalties Infeccioses i Sida de l'Hospital Clínic-IDIBAPS, i el Doctor TOMÀS PUMAROLA SUÑÉ, catedràtic de Microbiologia de la Universitat de Barcelona, cap de secció de Virologia del Servei de Microbiologia de l'Hospital Clínic de Barcelona i professor titular del Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona:

CERTIFIQUEM que tant el treball experimental com la redacció de la memòria titulada "ESTUDI DE L'EVOLUCIÓ DE L'ENVOLTA DEL VIH-1 EN PACIENTS INFECTATS SOTMESOS A VACUNACIÓ TERAPÈUTICA AMB VIRUS AUTÒLEG INACTIVAT" presentada per Meritxell Guilà Matarin, s'ha realitzat sota la nostra direcció i tutoria, i considerem que reuneix les condicions necessàries per ser defensada davant del Tribunal corresponent per optar al grau de Doctora en Bioquímica per la Universitat de Barcelona.

I per tal que quedi constància, signem aquest document a Barcelona, l'1 de Març del 2011.

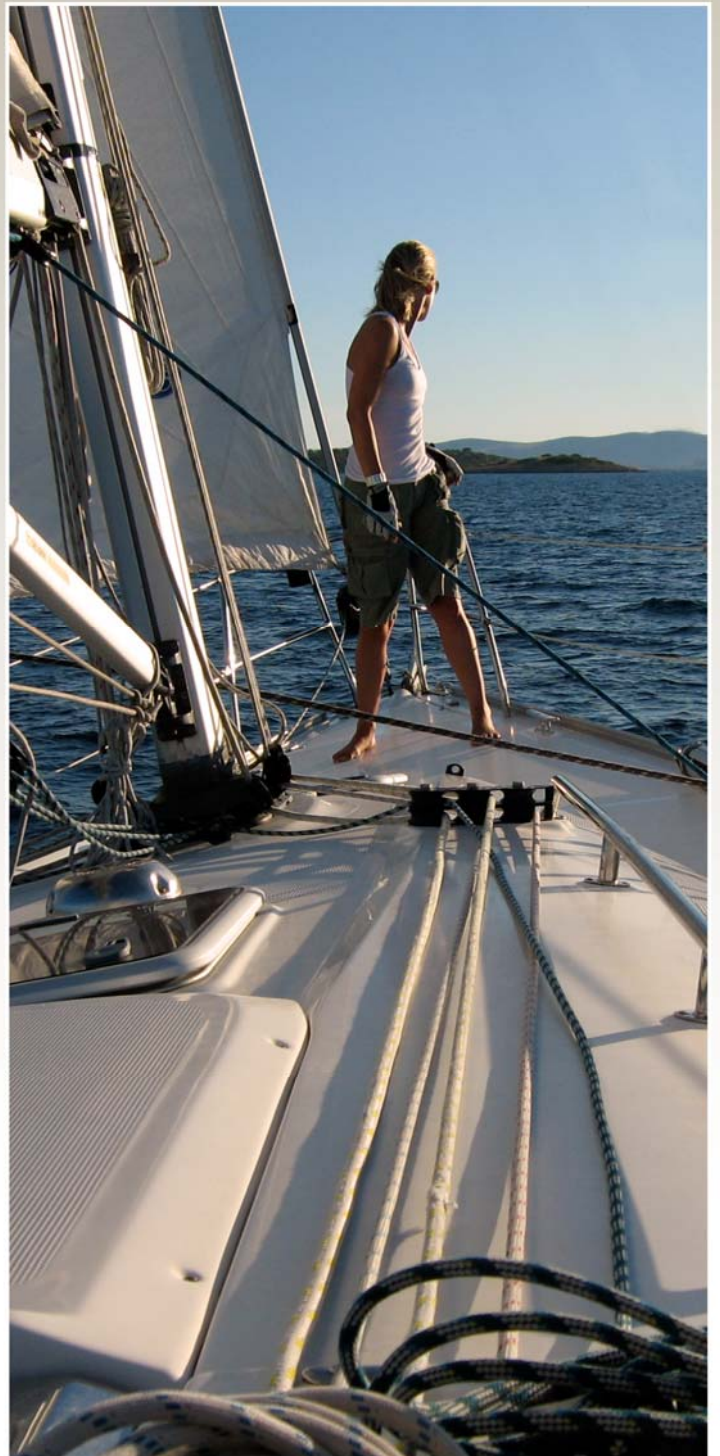
Dra Cristina Gil Roda

Dr Tomàs Pumarola Suñé

Al meu avi, Miquel Guilà,
el primer professor que vaig tenir (i el millor)

*Quan surts per fer
el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port
que els teus ulls ignoraven,
i vagis a ciutats
per aprendre dels que saben.*

*Lluís Llach
Viatge a Ítaca
1975*



AGRAÏMENTS

Per fi puc escriure una pàgina sense pensar, escriure les paraules que surten soles, sense raonar-les, sense referenciar-les, estirada al sofà amb el portàtil a la falda.

En primer lloc vull donar les gràcies a la persona que ha fet possible tot això, al Dr Josep Maria Gatell, que fa ja molt temps, entre reunió i reunió, va rebre al seu despatx a una bioquímica recent llicenciada, amb una sola línia al currículum però amb la il·lusió dels vint anys. Gràcies per donar-me l'oportunitat, per la confiança i la sinceritat.

Als meus directors de tesi, la Dra Cristina Gil i el Dr Tomàs Pumarola. Cristina, mil gracias. Sé que no ha sido fácil, pero hemos luchado y hemos aprendido juntas. Gracias por estar siempre ahí y por motivarme cuando veía el vaso medio vacío. Tomàs, gràcies per acollir-me els primers temps al laboratori, per ser tant pràctic i per respondre'm sempre que ho he necessitat.

A la meua família, que heu sigut, i sempre sereu el meu pilar a la terra:

Mama, mamutxí, ets la millor. Gràcies per tot, per escoltar-me, consolar-me, ajudar-me, per estar sempre pendent de mí, sense demanar res a canvi, amb un amor a prova de filles una mica hostils. Saps que no hagués pogut escriure aquesta tesi sense tu. T'estimo.

Al meu avi Miquel, gràcies per descobrir-me el meravellós món dels matraus i les pipetes quan era petita i que al final també han sigut la meua feina. Gràcies per ensenyar-me gran part del que sé i per repetir-me mil vegades que quan acabes d'estudiar una lliçó és quan te n'adones del que et falta per aprendre. I a la meua iaia Maria, Marieta, gràcies per estar sempre aquí, per confiar en mí i pels petits grans moments que passem juntes.

Al meu cosí, Roger, merci nen, per tot, no només pel suport informàtic, tecnològic, gràfic etc sinó també per tots els bons moments que hem compartit plegats, en especial els estius a Menorca, els farts de riure en les nits de divendres pocafèines, les mil aventures a bord del Trieste i a Sa Fonda Pepe de Formentera. @llauraor tuprígmaktqierfe.

Al meu tiet, Ignasi, que encara que no entenguis perquè em dedico a la ciència, sempre em dónes un cop de mà. Gràcies també pels teus e-mails, gtalks i skypees inesperats que et fan riure una bona estona! I a la meua tieta Dolors, gràcies per animar-me a continuar endavant fins l'últim dia i per fer-me prometre que lluitaré pels meus somnis. T'enyoro.

A les meves nenes del laboratori VIII, per compartir les nostres vides, riure i plorar juntes i per ser la meua segona família durant tant de temps:

Anna, ha sigut un honor poder treballar amb una amiga colze a colze, no oblidaré mai aquelles tardes inacabables alineant seqüències o fent deu milions de minipreps, sempre tararejant alguna cançoneta que alegrava la feina. Menys mal que et tenia al costat, sobretot quan les coses es giraven, que era bastant sovint. Gràcies Annutxi, per les xerrades, els ànims, els cafès, i per comprendre'm millor que ningú.

Maite, gracias por procesar las muestras... ies broma! No, en serio, gracias por enseñarme tanto, por tragarte alguna que otra bronca por culpa mía, pero sobretodo por echarme una mano siempre que lo he necesitado, y no sólo en el laboratorio.

Gloria, ai mi Gloritere, ¿que hubiese sido de mí sin tí? Gracias por esos vinitos terapéuticos al salir del laboratorio, por escucharme, entenderme e incluso ponerte los guantes para echarme una mano. De verdad, gracias por ser la columna donde agarrarme cuando las circunstancias me pusieron tacones de doce centímetros.

Carmen, gracias Carmencita, por estar ahí siempre apoyando en todo momento. Ana, ay sí no fuera por esos momentos... gracias por tu alegría contagiosa. María José, menos mal de tu humor sarcástico y tan necesario... ¡gracias! Sara, merci per tenir tanta curiositat per la meua feina i estar sempre disposada a que t'ensenyés alguna cosa... Laura, gracias por preocuparte por mí sobretodo cuando se me terminaba la beca, ¡ite debo una! Cristina, Laia, Núria i Harold, el "camarote", gràcies pels bons moments que hem passat (recordem el dragón???) Narcís, gràcies per animar-me a acabar, i per descobrir-me la gastronomia alacantina, francesa... i del món! Joan, gràcies per les teves rialles espontànies, la millor teràpia després d'hores davant l'ordinador. Sonsoles, gracias por tu ayuda y por enseñarme a ser práctica (y más caótica también...) en el labo. Mireia, gràcies per acollir-me quan vaig arribar, sé que estaves com jo en aquests moments i només et faltava una becària.

I a tots aquells que formen el gran grup de Sida del Clínic, en especial a la Dra Montse Plana, al Dr Felipe García, la Dra Teresa Gallart i al Dr Josep Maria Miró. Cadascun de vosaltres ha tingut un paper imprescindible en aquesta tesi.

Aquesta tesi no s'hauria escrit sense l'ajuda inigualable del Dr Javier Martínez-Picado, la Judit Dalmau i el Paco Codoñer de l'IRSI-Caixa. Javier, gràcies per donar-me suport, consells i per la teva sinceritat. Paco_mil_gràcies! Jud, gràcies per implicar-te tant, dedicar-me tant temps, i pels moments tant divertits que hem passat around the world.

També vull agrair el seu suport a TOT el Servei de Microbiologia del Clínic, en especial a l'Ester, el Diego, la Santse, les Veros, les Martes, la Pili Salvador, la Marta Parera, el Gabi Vergés i a l'inoblidable Toni Llorens, pels bons records que m'enduc de Micro, i perquè sempre que pujo a la 11-5 tinc una rebuda espectacular.

Quiero agradecer al Dr José Alcamí y a TODOS mis compañeros del ISCIH que me recibieran con los brazos abiertos durante mi estancia en Majadahonda. Y dar las gracias especialmente a Elena y a Sanne, por ser los Ángeles de Charlie, por todos los buenos momentos que pasamos juntas, por enseñarme tanto en tan poco tiempo, por no dejar que la amistad se diluyera en la distancia y sobretodo por hacer que una catalana se sintiera en Madrid como en casa. ¡Gracias! Bedanke!

vull agrair a tot el laboratori de Fisiologia i Fisiopatologia Digestiva de l'IR Vall d'Hebron. Maria, Chays, Encarna, Marta, Mila, Montse y Carmen por preocuparos por mí y darme vuestro más sincero apoyo. A la Truman unit: Maria, Cris, Bea, Marc, Carmen y Mar, por contagiarme de nuevo con vuestro entusiasmo, inquietud y pasión por la ciencia; Javier, por comprenderme y darme el respiro que necesitaba; Ana, gracias por tu generosidad, tu amistad, por cuidarme y animarme siempre y porqué desde el principio sabías que podía hacerlo, aunque yo no lo tuviese tan claro.

A les meves nenes, que sense vosaltres jo no seria jo:

Bego, gràcies per ser el més semblant a una germana, perquè em coneixes millor que ningú, per saber quan estic preocupada encara que ho intentí dissimular, per animar-me sempre, i no continuo que no acabo... t'ai lo viu pepíniaudemícorassaun! Patri, gràcies per trobar sempre un foradet en la teva apretada agenda per xerrar una estona, anar a voltar pel món o només fer un pití ràpid a davant de casa, no saps com t'ho agraeixo! Laia, gràcies perquè sé que sempre es pot comptar amb tu, sigui l'hora que sigui, en els bons i els mals moments. Aina, gràcies per fer-me riure fins que em salten les llàgrimes en qualsevol lloc i en qualsevol situació. Erehunamujédinnadeadmirá! Marta, gràcies perquè sempre estàs aquí encara que visquis allà. Lluïsa, gràcies per estar sempre disposada a donar un cop de mà. Eva, Votti, mysisterdelasmountains, gràcies per no canviar mai, per la teva energia que segueix íntacta des de fa quinze anys. Mireia, gràcies per preocupar-te per mí i pel teu renovat optimisme i alegria contagiosos. Ana, gràcies per ser-hi en els moments importants i... com no, pel club de fans!

I als meus nens, Artur, Peter, Lluís, Bro, Albert, Armand i Eduard, per les bones estones que sempre passem junts. David, gràcies per compartir amb mí confidències i experiències estrambòtiques. Per les trucades inacabables. Perquè hem après a tocar el flabiol i hem sobreviscut a la tempesta perfecta. I perquè per fi algú canta pitjor que jo.

I com no, gràcies també a tots els Pocafeïna (visiteu www.pocafeïna.cat !!!) en especial els twitaires, Roger, David, Pol, Emilio, Climent, Isma, Jordi, Pere i Rafa, que heu aguantat les neurcs d'una bioquímica pre-tèsica, tant en viu i en directe com online. Astrolabio xD

Ricard, gràcies per fer-me adonar que el que a mí em semblava una muntanya era un granet de sorra. Gràcies per parlar sempre amb tant orgull sobre la meua feina.

Roser, gràcies per tots els bons moments que hem compartit, perquè a pesar de la distància, quan ens retrobem sembla que el temps no hagi passat.

María, gracias por tu apoyo moral continuo, incluso cuando ibas a leer tu tesis y aún viviendo a miles y miles de kilómetros.

Joan, gràcies per la teua amistat inigualable. Gràcies per preocupar-te per mí, comprendre'm, animar-me sempre i per aguantar tots els rotllos científics estoïcament.

Carme, gràcies per considerar-me una més de la teua família, per la teua il·lusió i alegria, i perquè, encara que jo ho faci, tu no has dubtat mai de les meves possibilitats.

A Menorca, sa meua illa, i dò, per ser es meu racó de cel, per donam tota sa calma per enfrontar es que em venia a damunt. Gràcies per regalarn tots ets moments de felicitat, sa teua aigu, es teu sol i sa millor festa de sant Joan des món sencer.

I per últim, no puc deixar d'agrair als verdaers protagonistes d'aquesta tesi: Jordi, Mariano, Pietro, Carles, Manuel, Marta, Pere, José Luís, Josep Maria, Jordi, Maria Dolors, Santiago, Jordi, Josep Lluís, Eloy i Pedro, gràcies per la vostra valentia, generositat i confiança.

ÍNDEX

ABREVIATURES	- I -
PRÒLEG	- III -
INTRODUCCIÓ	
1. CLASSIFICACIÓ I ORIGEN DEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA	- 1 -
1.1 CLASSIFICACIÓ TAXONÒMICA DEL VIH	- 1 -
1.2 SUBTIPUS DEL VIH	- 2 -
1.3 ORIGEN DEL VIH	- 3 -
2. CARACTERÍSTIQUES DEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA TIPUS 1	- 5 -
2.1 MORFOLOGIA DEL VIH-1	- 5 -
2.2 ESTRUCTURA GENÈTICA DEL VIH-1	- 6 -
2.3 CICLE DE REPLICACIÓ DEL VIH-1	- 9 -
2.3.1 Fase primerenca	- 10 -
2.3.2 Fase tardana	- 12 -
2.4. VARIABILITAT GENÈTICA DEL VIH-1	- 14 -
2.4.1 Tamany poblacional	- 16 -
2.4.2 Taxa de mutació	- 16 -
2.4.3 Taxa de generació	- 16 -
2.4.4 Recombinació genòmica	- 17 -
2.4.5 Hipermutagènesi	- 18 -
2.4.6 Distribució de la variabilitat en el genoma	- 19 -
3. INFECCIÓ PER VIH-1 IN VIVO	- 21 -
3.1 TRANSMISSIÓ DEL VIH-1	- 21 -
3.2 HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ	- 22 -
3.2.1 Fase aguda	- 24 -
3.2.2 Fase crònica	- 24 -
3.2.3 Fase final o SIDA	- 25 -
3.3 MARCADORS DE LA PROGRESSIÓ DE LA INFECCIÓ	- 26 -
3.4 COM AFECTA LA PROGRESSIÓ DE LA INFECCIÓ A LA VARIABILITAT DEL VIH-1?	- 27 -
3.4.1 Complexitat viral	- 27 -
3.4.2 Tropisme viral	- 29 -
3.4.3 Escapament viral	- 31 -
3.4.3.1 <i>Escapament a la resposta cel·lular</i>	- 31 -
3.4.3.2 <i>Escapament a la resposta humoral</i>	- 32 -

4. TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL CONTRA EL VIH-1	- 34 -
4.1 TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL DE GRAN ACTIVITAT (TARGA)	- 35 -
4.2 TERÀPIES IMMUNOMEDIADES	- 36 -
4.2.1 Interrupcions estructurades del tractament (STI)	- 38 -
4.2.1.1 <i>Estratègies d'interrupció</i>	- 39 -
4.2.1.2 <i>Conseqüència de les interrupcions</i>	- 41 -
4.2.2 Vacunes terapèutiques	- 42 -
4.2.2.1 <i>Vacunes de virus complet inactivat</i>	- 42 -
4.2.2.2 <i>Vacunes d'ADN</i>	- 43 -
4.2.2.3 <i>Vacunes de vectors vírics recombinants</i>	- 44 -
4.2.2.4 <i>Vacunes de cèl·lules dendrítiques</i>	- 44 -
4.3 COM AFECTA EL TIPUS DE TRACTAMENT A LA VARIABILITAT GENÈTICA DEL VIH-1?	- 47 -
4.3.1 Resistències als fàrmacs antiretrovirals	- 47 -
4.3.2 Evolució genètica natural del VIH-1 i durant els tractaments immunomediats	- 49 -
4.4 ASSAIG CLÍNIC DE VACUNA TERAPÈUTICA EN PACIENTS VIH-1 ⁺ BASADA EN L'ADMINISTRACIÓ DE CÈL·LULES DENDRÍTIQUES AUTÒLOGUES CARREGADES AMB EL VIH-1 AUTÒLEG INACTIVAT PER CALOR (RESUM DEL PROTOCOL DCV01)	- 50 -

OBJECTIU - 59 -

PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES

1. SELECCIÓ DELS MOSTRES	- 63 -
2. OBTENCIÓ DE PLASMA DE SANG PERIFÈRICA	- 63 -
3. OBTENCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ARN DE VIH-1 EN EL PLASMA	- 64 -
4. OBTENCIÓ DE L'ARN DE VIH-1 DE PLASMA PER L'ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES	- 65 -
5. AMPLIFICACIÓ DE LA REGIÓ C2V5 DEL GEN <i>env</i> A PARTIR D'ARN DE VIH-1	- 65 -
5.1 RT-PCR	- 65 -
5.2 NT-PCR	- 66 -
6. CLONACIÓ DE LA REGIÓ C2V5 DEL GEN <i>env</i> DEL VIH-1	- 67 -
6.1 LLIGACIÓ I TRANSFORMACIÓ EN BACTÈRIES COMPETENTS	- 68 -
6.2 OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC (MINIPREPS)	- 69 -
7. OBTENCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DE LA REGIÓ C2V5	- 70 -
8. ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES	- 71 -

9. ANÀLISIS PROTEÏQUES	- 71 -
9.1 GLICOSILACIÓ	- 71 -
9.2 NOMBRE I CANVI D'AMINOÀCID	- 72 -
9.3 COMPLEXITAT	- 72 -
9.4 INFERÈNCIA DE LA UTILITZACIÓ DE CORRECEPTOR	- 73 -
10. ANÀLISIS FILOGENÈTIQUES	- 73 -
10.1 DIVERSITAT I DIVERGÈNCIA GENÈTICA	- 74 -
10.2 PRESSIÓ SELECTIVA	- 74 -
11. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES	- 75 -

RESULTATS

1. DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES	- 79 -
1.1 CÀRREGA VIRAL, TEMPS DE REBROT I CLONS OBTINGUTS	- 79 -
1.2 CONTROL DE QUALITAT	- 81 -
2. CARACTERITZACIÓ PROTEICA	- 83 -
2.1 GLICOSILACIÓ DE C2V5	- 83 -
2.2 INSERCIÓ I DELECIÓ A C2V5	- 87 -
2.3 CANVI D'AMINOÀCID	- 90 -
2.4 COMPLEXITAT VIRAL	- 93 -
2.5 TROPISME VIRAL	- 97 -
3. RELACIÓ FILOGENÈTICA	- 99 -
3.1 DIVERSITAT GENÈTICA	- 104 -
3.2 DIVERGÈNCIA GENÈTICA	- 109 -
3.3 PRESSIÓ SELECTIVA	- 115 -

DISCUSSIÓ	- 123 -
------------------	---------

CONCLUSIONS	- 135 -
--------------------	---------

BIBLIOGRAFIA	- 139 -
---------------------	---------

ANNEX MÈTODES (protocols)	- 151 -
----------------------------------	---------

ANNEX RESULTATS	- 179 -
------------------------	---------

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic complementari
APC	<i>Antigen-presenting cells</i>
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AUC	<i>Area under curve</i>
AZT	Azidotimidina
CD	Cèl·lules dendrítiques
CDDM	Cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits
CDm	Cèl·lules dendrítiques mieloides
cp	Còpies
CTL	<i>Cytotoxic T-cell lymphocytes</i>
CV	Càrrega viral
DDDP	<i>DNA-dependent DNA polymerase</i>
dNTPs	<i>Deoxynucleoside triphosphates</i>
EC	<i>Elite Controllers</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRC	Formes recombinants circulants
FRU	Formes recombinants úniques
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte and monocyte colony-stimulating factor</i>
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i>
IAS	<i>International AIDS Society</i>
IFN	Interferó
IL	Interleucina
IN	Integrasa
IP	Inhibidors de la proteasa
IQR	<i>Interquartile range</i>
Kb	Kilobase
log₁₀	Logarime en base 10
LTNP	<i>Long-term non-progressors</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
mg	Mil·ligram
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
mL	Mil·lilitre
MLV	<i>Murine leukemia virus</i>
mM	Mil·limolar
μM	Micromolar
mm³	Mil·límetre cúbic

M-MLV RT	<i>Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanòmetre
NNRTI	<i>Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
NRTI	<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
NT-PCR	<i>Nested polymerase chain reaction</i>
pb	Parell de bases
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PR	Proteasa
PSSM	<i>Position-specific scoring matrix</i>
RANTES	<i>Regulated-upon-activation normal T-expressed and secreted</i>
RDDP	<i>RNA-dependent DNA polymerase</i>
rpm	Revolucions per minut
RT	Retrotranscriptasa / Retrotranscripció
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
SE	<i>Standard error</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite Repression</i>
STI	<i>Structured treatment interruptions</i>
TARGA	Tractament antiretroviral de gran eficàcia
TBE	Tris-Borat EDTA
TD	Taxa de divergència
Th	Cèl·lules o resposta T <i>helper</i>
TR	Temps de rebrot
U	Unitats d'enzim
VIH	Virus de la Immunodeficiència humana
VIS	Virus de la immunodeficiència de simis

La Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida (Sida) fou descrita per primer cop en pacients homosexuals als Estats Units l'any 1981 ^[1, 2]. No va ser fins dos anys més tard, al 1983, quan es va descobrir l'agent causant de la sida, el virus de la immunodeficiència humana de tipus 1 (VIH-1) ^[3-5]. Uns anys més tard, al 1986, es va descobrir una variant del virus en pacients amb sida de l'Àfrica Occidental, el VIH-2, que també produeix la malaltia, tot i que és molt minoritari ja que presenta unes característiques patogèniques més atenuades ^[6, 7].

Mentre que inicialment la infecció per VIH-1 fou limitada, s'ha anat expandint estrepitosament durant aquests últims 25 anys, convertint-se en la pitjor epidèmia del segle XX. Amb 60 milions d'infeccions i més de 25 milions de morts, l'epidèmia de la sida es troba al mateix nivell que la pandèmia de grip de principis de segle XX i la de pesta bubònica del segle XIV ^[8].

Tot i que la sida és una malaltia relativament nova, s'han produït en poc temps avanços molt importants en el coneixement del virus que la produeix i de la seva immunopatogènia. Aquest fet ha permès que s'hagin pogut desenvolupar diferents fàrmacs efectius contra el VIH que poden controlar l'evolució clínica de la infecció, fins al punt que s'ha arribat a considerar la sida com una malaltia crònica. Desgraciadament, això no ocorre en totes les regions del món, sinó només en els països amb accés al tractament. De fet, les dades publicades per la OMS segueixen sent esfereïdores actualment: a finals de l'any 2009, el nombre de persones infectades per VIH en el món era de 33.3 milions, 22.5 dels quals es localitzaven en països de l'Àfrica subsahariana (Figura 1).

A més, durant l'any 2009 es van estimar un total de 2.6 milions de noves infeccions per VIH i 1.8 milions de morts per sida en tot el món, on més de la meitat dels casos es van donar a l'Àfrica subsahariana (dades publicades per la OMS al novembre de 2010, <http://www.unaids.org>).

Aquestes dades consciencien que tot i els grans avenços produïts en el camp del VIH-SIDA des dels seus inicis, fa més de dues dècades, cal invertir més esforços per frenar aquesta pandèmia arreu del món.

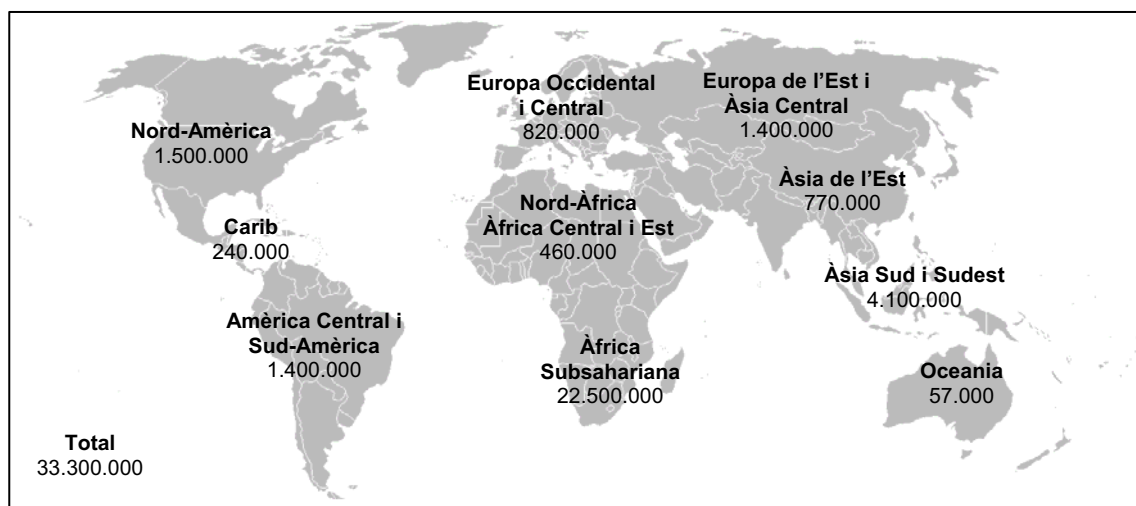


Figura 1 Distribució del número d'infeccions per VIH en el món l'any 2009 (modificada de <http://www.unaids.org>).

INTRODUCCIÓ

1. CLASSIFICACIÓ I ORIGEN DEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA

1.1 CLASSIFICACIÓ TAXONÒMICA DEL VIH

El VIH és un virus que pertany a la família *Retroviridae*. Els retrovirus són virus ARN que copien la seva informació genètica a ADN de doble cadena per poder integrar-se en el genoma de la cèl·lula que infecten. D'aquesta manera, mitjançant la maquinària cel·lular, es transcriuen les proteïnes virals que originaran una nova progènie vírica.

Tots els retrovirus tenen una organització genètica similar, presentant 3 gens estructurals anomenats *gag*, *pol* i *env* (que codifiquen per les proteïnes estructurals i els enzims necessaris per la replicació viral). A més, el genoma dels retrovirus, i per tant el del VIH, es troba flanquejat per unes seqüències repetitives (LTR, *long terminal repeats*) quan es troba de forma d'ADN integrat en el genoma de la cèl·lula hoste.

El VIH és un retrovirus del gènere *Lentivirus*, anomenat així perquè un dels seus trets característics és produir infeccions lentes, latents. El VIH, però, es considera un lentivirus atípic: la diana principal del virus són els limfòcits T CD4, i és precisament aquest limfotropisme el que representa una diferència important respecte altres lentivirus. A més, replica amb una cinètica molt agressiva en aquest tipus cel·lular induint una profunda immunosupressió a l'individu infectat degut tant a la destrucció limfocitària com a la interferència amb els mecanismes d'activació immune, fet que diferencia el VIH sobre la resta de lentivirus.

1.2 SUBTIPUS DEL VIH

La variabilitat del VIH suposa un repte per a la seva classificació, no obstant, mitjançant seqüències completes de diferents aïllats s'ha arribat a construir una classificació consensuada ^[9]. Els aïllats de VIH-1 es classifiquen en tres grups: Grup M (majoritari), grup O (*outlier* o marginal) i grup N (no-M, no-O).

El grup M és el majoritari en la pandèmia de sida i es divideix en 9 subtipus filogenètics (A, B, C, D, F, G,H, J, K) i diferents sub-subtipus (A1, A2 i F1, F2). El subtipus B és el més comú a Europa Occidental i als Estats Units, mentre que els subtipus no-B predominen als països en vies de desenvolupament, sent el subtipus C el causant de més de la meitat de les infeccions que tenen lloc en el món (Figura 2).

S'han descrit, a més, virus híbrids intersubtipus, de dos o més subtipus, denominats formes recombinants circulants (FRC) i formes recombinants úniques (FRU). Les FRCs es distribueixen en la població i es transmeten, mentre que les FRUs s'han detectat en només un individu o en alguns individus relacionats epidemiològicament.

El grup O és minoritari i s'han descrit varis centenars de casos quasi tots a Camerun; del grup N, que és molt minoritari, se n'han descrit molt pocs casos tots a Camerun ^[10].

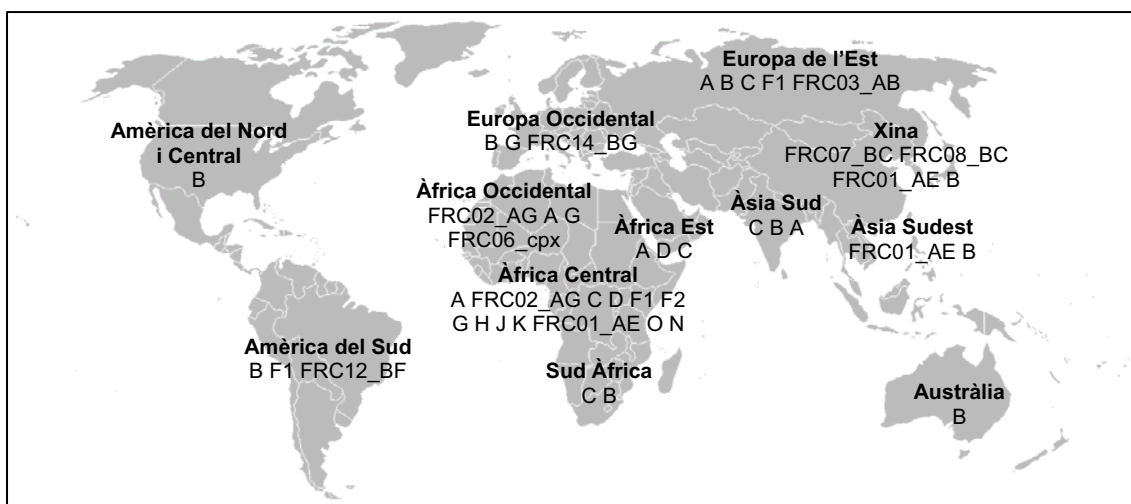


Figura 2 Distribució geogràfica dels diferents subtipus de VIH-1 i FRCs en les diferents àrees del món . Modificat de [10].

El VIH-2, tot i ser minoritari i presentar una distribució menor, té descrits diferents subtipus, tot i que només dos d'ells, l'A i el B s'han estès de forma epidèmica a l'Àfrica Occidental ^[11, 12].

1.3 ORIGEN DEL VIH

Els dos retrovirus que causen sida, el VIH-1 i el VIH-2, tenen orígens zoonòtics diferents. Mitjançant anàlisis filogenètiques, s'ha determinat que el VIH-1 deriva de virus aïllats de ximpanzés (*Pan troglodytes*). S'ha demostrat que aquest virus prové del virus VIScpz (virus de la immunodeficiència de simis en ximpanzé), i que aquest ha passat a la població humana en tres ocasions diferents ^[13], donant lloc als tres grups diferents de VIH-1, M, N i O (Figura 3).

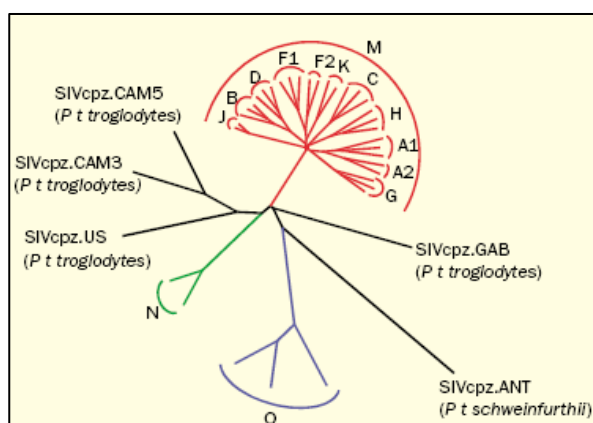


Figura 3 Arbre filogenètic construït a partir de seqüències completes de diferents aïllats de VIH-1 i de SIV de *Pan troglodytes troglodytes* i *Pan troglodytes schweinfurthii* [10].

El VIH-2 és menys virulent i es troba estès principalment a l'Àfrica Occidental, encara que també a Portugal, Angola, Moçambic i Índia. Els micos de cara ensutjada o *sooty mangabeis* (*Cercocebus atys*) estan àmpliament infectats per VISsm (virus de la immunodeficiència de simis en *sooty mangabeis*) en estat de vida salvatge i són el reservori de VIH-2, tal com s'ha demostrat mitjançant anàlisis filogenètiques de diferents lentivirus. Aquestes anàlisis mostren l'existència de diferents grups de VIH-2 que deriven de diferents introduccions en l'home a partir de *sooty mangabeis* ^[11]. De tots aquests grups, només dos, l'A i el B, s'han estès de forma epidèmica.

2. CARACTERÍSTIQUES DEL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA TIPUS 1.

2.1 MORFOLOGIA DEL VIH-1

El VIH-1 és una partícula esfèrica d'uns 100 nm de diàmetre. Aquesta forma ve determinada per tres estructures superposades: una bicapa lipídica externa, una matriu esfèrica i una càpsida troncocònica que conté el genoma viral en forma d'ARN.

La membrana externa (o envolta) deriva de membrana cel·lular de la cèl·lula hoste i conté les proteïnes de l'envolta viral, codificades pel gen *env* (gp120 i gp41). Aquesta envolta consta d'aproximadament 72 complexos glicoproteïcs, cadascun d'ells formats per trímers de les glicoproteïnes gp120 i gp41. La glicoproteïna gp120 és la subunitat de superfície i es troba ancorada a la membrana per la subunitat transmembrana gp41. A més, la subunitat gp120 presenta un domini d'unió al receptor cel·lular CD4. L'envolta viral també presenta proteïnes cel·lulars, tals com antígens del complex major d'histocompatibilitat (MHC o HLA), actina i ubiquitina ^[14].

Just per sota l'envolta viral, el virió conté una segona capa anomenada matriu, formada per aproximadament 2000 còpies de la proteïna viral p17, que prové del precursor p55 codificat en el gen *gag*. El mateix precursor dona lloc també a la proteïna p24, la qual forma la càpsida a l'interior de la qual hi ha el genoma del virus. L'ARN viral es troba estabilitzat en forma de complex ribonucleoproteïc, juntament amb les nucleoproteïnes virals (procedents de l'escisió del precursor codificat pel gen *gag*). Aquest complex format per l'ARN viral i proteïnes s'anomena nucleocàpsida o nucleoid. A més, dins la càpsida es

troben també els enzims codificats pel virus: Proteasa (PR), la Retrotranscriptasa (RT) i la Integrasa (IN) i algunes de les proteïnes virals accessòries, tals com Nef, Vif i Vpr^[15] (Figura 4).

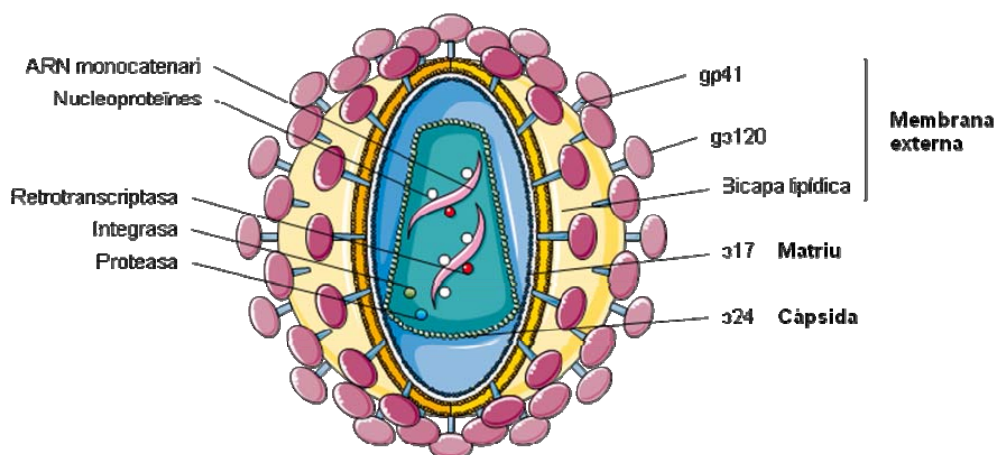


Figura 4 Estructura del virió del VIH-1

2.2 ESTRUCTURA GENÈTICA DEL VIH-1

El VIH-1, igual que tots els retrovirus, té dues formes genòmiques diferents. En la fase extracel·lular del cicle viral, el virus presenta dues còpies idèntiques d'ARN de cadena senzilla i polaritat positiva (forma denominada virió). En la fase intracel·lular, presenta una doble cadena d'ADN integrada dins el genoma cel·lular amb seqüències repetitives llargues (LTR, *long terminal repeats*) flanquejant els gens virals (forma denominada provirus). Són precisament aquestes LTR les que permeten la integració de l'ADN viral dins el genoma de la cèl·lula hoste i, a més, és on es localitzen els elements que inicien, dirigeixen i regulen l'expressió del genoma víric^[16]. Ambdues formes genòmiques, intra i extracel·lular, presenten una longitud de 9.2 kilobases (kb) aproximadament^[17].

Els gens que codifiquen per les proteïnes virals es divideixen en gens estructurals, reguladors i accessoris. Els gens estructurals són: el gen *gag*, que codifica principalment pels precursors de les proteïnes de la càpsida dels virions, el gen *pol*, que codifica pels precursors dels enzims virals com la Proteasa (PR), la Retrotranscriptasa (RT), la RNasa H i la Integrasa (IN), i el gen *env*, que codifica pels precursors de les glicoproteïnes de l'envolta gp120 i gp41. Els gens reguladors essencials són el gen transactivador transcripcional (*tat*) i el gen regulador de la expressió viral (*rev*); ambdós gens codifiquen per petites proteïnes essencials per la replicació viral que no apareixen en el virió. Finalment els gens accessoris (*vif*, *vpr*, *vpu* i *nef*) no són essencials per a la replicació viral de cèl·lules en cultiu tissular, però *in vivo* condicionen la patogènia de la malaltia^[18] (Taula 1, Figura 5).

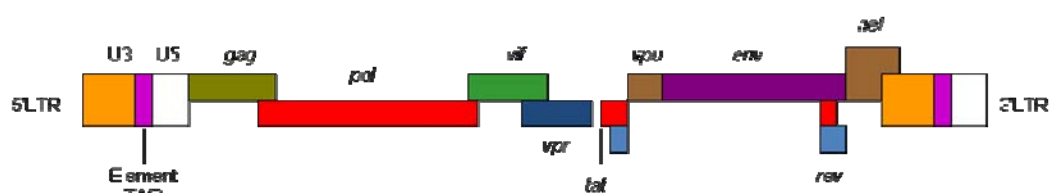


Figura 5 Organització del genoma de l'ADN proviral del VIH-1.

<i>Proteïnes estructurals</i>		
<i>gag</i>	p55	Precursora de p17, p24, p7, p6 i p1, totes elles internes en l'estructura del virió
	p17	Proteïna miristilada de la matriu. Afavoreix l'ancoratge en la membrana i dirigeix el complex de preintegració cap al nucli. Interacciona amb Env.
	p24	Proteïna de la càpsida.
	p15	Precursora d'altres proteïnes menors de la Nucleocàpsida: p7, p6 i p1
	p7	Proteïna de la nucleocàpsida. S'uneix a l'ARN viral.
	p6	Proteïna rica en prolina que s'uneix a Vpr. Afavoreix la maduració del virus.
	p1 i p2	Fragments molt curts de funció desconeguda que separen p6 i p7.
<i>pol</i>	p90	Precursora de l'enzim Proteasa (p10), retrotranscriptasa (p66, p51), RNasa H (p15) i Integrasa (p31).
	p10	Proteasa (PR). Processa la postraducció de proteïnes.
	p66, p51	Dues subunitats de la Retrotranscriptasa (RT). Retrotranscriuen l'ARN viral.
	p15	RNasa H, present en la subunitat p66 i no en la p51.
	p31	Integrasa (IN). Catalitza l'integració de l'ADN viral de doble cadena.
<i>env</i>	gp160	Glucoproteïna precursora de gp120 i gp41.
	gp120	Glucoproteïna de superfície.
	gp41	Glucoproteïna transmembrana.
<i>Proteïnes reguladores</i>		
<i>tat</i>	p14	Transactiva la transcripció de tots els ARNm del virus.
<i>rev</i>	p19	Transporta selectivament l'ARNm complet o processat parcialment cap al citoplasma
<i>Proteïnes accessòries</i>		
<i>nef</i>	p27	Augmenta la infectivitat del virió i té funció pleiotròpica, amb múltiples interaccions intracel·lulars. Regula a la baixa el receptor CD4 i els antigens d'histocompatibilitat MHC-I i II.
<i>vif</i>	p23	Proteïna associada en el VIH-1 a la infecciositat del virió.
<i>vpr</i>	p15	Para el cicle cel·lular en G2. Facilita l'entrada al nucli del complex de preintegració.
<i>vpu</i>	p16	Present només en el VIH-1. Augmenta l'alliberació dels virions de la cèl·lula infectada. Intervé en la degradació del CD4.
<i>vpx</i>	p15	Proteïna de 113 aminoàcids homòloga a Vpr en el VIH-2. Ajuda al complex de preintegració a entrar al nucli.

Taula 1 Proteïnes estructurals, reguladores i accesorïes del VIH-1 i 2.

2.3 CICLE DE REPLICACIÓ DEL VIH-1

El cicle de replicació del VIH-1, així com el dels lentivirus de primats, es pot dividir, en grans trets, en dues fases: primerenca i tardana. La fase primerenca comença amb la unió del virus a la cèl·lula i continua amb la formació del provirus integrat en el genoma cel·lular. La fase tardana comença, després d'un període de latència més o menys llarg, amb la transcripció de l'ARN viral a partir de l'ADN proviral i acaba amb l'alliberació dels virions de la cèl·lula (Figura 6).

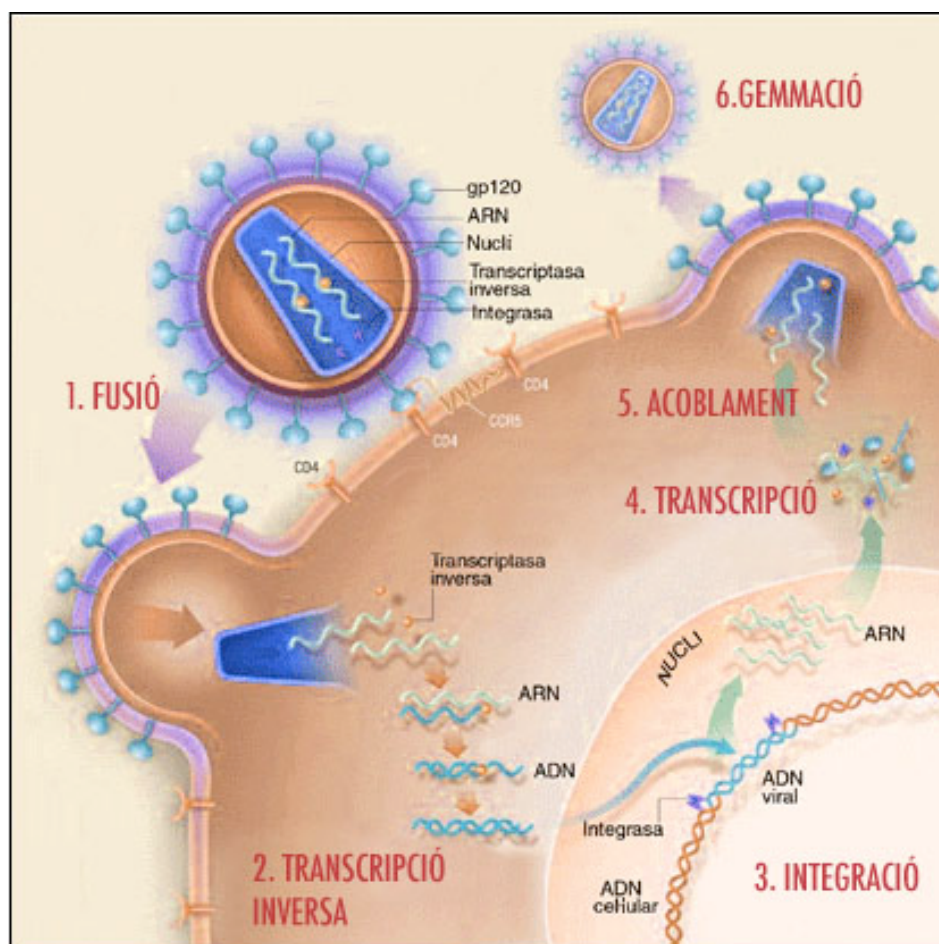


Figura 6 Cicle de replicació del VIH-1 (imatge modificada de <http://www.ggt-vih.org>).

2.3.1 Fase primerenca

L'entrada del virus a la cèl·lula és un procés seqüencial que es produeix mitjançant la interacció amb diferents molècules situades a la membrana plasmàtica cel·lular. Les partícules virals infecten als limfòcits T CD4 mitjançant la unió amb dos tipus de receptors: un receptor específic i comú a totes les variants de VIH, la molècula CD4, i dos coreceptors, CCR5 i CXCR4, que formen part de la família dels receptors de quimiocines. L'ús d'un o altre coreceptor depèn de la seqüència de l'envolta viral, que condiciona la seva capacitat d'unió amb menor o major afinitat a un o altre o ambdós coreceptors. El descobriment dels coreceptors va comportar una nova nomenclatura de les soques de VIH-1 basada en l'ús d'aquests coreceptors. Els virions que utilitzen CCR5 com a coreceptor es denominen soques R5 i els que empen el coreceptor CXCR4 es denominen soques X4. També existeixen virions capaços d'emprar ambdós coreceptors indistintament, CCR5 i CXCR4, als quals se'ls denominen soques duals o R5/X4 ^[19].

La unió del VIH-1 a la cèl·lula ve mediada per la interacció de la subunitat superficial de la proteïna de l'envolta viral (gp120) i l'antigen CD4 cel·lular ^[20, 21]. La unió de gp120 amb CD4 causa un canvi conformacional a gp120 ^[22-24] que li permet la interacció amb els coreceptors virals (CCR5 i/o CXCR4).

Després de la interacció gp120/coreceptor es produeix un canvi conformacional en gp41 (subunitat transmembrana de la proteïna de l'envolta viral), concretament en un pèptid de fusió que presenta en el seu extrem amino-terminal, provocant la unió i fusió de la membrana del virió amb la membrana cel·lular ^[25].

Després de produir-se la fusió de les membranes del virus i la cèl·lula, la nucleocàpsida viral és lliberada al citoplasma cel·lular on té lloc la síntesi de l'ADN viral per part de la RT. En primer lloc es sintetitza una cadena d'ADN a partir de l'ARN viral (activitat RDDP, de l'anglès *RNA-dependent DNA polymerase*), formant-se un híbrid ADN/ARN. Posteriorment l'ARN és degradat per la RNasa H i la RT sintetitza la cadena d'ADN complementària a la cadena anterior (activitat DDDP de l'anglès *DNA-dependent DNA polymerase*) [26, 27].

Un cop sintetitzada, la doble cadena d'ADN viral s'acobla a una sèrie de factors cel·lulars i virals formant el complex de pre-integració, que es transloca al nucli cel·lular, on es produeix l'integració de l'ADN viral amb el genoma de la cèl·lula hoste. Aquest procés és catalitzat per la integrasa viral (IN) [16, 28, 29]. L'integració en el genoma cel·lular no és totalment aleatòria, sinó que l'ADN viral s'insereix preferentment dins o a prop dels elements L1 o Alu [30].

Des d'aquesta situació el virus pot evolucionar de dues maneres: romandre a un nivell molt baix de replicació o bé experimentar una replicació massiva. La iniciació de la transcripció depèn de factors cel·lulars, on destaca el paper de la família de factors de transcripció Rel/NF- κ B [31]. Aquests factors no es troben actius en els limfòcits T CD4 en repòs, i s'indueixen únicament en el curs dels processos d'activació immunològica. D'aquesta manera, la replicació del VIH-1 depèn absolutament de l'activació dels limfòcits infectats [32]. La població latent donarà lloc a un reservori de la infecció en els limfòcits T CD4, sent inaccessible a la resposta immunitària al no expressar productes virals en la seva membrana.

2.3.2 Fase tardana

Després del període de latència, la síntesi de l'ARN viral es produeix a partir de l'ADN proviral en el nucli cel·lular. Posteriorment, aquest ARN viral és transportat al citoplasma, on té lloc l'expressió dels gens virals.

L'expressió té lloc en dues fases: en una fase primerenca es produeix la síntesi de les proteïnes reguladores, que no s'inclouran dins els virions (Tat i Rev) i en una fase tardana es sintetitzen les proteïnes estructurals i enzimàtiques que s'incorporaran als virions (Gag, Pol i Env) així com les proteïnes accessòries (Vif, Vpu i Nef).

La transcripció de l'ARN viral està regulada per mecanismes complexos, tant virals com cel·lulars, que influiran tant en la latència clínica com en la patogenicitat del virus.

L'expressió de la proteïna viral Tat augmenta la taxa de transcripció del genoma del VIH-1, i en cooperació amb altres factors cel·lulars, permet l'elongació completa de l'ARN missatger (ARNm). L'ARNm del VIH-1 es sintetitza en forma d'un únic transcrit que ha de ser transportat al citosol i processat en ARN de diferents grandàries. A més, aquest mateix ARNm serà l'ARN viral genòmic present en la progènie de nous virus^[33]. Ambdues etapes, tant el processament com el transport, són realitzades fonamentalment per la proteïna viral Rev.

Després de la seva síntesi, les proteïnes virals han de ser processades abans d'acoblar-se per poder formar partícules virals madures. En aquest procés hi participen proteases cel·lulars i la proteasa viral (PR). La proteïna viral Nef realitza diverses funcions, entre les que destaca la seva contribució a la patogenicitat del virus mitjançant la regulació negativa de l'expressió d'antigen CD4 i antigens d'histocompatibilitat de classe I i II, el que representa un mecanisme de protecció contra l'atac citotòxic mediat per les cèl·lules T CD8 i evita el reconeixement pels limfòcits T CD4.

Altres proteïnes importants durant les fases finals de la infecció són Vif i Vpu. Vpu augmenta l'alliberació de virions i Vif interacciona i neutralitza l'acció antiviral d'una proteïna cel·lular anomenada APOBEC3G, que forma part de la família dels enzims d'edició de l'ADN. En absència de Vif, APOBEC3G s'incorpora al virió i interfereix en el procés de retrotranscripció en la següent cèl·lula infectada al provocar mutacions en l'ADN sintetitzat per la RT, fet que origina virus no viables i frena el procés de propagació del VIH-1^[34].

En l'última fase, es produeix una associació dels precursors de Gag i Pol amb l'ARN viral genòmic i amb la membrana plasmàtica cel·lular, on aquest complex ribonucleoproteic es recobreix per la bicapa lipídica. Posteriorment es produeix l'acoblament i la lliberació de les noves partícules virals i després de desprendre's de cèl·lula, té lloc l'escissió dels precursors i dels enzims mitjançant la PR viral^[35].

2.4 VARIABILITAT GENÈTICA DEL VIH-1

La variació genètica és una característica inherent a tots els virus d'ARN i el cas del VIH-1 no és una excepció. La gran heterogeneïtat del VIH-1 ve determinada principalment per varis factors virals (elevat tamany poblacional, elevada taxa de mutació, dinàmica de la replicació viral molt activa i processos de recombinació) i per factors cel·lulars intrínsecs (Taula 2).

El conjunt d'aquests fenòmens comporta una acumulació de multitud de petits canvis en el genoma i la formació d'una estructura poblacional en quasiespècies. Les quasiespècies es poden definir com distribucions complexes de genomes diferents però genèticament relacionats entre si [36-38]. Sota aquest punt de vista, una quasiespècie vírica es pot entendre com un eixam de variants que poden trobar-se en l'hoste, i a partir d'aquest *pool* es generen diferències en el genotip i en el fenotip (Figura 7).

Producció diària de virus	~ 10 ⁹ -10 ¹⁰
Producció de virus per cèl·lula infectada	~ 10 ² virus/cèl·lula
Cicles de replicació diaris	~ 10 ⁷ cicles
Taxa d'error de la RT	~ 2.5x10 ⁻⁵ /lloc/generació
Genoma del VIH	~ 10 ⁴ nucleòtids
Probabilitat d'obtenir una mutació puntual específica en un codó (cada nucleòtid pot mutar a qualsevol dels altres tres nucleòtids)	0.33x10 ⁻⁵ /cicle replicació
Producció diària de virus amb una determinada mutació	~ 3300 virus
Producció de mutacions per genoma en un cicle de replicació	~ 0.1-1 mutacions/genoma/cicle

Taula 2 Dinàmica viral i generació de mutacions [39, 40]

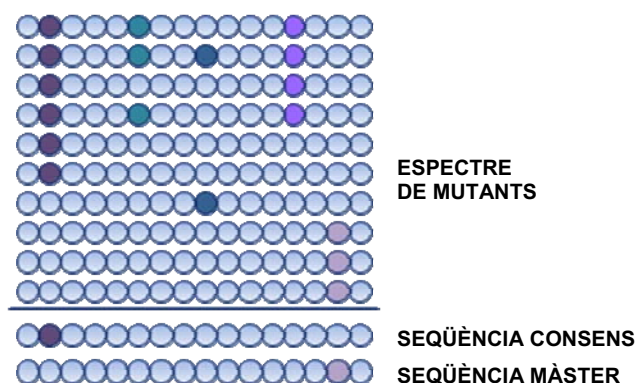


Figura 7 Representació esquemàtica del concepte de quasispècie.

En un pacient infectat per VIH-1, el *pool* genètic de la població viral consisteix, en un moment donat, en una seqüència màster (o predominant) que coexisteix amb una gran varietat de seqüències no predominants que difereixen de la majoria en unes poques mutacions puntuals o delecions. Canvis en l'ambient poden desplaçar la seqüència predominant seleccionant una seqüència que fins al moment havia sigut minoritària, convertint-la en majoritària.

La pressió de selecció (per exemple els fàrmacs antiretrovirals o el sistema immunitari) actua sobre la complexa estructura poblacional del VIH-1 i no sobre genomes individuals. Aquestes pressions afavoreixen una ràpida adaptació del virus als canvis de medi com a conseqüència de la preexistència, entre l'espectre de quasispècies, de variants fenotípiques potencialment útils per fer front a aquests canvis. Com a conseqüència, es poden seleccionar mutants resistents als fàrmacs antivirals, mutants d'escapament a la immunitat antígen-específica i produir-se alteracions en el tropisme viral i en la virulència o patogenicitat.

2.4.1 Tamany poblacional

Un cop el VIH-1 estableix una infecció productiva és capaç de mantenir una alta taxa de replicació. L'elevada replicació dona lloc a una producció diària al voltant de 10^9 - 10^{10} partícules virals en pacients infectats [39]. Aquest gran tamany poblacional facilita l'augment de la variabilitat unit a la resta de factors.

2.4.2 Taxa de mutació

La RT és un enzim multifuncional, posseeix activitat DNA polimerasa dependent d'ARN o ADN, activitat endonucleasa H i és responsable de la replicació del genoma del VIH-1. L'elevada taxa de mutació de la RT ($\sim 2.5 \times 10^{-5}$ parells de bases per cicle de replicació) tal com passa amb altres virus ARN (per exemple, Polio 1.3×10^{-5} , Virus de l'Estomatitis Vesicular 2.5×10^{-5}) [40], és conseqüència de la falta d'activitat exonucleasa 3'-5' de la RT. L'absència de l'activitat correctora incrementa la probabilitat de la incorporació errònia de nucleòtids quan es compara amb les ADN polimerases cel·lulars, que disposen de mecanismes de correcció i reparació.

2.4.3 Taxa de generació

La dinàmica poblacional del VIH-1 i el seu ritme de recanvi s'ha estimat en diferents estudis *in vivo* [41-43]. Segons aquests càlculs, la vida mitja d'un limfòcit activat és de 2 dies, i la d'un virió en plasma d'unes 6 hores, donant com a resultat que aproximadament de forma diària la població viral plasmàtica es renova quasi en la seva totalitat.

2.4.4 Recombinació genòmica

Els retrovirus són ben coneguts per experimentar delecions o insercions de nucleòtids, així com altres reorganitzacions genètiques més complexes durant el procés de retrotranscripció. El VIH-1 és diploide; cada virió conté 2 cadenes genòmiques d'ARN. Si una cèl·lula és infectada per 2 soques diferents de VIH, el virió resultant pot empaquetar un ARN genòmic de cada soca parental, convertint-se en una partícula viral heterozigota ^[44, 45].

La recombinació pot ocórrer quan aquest virió heterozigot infecti a la següent cèl·lula, ja que la RT viral pot saltar d'una cadena a una altra mentre realitza la retrotranscripció, creant un mosaic dels virus parentals en el trànscrip produït ^[46-48]. Aquestes infeccions duals, que poden donar lloc a recombinació genòmica, ocorren quan un individu és infectat amb soques derivades de 2 individus distints, el que pot produir-se de 2 maneres ^[49, 50]. 1) Coinfecció: és la infecció amb 2 soques simultàniament o en un període curt de temps abans que la primera soca s'hagi establert i la resposta immune s'hagi desenvolupat. Arbitràriament, la coinfecció pot donar-se en el primer mes d'infecció. 2) Superinfecció (Reinfecció): es defineix com una infecció amb una segona soca després de la infecció inicial, quan la resposta immune contra aquesta ja ha estat establerta. Alguns autors prefereixen utilitzar el terme reinfecció ja que superinfecció sembla implicar una segona infecció més forta, que no tindria perquè ser així, i altres autors descarten el terme reinfecció atès que sembla que impliqui que el primer virus s'ha aclarit abans de la segona infecció, el que no seria el cas. De tota manera s'utilitzen ambdós termes per al mateix fenomen ^[51].

La capacitat recombinogènica del VIH-1 és d'un ordre de magnitud major que la d'altres retrovirus, incloent el virus de la leucèmia murina (MLV) i el virus limfotrópic humà tipus 1 (HTLV-1) ^[45]. Aquest mecanisme, complementari a tots els altres, permet un increment més ràpid de la diversitat viral que l'acumulació de mutacions a causa de errors en la replicació ^[52, 53]. La freqüència de recombinació del VIH-1 varia entre 9 a 29 events de recombinació per cicle de replicació depenent diferents factors ^[48, 54, 55].

Les FRCs i les FRUs són la prova "vivent" de les infeccions duals, ja que són virus híbrids intersubtipus i només poden produir-se per processos de recombinació genètica ^[10].

2.4.5 Hipermutagènesi

Varis estudis han descrit la presència de factors cel·lulars que actuen com a inhibidors endògens del VIH-1, un d'ells és l'APOBEC3G. Aquest enzim, membre de la superfamília de les citidina deaminases cel·lulars, és el causant dels fenòmens d'hipermutagènesi (G→A) característiques dels lentivirus de primats ^[56-58]. L'acció de l'APOBEC3G té com a conseqüència l'hipermutagènesi letal de l'ARN viral inhibint la replicació per modificació directa del genoma viral o fixant la presència de noves mutacions (G→A). La proteïna viral Vif contrarresta l'acció de l'APOBEC3G interaccionant i evitant la seva incorporació als virions i, amb això, l'activació dels mecanismes de defensa intrínseca mediat per la deaminació de l'ADN.

2.4.6 Distribució de la variabilitat en el genoma

La variabilitat viral no es manifesta homogèniament al llarg de tot el genoma del VIH-1; segons les diferents pressions a les quals pot ser sotmès un determinat gen, ja sigui per les funcions que ocupa durant la infecció o per la seva exposició al medi, aquest presentarà un major o menor grau de variabilitat.

Ja des dels inicis de la infecció per VIH-1, l'extraordinària variabilitat del virus va prendre molt interès entre els investigadors. De fet, es va calcular que la taxa de mutacions sinònimes (que no produeixen canvi d'aminoàcid) del genoma del VIH-1 era de 10×10^{-3} substitucions nucleotídiques/lloc/any, mentre que la taxa de substitucions no sinònimes (que produeixen canvi d'aminoàcid) era de 4×10^{-3} substitucions nucleotídiques/lloc/any. Aquestes taxes suposen una variabilitat de més d'un milió de vegades superior a la variabilitat dels genomes d'ADN. Aquesta variabilitat, però, no és homogènia al llarg de tot el genoma (Taula 3) sinó que és més baixa en les regions que codifiquen per les proteïnes de la càpsida i la retrotranscriptasa, i és extremadament alta a les regions hipervariables del gen de l'envolta viral, suggerint un canvi extremadament ràpid de l'antigenicitat vírica ^[59, 60].

Regió Codificant	Taxa de Substitucions Sinònimes ($\times 10^{-3}$)	Taxa de Substitucions No Sinònimes ($\times 10^{-3}$)
<i>gag</i>	9.7 (6.5-13.1)	1.7 (1.1-2.3)
<i>pol</i>	11.0 (7.4-11.8)	1.6 (1.1-2.1)
<i>env</i>	9.2 (6.2-12.4)	5.1 (3.5-6.9)
gp120 V	17.2 (11.6-23.2)	14.0 (9.4-18.8)
gp120 C	8.1 (5.5-10.9)	3.3 (2.2-4.4)
gp41	9.8 (6.6-13.2)	5.1 (3.5-5.9)

Taula 3 Taxes de substitució nucleotídica per lloc per any. V=regions hipervariables, C= regions constants [60].

El gen del VIH-1 que presenta major diversitat és el gen de l'envolta viral (*env*) a causa de la seva exposició al sistema immunològic ^[61]. De fet, s'ha observat que la variabilitat del gen de l'envolta viral és tal que els virus que pertanyen al mateix subtipus poden diferir en més del 20% en les seves proteïnes de l'envolta, i que les distàncies entre els virus de diferents subtipus poden arribar al 35% ^[62]. Aquest gen codifica per les subunitats gp120 i gp41, que conformen la proteïna de l'envolta viral. La regió codificant de gp120 i té definides 5 regions conservades (C1-C5) i 5 regions hipervariables (V1-V5). Tot i que en un principi les zones que separen les regions variables es varen definir com altament conservades, s'ha comprovat que el grau de variació en les regions constants C2 i C3 és major que l'observat en la pròpia regió V3 ^[63]. Això vol dir que no només es produeixen variants amb mutacions en les zones variables, sinó que, encara que la variabilitat afecta a tot el gen per igual, les variants que tinguin mutacions en zones on s'afecti dràsticament la funcionalitat del gen no seran viables i per tant no podran establir-se com a població en la quasiespècie. La variabilitat està present en tot el genoma però es manifestarà en major o menor grau segons les pressions a les quals estigui sotmesa.

Aquesta variabilitat genètica del VIH-1 té conseqüències en les propietats biològiques del virus, ja que, pot produir el canvi de tropisme viral o l'escapament del virus a la resposta immune específica tant cel·lular com humoral. D'aquesta manera, la variabilitat del VIH-1 és un factor clau en la progressió de la infecció, tema que es detalla a l'apartat 3.4, donada aquesta relevància.

3. INFECCIÓ PER VIH-1 *IN VIVO*

3.1 TRANSMISSIÓ DEL VIH-1

El VIH-1 pot entrar a l'organisme humà per qualsevol de les tres vies principals de transmissió que es coneixen: sexual, vertical i parenteral:

La transmissió sexual constitueix la principal forma de contagi, tant per relacions homosexuals (majoritària a EEUU i Europa) com relacions heterosexuales (via principal de transmissió a l'Àfrica). El risc de transmissió del VIH en una relació sexual amb una parella infectada es situa entre el 0.08% i el 3.2% en relacions homosexuals anals, i en relacions heterosexuales entre 0.05%-0.15% (si l'home és el transmissor) i entre 0.03-0.09% (si la dona és la transmissora) tot i que aquestes dades varien funció del tipus de pràctica sexual, si hi ha altres malalties de transmissió sexual, la càrrega viral, etc ^[64, 65].

La transmissió vertical (mare a fill) és la causant de més del 90% dels casos de nens infectats en el món, i es dona principalment a l'Àfrica, tot i que hi ha casos arreu del món. En absència de tractament o profilaxi materna amb antiretrovirals i/o cesària d'elecció, el risc de transmissió vertical és del 14-25%, i es dona principalment en el part, tot i que també pot donar-se al final de la gestació o bé durant la lactància ^[66].

Actualment, el principal mecanisme de la transmissió parenteral és deguda a la drogoaddicció per aquesta via, quedant relegades (en el món desenvolupat) les antigues formes de transmissió per transfusions sanguínies, hemoderivats o trasplantaments, degut al cribatge d'aquests elements. Cal destacar en la transmissió de la infecció per una punxada amb una xeringa

amb sang contaminada que la supervivència del virus pot ser llarga (1-48 dies), estant en relació amb la càrrega viral, el volum de sang i la temperatura ^[67].

3.2 HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PER VIH-1

El VIH-1 és l'agent causal d'una malaltia de curs més o menys llarg amb una destrucció, pràcticament completa, dels limfòcits T CD4. L'aplicació de mètodes sensibles, capaços de quantificar la replicació del virus, ha permès conèixer de manera més precisa l'evolució d'aquesta malaltia i ha demostrat l'existència, en totes les fases de la infecció, una replicació viral molt activa. La progressió de la infecció per VIH-1 *in vivo* consta de tres etapes ^[68] relativament ben definides, tot i que no sempre identificables clínicament, i amb una duració variable que depèn de diferents factors relacionats tant amb el virus com amb l'hoste (Figures 8 i 9).

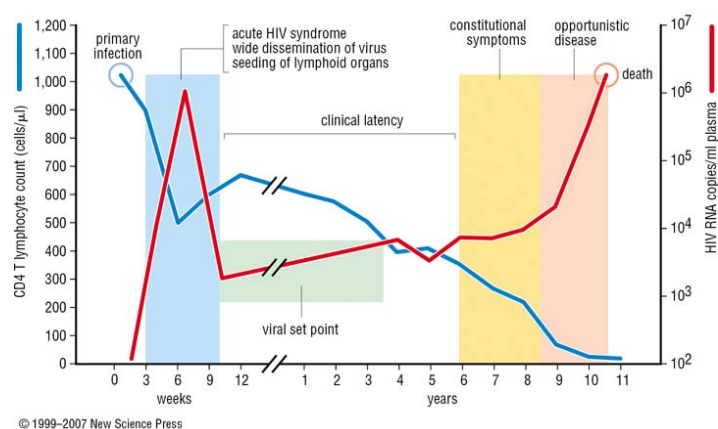


Figura 8 Evolució de càrrega viral (vermell) i dels limfòcits T CD4 (blau) en les diferents fases de la infecció per VIH-1 (imatge extreta del web <http://new-science-press.com>)

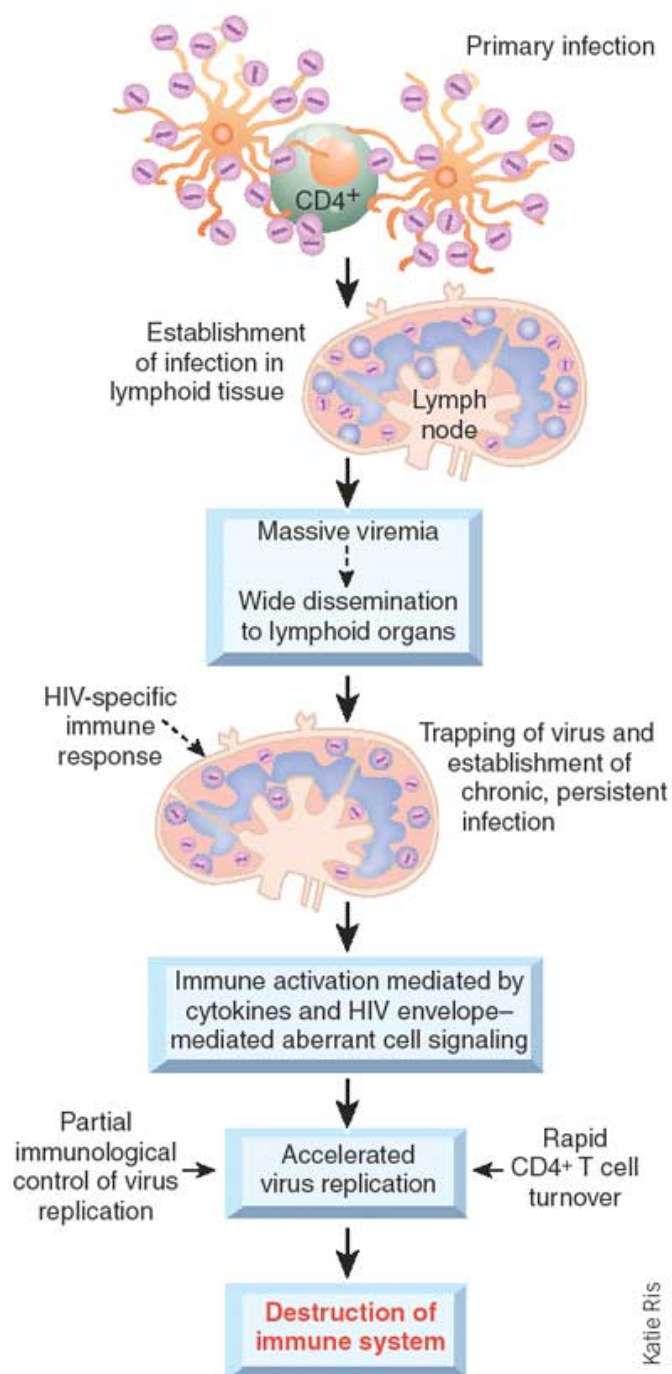


Figura 9 El VIH s'uneix a les cèl·lules dendrítiques que porten el virus a les cèl·lules T CD4 del teixit limfoide, establint-se la infecció. L'activació cel·lular accelera la replicació del virus i provoca una virèmia massiva i una àmplia difusió de la infecció a través dels teixits limfàtics. Una resposta immunitària contra el virus causa una certa protecció, però s'estableix una infecció crònica persistent. La producció de citocines i les divisions cel·lulars que regulen la resposta immune protectora també afavoreixen la replicació del VIH-1. Hi ha un ritme accelerat de recanvi de les cèl·lules T CD4 que, en última instància, condueix a la seva destrucció i a un canvi en els teixit limfoide que impedeix les respostes immunes [69].

3.2.1 Fase aguda

La fase aguda (o primoinfecció) es caracteritza per una virèmia plasmàtica elevada i una disminució brusca dels limfòcits T CD4 de sang perifèrica ^[70, 71], l'establiment d'un reservori de cèl·lules infectades ^[72, 73], la desaparició d'aproximadament un 90% de les cèl·lules CD4 memòria del teixit limfàtic associat a mucoses ^[74] i el desenvolupament d'una resposta immune específica anti-VIH, que causa una certa protecció, no obstant no evita que s'estableixi una infecció crònica persistent ^[75, 76]. Durant aquesta fase l'individu infectat roman asimptomàtic, a excepció d'alguns casos en els que s'observa una síndrome clínica aguda, amb una durada mitjana d'una a dues setmanes, caracteritzada per febre, letàrgia, astènia o faringitis, entre altres ^[77].

3.2.2 Fase crònica

La fase crònica és la fase asimptomàtica de la infecció, i té una durada variable en funció dels factors del virus, de l'hoste infectat i de l'ambient. Aquesta fase es perllonga varis anys, durant els quals la replicació viral persisteix, assolint un equilibri dinàmic. Per tant, tot i considerar-se una fase de latència, no existeix un verdader estat de latència virològica. La replicació viral es produeix en els òrgans limfoides, on la càrrega viral és entre 10 i 100.000 vegades superior a la present en el plasma sanguini ^[78]. Durant aquesta fase hi ha una latència clínica, ja que els pacients normalment romanen asimptomàtics. En adults, el 50% progressa cap a estadis més avançats als 7-10 anys d'haver-se produït la infecció.

3.2.3 Fase final o sida

En aquesta fase es produeix un increment de l'activitat replicativa del virus, igualant-se la càrrega viral circulant i la dels òrgans limfoides, i generant-se una depleció de limfòcits T CD4 circulants en sang perifèrica fins a un nivell inferior a 200 cèl·lules/ μ L. Clínicament apareix una greu alteració de l'estat general del pacient, amb el desenvolupament d'infeccions oportunistes, trastorns neurològics i tumors associats a la sida ^[79].

Existeix una gran variació en el curs de la infecció per VIH-1 entre els individus infectats: Els progressors típics (80%) són aquells individus que romanen asimptomàtics durant 8-10 anys i després d'aquest període de latència desenvolupen sida. Els progressors ràpids (10%) són els individus infectats que desenvolupen sida entre 2 i 5 anys després de la primoinfecció. Un petit percentatge (5-10%) dels individus infectats es denominen *long-term non-progressors* (LTNP) o actualment, controladors; són individus que presenten nivells estables de CD4, càrregues virals baixes i que romanen asimptomàtics sense tractament antiretroviral durant al menys 10 anys, tot i que eventualment poden progressar cap a sida. I per últim, els controladors d'èlit (o *elite controllers*, EC), que suposen menys d'un 1% del tots pacients no tractats, són capaços de mantenir la replicació viral per sota de les 50 còpies/mL i presenten unes taxes molt baixes tant en el descens de CD4 i com en la progressió de la malaltia ^[80].

Els estudis realitzats en aquests grups de pacients han permès determinar alguns dels factors, tant virals com de l'hoste, que influeixen en la patogenicitat i la progressió de la infecció, així com la resistència d'alguns individus a la infecció. S'ha descrit que un petit percentatge de EC estan

infectats amb virus defectius ^[80], així com també s'han identificat alguns factors genètics propis de l'hoste protectors front la virèmia i la progressió de la malaltia, com el HLA-B*5701 o la delecció CCR5Δ32 en heterozigosi ^[81].

3.3 MARCADORS DE LA PROGRESSIÓ DE L'INFECCIÓ PER VIH-1

Actualment existeixen, principalment, dos marcadors de la infecció per VIH-1, la càrrega viral (CV, còpies d'ARN del VIH per mil·lilitre de plasma) i els CD4 (nombre de limfòcits T CD4 per mil·límetre cúbic de sang). Tot i que en un principi s'utilitzaren alguns marcadors biològics per determinar el grau de progressió de la infecció en un pacient, com l'antigen p24 (que es detecta per ELISA), aquests han estat desplaçats per tècniques de PCR amb major sensibilitat, com la CV plasmàtica. Cal destacar, també, la càrrega proviral, que detecta l'ADN integrat a partir de limfòcits de sang perifèrica del pacient, mitjançant PCR, i que és un marcador imprescindible per diagnosticar el període finestra (període on hi ha absència de positivitat en els altres marcadors).

El nivell de virèmia plasmàtica (o càrrega viral, CV) és el millor marcador descrit fins al moment, per predir la progressió a sida i la supervivència. El recompte de limfòcits T CD4 té menor valor predictiu, probablement perquè els canvis es produeixen amb demora respecte a la CV. Les virèmies plasmàtiques <3.000 còpies/mL indiquen un bon pronòstic, entre 3.000-10.000 còpies/mL prediuen una evolució típica i >10.000 còpies/mL pronostiquen una ràpida progressió de la malaltia. No obstant, s'ha de destacar que no existeix un llindar inferior per sota del qual no hi hagi progressió ^[82].

3.4 COM AFECTA LA PROGRESSIÓ DE LA INFECCIÓ A LA VARIABILITAT VIRAL DEL VIH-1?

3.4.1 Complexitat viral

El grau d'heterogeneïtat de la població vírica present en un individu infectat varia al llarg de la malaltia. Aquesta variació està relacionada amb els nivells de virus en sang, la resposta immunològica de l'hoste i la duració de la malaltia.

Durant la fase aguda s'ha descrit una homogeneïtzació de les poblacions virals, principalment en l'envolta viral ^[83-88]. Aquesta homogeneïtat viral és deguda a que la transmissió constituiria un coll d'ampolla poblacional ja sigui perquè la infecció s'iniciï a partir d'un petit inòcul de virus i/o degut a les pressions selectives que tenen lloc durant l'establiment de la infecció.

La fase crònica es caracteritza per una contínua evolució de les poblacions víriques, reflex de la replicació constant del virus en l'individu infectat. Tenint en compte el número de cèl·lules que són infectades *de novo* cada dia i la taxa d'error associada a la RT del VIH-1 (Taula 2), en un únic dia és factible que una població vírica contingui totes les possibles mutacions puntuals, inclús l'1% de totes les possibles dobles mutacions ^[89, 90], el que demostra la gran heterogeneïtat en aquesta fase. La fase crònica de la infecció representa un equilibri entre la replicació del virus i la resposta del sistema immunològic de l'hoste. Independentment de les causes i de la velocitat a la que aquest equilibri desapareixi, la fase final o simptomàtica de la infecció es caracteritza per una nova homogeneïtzació de la població vírica ^[91- 94], probablement reflex de la replicació massiva d'una variant amb major eficàcia biològica (millor adaptada al medi) i del col·lapse del sistema immunològic.

Aquest patró d'evolució viral, però, pot variar en funció de la progressió que presenti l'individu infectat. En els pacients progressors ràpids es produeix un descens en el nombre de cèl·lules T CD4 per sota de 200 cèl·lules/ μ L ràpidament, el que va acompanyat d'elevats nivells d'ARN viral que no disminueixen substancialment després de la infecció primària. En aquests individus s'ha observat un elevat grau d'homogeneïtat de les quasiespècies víriques presents en al llarg del temps ^[95]. Aquesta poca variabilitat probablement és deguda a una resposta immunològica pobre per part de l'hoste.

En pacients controladors, en canvi, el nombre de cèl·lules T CD4 es manté a nivells normals inclús després de molts anys d'infecció, presentant normalment un nivell baix d'ARN víric en plasma i soques víriques menys patogèniques (virus R5). En aquests pacients s'ha observat una major heterogeneïtat en les quasiespècies víriques, reflexant, en conjunt, una resposta immunològica molt activa per part de l'hoste ^[96].

Així, doncs, les dades obtingudes a partir d'estudis longitudinals en pacients infectats amb diferents patrons de progressió indiquen que, en la majoria dels casos, una major heterogeneïtat en les quasiespècies reflexa una major duració del període asimptomàtic de la malaltia ^[91-101], no obstant, la complexitat dels factors selectius, fa que a més a més l'evolució vírica sigui altament impredecible en cada pacient infectat.

3.4.2 Tropisme viral

La variació genètica del VIH-1 té conseqüències en les propietats biològiques dels virions. Una de les conseqüències més importants és la seva capacitat d'infectar diferents tipus cel·lulars (tropisme).

Juntament amb CD4, les molècules de CCR5 i CXCR4 són els coreceptors principals utilitzats pel VIH-1 per entrar a les cel·lules ^[102, 103]. CCR5 i CXCR4 són els receptors naturals de les quimiocines MIP1 α , MIP1 β i RANTES i de SDF-1, respectivament ^[104, 105]. També s'han descrit altres coreceptors emprats per alguns aïllats de VIH-1 com CCR2b, CCR3, CCR8, CXCR1, CXCR2, CXCR5, CXCR6, CXCR7/RDC1, CX3CR1, D6, APJ, GPR1, CCR9B, CCR10 i XCR1 ^[106-117]. No obstant, actualment, encara no s'ha aclarit el paper d'aquests coreceptors en la infecció *in vivo* per VIH-1.

Certes mutacions, particularment al *loop* V3 de l'envolta viral ^[118-124] estan altament associades amb l'ús de CXCR4 i la formació de sincitis. S'ha descrit que la presència d'aminoàcids bàsics a les posicions 11 i 25 del *loop* V3 distingeixen molt freqüentment els virus X4 dels R5 ^[121, 122, 125-128] i en alguns casos també hi ha implicades les posicions 24 i 27 d'aquesta regió ^[129, 130].

Els virus R5 (que empen CCR5) predominen en les primeres fases de la malaltia ^[85, 131, 132]. Els virus X4 (que utilitzen CXCR4), per contra, tendeixen a aparèixer en fases més avançades, són més patogènics i estan associats amb un ràpid descens del nombre de cèl·lules T CD4, amb una acceleració de la progressió de la malaltia i amb una supervivència reduïda en pacients sense tractament ^[133-135]. Tot i que els individus infectats per VIH-1 poden progressar a

sida en absència de variants X4, la progressió de la malaltia s'ha associat, generalment, amb l'aparició de virus X4 o R5/X4 ^[136].

El receptor CD4 i els coreceptors CCR5 i CXCR4 s'expressen en els limfòcits T CD4, cèl·lules presentadores d'antigen (CD), monòcits, i macròfags, el que és consistent amb la transmissió i la progressió de la infecció ^[137]. CCR5 es troba molt expressat en cèl·lules T CD4 memòria, que són la principal font de producció viral *in vivo*. El GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), que és molt ric en aquestes cèl·lules, juga un paper crític ja que suposa el primer lloc per la replicació viral i la depleció massiva de limfòcits T CD4 ^[138]. Per contra, CXCR4 s'expressa preferencialment en cèl·lules T CD4 naïve, com els timòcits immadurs ^[139-141].

A part dels coreceptors hi ha altres factors que poden influir en el tropisme viral al llarg de la malaltia. Els elevats nivells de quimiocines, com per exemple SDF-1 (liligand natural de CXCR4), presents a l'intestí, podrien ser un factor supressor de la transmissió de soques X4 ^[142], o també el paper de les cèl·lules dendrítiques en l'amplificació selectiva de les variants R5 en el teixit limfoide ^[143, 144]. Per altra banda, recentment s'ha descrit que el tractament antiretroviral no sembla influir en la selecció de soques X4, que preferentment ocorre en pacients amb limfòcits T CD4 baixos ^[145].

L'expressió diferencial de CCR5 i CXCR4, principalment, així com diferents factors mencionats anteriorment, suposen una pressió selectiva sobre les quasiespècies del VIH-1 presents al llarg de la malaltia. Això suposa la selecció d'entre l'espectre de mutants, de les variants amb el tropisme "adequat" en cada fase de la progressió de la infecció per VIH-1.

3.4.3 Escapament viral

3.4.3.1 Escapament de la resposta cel·lular

Els dos aspectes de la resposta immunològica cel·lular a considerar en la patogènesi viral són la resposta T *helper* i la resposta de les cèl·lules T citotòxiques:

Les cèl·lules T *helper* (Th) són cèl·lules T CD4 específiques del VIH-1, que després de la seva activació secreten citokines (com IL-2) que indueixen la resposta T citotòxica i la resposta humoral. Aquestes cèl·lules són les cèl·lules diana del virus ^[146].

La resposta T citotòxica, per altra banda, és generada pels limfòcits citotòxics T CD8 específics de VIH-1 (CTL, *cytotoxic T-cell lymphocytes*) que maten a les cèl·lules infectades que presenten pèptids virals a la seva superfície. Els CTL reconeixen pèptids virals concrets presentats per MHC de classe I, i de fet, són els responsables del control parcial de la viremia durant la infecció aguda. Els CTL, doncs, exerceixen una pressió immunològica selectiva sobre el virus, però com que aquest presenta una elevada variabilitat, es produeix la selecció de variants d'escapament, és a dir, aquelles variants que presenten mutacions en els epítops que reconeixen els CTL podran evadir la resposta immune generada ^[147]. Les variants virals seleccionades per la influència de la resposta cel·lular normalment presenten una capacitat replicativa (*fitness viral*) inferior. Però, d'altra banda, s'ha descrit que en alguns casos, l'elevada variabilitat viral permet desenvolupar canvis compensatoris (dins o fora l'epítop diana) per restablir, al menys en part, la *fitness viral* ^[148].

3.4.3.2 Escapament de la resposta humoral

Les cèl·lules infectades per VIH-1 també són capaces d'induir la formació d'anticossos (resposta humoral). Els anticossos més efectius són aquells que impedeixen la entrada del virus a la cèl·lula al unir-se a les proteïnes de l'envolta viral, anomenats anticossos neutralitzants. Els principals epítops de neutralització es localitzen en la subunitat gp120 de la proteïna de l'envolta del virus, concretament en la regió variable V3 i en els dominis d'unió a CD4 i als coreceptors ^[149-152].

El dominis d'unió als coreceptors (CCR5 i CXCR4) són zones relativament conservades però resulten inaccessibles per als anticossos neutralitzants. L'estructura de l'envolta viral en la seva forma nativa oculta els dominis d'interacció amb els coreceptors virals.

Aquest emmascarament es deu a un doble mecanisme: per una banda, l'envolta viral de la superfície del virió és una estructura trimèrica i la seva pròpia disposició oculta els dominis conservats; d'altra banda, els dominis d'interacció amb els coreceptors cel·lulars només s'exposen quan es produeix la unió amb CD4. A més, les zones de la proteïna més exposades corresponen a epítops que poden ser modificats sense que s'alterin significativament les propietats d'unió i interacció amb els coreceptors cel·lulars ^[153]. Aquest doble emmascarament dels epítops de neutralització explica la dificultat d'aquests anticossos per accedir als seus dominis de neutralització, que només serien exposats en l'estret contacte entre la membrana viral i la plasmàtica.

L'estudi d'aquest mecanisme i de l'evolució de l'envolta viral al llarg de l'infecció confirmen que els anticossos neutralitzants sintetitzats pel pacient no tenen un ampli espectre. Mitjançant mutacions en els epítops de reconeixement que es troben en les zones variables de la proteïna, es seleccionen, en poques setmanes, variants d'escapament a la pressió immune humoral.

A aquest mecanisme de variabilitat se li sumen dos altres mecanismes d'escapament: la glicosilació dels aminoàcids dels epítops reconeguts pels anticossos neutralitzants, i la formació d'una estructura denominada "escut glicà", que consisteix en cadenes de sucres que es formen en els residus propers als epítops reconeguts pels anticossos neutralitzants i que els protegeixen de la unió d'aquests ^[152, 154]. De fet, els carbohidrats representen aproximadament la meitat del pes de la gp120 ^[155].

Tots aquests mecanismes demostren que l'envolta del VIH-1 està dotada d'una gran flexibilitat i variabilitat estructural i, per tant, d'una extraordinària capacitat d'escapament.

4. TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL CONTRA EL VIH-1.

L'espectre de drogues antiretrovirals descobertes per al VIH-1 es centren en dianes vulnerables del cicle de replicació del virus. En la primera teràpia antiretroviral es va emprar l'inhibidor de la retrotranscriptasa zidovudina (AZT), que és un anàleg de nucleòsid, aprovat per la Food and Drug Administration (FDA) l'any 1987 ^[156]. Els anàlegs de nucleòsid de la RT (*nucleoside reverse transcriptase inhibitors*, NRTI), interfereixen en la replicació del VIH-1 inhibint de forma competitiva aquest enzim. No obstant la monoteràpia poseeix una limitada activitat contra el virus ^[157]. Posteriorment, en avançar els coneixements sobre el virus, van aparèixer dianes addicionals a la RT, com la proteasa viral. Els inhibidors de la proteasa (IP) s'uneixen al seu centre actiu inhibint la formació de proteïnes virals madures, provocant que la partícula viral no sigui infecciosa. Més endavant es van introduir els inhibidors no-nucleòsids de la retrotranscriptasa (*non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*, NNRTI). Els NNRTI constitueixen un grup estructuralment divers que s'uneix a una regió distant del centre actiu de la RT inhibint la seva activitat. Posteriorment, van aparèixer els inhibidors de l'entrada del virus amb la cèl·lula hoste, i més tard els inhibidors de la integrasa viral. El desenvolupament de nous fàrmacs continua i es van introduint noves drogues paulatinament (Taula 4).

INHIBIDORS DE LA RETROTRANSCRIPTASA		INHIBIDORS DE LA PROTEASA	INHIBIDORS DE L'ENTRADA	INHIBIDORS DE LA INTEGRASA
<i>Anàlegs de nucleòsid</i>	<i>No nucleòsids</i>	Amprenavir	Enfurvitida	Raltegravir
Abacavir	Delavirdina	Fosamprenavir	Maraviroc	
Didanosina	Efavirenz	Tipranavir		
Estavudina	Etravirina	Indinavir		
Emtricitabina	Nevirapina	Lopinavir		
Lamivudina		Nelfinavir		
Zalcitabina		Ritonavir		
Zidovudina		Saquinavir		
Tenofovir ^a		Atazanavir		
		Darunavir		

Taula 4 Fàrmacs amb activitat antiretroviral aprovats per la FDA. ^a Inhibidor de la retrotranscriptasa anàleg de nucleòtid.

4.1 TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL DE GRAN ACTIVITAT (TARGA)

Avui en dia el tractament de la infecció per VIH-1 consisteix en la combinació de diferents fàrmacs antiretrovirals en determinades pautes, el que es denomina HAART (*highly active antiretroviral therapy*) o TARGA (tractament antiretroviral de gran activitat). Fou al 1995 quan es van dur a terme els primers assaigs clínics emprant un IP en combinació amb dos NRTI, i posteriorment, amb la introducció dels NNRTI varen ser possibles altres teràpies antiretrovirals triples. La instauració d'aquesta nova estratègia combinada canvia radicalment la història natural de la infecció per VIH-1: per un lloc es recupera el nombre de limfòcits T CD4 i per l'altre s'aconsegueix reduir la càrrega viral per sota les 20-50 còpies/mL en més del 50-80% dels pacients i manté aquest efecte durant períodes superiors a un any, assolint-se, inclús, respostes superiors als quatre anys ^[158].

En contra de les primeres expectatives que es van generar al introduir el tractament antiretroviral, actualment se sap que el TARGA només aporta una recuperació immunològica parcial, on no es recupera la resposta específica contra el VIH-1 ^[159-163]. Una conseqüència directa d'això és que el tractament no aconsegueix una erradicació de la infecció. Per aquest motiu, quan es suspèn el tractament, el virus reapareix en sang perifèrica, i és necessari mantenir el tractament de per vida, amb els conseqüents costos tant a nivell d'efectes secundaris com econòmics ^[164], el que, a la vegada, pot restar eficàcia a llarg termini degut a problemes d'adherència a la medicació. Davant aquesta situació es considera necessari buscar noves estratègies terapèutiques ^[165]. En aquest aspecte, s'està estudiant la possibilitat de combinar el TARGA amb una immunoteràpia capaç de restaurar o potenciar les respostes immunològiques específiques contra el VIH-1 ^[165, 166].

4.2 TERÀPIES IMMUNOMEDIADES

S'han assajat diferents tipus de teràpies immunomediades, que bàsicament intenten actuar per tres mecanismes diferents ^[167]. Per una banda, alguns mètodes intenten aportar aquells components en què l'individu infectat pot ser deficient, com el tractament amb citoquines o les tècniques d'immunoteràpia passiva. Unes altres es basen en les dades que indiquen que existeix una infecció selectiva de les cèl·lules T CD4 activades específiques anti-VIH en individus infectats, i que l'activació contínua del sistema immunològic és un factor de mal pronòstic, i proposen l'utilització d'immunomoduladors. I per altra banda, existeixen aquelles que intenten induir les respostes immunològiques que no acaben de funcionar en la infecció per VIH-1, com les vacunes terapèutiques o les interrupcions estructurades del tractament (STI, de l'anglès *structured treatment interruptions*). Les diferents estratègies utilitzades es resumeixen a la Taula 5.

En els últims anys, les interrupcions estructurades del tractament (STI) i les vacunes terapèutiques anti-VIH-1 han esdevingut propostes encoratjadores com a estratègies antiretrovirals complementàries per induir o millorar la resposta immune cel·lular específica contra el VIH-1. Aquests tipus d'immunoteràpies, en especial les vacunes terapèutiques, podrien ajudar a controlar la replicació del VIH-1 després de la retirada de la teràpia antiretroviral., el que permetria suspendre el TARGA de forma definitiva o, al menys, durant períodes variables de temps.

ESTRATÈGIA	REFERÈNCIA
<i>Immunoteràpia passiva</i>	
Infusió de limfòcits	168
Infusió de plasma	169-172
Infusió d'anticossos monoclonals	173-176
<i>Citoquines</i>	
Interleucina-2	177
Dosi baixa d'Interleucina 2	178
G-CSF	179
GM-CSF	180
IFN- α	181
Interleucina 10	182
Interleucina 12	183
Interleucina 15	184
Interleucina 16	185
Interleucina 7	186
<i>Immunomoduladors</i>	
Hidroxiurea	187, 188
Corticoides	189
Ciclosporina A	190
Àcid micofenòlic	191, 192
Talidomida	193
<i>STI</i>	
Primoinfecció	194
Infecció crònica	195, 196
<i>Vacunes terapèutiques</i>	
Virus inactivat complet	197
Canarypox	198
Vacunes d'ADN	199, 200
Vacunes d'adenovirus recombinants	201
Vacunes de cèl·lules dendrítiques	202-206

Taula 5 Estratègies d'immunoteràpia utilitzades en el tractament contra el VIH-1.

4.2.1 Interrupcions estructurades del tractament (STI)

Conegudes com STI (de l'anglès *Structured Therapy Interruption*), varen ser de les primeres estratègies d'interrupció, consistents en diversos cicles amb TARGA i sense TARGA dissenyats per a augmentar la immunitat VIH-específica cel·lular a través del concepte d'"autovacunació": l'augment en l'exposició a un virus autòleg de forma repetida podria estimular les respostes VIH-específiques i millorar el control de l'infecció.

Encara que s'han demostrat augments de les respostes específiques cel·lulars anti-VIH i que el temps de duplicació de la CV augmenta després de les interrupcions ^[196], generalment la CV després de la STI es correlaciona amb la CV pretractament ^[207, 208], i la magnitud de la resposta CD8 específica anti-VIH augmenta fins a una quantitat i qualitat comparables a les que es tenien abans del TARGA, suggerint una restauració de la resposta més que un augment *de novo* ^[207].

Per tot això, en general, les STI han fracassat com a teràpia immunomediada i únicament han permès controls efectius de la replicació viral a curt-mig termini en un 20% dels pacients que les realitzen. S'ha suggerit que la falta d'eficàcia de les STI és deguda a una resposta CD4 anti-VIH feble i transitòria ^[208]. No obstant, s'ha descrit una bona resposta immunològica i un manteniment de la virèmia plasmàtica post-STI en pacients que havien estat tractats desde la primoinfecció ^[209].

4.2.1.1 Estratègies d'interrupció

A part de la utilització de les STI com immunoteràpia, des que existeix la disponibilitat del TARGA i amb l'augment dels coneixements dels riscos de progressió de la infecció i la impossibilitat de l'erradicació del reservori del VIH, s'han elaborat diferents estratègies de suspensió programada del TARGA amb la intenció de reduir el temps acumulat de tractament per disminuir les seves repercussions^[210, 211] en diferents àmbits: efectes secundaris, costos econòmics o molèsties per al pacient.

Les metodologies de suspensió del tractament i els contextos en els quals s'han utilitzat són diversos. En pacients multitractats i en fracàs terapèutic amb virus multiresistents es va plantejar la hipòtesi que una suspensió del TARGA provocaria la reaparició del virus salvatge per tenir aquest una major capacitat replicativa o *fitness* viral, desplaçant a les quasiespècies multiresistents. En aquest moment i davant un virus salvatge, la reintroducció del TARGA podria tornar a ser efectiva i millorar el control de la replicació viral i la resposta immune. No obstant, s'ha demostrat que aquesta estratègia s'acompanya d'una deterioració immunològica que, al donar-se en pacients amb infecció avançada, augmenta molt el risc d'esdeveniments oportunistes^[212].

Un altre àmbit molt diferent és el de les interrupcions en pacients que han respost de forma satisfactòria al TARGA. En aquest context s'ha introduït el concepte de la interrupció "guiada" o "en polsos", en la qual aquests pacients podrien suspendre el TARGA i reiniciar-lo només quan tinguessin indicació, basant-se en el recompte de limfòcits T CD4 i/o CV segons les guies actuals.

L'any 2000 es va publicar un estudi esperançador de STI guiada per CV, en el que s'aturava el tractament en pacients que havien sigut tractats des de la primoinfecció, Els resultats indicaren que tots els pacients, a pesar del rebrot de virèmia, van ser capaços de conseguir un estat d'equilibri, al menys transitori, sense TARGA amb una càrrega viral per sota de les 5.000 cp/mL ^[209].

En l'estudi més gran en el qual s'explora la interrupció guiada per recompte limfocitari T CD4, el SMART, es randomitzaren un total de 5472 pacients amb TARGA i més de 350 limfòcits T CD4/ μ L a seguir amb el mateix tractament de forma convencional o a seguir una estratègia conservadora de fàrmacs guiada pel recompte de limfòcits T CD4, en la qual el TARGA es suspenia fins que els CD4 caiguessin per sota de 250 cèl·lules/ μ L, moment en el qual es reiniciava el TARGA fins que el recompte tornés a ser superior a 350 cèl·lules/ μ L, tornant llavors a suspendre's. El reclutament en l'estudi va haver d'aturar-se a l'observar que la branca conservadora de fàrmacs guiada per limfòcits T CD4 tenia un major risc de progressió de la malaltia o mort i esdeveniments greus associats a sida ^[213]. Es van observar resultats similars en un altre estudi amb menor nombre de pacients a l'Àfrica sub-sahariana, el Trivacan ^[214], amb idèntics valors de recompte limfocitari T CD4 per a l'inici i la suspensió de tractament. Un altre estudi en el que el nivell de limfòcits T CD4 necessari per a reiniciar el TARGA va ser superior (350 CD4/ μ L) va mostrar també majors manifestacions relacionades amb la infecció pel VIH però de tipus més lleu ^[215].

Davant aquests resultats, sembla que les estratègies de suspensió de TARGA guiades per limfòcits T CD4 no haurien de mantenir-se fins a nivells tan baixos de limfòcits T CD4 (250 cèl·lules/ μ L) pels riscos que comporta i s'haurien d'explorar estratègies amb dintells superiors.

4.2.1.2 Conseqüència de les interrupcions

Els diferents estudis realitzats han permès conèixer què ocorre després de la interrupció del TARGA des del punt de vista del virus i del pacient i el seu sistema immunitari. Ineludiblement, després de la suspensió del TARGA es produeix una elevació de la CV. Els pacients amb infecció crònica pel VIH-1 i CV indetectables per sota de 50 còpies/mL tenen un temps mig de 10 dies per a obtenir 500 còpies còpies/mL després de la suspensió del TARGA, podent observar CV detectables ja al tercer dia de suspensió ^[161, 216]. Això comporta que les estratègies d'interrupció puguin tenir una sèrie de conseqüències negatives secundàries a aquesta elevació, com són el risc que el TARGA fracassi posteriorment en la ressupressió de la replicació viral, la possibilitat del farciment dels reservoris cel·lulars, o el presentar una síndrome de primoinfecció ^[217].

A més, és molt important el risc de desenvolupament de resistències, ja que al parar el tractament poden coincidir nivells sub-òptims dels fàrmacs amb certa replicació viral. Els estudis fins a la data coincideixen en que el risc més important es dona en aquells pacients que prenen fàrmacs de vida mitja llarga i amb barrera genètica baixa ^[218-223], com poden ser els NNRTI o la lamivudina.

Pel que fa als limfòcits T CD4, tornen a descendir en aturar el tractament. S'ha descrit que aquest nou descens ocorre en dues fases: un descens ràpid inicial, d'un mes segons alguns autors ^[224] i de fins a quatre segons altres ^[225], i una segona fase de descens més lent. S'ha correlacionat la velocitat del descens de forma negativa amb la CV plasmàtica basal ^[224, 226], el recompte de limfòcits T CD4 *nadir* (el menor recompte de limfòcits T CD4 que hagués experimentat el pacient) ^[224, 225] i de forma positiva amb el recompte de limfòcits

T CD4 en el moment de la interrupció ^[224-226], els limfòcits T CD4 guanyats durant el TARGA ^[225, 226] i l'edat ^[226]. Aquest descens condiciona, de forma progressiva i sobretot a partir de nivells baixos, el risc de desenvolupar infeccions oportunistes i esdeveniments associats a sida que poden ser, fins i tot, letals ^[213]. D'aquí la importància que qualsevol interrupció sigui estretament monitoritzada. Existeix a més un risc, ara per ara més teòric que real, que en la pèrdua global de limfòcits T CD4 es perdin clons limfocitaris que s'haguessin retingut o recuperat i que després no es tornessin a recuperar amb el TARGA, el que podria condicionar el sistema immunitari del pacient per a tota la vida.

4.2.2 Vacunes terapèutiques

La vacunació terapèutica s'ha proposat com alternativa a l'ús continuat del TARGA ^[166], ja que la seva finalitat és augmentar les respostes immunitàries específiques del VIH-1 per aconseguir un control virològic en períodes sense TARGA. En general, la capacitat de les vacunes utilitzades per augmentar la resposta CD8 específica anti-VIH-1 ha estat molt limitada, sense un clar impacte en la CV ^[227-231], no obstant, algunes d'elles, en especial les que empren cèl·lules dendrítiques com a adjuvant cel·lular (veure apartat 4.2.5.4), han presentat resultats molt esperançadors.

4.2.2.1 Vacunes de virus complet inactivat

El Remune® és un immunogen del VIH-1, inactivat i deplecionat de la proteïna gp120. Els primers estudis publicats sobre aquesta vacuna van mostrar la capacitat d'aquest immunogen per estimular les respostes

limfoproliferatives específiques del VIH en pacients tractats amb antiretrovirals ^[232]. Estudis posteriors han mostrat resultats discordants, ja que la vacuna era capaç d'induir respostes CD4 específiques contra Gag (en ocasions molt potents), però sense capacitat de control immune de la replicació viral ^[233-235].

4.2.2.2 Vacunes d'ADN

Aquesta estratègia consisteix en utilitzar plasmidis d'ADN en què s'insereixen els gens virals d'interès i, posteriorment, s'injecten per via muscular. L'expressió dels productes proteics dels gens inserits desencadena la presentació d'antígens a través del MHC-I i II, el que dona lloc a les respostes de cèl·lules T CD8 i T CD4.

S'ha demostrat que les vacunes d'ADN per si mateixes només són capaces d'induir respostes immunitàries generalment dèbils i poc duradores en pacients tractats amb TARGA ^[236, 237] però el seu ús en combinació amb vacunes de vectors vírics recombinants (portadors del mateix immunogen) pot produir respostes cel·lulars anti-VIH més potents. Així, la vacuna d'ADN és la que inicia les respostes al immunogen, i potencia aquestes respostes després d'una segona fase de vacunació amb un vector viral modificat ^[238].

En qualsevol cas, les vacunes terapèutiques d'ADN plasmídic ofereixen avantatges que cal tenir en compte, com la capacitat d'incloure diversos gens del VIH-1 en la mateixa vacuna, la seva seguretat biològica i la possibilitat de produir-les i emmagatzemar-les a gran escala.

4.2.2.3 Vacunes de vectors vírics recombinants

Aquesta estratègia de vacunació es basa en la utilització de certs tipus de virus vius atenuats, els quals es modifiquen mitjançant enginyeria genètica per tal que puguin expressar gens del VIH.

Dins d'aquest grup de vacunes terapèutiques es troben les vacunes amb virus Canarypox recombinant. La immunogenicitat i seguretat biològica d'aquest tipus de vacuna s'ha demostrat en estudis realitzats en pacients infectats pel VIH ^[198, 239]. A més del virus Canarypox, s'ha utilitzat com a vector el virus Vaccinia-Ankara modificat, el virus MVA ^[240], amb resultats en general pobres exepete en alguns casos ^[200, 241].

4.2.2.4 Vacunes de cèl·lules dendrítiques

Les cèl·lules dendrítiques (CD) tenen grans habilitats per induir i coordinar la immunitat de les cèl·lules T. Això les converteix en els agents biològics ideals en les estratègies d'immunoteràpia per augmentar la immunitat de les cèl·lules T en la infecció pel VIH-1.

Els actuals assaigs clínics es basen en l'administració de CD carregades d'antígens del VIH-1, preparades *ex vivo*, per provar principalment que la immunoteràpia amb CD és segura i eficaç en pacients infectats pel VIH-1. Aquests assaigs depenen en gran mesura d'estudis preclínics que proporcionin coneixements i orientació sobre els tipus de CD, els millors antígens virals, els mètodes de maduració de les CD, la via d'administració de les CD, les mesures de la funció immunitària contra el VIH i, en última

instància, el control de la replicació del VIH-1. A més, s'estan desenvolupant propostes prometedores en la immunoteràpia basada en CD amb antígens del VIH-1 *in vivo*.

L'objectiu dels assaigs amb vacunes de CD és definir una estratègia segura i eficaç per millorar el control de la infecció pel VIH-1 en pacients sotmesos a teràpia antiretroviral, a part d'aconseguir respostes immunitàries específiques per al VIH-1 més eficaces que les generades per altres estratègies de vacunació. De fet, els primers estudis en models animals que millor van demostrar la capacitat d'una vacuna terapèutica d'incrementar la immunitat específica de forma eficaç, han estat els que han utilitzat vacunes basades en CD com a adjuvant cel·lular ^[242-244]. Actualment, les vacunes terapèutiques basades en CD són, precisament, les que estan tenint més rellevància ^[245, 246] com a estratègia complementària al tractament antiretroviral.

Les cèl·lules dendrítiques mieloides (CDm) són les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) més potents del sistema immunitari, ja que poden induir i potenciar tant la resposta immune adaptativa com la immunitat innata. Les CDm tenen la capacitat de capturar els patògens mitjançant processos d'endocitosi, de pinocitosi a través de DC-SIGN i de receptors de Fc, per transformar-los en petits pèptids. Posteriorment, les CDm presenten els antígens processats tant per MHC-I o MHC-II com per complexos MHC, a les cèl·lules T citotòxiques (CTL) i a les cèl·lules T CD4, respectivament, promovent l'expansió i la diferenciació d'aquestes. D'altra banda, les CDm també activen les cèl·lules NK (*natural killer*) ^[247, 248]. Aquestes habilitats extraordinàries, al seu torn, converteixen a les CDs en els adjuvants naturals més potents per una vacuna autòloga.

Diversos estudis realitzats *in vitro* i *in vivo* en models animals han demostrat que les cèl·lules dendrítiques autòlogues derivades de monòcits (CDDM) polsades amb immunògens basats en antigens de VIH-1/SIV poden induir i estimular la resposta immune específica ^[242, 249-252]. Aquesta estratègia s'ha aplicat també en pacients infectats polsant CDDM autòlogues amb diferents tipus d'immunògens: pèptids de VIH-1, vectors de *canarypox* que porten els gens del VIH-1 rellevants, ARN del VIH-1 autòleg i virions complets de VIH-1 autòlegs i inactivats ^[203-206, 253-255].

L'ús del VIH-1 complet inactivat com immunogen té l'avantatge sobre els altres immunògens del VIH d'oferir la varietat completa de proteïnes virals i la conformació natural del virus per induir la resposta immune específica, però, també té alguns desavantatges. D'una banda, algunes de les proteïnes immunogèniques es troben en baixa quantitat a l'interior de partícules virals, de manera que és necessària una alta concentració de virions, i per altra banda, el mètode d'inactivació ha de garantir una alta reducció de la infectivitat per no comprometre la seguretat del pacient enfront aquest tipus d'immunògen.

Els assaigs clínics en fase I / II de vacunes terapèutiques contra el VIH-1 en base a CDDM autòlogues polsades amb VIH-1 complet, autòleg i inactivat realitzats per Wei Lu (2004) ^[203] i Felipe García (2005) ^[204], han demostrat la seguretat i l'eficàcia d'aquest mètode per induir la resposta immune cel·lular específica. La vacuna del grup de Wei Lu va aconseguir una reducció de la CV de més del 90% en 8 dels 18 pacients immunitzats, mentre que la vacuna del grup de Felipe García va presentar una disminució de més de 0.5 log de la CV en 4 dels 12 pacients vacunats. Les diferències en l'eficàcia entre ambdós assaigs podria haver estat causada pel mètode de fabricació de la vacuna i per les característiques dels pacients vacunats.

4.3 COM AFECTA EL TIPUS DE TRACTAMENT A LA VARIABILITAT GENÈTICA DEL VIH-1?

4.3.1 Resistència als fàrmacs antiretrovirals

En la infecció per VIH-1, poden coexistir diferents variants genètiques en un mateix pacient. Aquesta heterogeneïtat viral permet al VIH-1 adaptar-se als canvis en el medi, seleccionant variants amb una major capacitat replicativa, un diferent tropisme cel·lular o bé amb unes característiques adequades per escapar a la resposta immune de l'hoste. A més a més, la variabilitat genètica del VIH-1 pot modificar la sensibilitat de determinades variants als fàrmacs antiretrovirals. De fet, s'han detectat virus portadors de mutacions de resistència als inhibidors nucleòsids (NRTI) i no nucleòsids (NNRTI) de la transcriptasa inversa i als inhibidors de la proteasa (IP) en pacients no tractats prèviament ^[256, 257].

Les mutacions de resistència poden estar produïdes per dos mecanismes: a) presència de polimorfismes genètics en codons crítics que redueixen l'afinitat d'un antiretroviral pel seu lloc d'unió a l'enzim diana ^[258], o b) transmissió d'un virus amb mutacions de resistència a partir d'un pacient exposat a tractament antiretroviral ^[259, 260]. Els mutants resistents a un determinat antiretroviral es troben en baixa concentració abans de l'inici del tractament ^[256-258], probablement degut a que presenten desavantatges cinètics respecte de les soques salvatges ^[43, 89], de tal manera que si el tractament antiretroviral no aconsegueix una adequada activitat farmacològica (és capaç de suprimir únicament la replicació de les soques salvatges), es produirà un sobrecreixement i predomini de les variants resistents. És a dir, la pressió ambiental selectiva de

la teràpia antiretroviral aporta a aquests mutants l'avantatge competitiva necessària per a que, eventualment, representin la població dominant.

Les mutacions de resistència s'han classificat en primàries i secundàries. Les mutacions primàries apareixen generalment en les etapes inicials del desenvolupament de la resistència, amb freqüència relacionades de manera específica amb el fàrmac que les relaciona. Les mutacions secundàries o compensatòries, en canvi, s'acumulen en el genoma viral quan ja han aparegut una o més mutacions primàries. Les mutacions secundàries per si mateixes tenen un efecte mínim o nul en la magnitud de les resistències, encara que en general milloren la capacitat replicativa del virus quan està en conjunció amb les mutacions primàries. No obstant, les diferències entre mutacions primàries i secundàries, o els seus efectes en relació amb la resistència clínica son difícils d'establir, per la qual cosa el grup d'experts internacionals de la IAS (*International AIDS Society*) recomana utilitzar aquesta distinció entre mutacions primàries i secundàries únicament en els IP. D'altra banda, es poden donar mutacions de resistència en qualsevol de les proteïnes diana dels fàrmacs antiretrovirals: RT (NRTI, NNRTI), gp41 (inhibidors de la fusió), integrasa (inhibidors de la integrasa), proteasa (IP) i inclús a Gag, en lloc de tall de la proteasa.

4.3.2 Evolució genètica natural del VIH-1 i durant els tractaments immunomediats

A part de les mutacions de resistència seleccionades pels fàrmacs antiretrovirals, el tractament en si mateix també afecta a l'evolució genètica del VIH-1. S'han fet diferents estudis longitudinals en pacients *naïve* (que no han rebut cap tractament) i en pacients en TARGA sobre l'evolució genètica del VIH-1, centrant-se bàsicament en la regió C2V5 del gen *env*. Aquesta regió és l'escollida per les anàlisis de la variabilitat ^[261, 262] perquè suposa una important diana per la resposta immunològica i mostra un elevat grau de variabilitat filogenètica.

En pacients infectats per VIH-1 no tractats es mostrà una taxa de divergència de l'1% per any aproximadament a partir de la soca inicial ^[132], mentre que la taxa d'evolució nucleotídica en pacients en TARGA és <0,05% per any, si aquesta pot ser detectada ^[263].

D'altra banda, existeix poca informació sobre l'evolució viral en els pacients sotmesos a teràpies immunomediades. Els pocs estudis que s'han presentat al respecte es basen en l'evolució viral durant les STI, suggerint-se que aquesta podria ser menor que la observada en pacients no tractats ^[263]. Encara avui en dia la variabilitat i l'origen dels virus que apareixen durant les aturades del tractament és un tema controvertit i no s'ha arribat a un consens. Alguns autors han suggerit que la replicació subjacent durant les STI sigui la responsable de la divergència del gen *env* durant els múltiples cicles d'interrupcions del tractament ^[264]. No obstant, altres estudis han demostrat que els virus que apareixen en les STI provenen del reservori viral, és a dir, algunes variants

virals preexistents al tractament són les responsables del rebrot viral produït durant les aturades del tractament ^[265].

Actualment, no es disposa d'informació sobre l'evolució viral en pacients que han estat sotmesos a vacunació terapèutica, tot i tractar-se d'una de les teràpies immunomediades més rellevants. És de gran interès conèixer com afecten aquestes noves estratègies a la variabilitat i a l'evolució del VIH-1, doncs al potenciar les respostes específiques contra el VIH-1 suposen una pressió selectiva directa sobre els virus.

El fet que el VIH no pugui arribar a ser controlat de forma efectiva és una mostra evident de la necessitat urgent d'entendre els mecanismes que li confereixen la capacitat d'adaptar-se davant les pressions selectives. Per tant, l'estudi del comportament de les poblacions virals (o quasiespècies) resulten importants no solament des d'un punt de vista acadèmic sinó també clínic.

4.4 ASSAIG CLÍNIC PILOT FASE I/II DE VACUNA TERAPÈUTICA EN PACIENTS VIH-1+ BASADA EN L'ADMINISTRACIÓ DE CÈL·LULES DENDRÍTIQUES AUTÒLOGUES CARREGADES AMB EL VIH-1 AUTÒLEG INACTIVAT PER CALOR (RESUM DEL PROTOCOL DCV01)

El grup d'investigació de la sida de l'Hospital Clínic de Barcelona va dur a terme un assaig clínic pilot fase I/II amb una vacuna terapèutica de cèl·lules dendrítiques, polsades amb virus autòlegs inactivats per calor, en 12 pacients amb infecció crònica pel VIH-1 en tractament antiretroviral en estadis primerencs de la infecció (protocol DCV01, aprovat per la Agencia Española del Medicamento l'any 2001, assaig clínic nº 00_0405, i subvencionat pel Ministerio

de Ciencia y Tecnología, SAF2001-2591). Tots els pacients inclosos en l'estudi van signar el seu consentiment informat per escrit i el protocol d'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Els divuit pacients inclosos es caracteritzaren per presentar una infecció per VIH-1 crònica i asimptomàtica, presentant uns nivells basals i *nadir* de cèl·lules T CD4 superiors a 500/ μ l, CV basal >5000 còpies/mL abans de rebre cap tractament i una CV <20 còpies/mL mantinguda al menys durant 2 anys mentre rebien TARGA. Aquests pacients foren randomitzats (2:1) per a ser immunitzats amb cèl·lules dendrítiques mieloides autòlogues polsades *ex-vivo* amb VIH-1 autòleg inactivat per calor (n=12), o bé per ser pacients control (n=6). Dos dels pacients control, no obstant, van abandonar l'estudi abans de la seva finalització, per causes alienes al mateix. Per tant, aquests subjectes foren exclosos, quedant el grup control amb n=4.

A tots els pacients se'ls va interrompre el tractament (stop 1) i quan la CV va assolir el pic màxim, només en els pacients que havien de ser immunitzats, se'ls realitzaren 3 plasmafèresis per a la obtenció del virus autòleg amb el qual es produïrien les vacunes. Als pacients control també se'ls va aturar el tractament però no foren sotmesos a plasmafèresi, únicament es va recollir una mostra de sang per comprovar que també s'assolís un pic de CV. Seguidament es va reintroduir el TARGA a tots els pacients, i la CV va disminuir per sota les 20 còpies/mL en 12 setmanes en tots ells.

Un any i mig després, aproximadament, es varen realitzar 5 immunitzacions a intervals de 6 setmanes. Una setmana abans de cada immunització es va efectuar una extracció de sang perifèrica per a la obtenció dels monòcits plasmàtics, els quals es cultivaren *ex-vivo* durant 8 dies amb

reactius aptes per ús clínic, per diferenciar-los a cèl·lules dendrítiques derivades de monòcits (CDDM) tal com ho descriuen Engelmayer i col·laboradors ^[266].

Els virus obtinguts per plasmafèresi es van inactivar per calor a 56°C durant 30 minuts i a continuació les CD-DM (mitjana de 2×10^6 cèl·lules) es polsaren amb els virus inactivats 24 hores abans de ser injectades subcutàniament (mitjana 5×10^6 virions per vacuna). La primera immunització va ser un control negatiu, immunitzant amb CD-DM no polsades amb VIH-1 (mock). Sis setmanes després de l'última immunització (setmana 30) es va interrompre de nou el TARGA i es va fer el seguiment dels pacients durant al menys 6 mesos. Els pacients control no foren immunitzats però si van seguir un calendari d'aturades del tractament igual al dels pacients vacunats (Figura 10).

Els resultats d'aquest estudi foren publicats l'any 2005 ^[204], conclouent que la vacuna era factible, segura i que no s'associava a efectes secundaris importants (l'article complet s'adjunta a la pàgina 191). En general no existien diferències importants entre el grup de pacients vacunats i el grup control, excepte en la CV basal, que en els controls era inferior a la dels pacients vacunats (mitjana 3.54 log còpies/mL vs. 4.44 log còpies/mL). Els pacients vacunats tenien una mitjana d'edat de 40 anys (entre 29 i 56) i els no vacunats de 43 anys (entre 35 i 58) (Taula 6).

Els criteris clínics per considerar aquests pacients responedors foren que el *set-point* de CV plasmàtica resultant als 6 mesos de la retirada final del TARGA (setmana 54) disminuís $\geq 0.5 \log_{10}$ còpies/mL significativament respecte el *set-point* de CV basal; que el promig del temps de duplicació del rebrot de la CV s'allargués significativament en el segon stop respecte el primer, i que l'àrea sota la corba (AUC) i el pic del rebrot de CV del segon stop disminuïssin significativament respecte el primer stop ^[204].

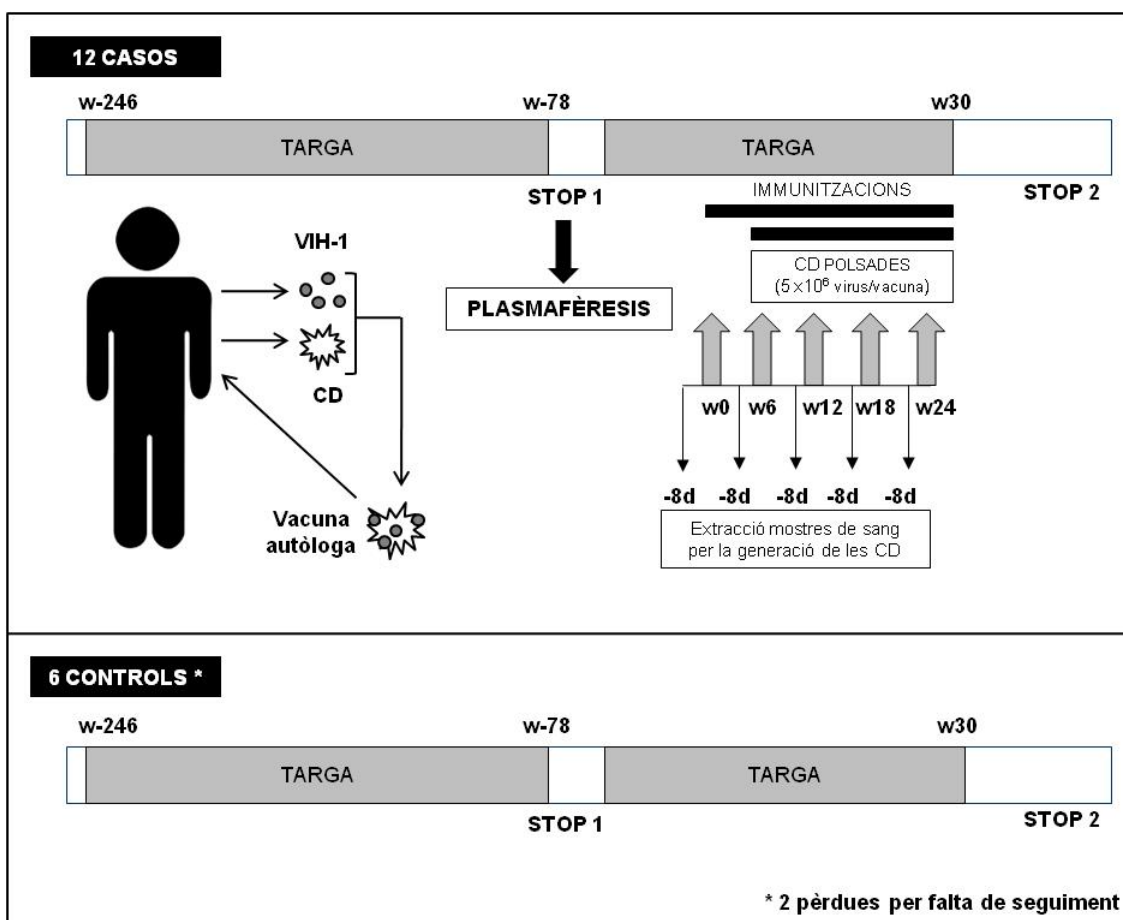


Figura 10 Disseny de l'estudi. Setanta vuit setmanes abans de rebre la primera immunització es va interrompre el TARGA i quan la CV va rebotar es van practicar tres plasmafèresis per obtenir el virus autòleg amb el qual es produïrien les vacunes. Seguidament es va reintroduir el TARGA, i, en tots els pacients, la CV va disminuir per sota les 20 còpies/mL. Setanta vuit setmanes després es varen realitzar 5 immunitzacions a intervals de 6 setmanes. Una setmana abans de cada immunització es va efectuar una extracció de sang perifèrica per a la generació de les CD-DM. Els virus obtinguts per plasmafèresi es van inactivar i a continuació les CD-DM (mitjana de 2×10^6 cèl·lules) es polsaven amb aquests 24 hores abans de ser injectades subcutàniament (mitjana 5×10^6 virions/vacuna). La primera immunització va ser un control negatiu, immunitzant als pacients amb CD-DM no polsades amb VIH-1 (mock). Sis setmanes després de l'última immunització (setmana 30) es va interrompre de nou el TARGA i es va fer el seguiment dels pacients durant al menys 6 mesos. Els pacients control no foren immunitzats però si van seguir un calendari d'aturades del tractament igual al dels pacients vacunats. w, setmana.

Número de pacient	Sexe	Edat (anys)	CD4/mm ³ basals	CV plasmafèresis per polsar les CD (log ₁₀ còpies/ml)	Càrrega Viral (log ₁₀ còpies/ml)		Temps de duplicació del rebrot de la CV (dies)		Àrea sota la corba del rebrot de la CV *		Pic del rebrot de la CV *	
					Baseline ^a	Setmana 54	Stop 1	Stop 2	Stop 1	Stop 2	Stop 1	Stop 2
CASOS												
269	Home	29	793	7.19	4.24	3.30	1.89	2.33	3.39	2.52	5.16	5.30
262	Home	45	707	7.90	4.58	3.90	1.76	3.95	3.28	1.40	5.07	3.09
46	Home	56	614	8.22	4.51	3.79	2.67	3.36	3.67	2.61	5.75	4.56
185	Dona	32	628	8.20	5.10	4.43	1.78	2.59	3.47	3.07	5.00	4.55
261	Home	30	781	7.07	4.12	4.12	2.23	2.80	2.29	3.20	4.94	4.46
201	Home	54	588	7.42	3.94	3.92	1.79	3.46	2.82	2.40	5.40	4.51
168	Home	37	1005	7.63	4.15	4.67	1.96	5.02	3.16	2.15	4.89	4.93
33	Home	48	763	7.56	4.65	4.80	1.37	1.83	3.48	2.96	6.37	4.92
158	Home	47	764	7.14	4.02	4.03	1.77	2.73	3.27	3.04	5.35	4.67
265	Home	28	759	9.11	5.22	5.03	1.82	1.69	4.03	3.93	6.15	5.67
213	Home	31	948	7.49	4.60	4.63	1.54	1.78	3.55	3.11	5.70	5.42
207	Home	48	706	7.98	4.11	4.70	2.76	2.30	3.32	3.36	5.14	4.96
<i>Mitjana</i>		40	754	7.74	4.44	4.27	1.9	2.8	3.32	2.87	5.41	4.75
<i>SE</i>		3	36	0.16	0.12	0.15	0.12	0.28	0.13	0.19	0.14	0.18
CONTROLS												
228	Dona	43	879	...	3.07	3.01	6.51	5.14	1.93	1.76	3.86	4.23
282	Home	58	619	...	3.74	3.43	5.55	4.95	1.67	1.56	3.89	4.08
296	Home	35	900	...	3.64	3.36	4.70	4.08	2.15	2.61	3.96	3.80
105	Home	39	504	...	3.73	3.54	2.70	2.56	2.48	3.33	5.19	5.09
<i>Mitjana</i>		43	725	...	3.54	3.34	4.86	4.18	2.06	2.31	4.22	4.30
<i>SE</i>		5	97	...	0.16	0.11	0.81	0.58	0.17	0.41	0.32	0.28

Taula 6 Característiques dels pacients vacunats (casos) i dels no vacunats (controls). Els pacients en negreta són els que van tenir una resposta virològica a la vacunació.

^a Mitjana de totes les mesures disponibles per als 2 anys anteriors a l'inici de qualsevol teràpia. * Calculat amb les dades de les 12 primeres setmanes d'interrupció.

Dades extretes de García *et al*, 2005 [204].

En els resultats de l'estudi es va observar una disminució del *set-point* de la CV plasmàtica major o igual a 0.5 logs en el 33% dels individus immunitzats (4 dels 12 pacients), mentre que no es va observar cap canvi en el grup control. Quan es va comparar la dinàmica en el rebrot de la CV en els dos períodes d'interrupció del tractament, s'observà, en el grup vacunat, un enlentiment en la mitjana del temps de duplicació de la CV ($p=0.01$), una disminució significativa de l'àrea sota la corba ($p=0.02$) i la disminució del valor màxim de CV plasmàtica ($p=0.004$) en la segona interrupció del tractament (stop 2) respecte la primera (stop 1). En el grup control no es varen observar diferències en aquests paràmetres entre la primera i la segona interrupció del tractament ^[204] (Taula 6, Figura 11).

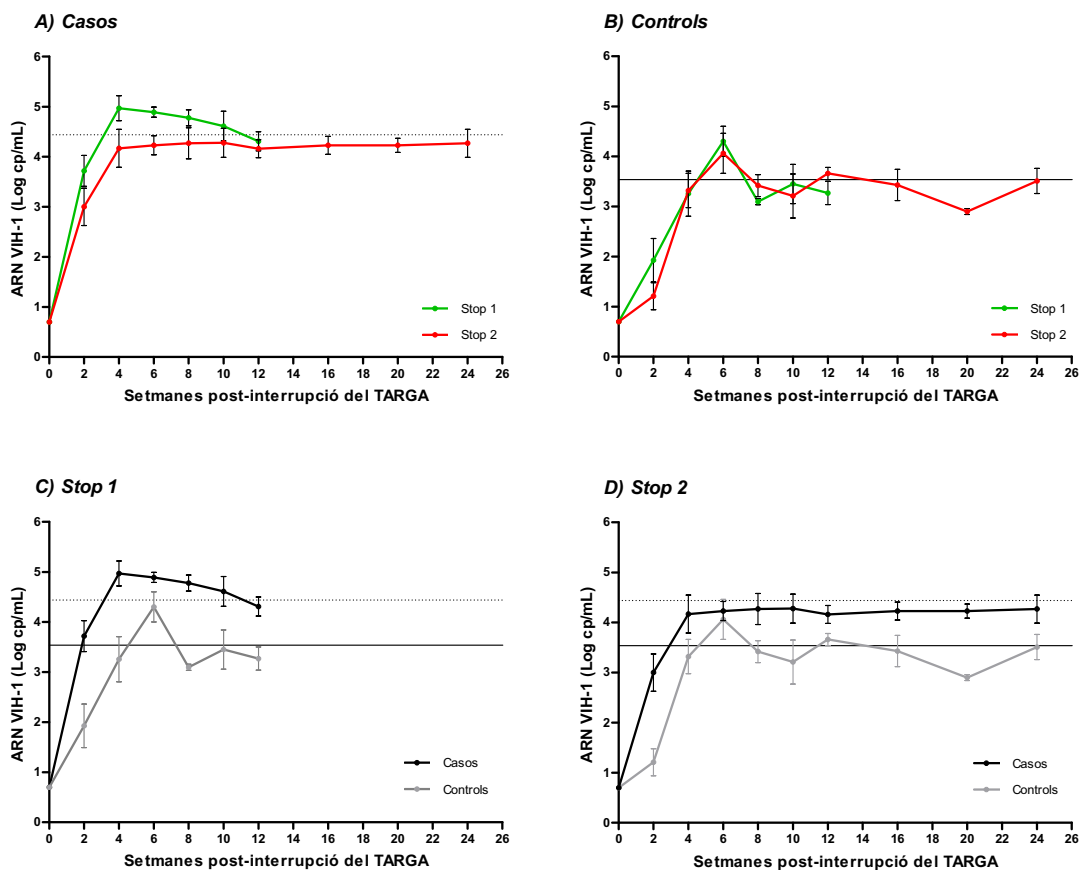


Figura 11 Dinàmica de la CV plasmàtica després de la primera i la segona interrupció del TARGA. Les línies contínues i discontinúes representen la mitjana de la CV plasmàtica basal (abans de rebre cap tractament) dels casos (que foren immunitzats entre el primer i el segon stop, línia discontinua) i dels pacients control (que no foren immunitzats, línia contínua). A) Mitjana de la CV plasmàtica en els casos. B) Mitjana de la CV plasmàtica en els controls. C) Mitjana de la CV plasmàtica en els casos i els controls després de la primera aturada del TARGA. D) Mitjana de la CV plasmàtica dels casos i dels controls després de la segona aturada del TARGA. Figura modificada de García *et al*, 2005 [204].

En aquest estudi es va utilitzar una vacuna terapèutica individualitzada anti-VIH, basada en l'administració de cèl·lules dendrítiques autòlogues carregades amb virus autòlegs inactivats, factible, segura i que no va provocar efectes adversos importants [204]. Aquesta vacuna va poder controlar parcialment la replicació vírica en un 33% dels casos després de sis mesos d'interrupció del TARGA i es va observar un descens significatiu (0,66 logaritmes) de la càrrega viral en les primeres 12 setmanes després de la interrupció, el que es va associar a canvis significatius, encara que febles i transitoris, de la resposta limfoproliferativa a l'antigen p24 del VIH-1, de la resposta CTL en sang perifèrica i de la xifra de cèl·lules CTL en teixit limfàtic. L'activitat neutralitzant del sèrum no va canviar després de les immunitzacions. L'efecte d'aquesta vacuna sobre les poblacions virals no ha estat estudiada.

OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquesta tesi és, analitzar l'evolució de l'envolta viral del VIH-1 en pacients infectats que han estat sotmesos a vacunació terapèutica basada en l'administració de cèl·lules dendrítiques autòlogues polsades amb el virus autòleg inactivat per calor (DCV01, assaig clínic nº 00_405).

Per assolir aquest objectiu s'han analitzat i comparat els canvis en la seqüència de la regió C2V5 de l'envolta viral de les quasiespècies circulants en el plasma abans i després de la vacuna. La variabilitat del VIH es manifesta principalment en el gen de l'envolta, i concretament en la seva regió C2V5, degut a l'exposició al sistema immunològic de les proteïnes que codifica. En aquest estudi s'ha analitzat l'evolució de la regió C2V5 de l'envolta viral perquè la seva variabilitat pot tenir conseqüències biològiques, tant a nivell dels antígens que es mostraran al sistema immune com a nivell de tropisme viral.

***PACIENTS,
MATERIALS I MÈTODES***

1. SELECCIÓ DE LES MOSTRES

Els punts d'interès de cada pacient foren: a) mostra de plasma sanguini basal (BS), abans de rebre cap tipus de tractament, b) mostra de plasma sanguini del rebrot de la CV durant la primera parada del tractament (stop 1 o S1) en els pacients control i mostra del *pool* de les plasmafèresis utilitzades per preparar l'immunògen en els casos, i c) mostra de plasma sanguini del rebrot de la CV durant la segona parada del tractament (stop 2 o S2). Les mostres plasmàtiques obtingudes en els rebrots d'ambdós stops corresponen a la fase exponencial de la corba descrita per la càrrega viral de cada pacient (Figura 12). A partir d'aquestes mostres s'han obtingut les poblacions virals en les que es basa aquesta tesi, per tant, a partir d'ara quan ens referim al terme població estarem parlant dels virus del moment basal, del primer stop o del segon stop.

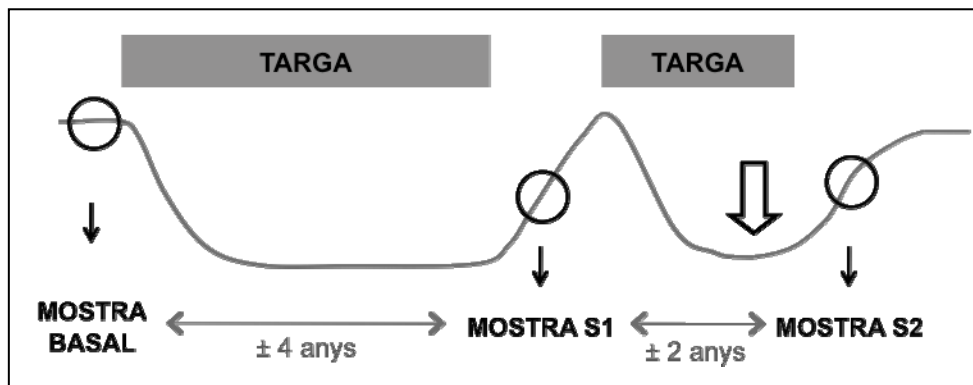


Figura 12 Mostres seleccionades al llarg del tractament per a l'estudi. La línia representa la càrrega viral i la fletxa blanca indica el moment quan va tenir lloc a vacunació (en els casos). S'indica també el temps aproximat que ha transcorregut entre les mostres seleccionades.

2. OBTENCIÓ DE PLASMA DE SANG PERIFÈRICA

Per a la obtenció del plasma de la sang total, es va partir d'una extracció de sang perifèrica del pacient en tubs *vacutainer* amb EDTA com anticoagulant. Es van preparar alíquotes d'un mil·lilitre del plasma resultant i es va enmagatzemar a -80°C . (Veure protocol detallat a l'apartat 1 de l'Annex Mètodes)

3. OBTENCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE L'ARN DE VIH-1 EN EL PLASMA

La virèmia o càrrega viral plasmàtica (CV) es va determinar utilitzant el sistema comercial Amplicor HIV-1 Monitor Test (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ, USA), seguint les instruccions del fabricant. Aquesta metodologia combina la retro-transcripció (RT) de l'ARN viral i la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per la medició quantitativa en plasma de l'ARN del VIH-1. El seu desenvolupament, descrit breument, s'exposa a continuació: en una única reacció s'amplifica una seqüència de 142 parells de bases (pb) del gen *gag* del VIH-1. En la reacció s'utilitza l'enzim rTth ADN polimerasa (que té activitat transcriptasa inversa i ADN polimerasa) i *primers* biotinilats en els extrems 5'. L'estàndard de quantificació de l'assaig és una molècula sintètica d'ARN no relacionada amb el VIH-1 que presenta els llocs d'unió dels *primers*, idèntics als existents en la seqüència diana del VIH-1. Els productes de l'amplificació biotinilats corresponents al VIH-1 i al patró de quantificació es detecten mitjançant un assaig immunoenzimàtic en pouets independents de plaques *Microtiter*. Aquests pouets es troben recoberts per sondes d'oligonucleòtids específiques del VIH-1 i del patró de quantificació. La quantificació es realitza en la placa *Microtiter* per dilucions seriades quintuples dels productes de l'amplificació, amb la posterior addició d'un conjugat avidina-peroxidasa i el seu substrat/cromògen específic. La lectura dels resultats es realitza en un espectrofotòmetre a 450 nm de longitud d'ona. El número de còpies de l'ARN del VIH-1 es calcula a partir del número conegut de còpies de l'estàndard de quantificació, de les densitats òptiques obtingudes en les lectures corresponents al VIH-1 i al patró de quantificació, i del factor de dilució. El límit de detecció de la tècnica és de 20 còpies d'ARN viral per mil·lilitre de plasma (Veure protocol detallat a l'apartat 2 de l'Annex Mètodes)

4. OBTENCIÓ DE L'ARN DE VIH-1 DE PLASMA PER L'ANÀLISI DE SEQÜÈNCIES

L'extracció de l'ARN viral es va realitzar a partir d'un mil·lilitre de plasma de cada mostra, centrifugant a 23.000 rpm 1 hora a 4°C. Es va descartar el sobrenedant i es va procedir a l'extracció amb els reactius comercials QIAamp Viral RNA kit, (Qiagen, Hilden, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant amb modificacions. (Veure protocol detallat a l'apartat 3 de l'Annex Mètodes)

5. AMPLIFICACIÓ DE LA REGIÓ C2V5 DEL GEN *env* A PARTIR D'ARN DE VIH-1

L'amplificació de la regió C2V5 del gen de l'envolta del VIH-1 es va realitzar mitjançant la combinació d'una retro-transcripció de l'ARN viral i una PCR (RT-PCR) i una PCR interna o *nested* (NT-PCR), modificant el mètode descrit per Arnedo-Valero i col·laboradors ^[267].

5.1 RT-PCR

La RT-PCR es realitzà a partir d' 1 µL i 10 µL d'ARN viral de cada mostra amb el sistema comercial *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq*, que conté una mescla d'una retro-transcriptasa (M-MLV RT modificada) i una ADN polimerasa per a la síntesi de l'ADNc i l'amplificació per PCR en un sol tub. Aquest sistema també inclou una mescla tamponada que proporciona la concentració adequada de Mg²⁺, dNTPs i estabilitzadors. L'especificitat de l'amplificació es va potenciar afegint a la reacció 3.5 U de l'ADN polimerasa d'alta fidelitat *Expand High Fidelity Enzyme* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) i els *primers* específics C2-2S i ED12 (veure Taula 7) a una concentració final de 0.4 µM. El volum final de la reacció fou de 50 µL.

Es realitzà un cicle de retro-transcripció a 45°C durant 45 minuts i desnaturalització a 94°C 2 minuts; i 30 cicles d'amplificació segons el perfil següent: 10 cicles de desnaturalització a 94°C 30 segons, hibridació dels *primers* específics 30 segons a 59°C i elongació de les cadenes 1 minut a 68°C; i 20 cicles amb el mateix patró però amb un increment de 0.5 segons d'elongació per cicle. Finalment, es realitzà un cicle únic d'elongació a 68°C durant 10 minuts (veure protocol detallat a l'apartat 4.1 de l'Annex Mètodes).

5.2 NT-PCR

La NT-PCR es va dur a terme a partir de 5 µL del producte de la RT-PCR. L'amplificació es realitzà amb 3.5 U de l'ADN polimerasa d'alta fidelitat *Expand High Fidelity Enzyme* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) i els *primers* específics C2FMod i WEAU a una concentració final de 0.4 µM (veure Taula 6). El volum final de la reacció fou de 50 µL amb una concentració final de 1.5 mM Mg²⁺.

Posteriorment a una desnaturalització inicial de 2 minuts a 94°C, es realitzaren 30 cicles d'amplificació segons el perfil següent: 10 cicles de desnaturalització a 94°C 30 segons, hibridació dels *primers* específics 30 segons a 51°C i elongació de les cadenes 1 minut a 68°C; i 20 cicles amb el mateix patró però amb un increment de 0.5 segons d'elongació per cicle. Finalment, es realitzà un cicle únic d'elongació a 68°C durant 10 minuts (veure protocol detallat a l'apartat 4.2 de l'Annex Mètodes).

Primer	Seqüència 3'-5'	Polaritat	Posició
C2-2S	CAATGTACACATGGAATTAGGCCA	+	6506-6529
ED12	AGTGCTTCCTGCTCCCAAGAACCCAAG	-	7328-7357
C2FMod	TCTGGATCCAACCTGCTGTAAATGGCAGTC	+	6534-6563
WEAU	TCTAAGCTTCACTTCTCCAATTGTCCCTC	-	7195-7223
M13_Fw	GTTTTCCCAGTCACGAC	+	
M13_Rv	CAGGAAACAGCTATGAC	-	

Taula 7 Seqüència nucleotídica i localització dels primers utilitzats en el genoma viral de referència HXB2.

Els productes obtinguts de l'amplificació s'analitzaren mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa 1% en tampó Tris-borat EDTA (TBE) i van ser purificats mitjançant el sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Invitrogen, Carlsbad, California) (veure protocols detallats als apartats 5 i 6 de l'Annex Mètodes).

6. CLONACIÓ DE LA REGIÓ C2V5 DEL GEN *env* DEL VIH-1

El clonatge dels productes de PCR purificats (o inserits) es realitzà en el vector *pGEM-T Easy* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) mitjançant el sistema de lligació comercial *DNA Rapid Ligation* (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany).

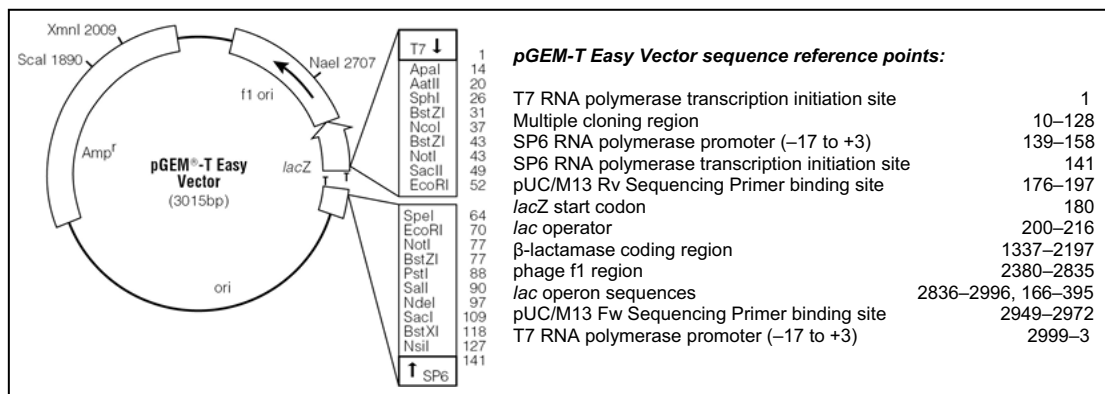


Figura 13 Esquema del vector *pGEM T Easy* utilitzat per la clonació del fragment C2V5 de l'envolta del VIH-1.

6.1 LLIGACIÓ I TRANSFORMACIÓ EN BACTÈRIES COMPETENTS

La lligació òptima amb el vector *pGEM-T Easy* va resultar amb una proporció molar vector:inserir 1:5, pel que es van emprar 50 ng del vector i 50 ng del producte de PCR en un volum final de 20 µL.

Per a la transformació es van emprar bacteries competents d'alta eficiència (*E. coli* DH5α, Invitrogen) en alíquotes de 50 µL, a les quals se'ls van afegir 5-10 µL de la lligació. Les bacteries es van incubar 30 minuts en gel i es van sotmetre a un xoc tèrmic a 37°C durant 20 segons. Posteriorment se'ls va afegir 1 mL de medi SOC i es van incubar 1 hora a 37°C amb una agitació de 250 rpm. Es van sembrar les bacteries transformades per duplicat, 20 µL i 200µL, per extensió en plaques de LB Agar amb ampicil·lina a una concentració de 50 µg/mL (per a la selecció de les colònies recombinants resistents a aquest antibiòtic), IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) a una concentració de 0.2 mM i X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside*) a una concentració final de 50 µg/mL (per a la selecció de bacteries recombinants per color).

Les plaques es van incubar tota la nit a 37°C. Es van obtenir, per mostra, 10-20 colònies amb ADN recombinant, seleccionades pel seu color blanc (veure protocols detallats als apartats 7 i 8 de l'Annex Mètodes).

6.2 OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC (MINIPREPS)

Cada colònia blanca a analitzar es va transferir a 3 mL de medi LB líquid amb ampicil·lina 50 µg/mL i es va incubar durant tota la nit a 37°C amb agitació a 250 rpm. Després de centrifugar durant 30 minuts a 3000 rpm, la purificació de l'ADN plasmídic obtingut des del sediment de cèl·lules es va realitzar amb el sistema comercial *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen, Hilden, Germany) seguint les instruccions del fabricant.

A més, es va comprovar que l'ADN plasmídic obtingut (miniprep) contingués l'inserit d'interès mitjançant una PCR senzilla amb 2 µL d'ADN, *primers* específics del vector M13_Fw i M13_Rv a 0.2 µM (veure Taula 7) i 12.5 µL de *Go Taq Green Master Mix* (Promega) en un volum final de 25 µL. Posteriorment a una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C, es realitzaren 40 cicles d'amplificació segons el perfil següent: desnaturalització a 94°C 10 segons, hibridació dels *primers* específics 10 segons a 50°C i elongació de les cadenes 2 minuts a 68°C. Finalment, es realitzà un cicle únic d'elongació a 68°C durant 10 minuts i es comprovà la presència d'inserit en un gel a l'1% d'agarosa amb TBE (veure protocols detallats als apartats 9 i 10 de l'Annex Mètodes).

7. OBTENCIÓ DE LA SEQÜÈNCIA NUCLEOTÍDICA DE LA REGIÓ C2V5

Les minipreps d'ADN recombinant obtingudes proporcionaren les seqüències de les diferents variants que conformen la població viral d'un pacient en un moment determinat. Es va emprar el mètode *Dideoxy chain-termination* (ABI PRISM Ready Reaction Amplitaq Fs, DyeDeoxy Terminators, Applied Biosystems) per seqüenciar aquestes minipreps.

Les reaccions de seqüenciació es realitzaren a partir de 2 µL de miniprep amb una concentració final de primer (M13_Fw o M13_Rv, veure Taula 7) de 0.5 µM, 1 µL *BigDye Terminator v3.1* i 1.5 µL de tampó 5x (Applied Biosystems) en un volum final de 10 µL. Posteriorment a una desnaturalització inicial de 5 minuts a 94°C, es realitzaren 40 cicles d'amplificació segons el perfil següent: desnaturalització a 94°C 10 segons, hibridació dels primers específics 10 segons a 50°C i elongació de les cadenes 2 minuts a 60°C. Finalment, es realitzà un cicle únic d'elongació a 72°C durant 10 minuts. Seguidament, les reaccions de seqüenciació es purificaren pel sistema comercial *Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup de Millipore* (veure protocols detallat a l'apartat 11 de l'Annex Mètodes).

La detecció de les seqüències es va realitzar mitjançant electroforesi capil·lar en equips *ABI Prism 3700* i *ABI Prism 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Westerland, Germany) a la Unitat de Genòmica del Parc Científic de Barcelona.

8. ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES

Els electroferogrames obtinguts foren editats, compilats i traduïts a aminoàcids (quan fou necessari) amb el software *BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.1* (Isis Pharmaceutical Inc.) per obtenir la seqüència completa de cadascun dels clons moleculars.

Els alineaments múltiples de les seqüències nucleotídiques i d'aminoàcids es van realitzar mitjançant l'aplicació *ClustalW* implementada en el programa informàtic lliure *MEGA4* ^[268] (<http://www.megasoftware.net>). Posteriorment, els alineaments obtinguts es van editar i corregir manualment per assegurar que la pauta de lectura fos la correcta.

Les seqüències de referència emprades en les diferents anàlisis van ser obtingudes a la base de dades on-line de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). Les seqüències consens de cada població es van generar amb l'aplicació *Consensus Maker* de la mateixa base de dades.

9. ANÀLISIS PROTEIQUES

9.1 GLICOSILACIÓ

El nombre de N-glicosilacions de cada seqüència individual es va calcular en base als llocs potencials de glicosilació NXS i NXT (N=asparagina, X=qualsevol aa, S=serina i T=treonina), mitjançant l'aplicació *N-GlycoSite* de la base de dades on-line de Los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov>).

9.2 NOMBRE i CANVI D'AMINOÀCID

El número d'aminoàcids totals de cada seqüència i el número de posicions mutants respecte la seqüència consens (número de canvis d'aminoàcid) s'han calculat manualment a partir dels alineaments de seqüències aminoacídiques de cada població.

9.3 COMPLEXITAT

La complexitat viral s'ha calculat a partir de les seqüències aminoacídiques de cada població. Les diferents variants virals (i, j, k, etc) de cada població s'han localitzat amb el programa lliure *DAMBE* ^[269] i la freqüència que cadascuna d'elles ocupa dins la població (p_i) s'ha calculat manualment a partir de la fórmula $p_i = (n_i / N)$, on n_i és el número de seqüències de cada tipus que trobem en la població i N és el número total de seqüències.

Pel càlcul de l'entropia com a índex de complexitat, ens hem basat en la fórmula de la teoria de la informació de Shannon i Weaver (1963): $S = -\sum(p_i \ln p_i)$, on p_i és la freqüència de cada tipus de seqüència diferent que trobem en la població (veure paràgraf anterior).

L'entropia normalitzada pel número de seqüències analitzat en cada cas es calcula com: $S_n = S / \ln N$, on N és el nombre total de seqüències que hem obtingut en cadascuna de les poblacions. S_n té uns valors compresos entre 0 i 1, on 0 correspon a la homogeneïtat total de la població i 1 correspon a la màxima complexitat.

9.4 INFERÈNCIA DE LA UTILITZACIÓ DE CORRECEPTOR

Per predir l'ús del coreceptor de cada clon, es va localitzar la regió de 35 aminoàcids corresponent al *loop* V3 en els alineaments de seqüències de cadascun dels pacients de l'estudi. A partir de les seqüències aminoacídiques de V3, i mitjançant comparació de seqüències amb tropisme conegut, es va obtenir una puntuació PSSM (*position-specific scoring matrix; B subtype SI/NSI matrix*, <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/>), a partir de la qual es va inferir el tropisme viral de cada variant ^[270]. Aquesta eina bioinformàtica ha presentat una bona concordança amb els tests fenotípics d'ús de coreceptor del VIH-1 ^[271].

10. ANÀLISIS FILOGENÈTIQUES

La relació filogenètica de totes les seqüències obtingudes de cadascun dels pacients de l'estudi es realitzà utilitzant el software *MEGA4* ^[268] (<http://www.megasoftware.net>). Les matrius de distàncies es van calcular mitjançant el model de dos paràmetres de Kimura i s'utilitzaren com a base per la construcció dels arbres filogenètics mitjançant el mètode del veí més pròxim (*neighbor-joining*). La robustesa estadística dels arbres filogenètics es provà mitjançant un remostratge de 1000 rèpliques ("*bootstrap*") dels alineaments múltiples. Els arbres filogenètics es van editar amb l'aplicació *TreeExplorer* del mateix programa.

Amb aquest procediment també es va realitzar un anàlisi conjunt de totes les seqüències de l'estudi per descartar la contaminació creuada entre les diferents mostres dels pacients.

10.1 DIVERSITAT I DIVERGÈNCIA GENÈTICA

La diversitat i la divergència són la distància genètica mitjana que hi ha entre les seqüències nucleotídiques d'una població (diversitat) o dues poblacions separades en el temps (divergència). La distància genètica és una mesura que ens indica quant diferents són dues seqüències nucleotídiques, o en aquest cas, un grup de seqüències entre elles. Ambdós paràmetres es van calcular utilitzant el software lliure *MEGA4* ^[268] (<http://www.megasoftware.net>). Es va obtenir la distància genètica mitjana i l'error estàndar (SE) mitjançant un remostratge (*bootstrap*) de 1000 rèpliques en cada anàlisi.

10.2 PRESSIÓ SELECTIVA

La presència o absència de pressió selectiva s'ha testat amb el programa *SWAPSC* ^[272] prèvia obtenció dels paràmetres necessaris per aquesta anàlisi amb el software *PALM4.2* ^[273]. Cal remarcar que *SWAPSC* és un mètode conservador a l'hora de detectar selecció positiva d'una població o d'un clon concret, ja que té en compte l'efecte de la selecció positiva sobre la taxa de substitució sinònima. Aquest software calcula la probabilitat que es donin substitucions sinònimes (dS), substitucions no-sinònimes (dN) i la relació entre elles (ω dN/dS) en cada branca de l'arbre filogenètic, obtenint així un valor per cada virus (o grup de virus) relacionat genèticament amb un altre (o altres). Recordem que quan $\omega=1$ les probabilitats que es doni una substitució sinònima (que no produeix canvi d'aminoàcid) o una no-sinònima (que produeix canvi d'aminoàcid) són les mateixes, el que implica una evolució neutra, ja sigui perquè una contrarresta l'altre o bé perquè no hi ha hagut selecció. Quan $\omega>1$,

la probabilitat que es doni una substitució no-sinònima és superior a la que es doni una sinònima, el que comporta una selecció positiva darwiniana. Quan $\omega < 1$, la probabilitat que es doni un canvi sinònim és superior a la que es doni un no-sinònim, implicant una pressió estabilitzadora, el que també es denomina pressió negativa, doncs suposa una evolució més conservadora al llarg del temps del que s'espera. Quan $\omega = 0$, $dN=0$ i $dS>0$, s'entén que hi ha una saturació de substitucions sinònimes en detriment de les no-sinònimes, i quan $\omega = \infty$, $dN>0$ i $dS=0$, es suposa una acceleració de canvis no-sinònims.

11. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES

Tots els càlculs estadístics de les dades obtingudes es van realitzar amb el programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Incorporated). La prova estadística s'indica en cada cas. Les diferències observades entre pacients vacunats i no vacunats, i entre vacunats responedors i no responedors, no obstant, no s'han pogut analitzar estadísticament degut a l'insuficient nombre d'individus en el grup control i en el grup responedor. Davant aquesta limitació, quan ha estat possible, s'han comparat les poblacions dels pacients immunitzats abans i després de la vacunació per saber si aquesta intervenció terapèutica tenia un efecte sobre els diferents paràmetres virals.

RESULTATS

1. DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES

1.1 CÀRREGA VIRAL, TEMPS DE REBROT I CLONS OBTINGUTS

Per dur a terme l'estudi de les poblacions virals d'aquests pacients, es van seleccionar mostres de plasma de cada pacient obtingudes en els tres punts d'interès: la mostra basal (BS) corresponia a la primera mostra de plasma disponible del pacient, abans de rebre cap tipus de tractament antirretroviral; la mostra S1 corresponia al primer STOP, amb una mediana de 8 setmanes sense TARGA en els pacients vacunats i d'11 setmanes en els no vacunats; i la mostra S2 corresponia al segon STOP, amb una mediana 5 setmanes sense TARGA en els pacients vacunats i de 7 setmanes en els pacients no vacunats (Taula 8).

Totes les mostres utilitzades tenien CV detectable i elevada. En els pacients vacunats, la CV mediana va ser de 4.11 log₁₀ cp/mL (IQR 3.94-4.91) en la mostra BS, 4.35 log₁₀ cp/mL (IQR 3.96-4.89) en la mostra S1 i de 4.53 log₁₀ cp/mL (IQR 3.94-4.85) en la mostra S2. En els pacients no vacunats, la CV mediana va ser de 3.48 log₁₀ cp/mL (IQR 2.32-4.46) en la mostra BS, 4.18 log₁₀ cp/mL (IQR 3.17-5.87) en la mostra S1 i de 3.98 log₁₀ (IQR 3.31-4.21) cp/mL en la mostra S2. No va haver diferències en la CV de les mostres de pacients vacunats i pacients control (Taula 8).

	BASAL			STOP 1			STOP 2		
	TR	CV	Clons	TR	CV	Clons	TR	CV	Clons
CASOS									
46	-	4,91	18	7	4,97	20	5	3,60	11
185	-	4,96	9	8	4,94	17	5	4,55	20
262	-	4,54	17	8	4,64	20	9	3,09	18
269	-	4,11	10	8	3,85	10	4	5,30	16
33	-	-	-	12	4,31	20	9	4,90	17
158	-	4,21	18	8	3,89	10	5	3,83	11
168	-	3,94	19	8	4,38	16	5	5,49	15
201	-	4,05	20	6	4,17	17	6	4,51	6
207	-	3,91	11	8	4,73	17	6	4,70	12
213	-	3,10	12	12	4,24	18	10	4,63	20
261	-	4,09	16	11	3,81	12	4	4,47	15
265	-	5,22	15	10	5,86	19	2	4,26	7
<i>Mediana</i>	-	<i>4,11</i>	<i>16</i>	<i>8</i>	<i>4,35</i>	<i>17</i>	<i>5</i>	<i>4,53</i>	<i>15</i>
<i>IQR</i>	-	<i>(3,94-4,91)</i>	<i>(11-18)</i>	<i>(8-10,75)</i>	<i>(3,96-4,89)</i>	<i>(13-19,75)</i>	<i>(4,25-8,25)</i>	<i>(3,94-4,85)</i>	<i>(11-17,75)</i>
CONTROLS									
105	-	3,45	18	2	6,19	11	3	4,15	20
228	-	1,94	17	14	3,08	11	8	4,23	13
282	-	4,78	17	13	3,44	19	6	3,15	13
296	-	3,51	17	9	4,92	18	10	3,81	15
<i>Mediana</i>	-	<i>3,48</i>	<i>17</i>	<i>11</i>	<i>4,18</i>	<i>14,5</i>	<i>7</i>	<i>3,98</i>	<i>14</i>
<i>IQR</i>	-	<i>(2,32-4,46)</i>	<i>(17-17,75)</i>	<i>(3,75-13,75)</i>	<i>(3,17-5,87)</i>	<i>(11-18,75)</i>	<i>(3,75-9,5)</i>	<i>(3,31-4,21)</i>	<i>(13-18,75)</i>

Taula 8 Característiques de les mostres de plasma de cada pacient en el moment Basal, Stop 1 i Stop 2. S'indica la CV (\log_{10} cp/mL) de cada mostra utilitzada i el número de clons virals (o seqüències nucleotídiques) que es van obtenir de cadascuna d'aquestes mostres. En les columnes corresponents a les aturades del tractament s'anota el temps que ha transcorregut (en setmanes) des que es va interrompre el TARGA (TR, temps de rebrot). En cursiva, es mostren les medianes de CV, nombre de clons i temps de rebrot de cada grup de pacients en cada punt d'estudi, i entre parèntesi, el rang inter-quartil (IQR). En negreta es ressalten els pacients amb resposta virològica a la vacunació.

Es va extreure l'ARN viral de les mostres de plasma descrites, es va retrotranscriure i amplificar per nested-PCR un fragment de 650 pb corresponent a la regió C2V5 del gen de l'envolta del VIH-1 (Figura 14). El producte de PCR es va

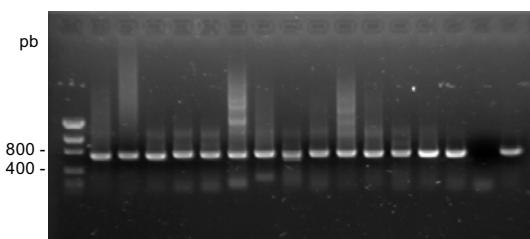


Figura 14 Amplificació del fragment C2V5 del gen *env* del VIH-1 sobre gel d'agarosa 1%. Carril 1: Marcador de pes molecular (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen). Carril 2 a 15: Amplificació del fragment, sobre les mostres 46BS, 269S1, 46S2, 207S2, 261S2, 269S2, 168S2, 185S2, 201S2, 261BS, 269BS, 201BS, 265BS i 265S2. Carril 16: Control negatiu. Carril 17: Control positiu (NL4.3). BS: basal, S1: stop 1, S2: stop 2.

clonar mitjançant un vector comercial en bactèries competents DH5 α . Es va seqüenciar la regió C2V5 del gen de l'envolta viral (*env*) dels diferents clons, obtenint entre 6 i 20 seqüències nucleotídiques per mostra (Taula 8).

1.2 CONTROL DE QUALITAT

Abans d'analitzar les poblacions, es va comprovar que no hi havia hagut contaminació creuada entre pacients deguda a la manipulació de l'elevat nombre de mostres d'aquest estudi. Amb aquest objectiu es va construir un arbre filogenètic amb totes les seqüències virals que s'havien obtingut. Com a control es van incloure les seqüències dels diferents virus de referència que s'utilitzen habitualment en el nostre laboratori (VIH-1_{BaL}, VIH-1_{NL4.3} i VIH-1_{HXB2}).

Les seqüències de cada pacient i de cada virus control es van segregar en *clusters* separats, indicant que no va haver-hi contaminació creuada entre les diferents mostres de l'estudi (Figura 15).

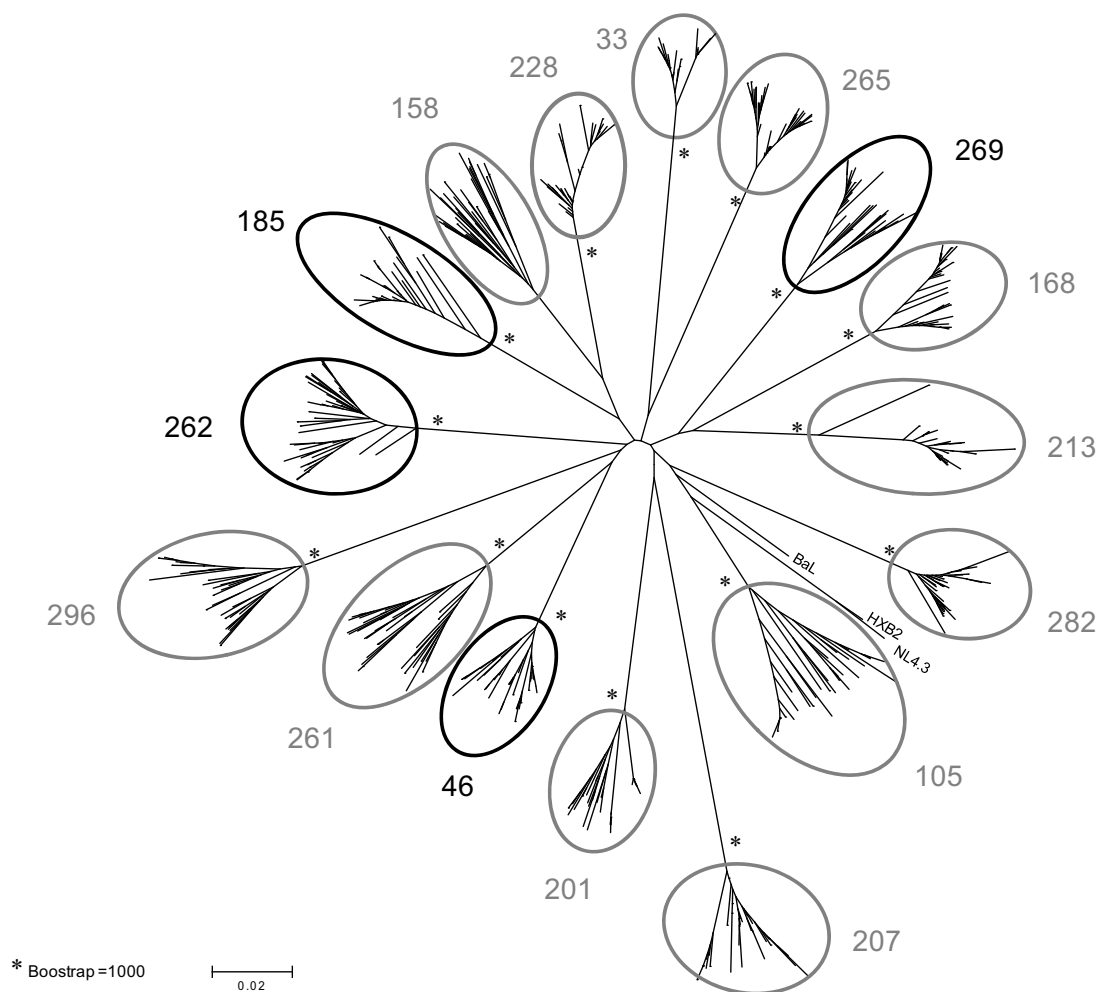


Figura 15 Control de qualitat de les mostres utilitzades a l'estudi. S'ha construït un arbre filogenètic amb totes les seqüències de C2V5 obtingudes i tres virus VIH-1 de referència (BaL, HXB2 i NL4.3). Les seqüències de cada pacient s'han agrupat en *clusters* separats amb un *bootstrap* elevat, el que indica que no hi ha hagut contaminació creuada entre pacients. S'han ressaltat aquests *clusters* amb cercles. En color negre es destaquen els pacients responedors.

2. CARACTERITZACIÓ PROTEICA

Una de les característiques més destacables de la replicació del VIH-1 és l'elevada taxa d'error de la retrotranscriptasa. Aquest enzim introdueix mutacions en el genoma del virus durant la retrotranscripció de l'ARN viral, el que desemboca en una elevada heterogeneïtat, tant genètica com també a nivell de proteïna. Aquest fet és especialment important en l'envolta viral a causa de la seva exposició al sistema immunològic, i pot tenir conseqüències biològiques, com el canvi dels antigens que es presentaran al sistema immunològic o el tropisme viral. En aquest apartat, s'ha caracteritzat l'envolta viral abans i després de la vacunació amb cèl·lules dendrítiques carregades amb virus autòlegs, i s'ha analitzat si aquesta intervenció terapèutica té un efecte sobre aquesta proteïna.

2.1 GLICOSILACIÓ DE C2V5

Un dels mecanismes que té el VIH-1 per escapar a la resposta immunològica humoral és glicosilant les proteïnes més exposades al medi, ja que aquest fenomen pot crear una mena d'escut glicà que impedeixi la unió d'anticossos. L'envolta viral, i concretament la seva regió C2V5, és precisament la proteïna que es troba més exposada al sistema immune, pel que es van analitzar els aminoàcids susceptibles de glicosilació d'aquesta regió en les diferents etapes d'aquest estudi.

L'anàlisi global indicà una elevada heterogeneïtat en el número de glicosilacions de la regió C2V5 de l'envolta viral en les quasiespècies de tots els pacients, en al menys dues de les tres poblacions estudiades: Basal, Stop 1 i Stop 2 (Figura 16A).

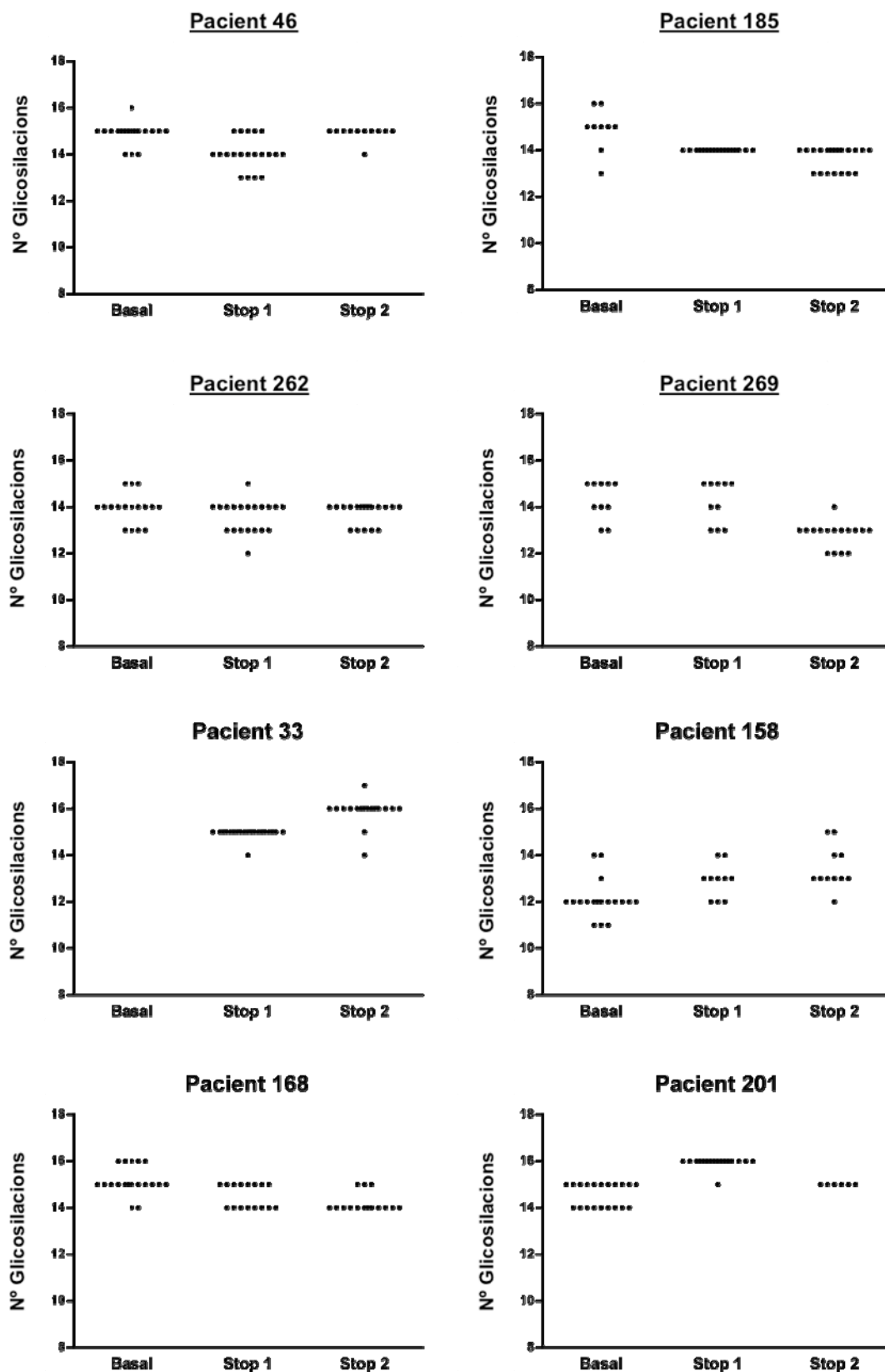


Figura 16A Representació del número de glicosilacions en la regió C2V5 de cada clon viral estudiat de cada pacient en els tres punts d'estudi (Basal, Stop 1 i Stop 2). Els pacients que presentaren resposta virològica a la vacunació s'han subratllat.

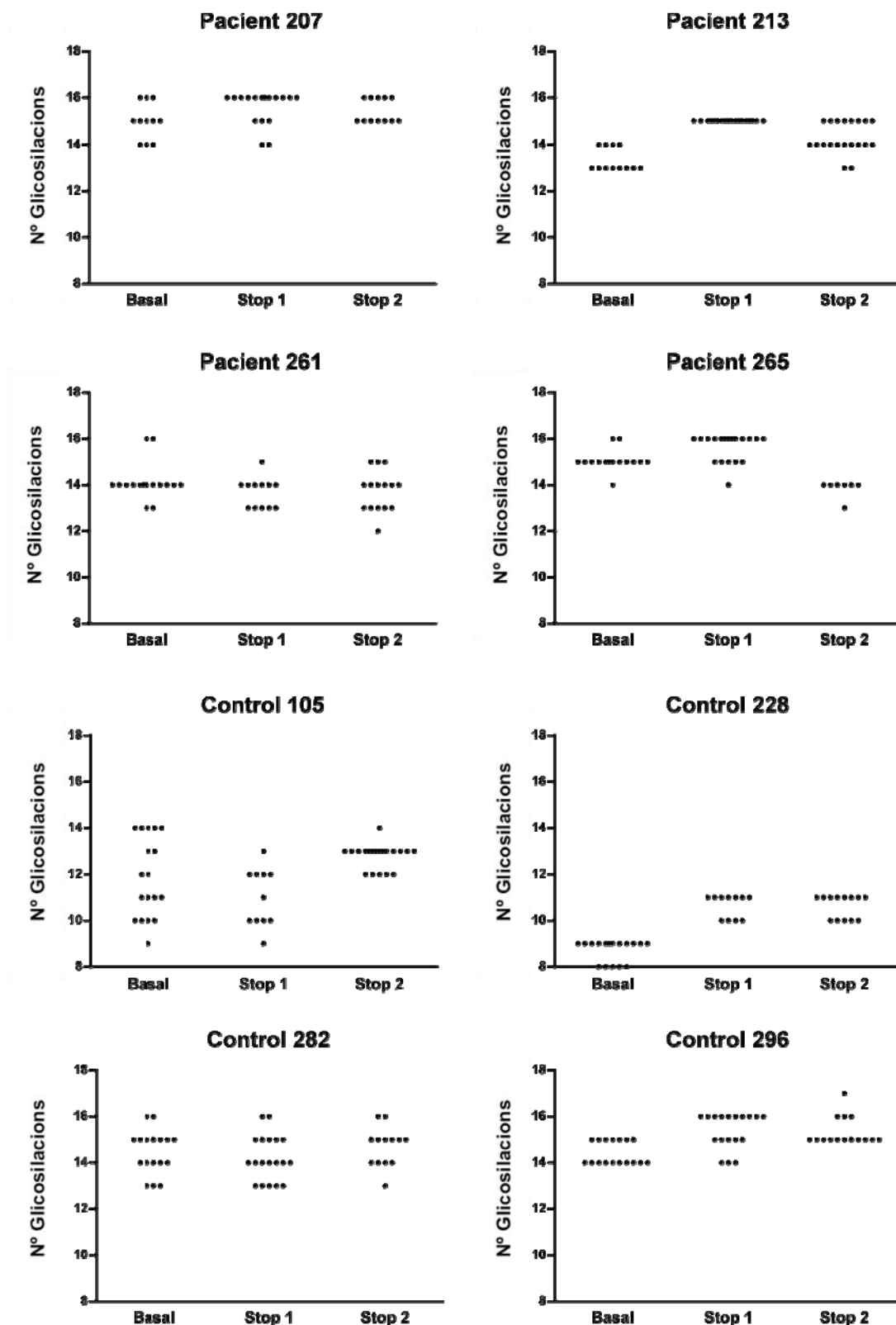


Figura 16A Continuació

En els pacients vacunats, la mediana va ser de 15 glicosilacions en la població basal, 15 en el primer stop i 14 en el segon stop. En els pacients no vacunats, la mediana fou de 13 glicosilacions en la població basal, 13 en el primer stop i 14 en el segon stop (Taula 9).

	BASAL	STOP 1	STOP 2
CASOS			
Mediana (IQR)	15 (11-16)	15 (12-16)	14 (12-17)
Responedors	15 (14-15)	14 (14-14)	14 (13-15)
No Responedors	15 (13-15)	15 (14-16)	14 (14-15)
CONTROLS			
Mediana (IQR)	13 (8-16)	13 (9-16)	14 (10-17)

Taula 9 Número de glicosilacions de la regió C2V5 de l'envolta viral per cada grup de pacient en cadascuna de les poblacions estudiades (Basal, Stop 1 i Stop 2). S'indica la mediana del nombre de glicosilacions per cada grup i el corresponent IQR entre parèntesi.

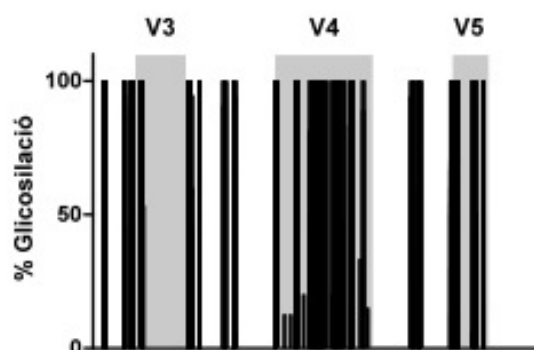


Figura 16B Distribució dels llocs potencials de glicosilació de la regió C2V5 en totes les poblacions de tots els pacients inclosos en l'estudi. Cada barra representa el % de clons d'una població (BS, S1 o S2) que presenten un lloc de glicosilació en la posició corresponent de C2V5. Les regions variables del fragment analitzat es destaquen en sombrejat.

No es van trobar diferències entre pacients vacunats i pacients controls respecte al número de glicosilacions de la regió C2V5 de l'envolta viral, així com tampoc no va haver-hi diferències en la distribució d'aquests llocs de glicosilació entre els diferents pacients (Figura 16B).

Els llocs de glicosilació no es distribuïen homogèniament al llarg de la seqüència de C2V5, sinó que es va observar un enriquiment de llocs de glicosilació, especialment en V4 (Figura 16B). Aquesta distribució dels llocs de glicosilació de C2V5 fou bastant conservada, tant entre pacients, com entre les diferents poblacions analitzades.

2.2 INSERCIÓ I DELECCIÓ A C2V5

Un dels factors que poden influenciar la variabilitat del VIH-1 és l'inserció o deleció de nucleòtids en els seus genomes. Aquest tipus de mutacions, a part que poden desviar el marc de lectura, es tradueixen en un canvi en la longitud de les proteïnes virals. Per conèixer si durant aquesta intervenció terapèutica s'han produït canvis en aquest aspecte, es va calcular el número d'aminoàcids del fragment C2V5 de l'envolta viral de cadascun dels clons que conformaven les tres poblacions d'interès (Basal, Stop 1 i Stop 2).

Es va observar, en tots els pacients, que la longitud de C2V5 variava al llarg del temps, el que indicà que va haver-hi fenòmens d'inserció i depleció d'aminoàcids. També s'observà que la majoria dels virus d'una mateixa població presentaven diferent número d'aminoàcids entre ells; només el 25% de les poblacions estudiades (12/47) tots els virus tenien la mateixa llargada de C2V5, de les quals, 3 són poblacions basals, 2 són poblacions del primer stop i 7 corresponen al segon stop (Figura 17).

En els casos, la longitud mediana de C2V5 de la població basal va ser de 202 aminoàcids, la del stop 1 fou de 204 aminoàcids i la del stop 2 fou de 202 aminoàcids. En els controls, va ser de 203 aminoàcids en la població basal, de 204 aminoàcids en el primer stop i de 203 aminoàcids en el segon stop (Taula 10). En general, en cada pacient, les poblacions amb certs tamanys van anar seleccionant-se en el temps, donant lloc a poblacions de mida més homogènia en el segon stop respecte a la població basal i la del primer stop. Degut que aquesta característica s'observà tant en els vacunats com en els no vacunats, probablement aquest fenòmen de selecció fos degut a les aturades del tractament que per la pròpia vacuna.

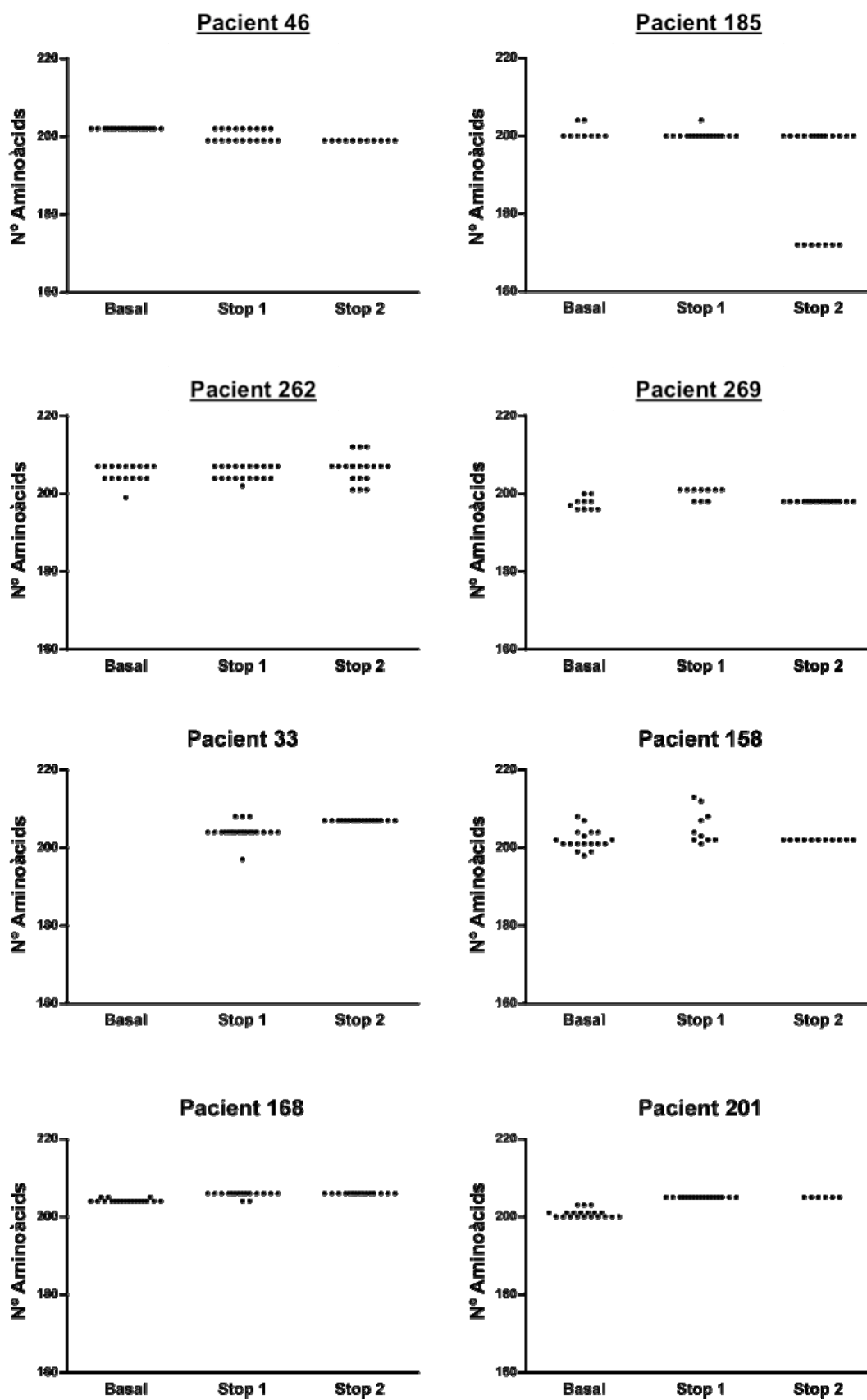


Figura 17 Longitud del fragment C2V5 de l'envolta del VIH-1 (expressat en número d'aminoàcids) de cadascun dels clons analitzats en cada pacient en el moment basal, Stop 1 i Stop 2. Els pacients reponedors a la vacunació es mostren subratllats.

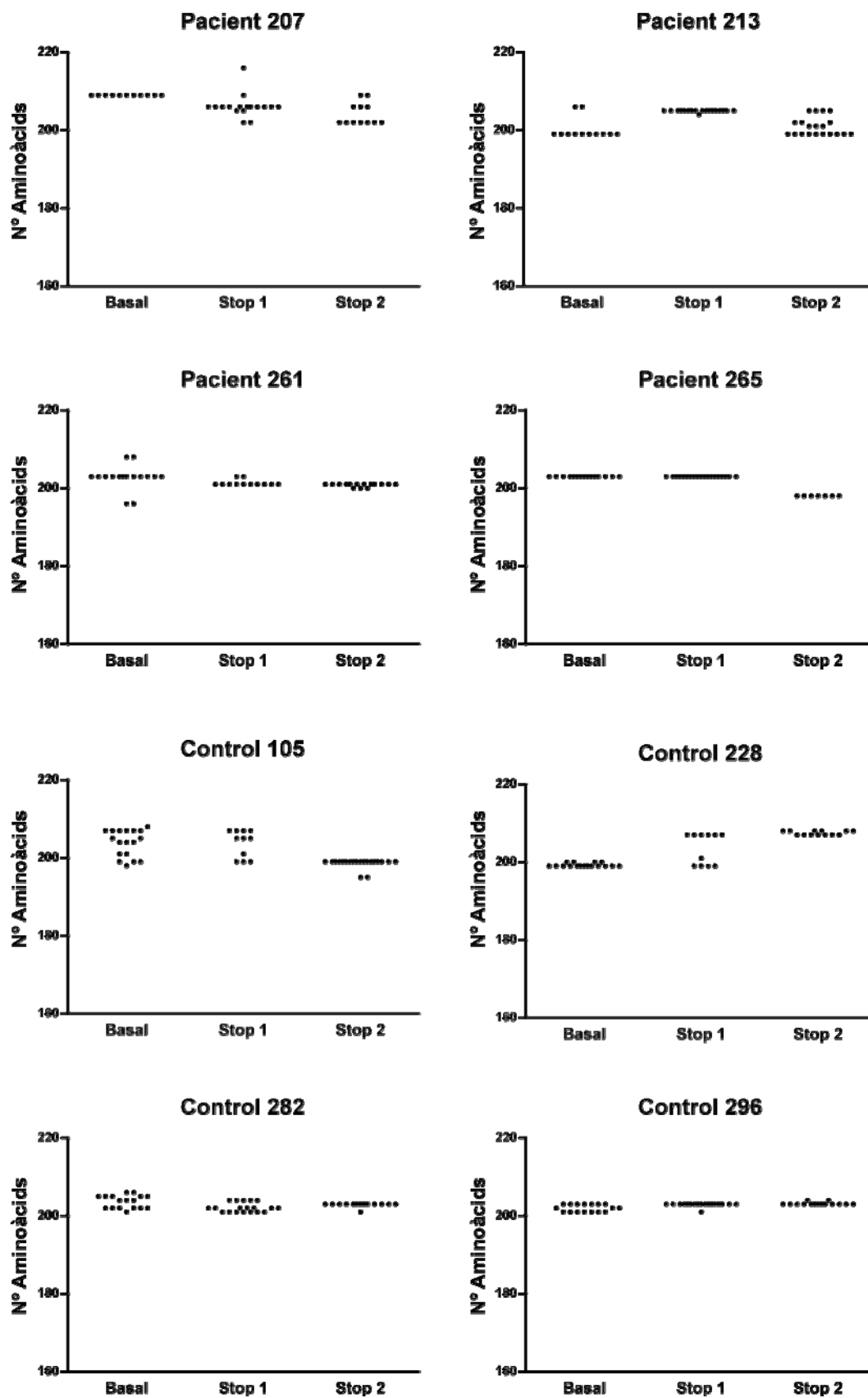


Figura 17 Continuació

	BASAL		STOP 1		STOP 2	
CASOS						
46	202	(202-202)	199	(199-202)	199	(199-199)
185	200	(200-204)	200	(200-204)	200	(172-200)
262	207	(199-207)	206	(202-207)	207	(201-212)
269	198	(196-200)	201	(198-201)	198	(198-198)
33	-	-	204	(197-208)	207	(207-207)
158	201	(198-208)	204	(201-213)	202	(202-202)
168	204	(204-205)	206	(204-206)	206	(206-206)
201	201	(200-203)	205	(205-205)	205	(205-205)
207	209	(209-209)	206	(202-216)	202	(202-209)
213	199	(199-206)	205	(204-205)	200	(199-205)
261	203	(196-208)	201	(201-203)	201	(200-201)
265	203	(203-203)	203	(203-203)	198	(198-198)
CONTROLS						
105	205	(198-208)	205	(199-207)	199	(195-199)
228	199	(199-200)	207	(199-207)	207	(207-208)
282	204	(201-206)	202	(201-204)	203	(201-203)
296	202	(201-203)	203	(201-203)	203	(203-204)
<i>Mediana Casos (IQR)</i>	202	(200-204)	204	(201-205)	202	(199-206)
<i>Responedors</i>	201	(198-206)	201	(199-204)	200	(198-205)
<i>No Responedors</i>	203	(201-204)	205	(203-206)	202	(200-206)
<i>Mediana Controls (IQR)</i>	203	(200-204)	204	(202-207)	203	(200-206)

Taula 10 Longitud de C2V5 (en número d'aminoàcids) de cada pacient en cadascuna de les poblacions estudiades (Basal, Stop 1 i Stop 2). S'indica la mediana de la longitud observada en tots els clons de la població corresponent i entre parèntesi s'apunta la longitud mínima i màxima observada en cada cas. A la part inferior de la taula, en cursiva, s'indica la mediana de la longitud de C2V5 per cada grup de pacients i el rang interquartil (IQR). En negreta es remarquen els pacients que presenten resposta virològica a la vacunació.

2.3 CANVI D'AMINOÀCID

La replicació del VIH-1 implica l'introducció de mutacions, sobretot en proteïnes exposades al sistema immunològic. L'envolta viral, i en especial la regió C2V5, és una de les proteïnes més susceptibles a patir canvis d'aminoàcid degut a la seva localització superficial en la partícula vírica. En aquest estudi s'ha analitzat la freqüència de mutació (o canvis d'aminoàcid) en la regió C2V5 de

l'envolta viral en les diferents etapes, i s'ha avaluat si la vacunació terapèutica hi tenia algun efecte.

El nombre de canvis d'aminoàcid de cada població es va calcular comptant totes les posicions mutades en un o varis clons respecte la seqüència proteica consens de la població (Taula 11). El número de canvis d'aminoàcid no es va relacionar amb la longitud de la seqüència consens corresponent (*Test de Spearman*; $r -0.113$, $p=0.451$, Figura 18).

	BASAL	STOP 1	STOP 2
CASOS			
46	19	27	8
185	35	23	9
262	25	31	26
269	38	26	15
33	-	16	13
158	44	54	32
168	15	28	15
201	29	5	3
207	14	19	21
213	17	12	17
261	29	21	38
265	15	22	5
CONTROLS			
105	58	37	17
228	21	13	14
282	17	13	14
296	27	32	27
<i>Mediana Casos (IQR)</i>	<i>25 (15-35)</i>	<i>23 (17-28)</i>	<i>15 (8-25)</i>
<i>Responedors</i>	<i>30 (21-37)</i>	<i>27 (24-30)</i>	<i>12 (8-23)</i>
<i>No Responedors</i>	<i>17 (15-29)</i>	<i>20 (13-27)</i>	<i>16 (7-29)</i>
<i>Mediana Controls (IQR)</i>	<i>24 (18-50)</i>	<i>23 (13-38)</i>	<i>16 (14-25)</i>

Taula 11 Número d'aminoàcids variables de la regió C2V5 respecte la seqüència consens, en cadascuna de les poblacions d'estudi: Basal, Stop 1 i Stop 2.. En cursiva, es mostren les medianes del nombre d'aminoàcids variables, per grup de pacients, i entre parèntesi, el rang inter-quartil (IQR). En negreta es ressalten els pacients responedors a la vacunació

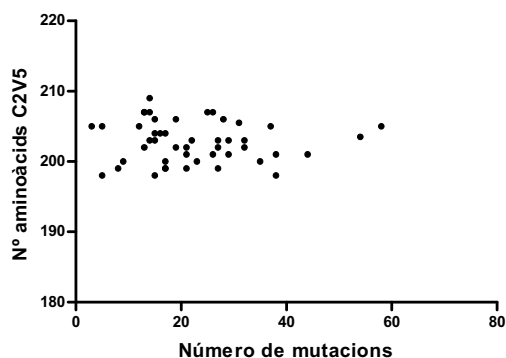


Figura 18 Relació entre número de canvis d'aminoàcid observats i la longitud de C2V5 (en número d'aminoàcids) en cadascuna de les mostres utilitzades en aquest estudi. No existeix correlació entre el nombre de mutacions i el número d'aminoàcids del fragment analitzat (*Test de Spearman*; $r = -0.113$, $p = 0.451$).

En els pacients vacunats, es va trobar una mediana de 25 mutacions en la població basal, 23 en el primer stop i de 15 en el segon stop. En els pacients no vacunats, es van detectar 24 canvis d'aminoàcid en la població basal, 23 en el stop 1 i 16 en el stop 2 (Taula 11).

En el grup de pacients vacunats, s'observà una disminució en el número de mutacions després de la vacunació (en el segon stop), deguda principalment als responedors; encara que no resultà estadísticament significativa (*Wilcoxon signed rank test*; S1-S2 $p=0.071$) i aquesta disminució en el nombre de mutacions també s'observà en els pacients control (Figura 19).

Dins els pacients vacunats, s'observaren certes diferències entre individus responedors i no responedors. En els pacients responedors, el número de canvis d'aminoàcid presentava una disminució al llarg de l'estudi, més acusada, sobretot, després de les vacunacions. En els no responedors, en canvi, el nombre de mutacions, tot i disminuir també en el segon stop, es va mantenir més o menys homogeni al llarg de l'estudi (Taula 11, Figura 19).

El número limitat de pacients analitzats en cada grup, vacunats i controls, no permet concloure que el menor número de canvis observats en les poblacions virals després de la vacuna sigui una conseqüència de la resposta immune induïda per la vacunació.

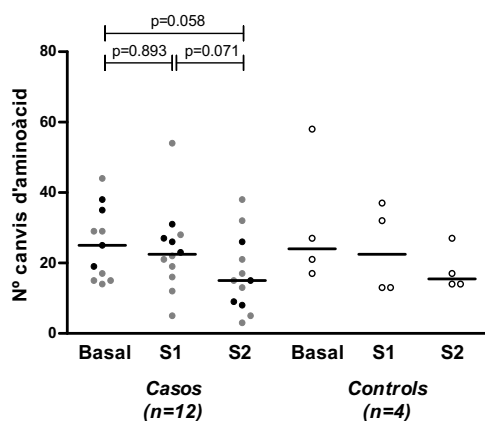


Figura 19 Número de canvis d'aminoàcid en les tres poblacions estudiades (basal, stop 1 i stop2) de cada pacient. En color negre s'han representat els pacients responedors. No s'han vist diferències entre pacients vacunats i pacients control. En els casos, s'observa una disminució en el nombre de mutacions després de la vacunació. No obstant, aquesta disminució no és estadísticament significativa: BS-S1 $p=0.893$; BS-S2 $p=0.058$; S1-S2 $p=0.071$ (Wilcoxon signed rank test).

2.4 COMPLEXITAT VIRAL

El fet que el VIH-1 repliqui amb una alta taxa d'error fa que la composició viral de les poblacions resultants sigui variable en funció del número i freqüència de variants virals que formin aquestes poblacions. En aquest treball s'ha analitzat quina complexitat presentaven les poblacions virals abans i després de rebre la vacunació terapèutica, i si aquesta tenia algun efecte sobre la complexitat viral.

En primer lloc, es va calcular la freqüència que cadascuna de les diferents variants virals ocupaven dins de cada població (p_i), i, a partir d'aquestes dades es va analitzar la complexitat mitjançant el càlcul de l'entropia de Shannon normalitzada (S_n) de cada població, obtenint, d'aquesta manera, un valor únic que permetia quantificar aquesta complexitat.

La complexitat viral fou elevada en tots els pacients. En dos dels pacients vacunats (168, no responedor, i 185, responedora) s'advertia que en el segon stop havia reaparegut una variant del primer stop amb una major freqüència (Figura 20).

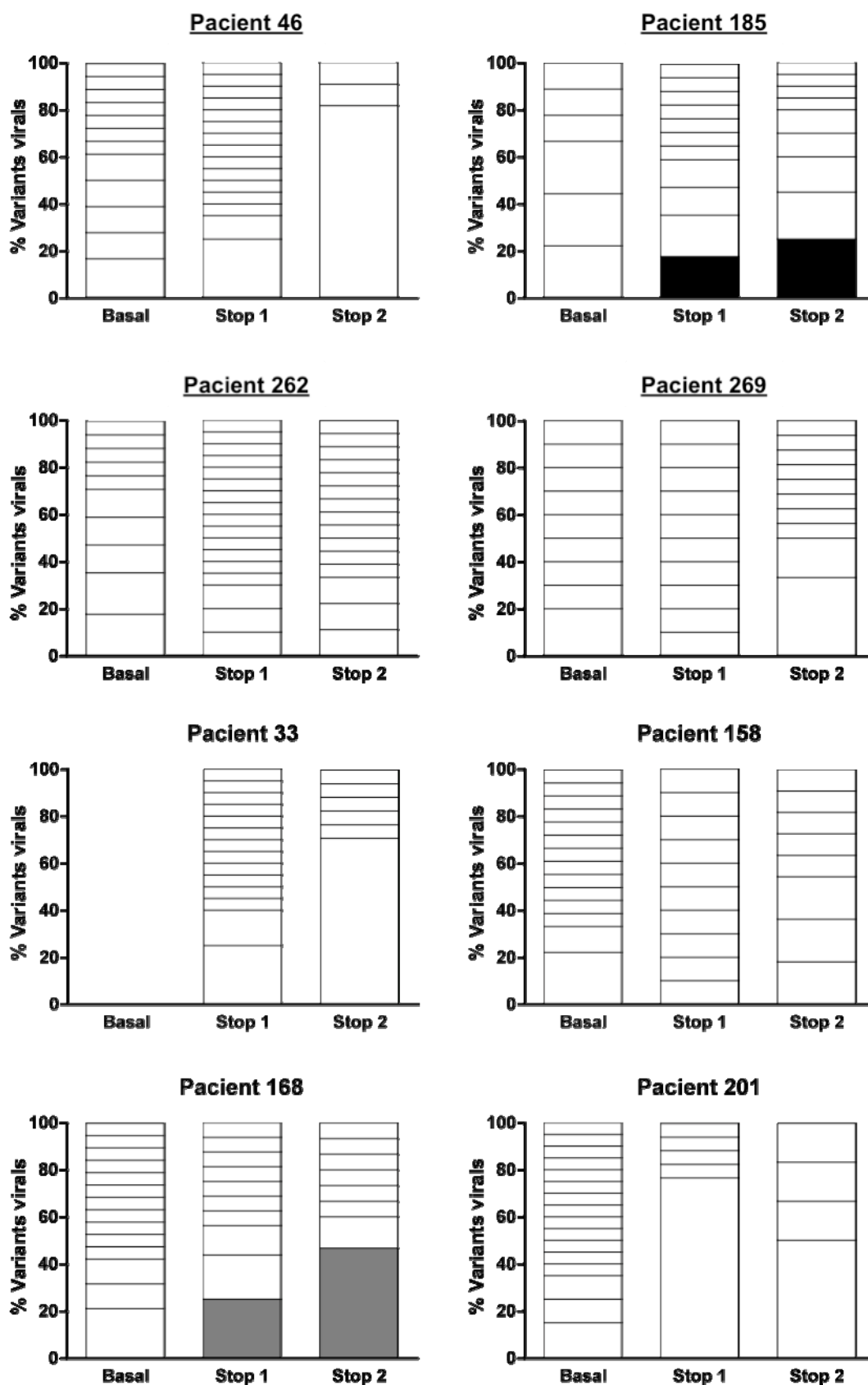


Figura 20 Representació de les diferents variants virals que conformen cada població al llarg de l'estudi (basal, stop 1 i stop 2) segons la freqüència (p , %) que cadascuna d'elles ocupa dins la corresponent població. Cada caixa representa una variant viral diferent (n_i); únicament aquelles que reapareixen es representen en color.

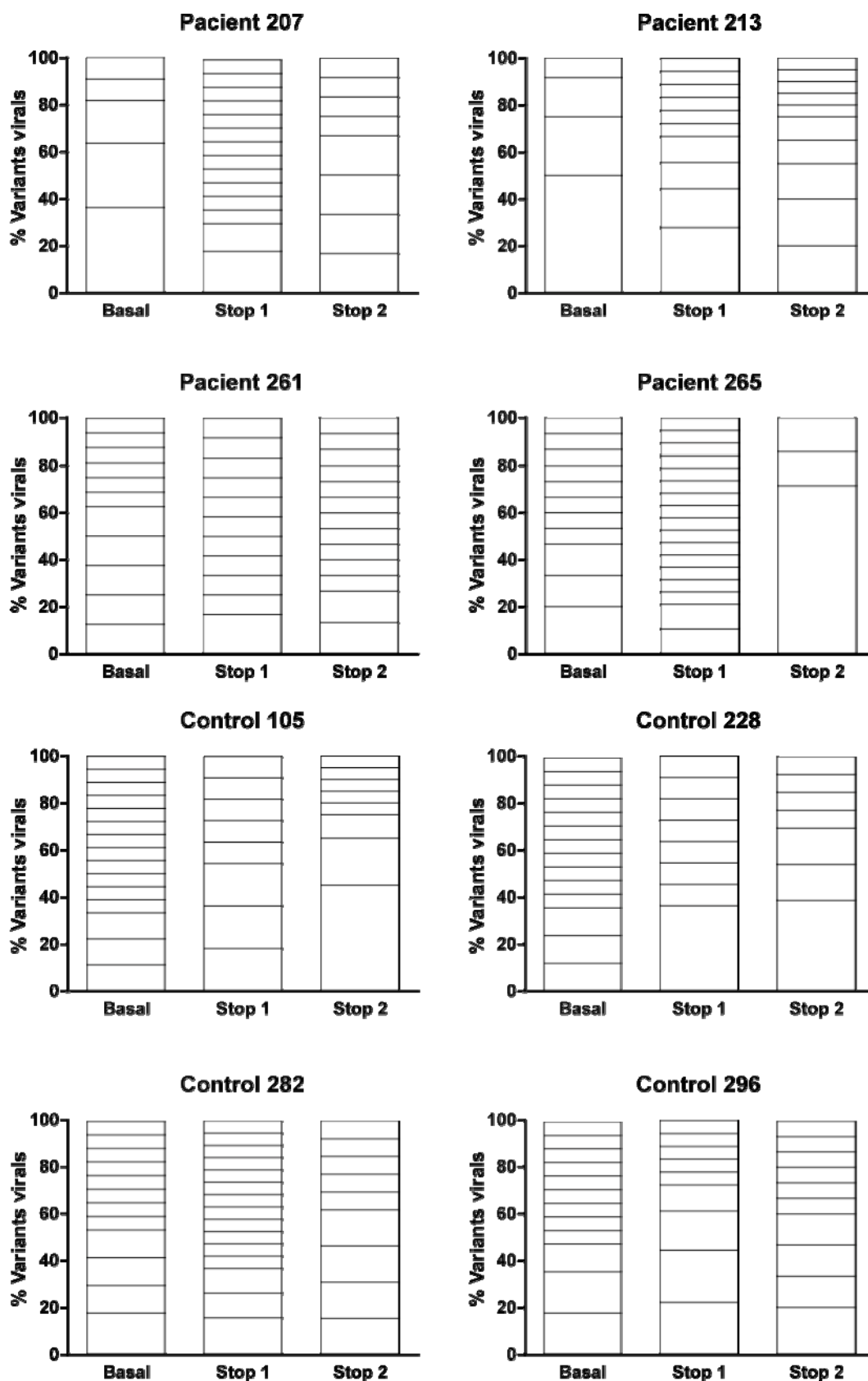


Figura 20 Continuació

La Taula 12 mostra l'entropia de Shannon normalitzada (S_n) com a índex de complexitat de cada població. La S_n té en compte les freqüències d'aparició de cada variant (p_i) així com el número total de variants de la població (n). Un valor $S_n=0$ és indicador d'homogeneïtat total, mentre que $S_n=1$ suposa la màxima complexitat (totes les variants de la població són diferents).

	BASAL	STOP 1	STOP 2
CASOS			
46	0.832	0.843	0.250
185	0.785	0.698	0.672
262	0.778	0.923	0.923
269	0.940	1	0.865
33	-	0.811	0.381
158	0.814	1	0.842
168	0.828	0.769	0.632
201	0.899	0.308	0.694
207	0.612	0.904	0.814
213	0.482	0.730	0.714
261	0.842	0.952	0.934
265	0.852	0.954	0.409
CONTROLS			
105	0.868	0.751	0.504
228	0.915	0.790	0.676
282	0.846	0.894	0.834
296	0.835	0.698	0.718
<i>Mediana Casos (IQR)</i>	<i>0.828 (0.778-0.852)</i>	<i>0.874 (0.740-0.953)</i>	<i>0.704 (0.465-0.859)</i>
<i> Responedors</i>	<i>0.809 (0.780-0.913)</i>	<i>0.883 (0.734-0.981)</i>	<i>0.769 (0.356-0.909)</i>
<i> No Responedors</i>	<i>0.828 (0.612-0.852)</i>	<i>0.858 (0.740-0.954)</i>	<i>0.704 (0.465-0.835)</i>
<i>Mediana Controls (IQR)</i>	<i>0.857 (0.838-0.903)</i>	<i>0.771 (0.711-0.868)</i>	<i>0.697 (0.547-0.805)</i>

Taula 12 Entropia de Shannon normalitzada (S_n) en cadascuna de les poblacions estudiades, Basal, Stop 1 i Stop 2, a partir de les seves seqüències d'aminoàcids. En cursiva s'indica la mediana de la S_n per cada grup de pacient i , entre parèntesi, el rang interquartil (IQR). En negreta s'han remarcat els pacients amb resposta virològica a la vacunació.

S'observà una gran complexitat en totes les poblacions estudiades: en els pacients vacunats, la S_n mediana de la població basal fou de 0.828, en el primer stop, de 0.873 i en el segon stop, de 0.704. En els pacients control, la S_n mediana va ser 0.857 en la població basal, 0.771 en el primer stop, i 0.697 en el segon stop. No es van observar diferències entre pacients vacunats i controls

respecte la S_n de les poblacions ni tampoc entre vacunats responedors i no responedors.

En els pacients vacunats, es va veure una disminució de la S_n després de la vacunació, sent aquesta menor complexitat detectada estadísticament significativa (*Wilcoxon signed rank test*; S1-S2 $p=0.024$). Aquest resultat suggeria que la vacunació podia ser causa de la menor complexitat de les poblacions virals. Tot i així no es pot descartar que aquesta disminució també podia haver sigut deguda al fet d'interrompre dues vegades el tractament, ja que també s'observava en els pacients control (Figura 21).

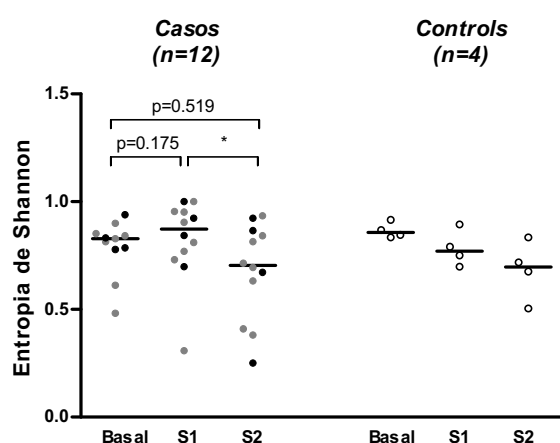


Figura 21 Entropia de Shannon normalitzada (S_n) de cada pacient en el punt basal, stop 1 i stop 2, calculada a partir de les seqüències d'aminoàcids. No es van trobar diferències en la S_n entre pacients vacunats i pacients control. En els casos, s'observà una menor complexitat, estadísticament significativa, després de la vacunació: BS-S1 $p=0.175$; BS-S2 $p=0.519$; S1-S2 $p=0.024$ (*Wilcoxon signed rank test*). En color negre s'han representat els pacients amb resposta virològica. * $p<0.05$.

2.5 TROPISME VIRAL

La variabilitat genètica del VIH-1 té conseqüències en les propietats biològiques de les partícules virals. Una de les més importants és la capacitat de poder infectar diferents tipus cel·lulars, en funció del correceptor cel·lular (CCR5 o CXCR4) que utilitzin aquests virus per entrar a les cèl·lules hoste. La unió del virus amb un o altre correceptor ve condicionada per la seqüència del loop V3 de la proteïna de l'envolta viral, essent, doncs, aquesta regió la que determina el

tropisme viral. En aquest treball hem estimat quin tropisme (R5 o X4) presentaven els virus en cada punt de l'estudi i si el fet de rebre una vacuna terapèutica tenia algun efecte sobre el canvi de tropisme viral.

Les seqüències de la regió V3 obtingudes es mostren a la Figura S1 (Annex Resultats). Tots els virus analitzats en aquest estudi eren de tropisme R5 (predicció d'ús de CCR5 únicament), a excepció de tres virus de la població basal del pacient 296 (no vacunat), que van obtenir una predicció que no descarta l'ús de CXCR4. Aquestes seqüències, no obstant, no van reaparèixer en punts analitzats posteriorment (Figura 22).

Aquestes anàlisis demostren que ni les interrupcions del tractament ni la vacunació provocaven canvi de tropisme R5 a X4 en aquests pacients.

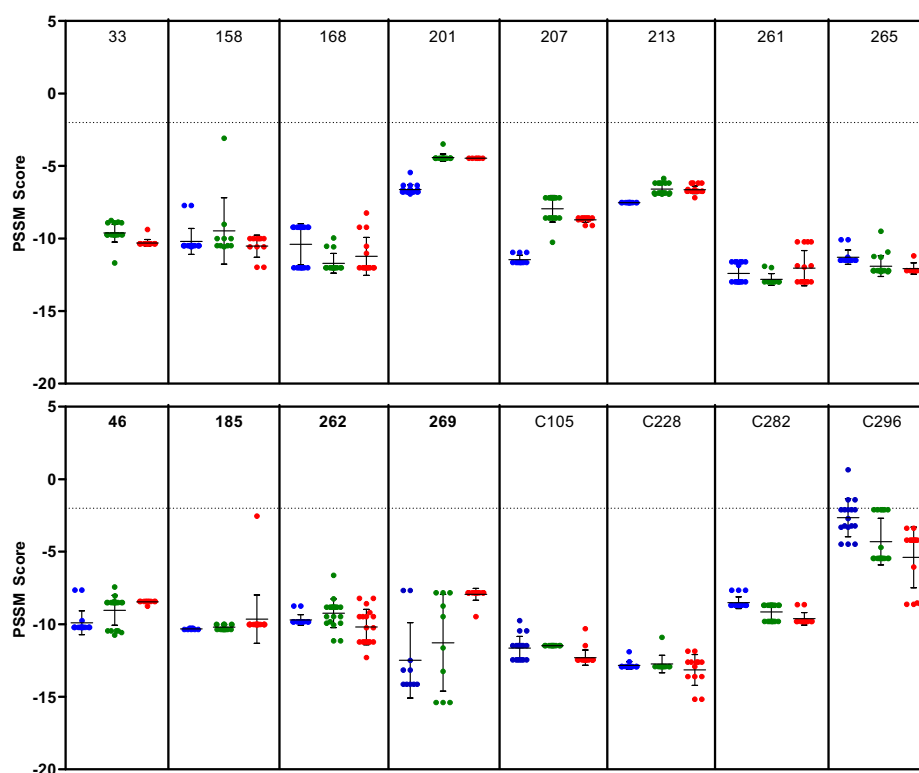


Figura 22 Predicció de l'ús de correceptor per l'alineament les seqüències aminoacídiques del loop V3 segons la matriu de puntuació per posició específica (PSSM, *position-specific scoring matrix*; B subtype SI/NSI matrix, <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/>). Es mostra la puntuació obtinguda per cada clon individual longitudinalment, en el moment basal (punts blaus), en el primer stop (punts verds) i el segon stop (punts vermells) de cada pacient. Les barres indiquen la mitjana i la desviació estàndar. Les puntuacions per sobre -2 aproximadament són predictives del possible fenotip X4. En negreta s'han ressaltat els pacients amb resposta virològica, i els controls amb una C davant el codi del pacient.

3. RELACIÓ FILOGENÈTICA

L'elevada taxa d'error produïda per la retrotranscriptasa del VIH-1 fa que les poblacions virals presentin una considerable variabilitat genètica, el que permet una ràpida adaptació dels virus a canvis ambientals. El gen del VIH-1 que presenta major variabilitat genètica és el gen de l'envolta viral, a causa de la seva exposició al sistema immunològic. Gràcies a aquesta variabilitat és el gen d'elecció per estudiar les relacions filogenètiques que s'estableixen entre els virus d'una o diferents poblacions al llarg del temps. En aquest treball s'ha plantejat com la vacunació amb cèl·lules dendrítiques carregades amb virus autòlegs afectava la relació genètica existent entre els virus obtinguts abans i després d'aquesta intervenció terapèutica.

Per a aquest fi, es van construir els arbres filogenètics a partir de totes les seqüències obtingudes de la regió C2V5 de l'envolta viral de cadascun dels pacients inclosos en l'estudi (Figura 23). Aquests arbres representen, a escala, les distàncies genètiques existents entre tots els virus analitzats, per la qual cosa mostren, d'una manera gràfica, tant la diversitat com la divergència de les poblacions virals. Els valors de *bootstrap* es mostren en la Figura S2 de l'Annex Resultats.

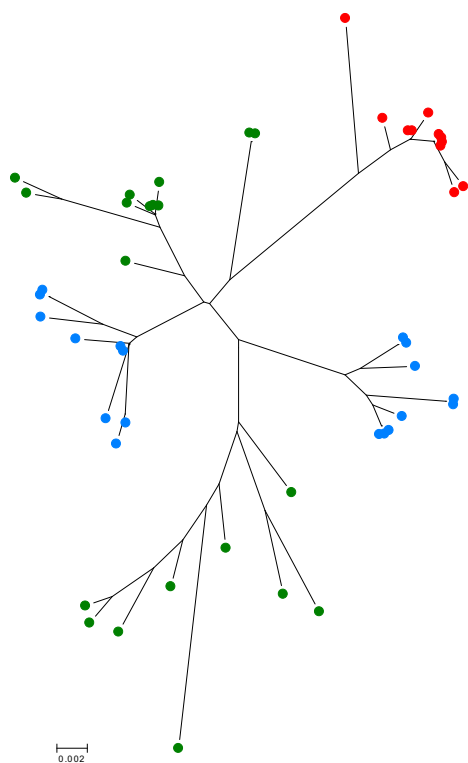
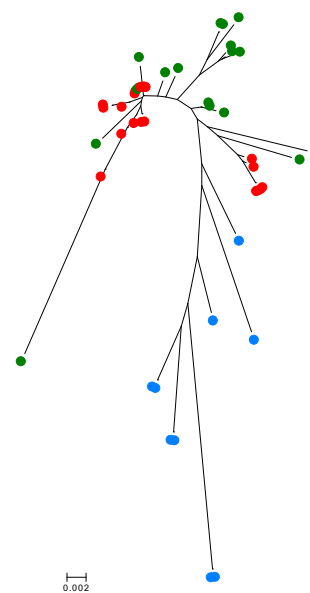
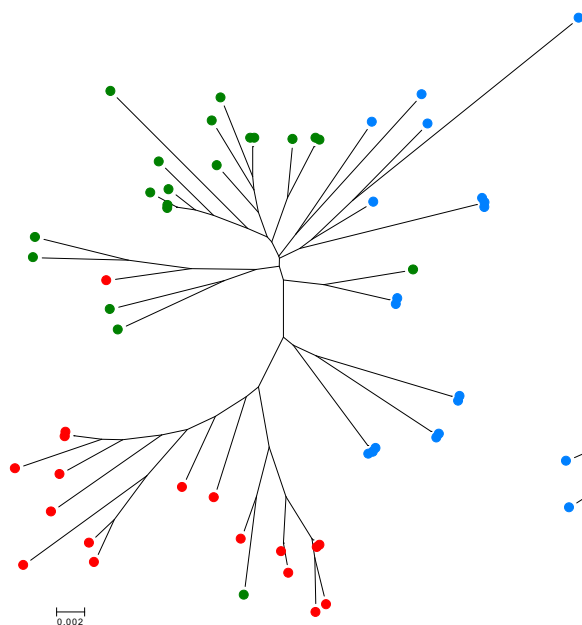
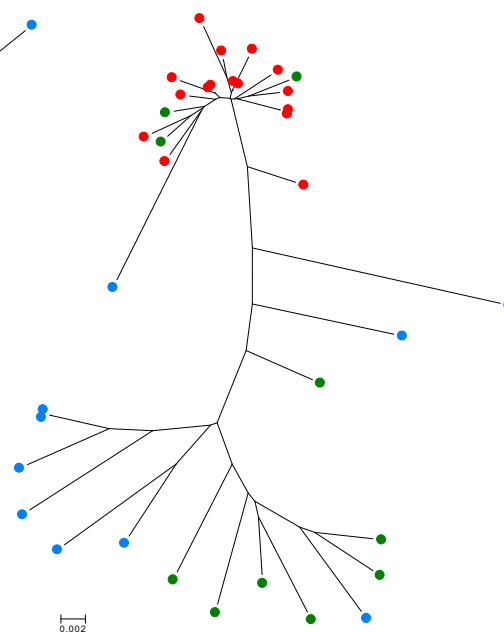
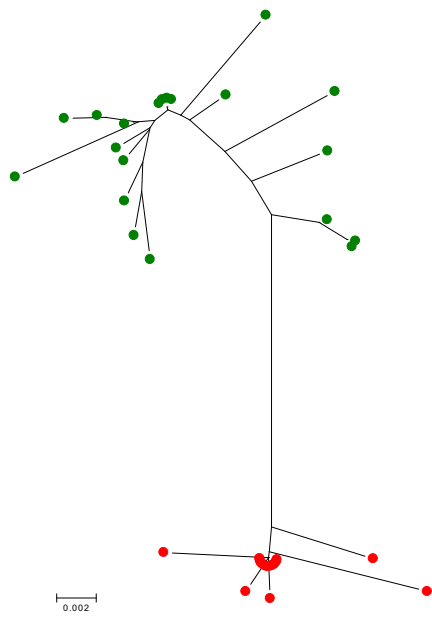
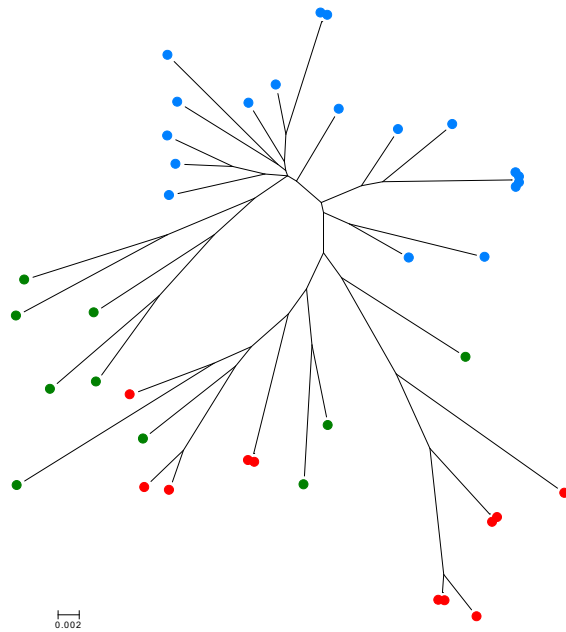
Pacient 46**Pacient 185****Pacient 262****Pacient 269**

Figura 23 Arbres filogenètics consens obtinguts per cadascun dels 16 pacients de l'estudi. Es van analitzar totes les seqüències nucleotídiques de la regió C2V5 de l'envolta del VIH-1 de cada pacient, introduint la matriu de distàncies Kimura dos-paràmetres dins l'algorisme de construcció d'arbres *neighbor-joining*. Per comprovar la consistència dels arbres es va emprar el mètode *bootstrap* de remostreig, realitzant 1000 rèpliques aleatòries de la mostra inicial. Les llargades de les branques s'han representat a escala. En color blau es mostren els clons de la població basal, en verd els corresponents al stop 1 i en vermell els del stop 2. S'han subratllat els pacients responedors.

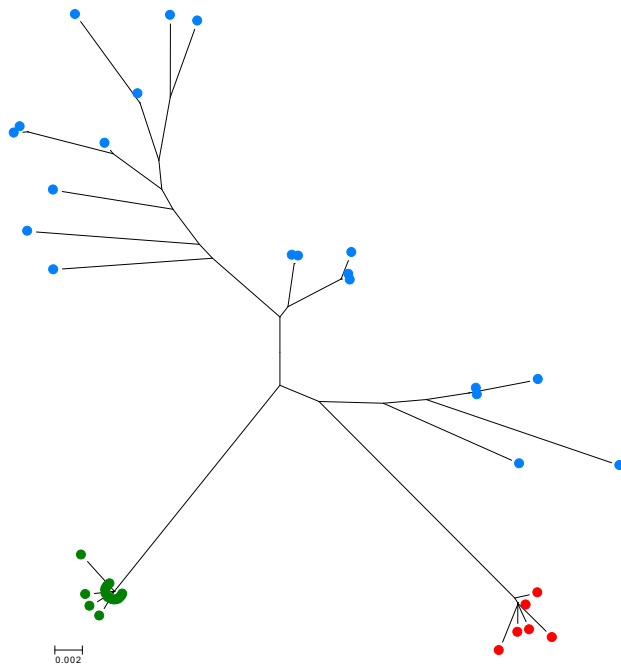
Pacient 33



Pacient 158



Pacient 168



Pacient 201

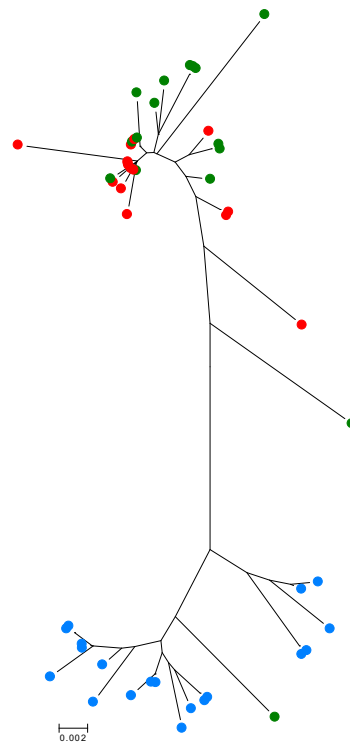
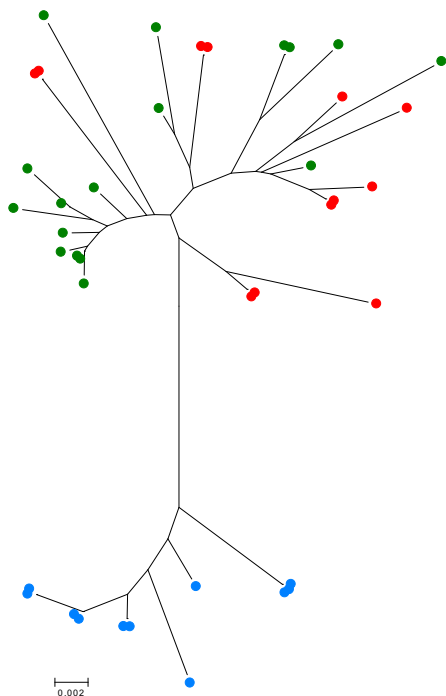
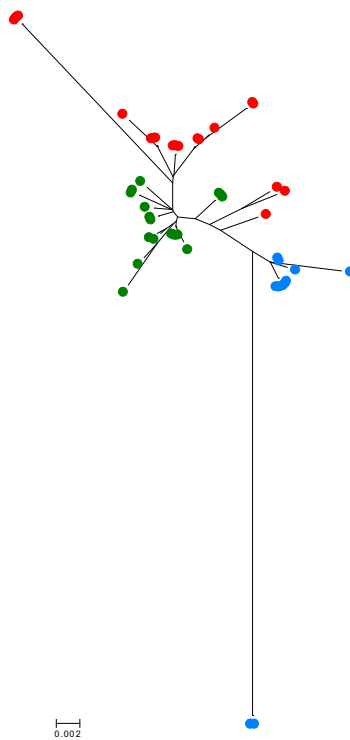


Figura 23 Continuació

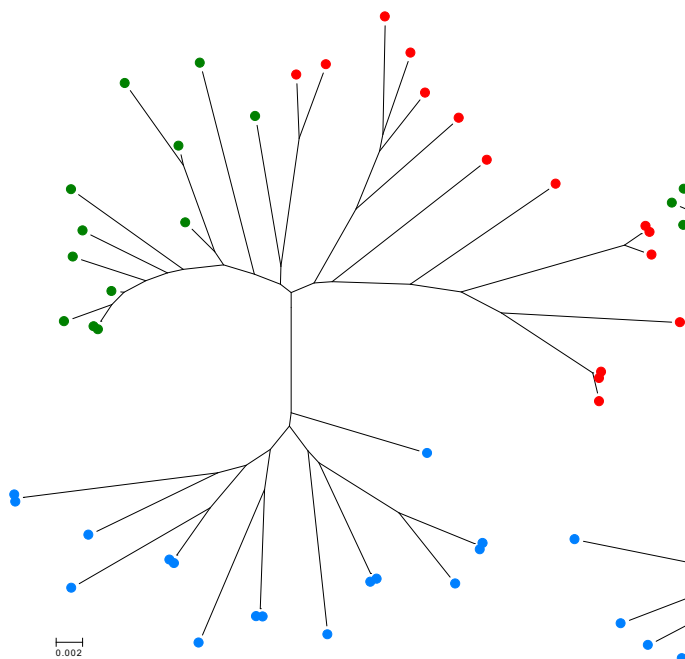
Pacient 207



Pacient 213



Pacient 261



Pacient 265

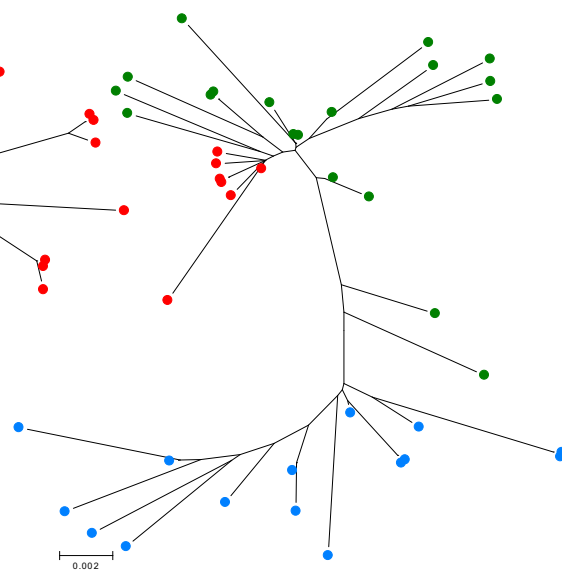


Figura 23 Continuació

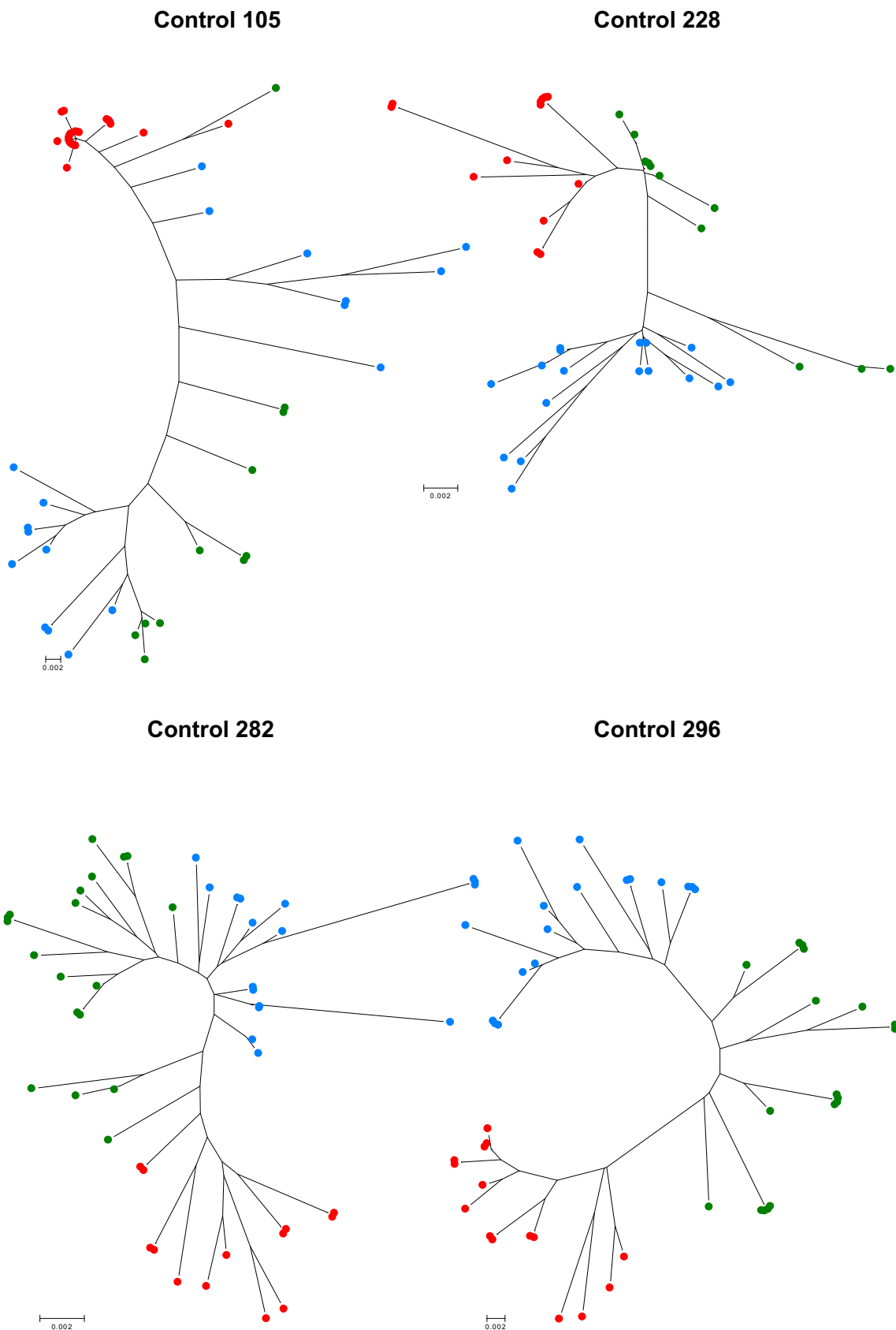


Figura 23 Continuació

3.1 DIVERSITAT GENÈTICA

La diversitat és la varietat d'espècies d'una població, i en funció de com estiguin relacionades genèticament aquestes espècies (o virus, en el nostre cas) tindrem una població més o menys diversa. Si els virus que componen una població es troben molt relacionats genèticament (poca distància genètica), parlem d'una població poc diversa, ja que aquests virus són molt semblants entre ells. Si per contra, aquests virus estan poc relacionats entre ells (molta distància genètica), parlem d'una població amb molta diversitat.

Observant els arbres filogenètics (Figura 23), es van veure diferents tipus de poblacions: unes on tots els virus de la població (o la gran majoria) s'agrupaven en un sol *cluster*, o bé, poblacions que mostraven els seus virus separats en *clusters* diferents:

Els clons de les poblacions S2, post-vacunació, s'agrupaven principalment en un sol *cluster* en tots els pacients (vacunats i control), tot i que en alguns casos, aquest *cluster* fos bastant dispers (pacients 185, 158, 213) o bé tingués alguns clons puntuals aïllats (pacient 207). Aquesta observació indicà una baixa diversitat en el segon stop del tractament en tots els pacients.

Els clons de les poblacions basals apareixien en un o més *clusters* separats. Aproximadament la meitat dels pacients (185, 269, 207, 213, 261, 265, 228, 282 i 296) presentaven un sol *cluster* basal, mentre que l'altra meitat mostrava la població basal segregada en dos *clusters* diferenciats (46, 262, 158, 168, 201, 105); independentment que pertanyessin al grup vacunat o control. El tipus de resposta a la vacunació tampoc no es va relacionar amb aquesta observació de les poblacions basals.

En referència a les poblacions S1 el 75% dels pacients estudiats (12/16) presentaven els virus principalment en sol *cluster* (262, 269, 33, 158, 168, 201, 207, 213, 261, 265, 105 i 296), mentre que el 25% restant (46, 158, 228, 282) presentaven la població S1 dividida en dos *clusters* separats. Aquest fet podia indicar que aquest últim grup de pacients tindrien una població S1 més diversa que la majoria, però s'han de tenir en compte els valors de distància genètica. Per aquest motiu es va calcular la diversitat de cadascuna de les poblacions, és a dir, la distància genètica mitjana entre tots els clons d'una població per poder analitzar les observacions realitzades i comparar la diversitat entre pacients (Taula 13).

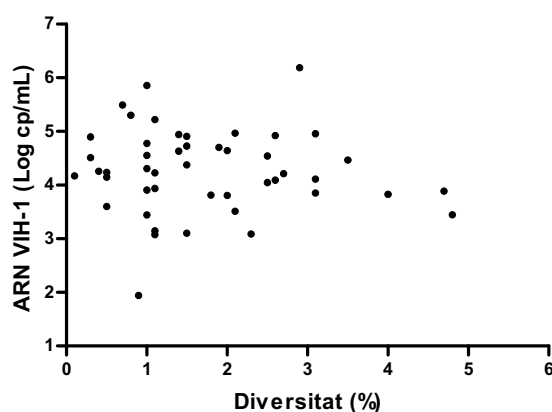


Figura 24 Relació entre la concentració de virus en plasma (CV) i la diversitat genètica observada en cadascuna de les mostres utilitzades en aquest estudi. No existeix correlació entre la diversitat viral i la CV plasmàtica de les mostres analitzades (*Spearman test*; $r = 0.002$, $P = 0.489$).

Es va observar que la diversitat de les poblacions d'aquest estudi no es trobava afectada per la concentració de virus present a la mostra; no es va trobar correlació al relacionar la diversitat amb la càrrega viral corresponent de la mostra (*Test de Spearman*; $r = 0.002$, $P = 0.489$, Figura 24).

En els pacients vacunats, s'observà la màxima diversitat en el moment basal (mediana 2.50%). Aquesta diversitat va anar disminuint al llarg del temps, sent de 1.50% en el primer stop i de 0.90% en el segon stop, tal com s'intuïa en els arbres filogenètics. En els pacients control aquesta disminució no fou tant evident (Taula 13, Figura 25).

	BASAL		STOP 1		STOP 2	
	%	SE	%	SE	%	SE
CASOS						
46	1.50	0.30	2.10	0.40	0.50	0.10
185	3.10	0.40	1.40	0.30	1.00	0.20
262	2.50	0.40	2.00	0.30	2.30	0.40
269	3.10	0.40	3.10	0.40	0.80	0.20
33	-	-	1.00	0.20	0.30	0.10
158	2.70	0.30	4.70	0.50	4.00	0.50
168	1.10	0.20	1.50	0.20	0.70	0.20
201	2.50	0.40	0.10	0.00	0.30	0.10
207	1.00	0.20	1.50	0.30	1.90	0.30
213	1.50	0.30	0.50	0.10	1.40	0.20
261	2.60	0.40	1.80	0.30	3.50	0.50
265	1.10	0.20	1.00	0.20	0.40	0.10
CONTROLS						
105	4.80	0.60	2.90	0.40	0.50	0.10
228	0.90	0.20	1.10	0.30	1.10	0.30
282	1.00	0.20	1.00	0.30	1.10	0.20
296	2.10	0.30	2.60	0.40	2.00	0.30
<i>Mediana Casos (IQR)</i>	<i>2.50</i>	<i>(1.1-2.7)</i>	<i>1.50</i>	<i>(1.0-2.1)</i>	<i>0.90</i>	<i>(0.4-2.2)</i>
<i> Responedors</i>	<i>2.80</i>	<i>(1.7-3.1)</i>	<i>2.05</i>	<i>(1.5-2.8)</i>	<i>0.90</i>	<i>(0.6-2.0)</i>
<i> No Responedors</i>	<i>1.50</i>	<i>(1.1-2.6)</i>	<i>1.25</i>	<i>(0.6-1.7)</i>	<i>1.05</i>	<i>(0.3-3.1)</i>
<i>Mediana Controls (IQR)</i>	<i>1.55</i>	<i>(0.9-4.1)</i>	<i>1.85</i>	<i>(1.0-2.8)</i>	<i>1.10</i>	<i>(0.7-1.8)</i>

Taula 13 Diversitat genètica de les tres poblacions estudiades de cada pacient (basal, stop 1 i stop 2). La diversitat s'ha calculat com la distància genètica (en %) entre els diferents virus de cada població, indicant-se també l'error estàndar (SE) obtingut en cada cas. Es destaquen, en negreta, els pacients amb resposta virològica a la vacunació. A la part inferior de la taula, en cursiva, la mediana de la diversitat genètica i el corresponent IQR de cada grup de pacients.

La diversitat genètica observada en les poblacions dels pacients vacunats es va comparar per saber si la vacunació tenia un efecte sobre la diversitat viral. No es van trobar diferències estadísticament significatives en la diversitat del segon stop (post-vacunació) respecte al primer stop (pre-vacunació) en els pacients vacunats (*Wilcoxon signed rank test*, BS-S1 $P=0.444$; BS-S2 $P=0.240$; S1-S2 $P=0.346$, Figura 25). Amb les dades que disposem, no es pot afirmar que, en general, la disminució de la diversitat genètica observada pugui atribuir-se a la vacunació.

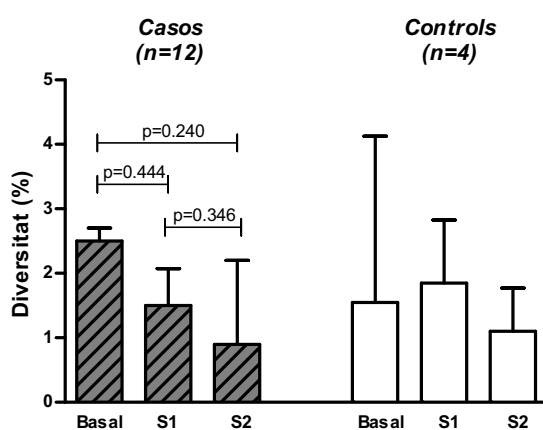


Figura 25 Diversitat genètica dels pacients vacunats (casos) i dels pacients control, en cada punt estudiat. La menor diversitat observada en el segon stop (després de la vacunació) no és estadísticament significativa (*Wilcoxon signed rank test*). Mediana \pm IQR.

La tendència a la disminució de la diversitat genètica s'observà tant en els responedors, com en els no responedors. Els responedors, però, van mostrar una disminució de diversitat al llarg del temps més acusada que els no responedors (Figura 26). En 3/4 pacients responedors la diversitat observada a S2, després de la vacunació amb virus autòleg, va ser menor que l'observada en la quasiespècie S1, amb la qual havien estat vacunats. En els pacients no responedors, aquesta disminució de la diversitat en la quasiespècie del S2 només es va observar en 3/8 pacients d'aquest grup. En 2/4 pacients del grup control també es va observar la disminució de la diversitat de la població S2 respecte l'observada a S1, tot i no haver estat vacunats amb la població viral del S1 (Taula 13).

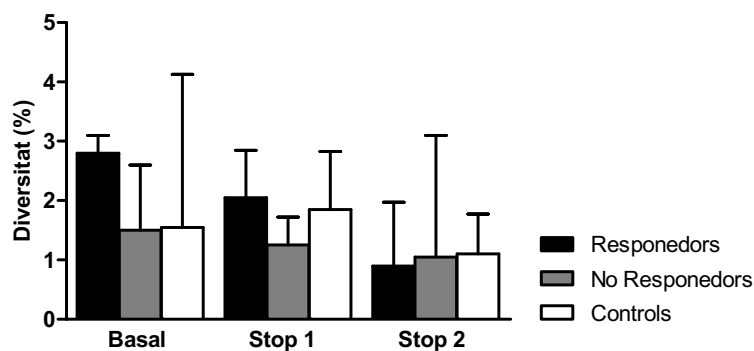


Figura 26 Diversitat observada en els tres punts estudiats: basal, stop 1 i stop 2. Les columnes indiquen la mediana i el IQR de la diversitat en cada grup de pacients. S'observa una disminució de la diversitat al llarg del temps en els dos grup de pacients vacunats (responedors i no responedors). Els pacients control no mostren aquesta disminució progressiva, tot i que també presenten la menor diversitat viral en l'últim punt estudiat. En el moment basal, el grup de responedors obté els valors més elevats de diversitat, mentre que els no responedors i els controls (a excepció del control 105) mostren uns nivells inferiors.

A l'analitzar la disminució de la diversitat en el S2 respecte a la població viral basal, aquesta també fou una mica més acusada en 4/4 pacients responedors, en 4/8 pacients no responedors i en 2/4 pacients del grup control no vacunat (Taula 13).

D'altra banda, els vacunats responedors presentaren uns valors de diversitat més elevats que els no responedors, tant en el moment basal (2.80% vs 1.50%) com en el primer stop (2.05% vs 1.25%). Després de la vacunació, en el segon stop, no es van trobar diferències entre responedors i no responedors, observant-se, en ambdós grups, valors similars i inferiors als valors mostrats anteriorment (0.90% i 1.05%, respectivament). En els pacients control, en canvi, la diversitat no presentava el seu màxim en el moment basal com en els pacients vacunats. La diversitat basal fou de 1.55%, en el primer stop va augmentar a 1.85%, i en el segon stop va disminuir fins a 1.10% (Taula 13, Figura 26).

3.2 DIVERGÈNCIA GENÈTICA

La divergència genètica és la diversitat existent entre poblacions separades en el temps. Per tant, segons com estiguin relacionades genèticament aquestes poblacions tindrem una major o una menor divergència. Quan els virus de dues poblacions es troben molt relacionats genèticament (poca distància genètica entre tots ells), parlem d'una baixa divergència entre aquestes poblacions. Si, contràriament, aquestes poblacions estan poc relacionades genèticament entre elles (molta distància genètica), parlem de poblacions molt divergents.

L'anàlisi individual dels arbres filogenètics per cada pacient (Figura 23) mostrà dos models d'evolució viral diferenciats: en 11/16 pacients inclosos en l'estudi (46, 185, 33, 168, 207, 213, 261, 265, 228, 282 i 296) s'observà una evolució linial de les quasiespècies al llarg del temps, desde la població basal cap al primer stop i d'aquesta cap al segon stop; mentre que en els 5/16 pacients restants (262, 269, 158, 201 i 105) presentaren una evolució no linial. Aquests dos models d'evolució viral observats no estan relacionats ni amb el grup de pacient (vacunat o control) ni amb la resposta del pacient a la vacunació.

Tot i que la tendència de l'evolució viral pot indicar d'una manera intuïtiva com es relacionaven els virus d'un pacient, no demostra quin és l'origen de les poblacions. L'arbre filogenètic és només una representació de les distàncies genètiques que hi ha entre els virus que el componen i, per tant, s'han de tenir en compte aquests valors de distància a l'hora d'analitzar el possible origen o procedència d'una població i no només la representació gràfica de l'arbre.

La divergència genètica es calculà com la mitjana de les distàncies genètiques entre totes les possibles parelles de seqüències de dues poblacions a relacionar: BS-S1, BS-S2 i S1-S2 (Taula 14). S'observà que la divergència entre les poblacions d'aquest estudi podia dependre del temps que ha transcorregut entre elles. No hi havia correlació entre la divergència entre el punt basal i els stops (on havia passat més temps). No obstant, hi havia una correlació negativa entre la divergència observada i el temps transcorregut entre el primer stop i el segon stop (*Spearman test*; $r=0.516$, $p<0.05$, Figura 27).

	BASAL*		STOP 1		STOP 2	
	%	SE	%	SE	%	SE
CASOS						
46	1,4	0,3	2,8	0,4	3,1	0,6
185	2,7	0,4	4,2	0,6	3,9	0,6
262	2,4	0,3	3,0	0,4	3,4	0,5
269	2,8	0,4	3,7	0,5	4,3	0,6
33						
158	2,6	0,4	4,5	0,5	5,2	0,6
168	1,1	0,2	4,1	0,7	4,3	0,7
201	2,4	0,4	4,1	0,6	4,1	0,6
207	0,9	0,2	3,6	0,6	3,6	0,6
213	1,3	0,2	2,0	0,4	2,2	0,4
261	2,4	0,3	4,3	0,6	4,6	0,5
265	1,0	0,2	2,0	0,4	1,7	0,4
CONTROLS						
105	4,5	0,5	4,9	0,5	6,1	0,8
228	0,9	0,2	1,7	0,4	2,3	0,5
282	0,9	0,2	1,3	0,3	1,8	0,4
296	2,0	0,3	4,1	0,5	6,0	0,7
<i>Mediana Casos (IQR)</i>	2,6	(1,1-2,6)	3,7	(2,8-4,2)	3,9	(3,1-4,3)
<i>Responedors</i>	2,6	(1,1-2,8)	3,3	(2,8-4,1)	3,7	(3,2-4,2)
<i>No Responedors</i>	1,3	(1,0-2,4)	4,1	(2,0-4,3)	4,1	(2,2-4,6)
<i>Mediana Controls (IQR)</i>	1,4	(0,9-3,9)	2,9	(1,4-4,7)	4,2	(1,9-6,1)

Taula 14 Divergència genètica observada en les diferents poblacions estudiades de cada pacient (basal*, stop 1 i stop 2) respecte la població basal. La divergència s'ha calculat com la distància genètica (en %) entre els diferents virus de dues poblacions, indicant-se també l'error estàndar (SE) obtingut en cada cas. Es destaquen, en negreta, els pacients amb resposta virològica a la vacunació. En la part inferior de la taula es mostra la mediana (IQR) del % de divergència observat en els casos (responedors i no responedors) i en els controls. * La divergència basal és intrapoblacional, ja que està calculada amb les seqüències del mateix punt.

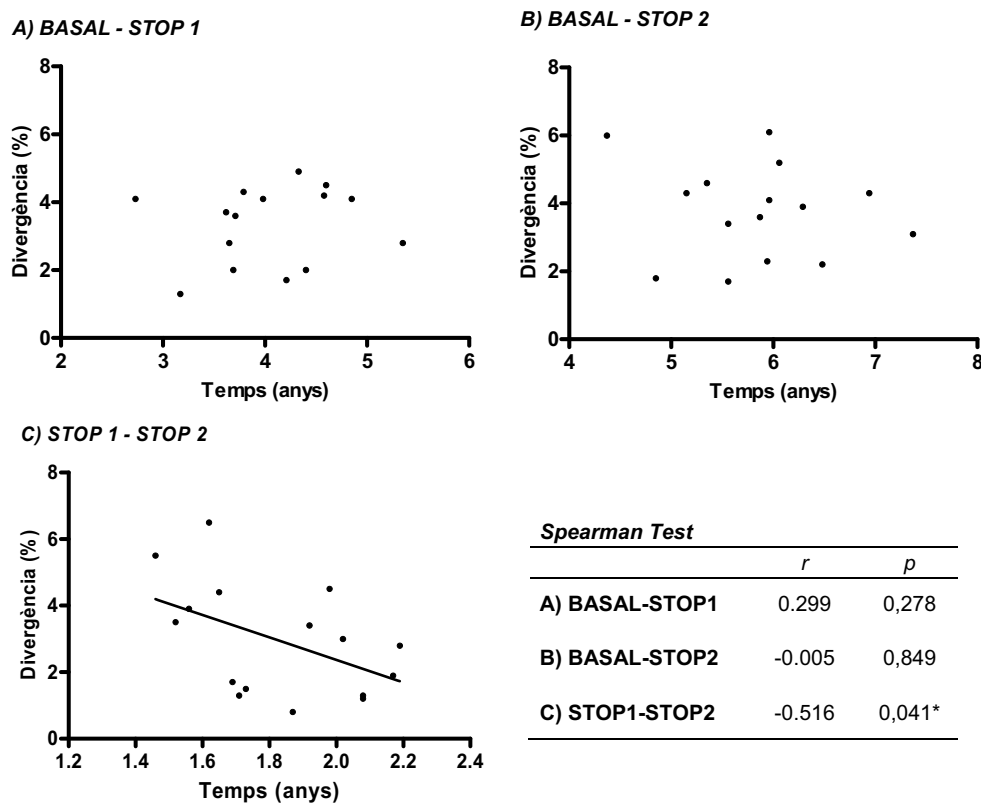


Figura 27 Relació entre la divergència genètica observada entre les diferents poblacions i el temps transcorregut entre cadascuna d'elles. Existeix una correlació significativa entre la divergència viral i el temps transcorregut entre el primer i el segon stop (*Spearman test*; $r = -0.516$, $* p < 0.05$).

En els pacients vacunats, la divergència en el primer stop incrementà significativament respecte el moment basal (3.7% vs 2.6%, *Wilcoxon signed rank test*, $p=0.001$). En el segon stop, després de la vacunació, la divergència també es va mantenir elevada significativament respecte el punt basal (3.9% vs 2.6%, *Wilcoxon signed rank test*, $p=0.001$). No obstant, la vacunació no semblava afectar a la divergència de les poblacions virals respecte el moment basal, ja que no es van observar diferències entre la divergència en el primer i en el segon stop (*Wilcoxon signed rank test*, $p=0.123$).

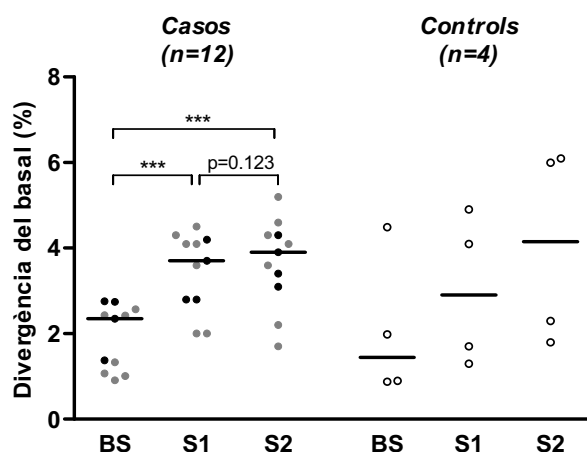


Figura 28 Canvis al llarg del temps en la divergència genètica respecte el moment basal, en pacients vacunats i pacients control. Els cercles de color negre corresponen als vacunats responedors, els de color gris als vacunats no responedors i els cercles oberts als pacients control. La divergència respecte el punt basal augmenta significativament en el primer i el segon stop en els pacients vacunats. Els controls presenten una tendència similar, no obstant no s'ha pogut analitzar estadísticament per manca de pacients en aquest grup. Wilcoxon signed rank test; ***, $p < 0.001$

que aquestes diferències no es van comprovar estadísticament per manca d'individus en aquest grup (Taula 14, Figura 28).

Per analitzar la divergència del segon stop respecte el primer, es va calcular la taxa de divergència (TD). Es va dividir cada valor de divergència obtingut entre les diferents poblacions (BS-S1, BS-S2 i S1-S2) pel temps (en anys) transcorregut en cada cas. D'aquesta manera s'evità la influència del temps en la comparativa, ja que, la divergència correlacionava amb el temps entre el primer i el segon stop (Taula 15).

L'increment de la divergència en ambdós stops respecte el punt basal es va donar tant en els pacients responedors com en els no responedors (Taula 14, Figura 28). En els pacients que no van ser vacunats, la divergència respecte el punt basal també augmentà en el primer i el segon stop (2.9% i 4.2%, respectivament), tot i

	B A S A L – S T O P 1		B A S A L – S T O P 2		S T O P 1 – S T O P 2	
	Temps (anys)	TD (% anual)	Temps (anys)	TD (% anual)	Temps (anys)	TD (% anual)
CASOS						
46	5.6	0.52	7.4	0.42	2.0	1.49
185	4.6	0.92	6.3	0.62	1.7	0.76
262	3.7	0.77	5.6	0.61	1.9	1.77
269	3.6	1.02	5.2	0.84	1.5	2.30
33					2.2	1.28
158	4.6	0.98	6.1	0.86	1.5	3.77
168	4.9	0.84	6.9	0.62	2.1	0.58
201	4.0	1.03	6.0	0.69	2.0	2.27
207	3.7	0.97	5.9	0.61	2.2	0.88
213	4.4	0.32	6.5	0.25	2.1	0.62
261	3.8	1.13	5.4	0.86	1.6	2.50
265	3.7	0.54	5.6	0.31	1.9	0.43
CONTROLS						
105	4.3	1.13	6.0	1.03	1.6	4.00
228	4.2	0.40	5.9	0.39	1.7	0.87
282	3.2	0.41	4.9	0.37	1.7	1.01
296	2.7	1.50	4.4	1.37	1.7	2.67
<i>Mediana Casos (IQR)</i>	<i>4.0 (3.7-4.6)</i>	<i>0.92 (0.32-1.02)</i>	<i>6.0 (5.6-6.5)</i>	<i>0.62 (0.42-0.84)</i>	<i>2.0 (1.6-2.1)</i>	<i>1.38 (0.66-2.29)</i>
<i>Responedors</i>	<i>4.1 (3.1-5.2)</i>	<i>0.84 (0.58-1.00)</i>	<i>5.9 (5.3-7.1)</i>	<i>0.62 (0.47-0.78)</i>	<i>1.8 (1.6-2.0)</i>	<i>1.63 (0.94-2.47)</i>
<i>No Responedors</i>	<i>4.0 (3.7-4.6)</i>	<i>0.97 (0.54-1.03)</i>	<i>6.0 (5.6-6.5)</i>	<i>0.62 (0.31-0.86)</i>	<i>2.0 (1.6-2.1)</i>	<i>1.08 (0.59-2.44)</i>
<i>Mediana Controls (IQR)</i>	<i>3.7 (2.8-4.3)</i>	<i>0.77 (0.41-1.41)</i>	<i>5.4 (4.5-6.0)</i>	<i>0.71 (0.38-1.28)</i>	<i>1.7 (1.6-1.7)</i>	<i>1.84 (0.90-1.84)</i>

Taula 15 Taxa de divergència genètica (TD) entre les tres poblacions estudiades de cada pacient (basal-stop 1, basal-stop 2 i stop 1-stop 2). La TD s'ha calculat com la distància genètica entre els virus de dues poblacions dividida pel temps transcorregut entre elles (% per any). Es destaquen, en negreta, els pacients amb resposta virològica a la vacunació. En cursiva, la mediana de la TD i el corresponent IQR de cada grup de pacients.

En els pacients vacunats, la taxa de divergència mediana entre S1-S2 fou significativament superior que entre BS-S1 (1.38 vs 0.92% per any, respectivament; *Wilcoxon signed rank test*, $p=0.042$). Per tant, els virus vacunals (S1) estaven més relacionats amb els virus basals (BS) que amb els virus que aparegueren després de la vacunació (S2). A més, la taxa de divergència entre S1-S2 també va ser significativament superior a l'observada entre BS-S2 (1.38 vs 0.62% per any; *Wilcoxon signed rank test*, $p=0.001$), el que indicava que els virus S2 també estaven més relacionats genèticament amb els virus BS que amb els S1. No obstant, la relació dels virus S2 amb els BS era més propera que la dels virus S1 amb els BS, doncs la taxa de divergència entre BS-S2 fou significativament menor que l'observada entre BS-S1 (0.62 vs 0.92% per any; *Wilcoxon signed rank test*, $p=0.002$) (Taula 15, Figura 29). Aquestes diferències en les TD es donaren tant en individus responedors com en no responedors (Taula 15).

En els pacients control, s'observà un comportament en la taxa de divergència similar al dels pacients vacunats. En aquest grup, la TD mediana entre BS-S1 va ser de 0.77% per any, entre BS-S2 és de 0.71% per any i entre S1 i S2 és de 1,84% per any (Taula 15, Figura 29).

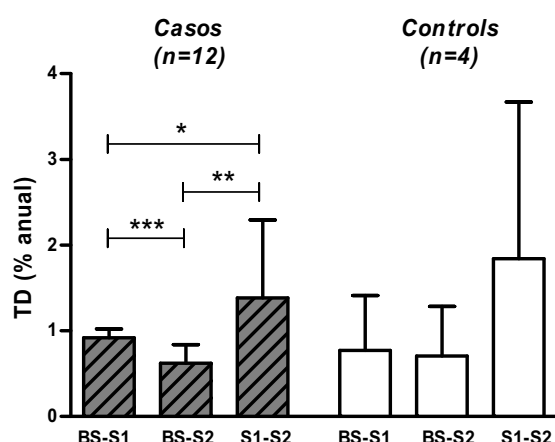


Figura 29 Relació genètica dels virus dels diferents punts estudiats en els pacients vacunats i en els control. En els casos, la divergència entre els virus basals (BS) i els del primer stop (S1) és major que la divergència entre els virus BS i els del segon stop (S2). Per altra banda, la divergència entre els virus BS i els virus S1 és inferior que l'observada entre els virus S1 i els S2, i la divergència entre els virus BS i els S2 és significativament inferior a la divergència entre els virus S1 i S2. Aquests resultats indiquen que, en els pacients vacunats, els virus dels dos stops estan més relacionats amb els virus basals que entre ells (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; *Wilcoxon signed rank test*). Mediana + IQR. TD taxa de divergència.

3.3 PRESSIÓ SELECTIVA

Les poblacions del VIH-1 són susceptibles als canvis ambientals, ja sigui els exercits per la resposta immune o per la teràpia antirretroviral. Donat que la vacunació terapèutica es basa en la reactivació de la resposta immunològica específica, aquesta intervenció pot suposar un coll d'ampolla sobre les poblacions virals. En aquest apartat s'ha analitzat si aquesta vacuna terapèutica ha estat prou potent com per generar una pressió selectiva sobre les poblacions virals i provocar canvis en aquestes, concretament sobre la regió C2V5 de l'envolta viral.

Es va analitzar la pressió selectiva que es dóna en cadascuna de les branques de l'arbre filogenètic obtingut de cada pacient (Figura 23) generant, en primer lloc, una simulació on l'evolució viral seria neutra i comparant-la amb l'arbre del pacient. Cap dels individus de l'estudi va presentar selecció positiva. D'altra banda, s'observà que la majoria d'individus de l'estudi (vacunats: 262, 269, 33, 158, 207, 213; controls: 105, 228, 296) presentaven una evolució neutra en totes les branques, és a dir, els seus virus no es trobaven sota cap tipus de pressió selectiva, per tant, ni la vacunació ni les aturades del tractament no han provocat els canvis observats. A més, els individus vacunats 46, 185, 168, 201, 261, 265 i el control 282 mostraven selecció negativa en alguna de les seves branques (Figura 27). Això indicava que alguns dels seus virus presentaven una evolució més conservada de l'esperat, ja que el nombre de substitucions no-sinònimes era inferior a l'esperada en una evolució neutra. Els pacients 201 i 261 (no responedors) també mostraren acceleració de canvis no-sinònims en certes branques, no obstant aquest fenomen no es va associar a una població viral d'un temps concret.

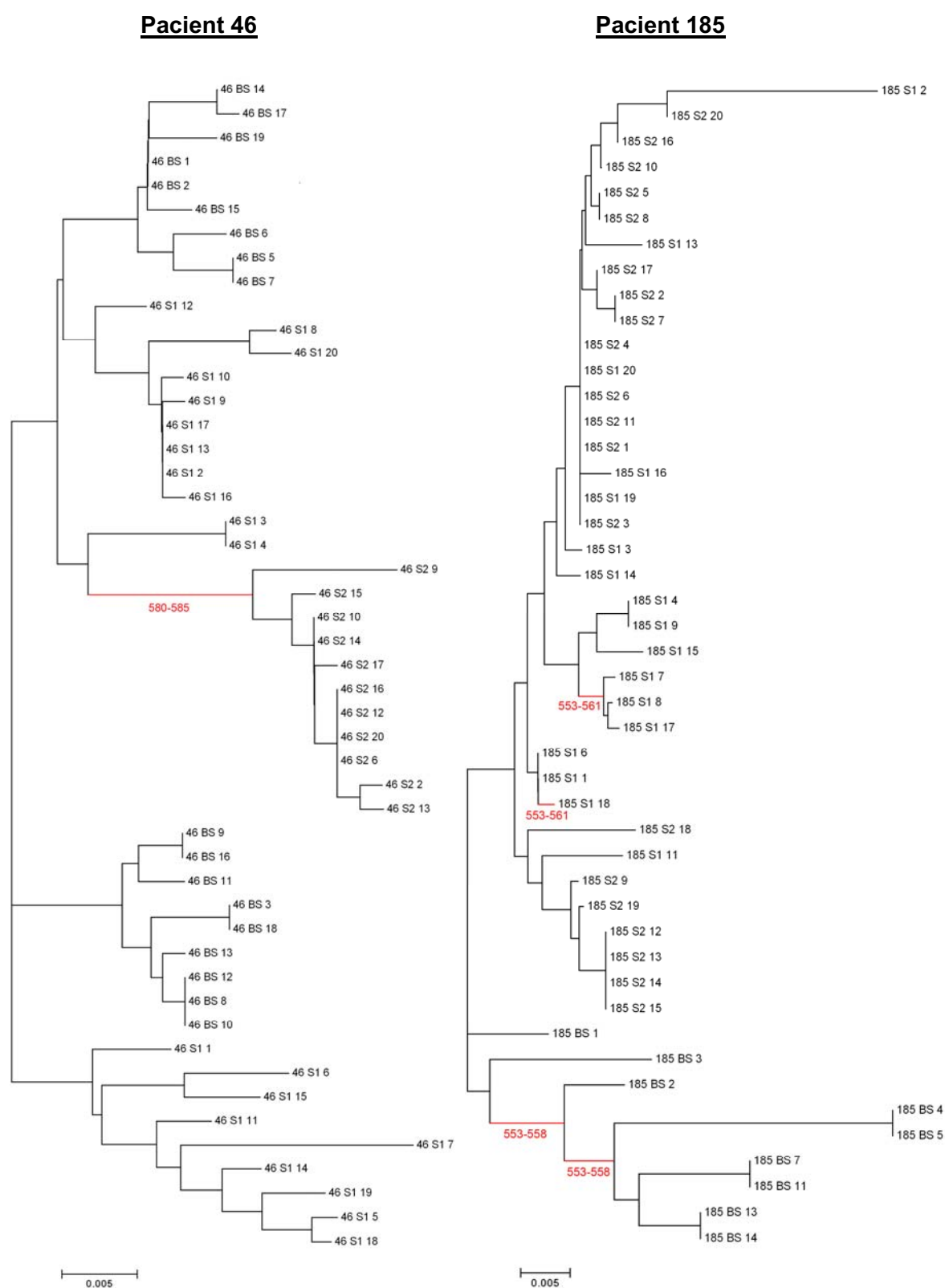


Figura 27 Arbres filogenètics obtinguts per cadascun dels pacients de l'estudi on es va observar pressió selectiva (46, 185, 168, 201, 261, 265, 282). Les llargades de les branques s'han representat a escala. En color verd es mostren les branques amb selecció positiva (on hi ha més canvis no sinònims que l'esperat que una evolució neutra), en vermell, les branques amb selecció negativa (on hi ha menys substitucions de l'esperat en una evolució neutra) i en blau, aquelles on s'ha observat acceleració de canvis no-sinònims. S'indica en cada cada branca la posició nucleotídica de C2V5 on s'han detectat aquests fenòmens. S'han subratllat els pacients responedors.

Pacient 168

Pacient 201

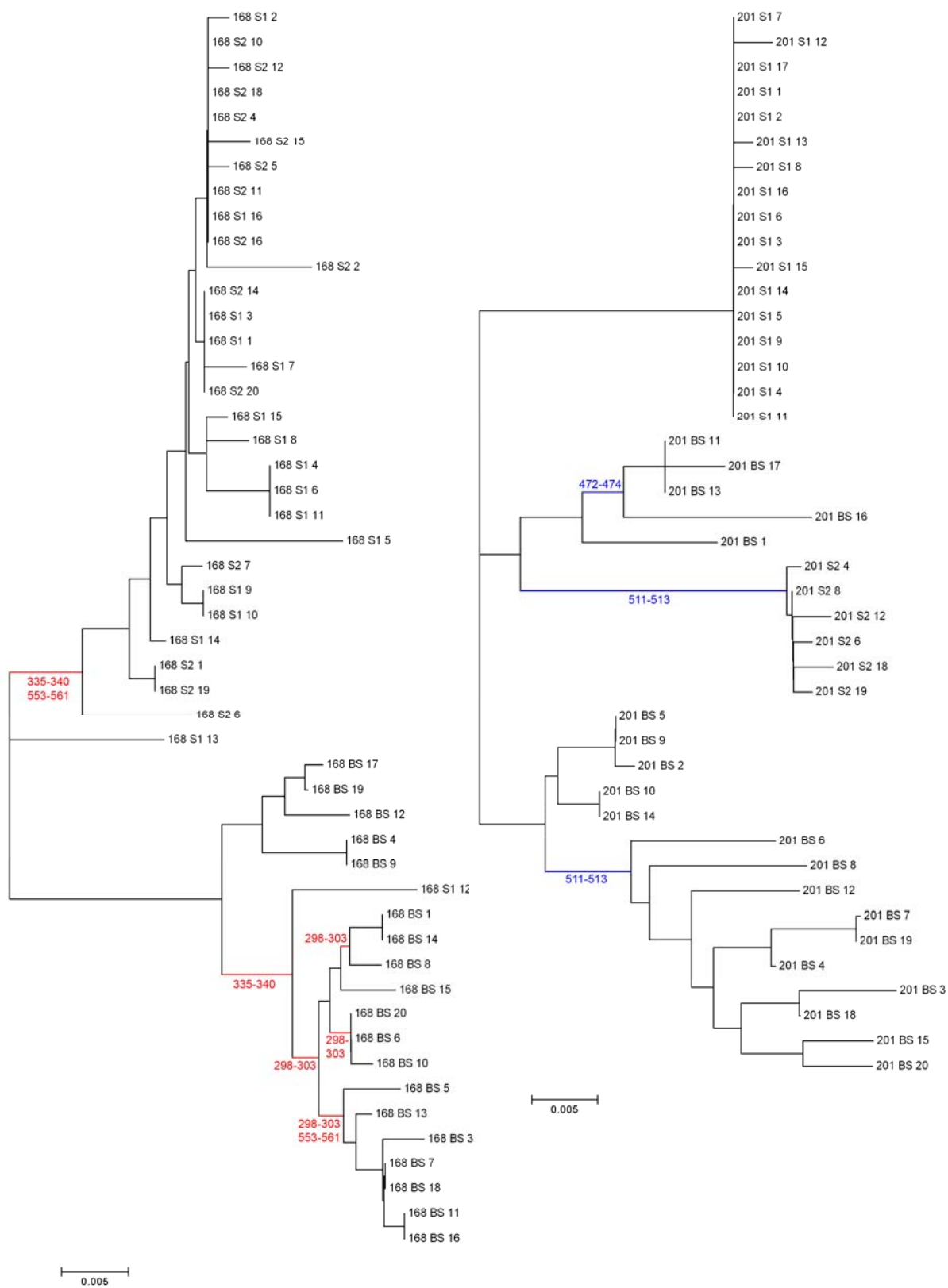
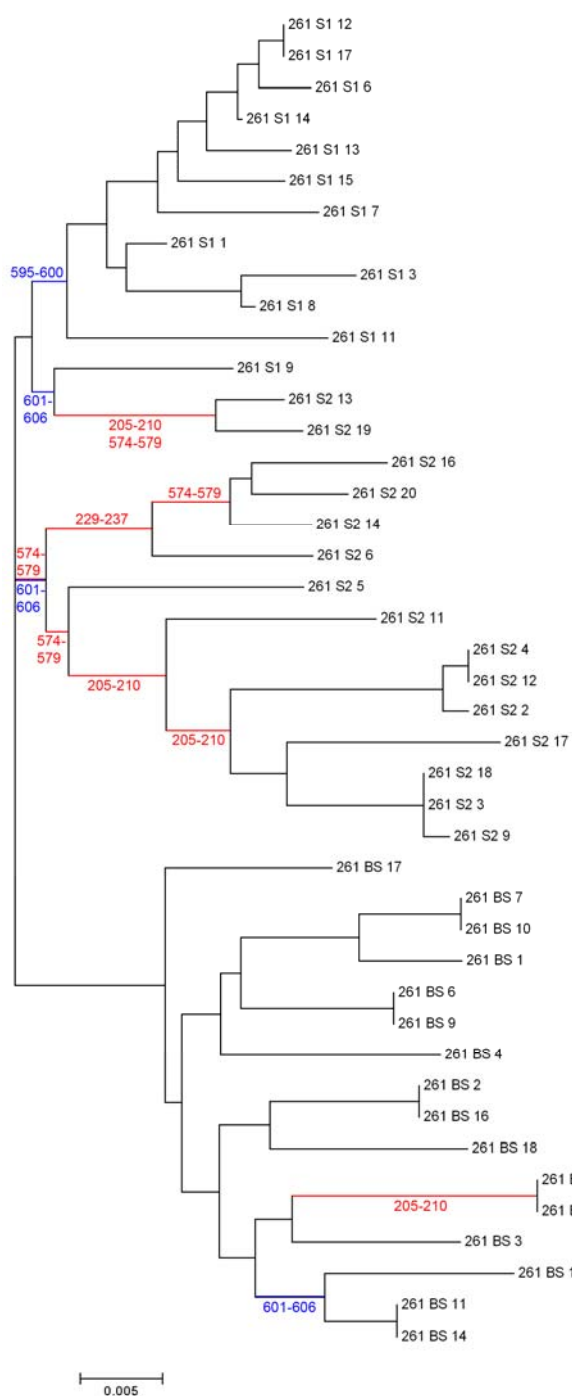


Figura 27 Continuació

Pacient 261



Pacient 265

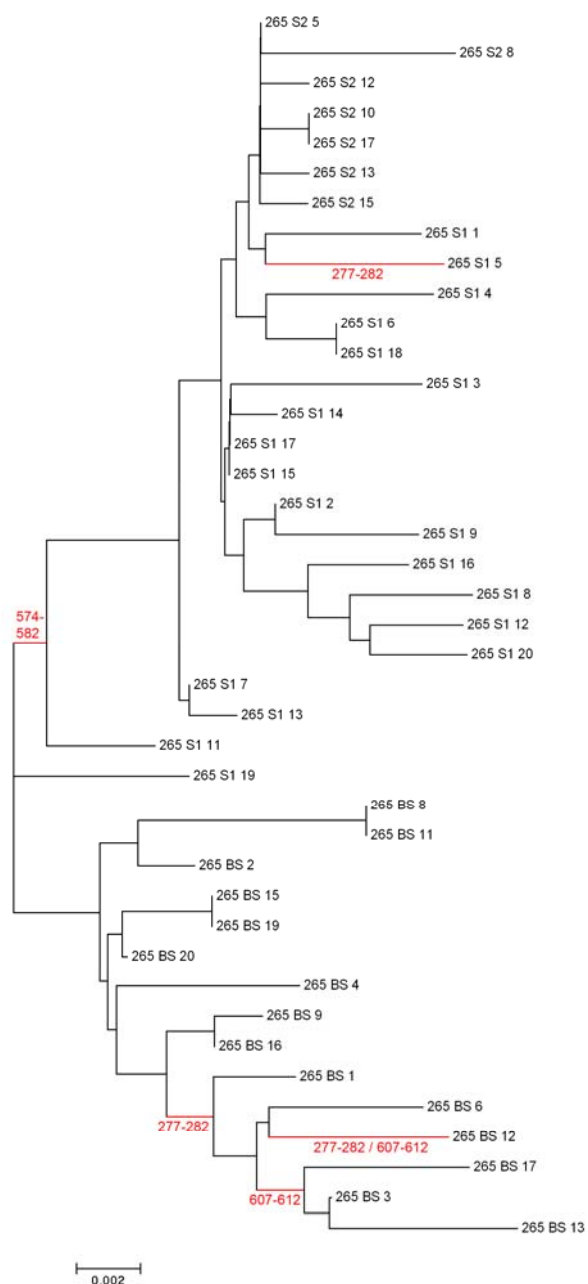


Figura 27 Continuació

Control 282

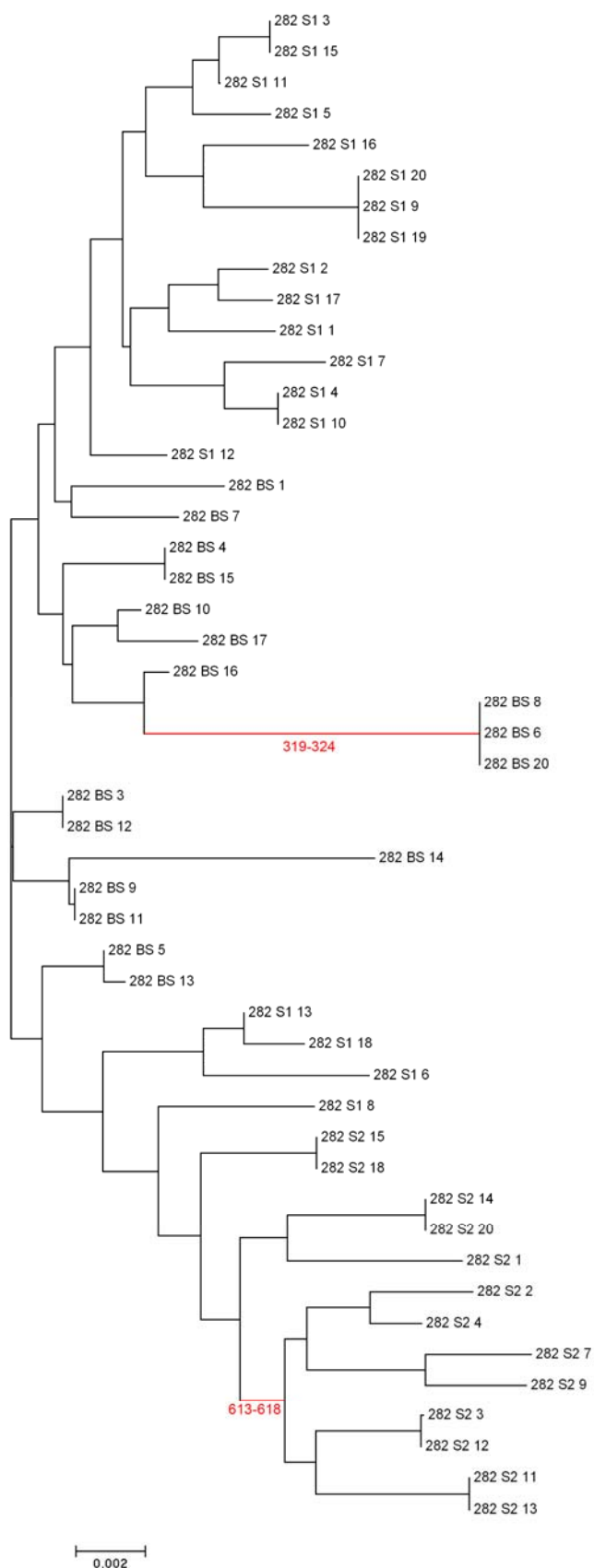


Figura 27 Continuació

DISCUSSION

El VIH-1 es caracteritza per la seva elevada variabilitat genètica. Aquesta variabilitat és originada per l'extraordinària taxa d'error de la RT durant la retrotranscripció del genoma viral, que proporciona canvis en la seqüència genòmica dels nous virions. En certes ocasions, aquests errors introduïts en el genoma viral poden resultar en canvis fenotípics avantatjosos davant de pressions selectives.

Els errors generats per la RT es tradueixen en substitucions, insercions o delecions d'aminoàcids i, fins i tot, en recombinacions homòlogues i no homòlogues entre diferents genomes del VIH-1. A nivell epidemiològic, s'han descrit tres grups importants de VIH-1: el grup M (subtipus A-D, F, H, J i K) el grup N i el grup O ^[274]. A més, igual que en moltes altres malalties víriques, els virus de l'individu infectat es troben en constant evolució, produïnt-se distribucions dinàmiques de genomes virals no idèntics (mutants) però altament relacionats, genomes subjectes a un procés continu de variació genètica i de selecció, que actuen com una unitat de selecció anomenada quasiespècie ^[275].

En la infecció per VIH-1, algunes variants virals poden estar representades en major o menor mesura dins la quasiespècie en diferents moments del transcurs de la infecció, com a conseqüència d'una memòria replicativa (nous mutants que apareixen derivats de genomes preexistents en la quasiespècie) i com a conseqüència d'una memòria cel·lular lligada al propi cicle cel·lular del virus (ADN proviral integrat en el genoma cel·lular que roman amb baixa activitat replicativa durant llargs períodes de temps, constituïnt reservoris virals que poden re-emergir en determinades circumstàncies durant la infecció) ^[275-277].

Aquesta elevada variabilitat dificulta el coneixement íntim dels mecanismes pels quals el VIH-1 és capaç de produir la sida, del desenvolupament de proves diagnòstiques, del coneixement de la seva epidemiologia molecular, dels seus mecanismes de transmissió i possibilitats de prevenció, de l'aparició de resistències i el desenvolupament de tractaments i

vacunes eficaces. S'ha descrit que la variabilitat intra-pacient es situa entre un 1% i un 6% de variació vírica, així com també s'ha determinat la variabilitat virològica en les diferents fases de la malaltia, tant en pacients *naïve* com en pacients tractats amb TARGA, el que ha permès conèixer l'evolució virològica en el pacient infectat i la correlació d'aquesta variabilitat amb la progressió de la malaltia ^[83-101]. Aquests coneixements han estat possibles gràcies a la caracterització molecular del VIH-1, la seva seqüència i l'anàlisi filogènica. D'aquesta manera, l'estudi de les quasiespècies virals és de gran interès tant en la ciència bàsica, com també en la clínica de la infecció per VIH-1.

Actualment existeixen pocs estudis de variabilitat viral en pacients infectats per VIH-1 que hagin estat tractats amb teràpies immunomediades. De fet, els pocs treballs que s'han realitzat en aquest camp es basen en pacients que han estat sotmesos a interrupcions estructurades del tractament (STI) ^[264, 278-280]. I, fins a la data, no existeix cap estudi sobre la variabilitat de les quasiespècies en pacients tractats amb vacunació terapèutica anti-VIH-1.

En aquest treball s'ha realitzat per primer cop un estudi de l'evolució del VIH-1 en pacients que han rebut una vacuna terapèutica anti-VIH-1: Assaig clínic pilot fase I/II de vacuna terapèutica en pacients VIH-1+ basada en l'administració de cèl·lules dendrítiques autòlogues carregades amb el VIH-1 autòleg inactivat per calor (Protocol DCV01) ^[204].

En el disseny d'aquest estudi, el grup de pacients vacunats i el grup de pacients control van rebre tractament antiretroviral durant una mitjana de dos anys, amb el que van aconseguir controlar la càrrega viral en plasma per sota del límit de detecció de les tècniques estàndards fins que es va iniciar la primera interrupció programada del tractament (S1). Durant aquesta primera interrupció del tractament es va recollir plasma mitjançant plasmafèresi, s'inactivà el VIH-1 i es concentrà per preparar l'immunogen de manera individualitzada, que posteriorment seria reinjectat en els pacients, ja processat a través de

les cèl·lules dendrítiques autòlogues. Durant la preparació de l'immunogen, els pacients reiniciaren el tractament antiretroviral amb el que aconseguiren tornar a controlar la càrrega viral en plasma per sota del límit de detecció, durant una mitjana de 18 mesos abans d'interrompre'l novament de manera programada (S2). En aquest moment, el grup de pacients vacunats va rebre 5 immunitzacions mentre que el grup control no les va rebre. D'aquesta manera, la població viral inicial (Basal) present en cadascun dels pacients havia de ser sotmesa a la pressió selectiva del tractament antiretroviral, a la pressió generada per les aturades estructurades del tractament, i pel sistema immunològic memòria induït per la vacunació, en el cas dels pacients vacunats.

Aquest estudi analitza l'evolució viral mitjançant l'anàlisi de la variabilitat de la regió codificant C2V5 (650 pb) del gen *env* del VIH-1, a partir de les seqüències del genoma viral circulant el plasma abans i després de la vacunació: en el moment previ a rebre qualsevol tractament antiretroviral (Basal, BS); en la primera interrupció del tractament, per a la preparació de l'immunogen (S1); i en la segona interrupció del tractament antiretroviral, després de la vacunació amb les cèl·lules dendrítiques autòlogues carregades amb virus autòleg inactivat (S2). L'anàlisi de variabilitat també s'ha efectuat paral·lelament en el grup de pacients control, els quals van aturar el tractament antiretroviral en S1 i S2, igual que els casos, però amb la diferència que no van ser vacunats.

Al tractar-se d'un estudi pilot amb pocs pacients inclosos, s'ha d'anar alerta alhora d'interpretar en conjunt els possibles efectes que hagi pogut tenir la vacunació en els diferents paràmetres de variabilitat analitzats. A més, s'ha de tenir en compte que en les anàlisis de variabilitat s'utilitza una part del genoma viral, en concret la regió C2V5 de l'envolta, per tant els resultats obtinguts s'han d'interpretar amb certa cautela.

En aquest treball, en primer lloc, s'han estudiat les característiques fenotípiques de l'envolta viral analitzant les seqüències proteiques de les diferents poblacions obtingudes, i en segon lloc, s'han relacionat filogenèticament aquestes poblacions mitjançant les seqüències nucleotídiques.

La glicosilació d'aminoàcids en zones estratègiques de les proteïnes de l'envolta permet al virus evadir l'acció d'anticossos capaços de neutralitzar la infecció. Fins al moment s'han desenvolupat molt pocs anticossos neutralitzants (b12, 2G12, 17b, 2F5, 4E10, Z13) degut a que l'entrada del virus requereix una interacció dinàmica entre certes regions de gp120 i dels coreceptors que produeixen canvis conformacionals en aquesta proteïna abans que es produeixi la fusió, pel que, molt sovint, aquestes regions es troben poc exposades [281]. En els nostres pacients s'ha observat heterogeneïtat en el número de glicosilacions però no en la posició, indicant que, efectivament, existeix variabilitat en la glicosilació de la regió C2V5 de l'envolta viral (Figures 16A i B). Aquests canvis, no obstant, no eren diferents entre pacients vacunats i controls, ni tampoc s'han vist diferències entre els pacients responedors i els no responedors. Per tant, els nostres resultats apunten a que la variabilitat observada en la glicosilació de l'envolta viral ha estat deguda a la pròpia variabilitat genètica del VIH-1, i no per la vacunació terapèutica. A més, aquestes observacions estan en consonància amb el fet que no es detectessin canvis significatius en els títols d'anticossos neutralitzants en els individus vacunats durant l'assaig [204].

En aquest estudi, a més, s'ha analitzat la longitud del fragment C2V5 de l'envolta viral. Diferents estudis han demostrat que la pròpia variació en la llargada de l'envolta pot tenir implicacions biològiques [282-283] ja que pot afectar a la càrrega de la proteïna (i per tant al tropisme) i al nombre de llocs potencials de glicosilació. En tots els individus estudiats s'ha observat com la llargada de C2V5 varia dins del propi pacient, el que indica que hi ha hagut fenòmens d'inserció i delecció d'aminoàcids durant aquest estudi. En general, s'ha observat

una certa homogenització en les poblacions d'un determinat tamany de C2V5 en S2, després de la vacunació (Figura 17), tot i així, no s'han trobat diferències d'inserció o deleció entre pacients vacunats i control, ni tampoc entre pacients responedors i no responedors.

També s'ha observat, en ambdós grups, vacunats i control, una certa homogeneïtzació respecte al nombre de mutacions (o canvis d'aminoàcid) en els virus circulants que van anar aparèixent en cada rebrot, donant lloc a poblacions virals cada vegada amb menys canvis, especialment en S2. En el grup de vacunats responedors, aquesta disminució del nombre de canvis d'aminoàcid ha estat més acusada, sobretot després de la vacunació (Figura 19). Respecte a la composició d'aquestes poblacions virals, s'ha observat que tots virus circulants en els tres punts analitzats de cada pacient eren diferents. De fet, només en dos dels pacients vacunats va reaparèixer una sola variant viral present en el virus vacunal durant S2. Aquests resultats posen de manifest l'elevada variabilitat que presenta l'envolta del VIH-1, atribuint-se l'aparició dels virus dels rebrots a la ràpida reactivació de cèl·lules infectades després de la interrupció del tractament antiretroviral. Per altra banda, tot i aquesta gran variabilitat, s'ha observat que les poblacions virals del S2, després de la vacunació, són significativament menys complexes que les que apareixien anteriorment (Figura 21).

La regió V3 s'ha analitzat amb més deteniment degut a la seva implicació en l'ancoratge de la gp120 al co-receptor durant la infecció de la cèl·lula. Està descrit que els virus que empren el co-receptor CXCR4 (virus de tropisme X4) s'associen a una replicació viral més ràpida i a la progressió de la malaltia que els que empren CCR5 (virus amb tropisme R5) ^[133-135]. L'anàlisi de l'ús de co-receptor en els pacients vacunats indicà que els virus circulants en el moment BS i S1, amb els quals es va vacunar als pacients, van ser R5, així com també els observats en S2, després de la vacunació. Les vacunacions amb cèl·lules dendrítiques i virus autòlegs no van provocar un canvi de tropisme de R5 a X4.

Com s'ha mencionat anteriorment, la variabilitat del VIH-1 ve donada per l'elevada taxa d'error de la retrotranscriptasa viral, que introdueix mutacions en el genoma del virus amb una elevada freqüència. Aquestes mutacions genètiques no sempre es tradueixen en canvis a nivell proteic, i per tant el seu anàlisi dóna més informació sobre com estan relacionats els diferents virus que componen una població o els virus de dues poblacions separades en el temps. En aquesta tesi s'ha analitzat tant la diversitat com la divergència genètica de les quasiespècies virals al llarg de l'estudi de vacunació terapèutica DCV01, així com la relació de les substitucions sinònimes i no sinònimes com a marcador de pressió selectiva.

Les anàlisis de seqüències proteiques han suggerit que les poblacions virals cada vegada eren més homogènies al llarg del temps però diferents en cada rebrot. Aquesta homogeneïtzació també ha estat detectada en l'anàlisi de la diversitat genètica dels pacients vacunats, especialment en el segon stop, després de la vacunació (Figura 25). En els pacients vacunats (tant responedors com no responedors) s'ha observat que la diversitat viral va disminuint al llarg de l'estudi, presentant la diversitat més elevada en el moment basal i menor diversitat en les interrupcions de tractament, sobretot en el S2. En els pacients control, aquesta tendència a la disminució no ha estat tant evident, tot i que en el segon stop, aquest grup també va presentar una menor diversitat. La disminució de la diversitat viral al llarg del temps ha estat descrita, també, en altres estudis de pacients crònics sotmesos a interrupcions estructurades de tractament ^[265], on aquest fet s'ha relacionat amb la reactivació dels reservoris. En el nostre cas, a part de les interrupcions del tractament, va haver-hi una intervenció terapèutica, tot i que el limitat nombre de pacients de cada grup no va permetre establir una relació causa-efecte estadísticament significativa entre la disminució de la diversitat en S2 i la vacunació terapèutica. Malgrat tot, dins el grup de pacients vacunats, s'ha observat que els pacients responedors van presentar una disminució més acusada de la diversitat en el segon stop que els no responedors (Figura 26). Aquest

resultat suggeriria que la vacuna terapèutica sí podria tenir un efecte sobre la diversitat viral. La tendència a la disminució de la diversitat observada en els pacients d'aquest treball seria deguda, principalment, a les interrupcions del tractament, però la vacunació també podria tenir una possible influència. Caldria augmentar el nombre de pacients en l'assaig per poder discernir més clarament l'efecte de la vacunació terapèutica sobre la diversitat viral.

La principal diferència entre pacients vacunats responedors i no responedors ha estat el grau de diversitat que presentaren en les seves poblacions. Tot i que ambdós grups mostraren una disminució de la diversitat al llarg de l'estudi i uns valors baixos al segon stop, els responedors tenien una diversitat superior, especialment en el punt basal, i també en el primer stop (Figura 26). Els valors basals de diversitat obtinguts en els no responedors són més semblants als dels pacients control que als dels responedors. Tant els no responedors com els no vacunats no van presentar resposta virològica en l'última interrupció del tractament, mentre que els responedors sí van controlar la càrrega viral. Els nostres resultats suggeririen que una major diversitat basal podria estar correlacionada amb una millor resposta, tot i que degut al baix nombre de responedors, no s'ha pogut corroborar estadísticament. Existeix un gran debat sobre aquest tema i una certa controvèrsia al respecte. Mentre que varis estudis han argumentat que una menor diversitat pre-tractament pot millorar la progressió de la malaltia ^[279, 284, 285, 95], com a indicadora d'una pressió immune més potent, altres autors han relacionat una major diversitat basal amb un major control de la infecció ^[91, 99, 100, 286], reflex d'un major ventall d'antigens contra els què generar una resposta. En el nostre cas, s'ha de tenir en compte que, a part del tractament antiretroviral, s'ha introduït una intervenció vacunal, i que a més, l'immunogen utilitzat en la vacuna ha estat la pròpia població viral del pacient (població stop 1). La diversitat observada en la població vacunal fou quasi el doble en els responedors que en els no-responedors, de manera que els responedors foren vacunats amb un repertori més gran d'antigens que els no responedors. Una major diversitat viral en la vacuna podria ser clau en la resposta a la

vacunació, tot i que necessitaríem un major nombre de pacients per poder confirmar aquesta observació

L'anàlisi de seqüències nucleotídiques ha permès estudiar l'evolució viral al llarg del temps. S'ha quantificat aquesta evolució mitjançant l'anàlisi de la divergència (o diversitat entre poblacions). S'ha vist que en els pacients vacunats, hi havia un augment significatiu de la divergència respecte el punt basal, tant en el primer com en el segon stop (Figura 28). Aquests resultats apunten a que l'increment de la divergència era degut pròpiament a les aturades del tractament. La vacunació no va tenir efectes sobre la divergència viral, ja que no va haver diferències significatives abans i després de la vacunació, ni entre pacients vacunats i control. Aquesta situació també ha estat descrita en un treball sobre malalts crònics sotmesos a STIs, on es va mostrar que la divergència augmentava en el primer stop i després es mantenia relativament estable en les següents interrupcions del tractament ^[265].

La divergència va presentar una correlació significativa amb el temps transcorregut entre el primer i el segon stop. Per aquest motiu es va emprar la taxa de divergència (TD) per analitzar els resultats entre aquestes poblacions i evitar la influència del temps. En els pacients vacunats, tant responedors com no responedors, la TD entre S1-S2 va ser significativament superior que entre BS-S1, i a més, també fou significativament superior a l'observada entre BS-S2. Aquests resultats indiquen que els virus que apareixen en els stops (tant els vacunals, S1, com els de després de la vacunació, S2) estaven més relacionats amb els virus basals que entre ells. A més, la relació dels virus que apareixien després de la vacunació amb els basals era més propera que la dels virus de l'immunogen amb els basals. Això suggeriria que hi ha hagut reactivació dels reservoris, tant en el primer com en el segon stop, ja que els virus que han rebrotat estan relacionats genèticament amb els basals. I segurament, tot i la reactivació del mateix reservori basal, han rebrotat diferents llinatges en cadascun dels dos stops, ja que tot i tenir el mateix origen, els virus S1 i els S2

no estan gaire relacionats genèticament entre ells, i a més, presenten diferent relació amb els virus basals.

Aquests resultats posen de manifest l'importància d'escollir el tipus d'immunògen a l'hora de dissenyar una vacunació terapèutica. Varis autors han descrit, que l'origen dels virus dels rebrots procedien del reservori viral latent, tot i que alguns no descarten el rebrot a partir d'una replicació subjacent de diferents compartiments [265, 278, 280, 287-289]. Els nostres resultats donen pistes a favor que potser l'immunògen autòleg més adequat podria ser el virus integrat al reservori, doncs sembla ser el que ressurgeix al aturar el tractament antiretroviral. De fet, el nostre grup ha publicat recentment els resultats d'un assaig amb vacuna terapèutica de cèl·lules dendrítiques carregades amb virus autòlegs inactivats per calor aïllats del reservori viral, presents en les cèl·lules infectades de sang perifèrica [290]. En aquest cas, es van vacunar 10 pacients (sense tractament) amb tres dosis de vacuna, l'immunogen de la qual procedia del cultiu viral *ex-vivo* de les PBMCs de cada pacient. Als sis mesos de l'última dosi de vacuna es va veure una disminució significativa de la càrrega viral dels pacients vacunats amb virus autòleg respecte els pacients vacunats amb placebo, i a més aquesta disminució es mantenia fins a un any després de la vacunació [290]. Prèviament, Wei Lu i col·laboradors també havien descrit una vacuna terapèutica similar, amb virus del reservori com a immunogen, que mostrava una reducció de la CV de més del 90% en 8 dels 18 pacients immunitzats [203]. Aquests estudis han demostrat la factibilitat de crear una vacuna amb virus autòleg del reservori i representen una opció esperançadora en el camp de les vacunes terapèutiques.

En aquest treball també s'ha analitzat si la vacuna ha estat capaç de generar una pressió selectiva sobre les poblacions virals. Les pressions evolutives han estat quantificades per la ràtio ω (relació de les substitucions sinònimes i no-sinònimes) de totes les relacions filogenètiques (o branques) prèviament obtingudes. No s'ha observat cap

pressió selectiva positiva en les poblacions virals d'aquests pacients, i en certs clons de dos pacients, s'ha observat una relació evolutiva més conservada del que s'esperaria, deguda a l'atzar. Aquestes dades suggeririen que ni les aturades estructurades del tractament, ni les vacunacions han suposat un coll d'ampolla en la regió C2V5 de l'envolta dels virus estudiats, no obstant, s'ha de tenir en compte que no s'ha analitzat la seqüència completa del VIH-1, sinó només l'envolta viral, quan l'immunogen contenia el virus complet. A més, la mostra analitzada després de la vacunació (S2) contenia uns virus amb una mediana de 5 setmanes de rebrot, temps segurament insuficient alhora de detectar pressions selectives. Aquesta vacunació va provocar una disminució significativa de diferents paràmetres de la dinàmica de la CV, amb el que s'intueix que s'ha donat una pressió selectiva viral, tot i que l'anàlisi filogenètic de C2V5 no hagi estat capaç de detectar-la.

Englobant tots els resultats obtinguts, en els pacients vacunats, i especialment en els responedors, hi ha una disminució en la variabilitat de les poblacions virals després de la vacunació, tot i que no s'ha detectat una pressió selectiva directa sobre l'envolta viral. Això apuntaria a que aquesta vacuna terapèutica, a pesar dels propis efectes que podrien tenir les interrupcions estructurades del tractament, podria haver exercit una certa pressió selectiva sobre el VIH-1, probablement en altres regions que no corresponen a l'envolta o en un moment més tardà, i que això es reflexés de manera indirecta en la menor variabilitat observada. Davant aquesta hipòtesi, és necessari analitzar la variabilitat tant de mostres més posteriors a la vacunació com de la resta de proteïnes immunogèniques del VIH-1, en un estudi amb una major inclusió de pacients vacunats i control.

CONCLUSIONS

1. Existeix una gran variabilitat en la regió C2V5 de l'envolta viral, tant genètica com a nivell de proteïna, en totes les poblacions virals analitzades (basal, stop 1 i stop 2) dels 16 pacients estudiats.
2. Tant la vacunació com les aturades del tractament no suposen un canvi evident en el patró glicosilació de la regió C2V5 de l'envolta del VIH-1 que pugui associar-se a un mecanisme d'evasió adquirit.
3. La vacuna *per se* no influeix sobre la llargada de C2V5. La homogeneïtzació d'un cert tamany poblacional al final d'aquesta intervenció terapèutica s'atribueix a les aturades del tractament antiretroviral.
4. La vacunació disminueix tant el nombre de mutacions com la complexitat en pacients vacunats, tot i que no es pot descartar que aquest efecte sigui provocat per les aturades del tractament.
5. Ni la vacunació terapèutica ni les aturades estructurades del tractament antiretroviral que comporta aquesta intervenció, no provoquen canvi de tropisme R5 a X4 .
6. Una major diversitat viral basal, així com una major diversitat en el virus utilitzat com immunogen, s'associen a una millor resposta virològica després de la vacunació.
7. La vacunació terapèutica no afecta a la divergència entre el virus que rebrota al segon stop i la població viral basal, sinó que aquesta és deguda a les interrupcions del tractament.

8. Els virus que rebroten durant les dues aturades del tractament tenen un origen proper a la població basal en els pacients vacunats. Tanmateix aquests virus dels rebrots estan molt poc relacionats genèticament entre ells.

9. Un immunogen basat en virus autòlegs obtinguts del reservori de cèl·lules infectades, podria ser un bon candidat per una vacuna terapèutica, doncs contindria una major representació de la població viral que reapareix en el transcurs de la infecció.

10. És necessari seguir investigant la variabilitat de les poblacions virals en futurs assaigs per poder dissenyar una vacuna terapèutica òptima que permeti la retirada del tractament antiretroviral el major temps possible.

BIBLIOGRAFIA

1. Gottlieb GJ, Ragaz A, Vogel JV, Friedman-Kien A, Rywlin AM, Weiner EA, Ackerman AB. *A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men.* Am J Dermatopathol. 1981; 3(2):111-4
2. Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, et al. *Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions.* N Engl J Med. 1981; 305(24):1439-44.
3. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., VéAzinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983; 220, 868-871.
4. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.* Science. 1984; 224(4648):500-3.
5. Levy, J. A., Hoffmann, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. & Oshiro, L. S. *Recovery of AIDS-associated retroviruses from patients with AIDS or AIDS-related conditions and from clinically healthy individuals.* J. Infect. Dis. 1984; 152:734-738.
6. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al. *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.* Science. 1986; 233(4761):343-6.
7. Stevenson M. *HIV-1 pathogenesis.* Nat Med. 2003; 9(7):853-60.
8. The Global HIV/AIDS pandemic. MMWR Morb Mortal Rep. 2006; 55:841.
9. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. *HIV-1 nomenclature proposal.* Science. 2000 ;288(5463):55-6.
10. Thomson, Perez-Alvarez, Nájera R. *Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy.* Lancet Infect Dis. 2002; 2(8):461-71.
11. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications.* Science. 2000; 287(5453):607-14.
12. McCutchan FE. *Global epidemiology of HIV.* J Med Virol. 2006; 78 Suppl 1:S7-S12.
13. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.* Nature. 1999; 397(6718):436-41.
14. Arthur LO, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines.* Science. 1992; 258(5090):1935-8.
15. Turner BG, Summers MF. *Structural biology of HIV.* J Mol Biol. 1999; 285(1):1-32.
16. Gaynor R. *Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression.* AIDS. 1992; 6(4):347-63. Review. Erratum in: AIDS 1992 Jun;6(6):following 606.
17. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, Capon DJ. *Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus.* Nature. 1985; 313(6002):450-8.
18. Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M. *HIV/HTLV gene nomenclature.* 1988 Nature. Jun 9;333(6173):504
19. Doms RW. *Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection.* Virology. 2000 25; 276(2):229-37.
20. Broder CC, Berger EA. *CD4 molecules with a diversity of mutations encompassing the CDR3 region efficiently support human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion.* J Virol. 1993; 67(2):913-26.
21. Brand D, Srinivasan K, Sodroski J. *Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein.* J Virol. 1995; 69(1):166-71.
22. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.* Cell. 1996; 85(7):1135-48.
23. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5.* Nature. 1996; 384(6605):179-83.
24. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.* Nature. 1996; 382(6594):833-5. Erratum in: Nature 1996;384(6606):288.
25. Dimitrov AS, Louis JM, Bewley CA, Clore GM, Blumenthal R. *Conformational changes in HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and inactivation.* Biochemistry. 2005; 44(37):12471-9.
26. Peliska JA, Benkovic SJ. *Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase.* Science. 1992; 258(5085):1112-8.
27. DeStefano JJ, Buiser RG, Mallaber LM, Myers TW, Bambara RA, Fay PJ. *Polymerization and RNase H activities of the reverse transcriptases from avian myeloblastosis, human immunodeficiency, and Moloney murine leukemia viruses are functionally uncoupled.* J Biol Chem. 1991; 266(12):7423-31.
28. Bowerman B, Brown PO, Bishop JM, Varmus HE. *A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA.* Genes Dev. 1989; 3(4):469-78.
29. Farnet CM, Haseltine WA. *Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex.* J Virol. 1991; 65(4):1910-5.
30. Stevens SW, Griffith JD. *Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(12):5557-61.
31. Alcami J, Lain dL, Folgueira L, Pedraza MA, Jacque JM, Bachelier F et al. *Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes.* EMBO J. 1995; 14(7):1552-1560.
32. Bermejo M, Sanchez-Palomino S, Usan L, Alcami J. *Dynamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors.* J Med Virol. 2004; 73(4):502-507.

33. Neumann M, Harrison J, Saltarelli M, Hadziyannis E, Erfle V, Felber BK, Pavlakis GN. *Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction*. AIDS Res Hum Retroviruses. 1994; 10(11):1531-42.
34. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. *HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation*. Nat Med. 2003; 9(11):1398-403.
35. von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B, Ward DM, Chung HY, Morita E et al. *The protein network of HIV budding*. Cell 2003; 114(6):701-713
36. Domingo E and Holland JJ. *RNA virus mutations and fitness for survival*. Annu Rev Microbiol, 1997; 51:151-178.
37. Ruiz-Jarabo CM, Arias A, Baranowski E, Escarmis C, Domingo E. (2000) *Memory in viral quasispecies*. J Virol. 74 (8): 3543-3547
38. Cichutek K, Merget H, Norley S, Linde R, Kreuz W, Gahr M, Kurth R. *Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(16):7365-9.
39. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. *HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time*. Science. 1996; 15;271(5255):1582-6.
40. Preston BD, Poesz BJ, Loeb LA. *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase*. Science. 1998; 242:1168-1171
41. McCune JM. *The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease*. Nature. 2001; 410(6831):974-9.
42. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature. 1995; 373:123-126
43. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM. *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. Nature 1995; 373:117-122
44. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. *Genetic recombination of human immunodeficiency virus*. J Virol. 1989; 63(3):1455-9.
45. Hu WS, Temin HM. *Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(4):1556-60.
46. Temin HM. *Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal transfers result in retrovirus genetic variation*. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 6900-6903
47. Jung A, Maier R, Vartanian JP, et al. *Recombination - multiply infected spleen cells in HIV patients*. Nature 2002; 418:144.
48. Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. *Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:4204-9.
49. Zhu TF, Wang N, Carr A, Wolinsky S, Ho DD. *Evidence for coinfection by multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 subtype B in an acute seroconverter*. J Virol 1995; 69:1324-7.
50. Yerly S, Jost S, Monnat M, et al. *HIV-1 co/ super-infection in intravenous drug users*. AIDS. 2004; 18:1413-21.
51. Smith DM, Richman DD, Little SJ. *HIV superinfection*. J Infect Dis. 2005; 192(3):438-44.
52. Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. *Recombination in HIV*. Nature 1995; 374:124-6.
53. Malim MH, Emerman M. *HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation*. Cell. 2001; 104:469-72.
54. Rhodes T, Wargo H, Hu WS. *High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication*. J Virol. 2003; 77(20):11193-200.
55. Rhodes TD, Nikolaitchik O, Chen J, Powell D, Hu WS. *Genetic recombination of human immunodeficiency virus type 1 in one round of viral replication: effects of genetic distance, target cells, accessory genes, and lack of high negative interference in crossover events*. J Virol. 2005; 79(3):1666-77.
56. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. *The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA*. Nature. 2003; 424(6944):94-8.
57. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH. *DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection*. Cell. 2003; 113(6):803-9. Erratum in: Cell. 2004; 116(4):629.
58. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. Nature. 2003; 424(6944):99-103.
59. Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME, Redfield RR, Markham PD, Salahuddin SZ, Wong-Staal F, Gallo RC, Parks ES, Parks WP. *Genetic variation in HTLV III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS*. Science. 1986; 232:1548-1553
60. Li WH, Tanimura M, Sharp PM. *Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences*. Mol Biol Evol. 1988; 5(4):313-30.
61. Hahn BH, Gonda MA, Shaw GM, Popovic M, Hoxie JA, Gallo RC, Wong-Staal F. *Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985; 82(14):4813-7.
62. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B. *Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection*. Science. 2002; 296(5577):2354-60.
63. Engelstad M. *Genetic diversity of env V3 loop sequences in HIV type 1-infected homosexuals, heterosexuals, intravenous drug users, and hemophilia patients in Norway: high prevalence of subtype B and detection of subtype C*. AIDS Res Hum Retroviruses. 1996; 12(18):1733-8.
64. Royce RA, Seña A, Cates W Jr, Cohen MS. *Sexual transmission of HIV*. N Engl J Med. 1997; 336(15):1072-8.
65. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH. *Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group*. N Engl J Med. 2000; 342(13):921-9
66. Newell ML. *Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1*. AIDS. 1998; 12(8):831-7.
67. Abdala N, Crowe M, Tolstov Y, Heimer R. *Survival of human immunodeficiency virus type 1 after rinsing injection syringes with different cleaning solutions*. Subst Use Misuse. 2004; 39(4):581-600.
68. Derdeyn CA, Silvestri G. *Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection*. Curr Opin Immunol. 2005; 17(4):366-73.

69. Fauci AS. *HIV and AIDS: 20 years of science*. Nat Med. 2003; 9(7):839-43.
70. Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, Blattner WA, Wiesner D, Eyster ME, Goedert JJ. *Natural history of HIV-1 cell-free viremia*. JAMA. 1995; 274(7):554-8.
71. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, Kappes JC, Hahn BH, Shaw GM. *High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection*. N Engl J Med. 1991; 324(14):954-60.
72. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(15):8869-73.
73. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF. *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. Science. 1997; 278(5341):1295-300.
74. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA. *Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection*. Science. 1998; 280(5362):427-31.
75. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. J Virol. 1994; 68(7):4650-5.
76. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, Picker LJ. *HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression*. Nat Med. 1999; 5(5):518-25.
77. Keet IP, Krijnen P, Koot M, Lange JM, Miedema F, Goudsmit J, Coutinho RA. *Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters*. AIDS. 1993; 7(1):51-7.
78. Tamalet C, Lafeuillade A, Yahi N, Vignoli C, Tourres C, Pellegrino P, de Micco P. *Comparison of viral burden and phenotype of HIV-1 isolates from lymph nodes and blood*. AIDS. 1994; 8(8):1083-8.
79. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. *New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med. 1993; 328(5):327-35.
80. Blankson JN. *Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: Highly active immune responses?* Antiviral Res. 2010; 85(1):295-302.
81. Fellay J, Ge D, Shianna KV, Colombo S, Ledergerber B, Cirulli ET, Urban TJ, Zhang K, Gumbs CE, Smith JP, Castagna A, Cozzi-Lepri A, De Luca A, Easterbrook P, Günthard HF, Mallal S, Mussini C, Dalmau J, Martinez-Picado J, Mirot JM, et al. *Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans*. PLoS Genet. 2009; 5(12):e1000791.
82. Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr. *Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection*. Ann Intern Med. 1997; 126(12):946-54.
83. Karlsson AC, Lindbäck S, Gaines H, Sönnnerborg A. *Characterization of the viral population during primary HIV-1 infection*. AIDS. 1998; 12(8):839-47.
84. Wolinsky SM, Wike CM, Korber BT, Hutto C, Parks WP, Rosenblum LL, Kunstman KJ, Furtado MR, Muñoz JL. *Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants*. Science. 1992; 255(5048):1134-7.
85. Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. *Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection*. Science. 1993; 261(5125):1179-81.
86. Zhu T, Wang N, Carr A, Nam DS, Moor-Jankowski R, Cooper DA, Ho DD. *Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission*. J Virol. 1996; 70(5):3098-107.
87. Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. *Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection*. J Virol. 1993; 67(6):3345-56.
88. Learn GH, Muthui D, Brodie SJ, Zhu T, Diem K, Mullins JI, Corey L. *Virus population homogenization following acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol. 2002; 76(23):11953-9.
89. Coffin JM. *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy*. Science. 1995; 267(5197):483-9.
90. Perelson AS, Essunger P, Ho DD. *Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo*. AIDS. 1997; 11 Suppl A:S17-24.
91. Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, Wolinsky SM. *Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease*. J Virol. 1997; 71(1):663-77.
92. Shioda T, Oka S, Xin X, Liu H, Harukuni R, Kurotani A, Fukushima M, Hasan MK, Shiino T, Takebe Y, Iwamoto A, Nagai Y. *In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: association of V2 extension with slow disease progression*. J Virol. 1997; 71(7):4871-81.
93. Wolinsky SM, Korber BT, Neumann AU, Daniels M, Kunstman KJ, Whetsell AJ, Furtado MR, Cao Y, Ho DD, Safrit JT. *Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection*. Science. 1996; 272(5261):537-42.
94. Yamaguchi Y, Gojobori T. *Evolutionary mechanisms and population dynamics of the third variable envelope region of HIV within single hosts*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(4):1264-9.
95. Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, Wolpert D, Neumann AU, Korber B, Mullins JI. *Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS*. J Virol. 1997; 71(10):7498-508.
96. Levy JA, Hsueh F, Blackburn DJ, Wara D, Weinrub PS. *CD8 cell noncytotoxic antiviral activity in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected children*. J Infect Dis. 1998; 177(2):470-2.
97. Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. *Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays*. J Virol. 1994; 68(10):6672-83.
98. Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L, Mullins JI. *Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses*. J Virol. 1997; 71(6):4284-95.
99. Lukashov VV, Kuiken CL, Goudsmit J. *Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to length of the immunocompetent period*. J Virol. 1995; 69(11):6911-6.

100. McDonald RA, Mayers DL, Chung RC, Wagner KF, Ratto-Kim S, Bix DL, Michael NL. *Evolution of human immunodeficiency virus type 1 env sequence variation in patients with diverse rates of disease progression and T-cell function.* J Virol. 1997; 71(3):1871-9.
101. Salvatori F, Masiero S, Giaquinto C, Wade CM, Brown AJ, Chieco-Bianchi L, De Rossi A. *Evolution of human immunodeficiency virus type 1 in perinatally infected infants with rapid and slow progression to disease.* J Virol. 1997; 71(6):4694-706.
102. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5.* Nature. 1996; 381(6584):667-73.
103. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.* Science. 1996; 272(5263):872-7.
104. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.* Annu Rev Immunol. 1999; 17:657-700.
105. Lane TE (ed.) *Chemokines and viral infection.* Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2006
106. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusin cofactors.* Cell 1996; 85:1149-1158.
107. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. *Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses.* Nature 1997; 388:296-300.
108. Jinno A, Shimizu N, Soda Y, Haraguchi Y, Kitamura T, Hoshino H. *Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection.* Biochem Biophys Res Commun 1998; 243:497-502.
109. Soda Y, Shimizu N, Jinno A, Liu HY, Kanbe K, Kitamura T, et al. *Establishment of a new system for determination of coreceptor usages of HIV based on the human glioma NP-2 cell line.* Biochem Biophys Res Commun 1999; 258:313-321.
110. Kanbe K, Shimizu N, Soda Y, Takagishi K, Hoshino H. *A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2.* Virology 1999; 265:264-273.
111. Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. *STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell linetropic HIV-1.* J Exp Med 1997; 185:2015-2023.
112. Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, et al. *A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses.* J Virol 2000; 74:619-626.
113. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. *Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1.* J Biol Chem 1998; 273:23799-23804.
114. Neil SJ, Aasa-Chapman MM, Clapham PR, Nibbs RJ, McKnight A, Weiss RA. *The promiscuous CC chemokine receptor D6 is a functional coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 on astrocytes.* J Virol 2005; 79:9618-9624.
115. Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, et al. *The orphan seven-transmembrane receptor Apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1.* J Virol 1998; 72:6113-6118.
116. Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Jinno A, Kitamura T, et al. *An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in brain-derived cells.* J Virol 1999; 73:5231-5239.
117. Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Mori T, Ohtsuki T, Apichartpiyakul C, Uchiumi H, Nojima Y, Hoshino H. *Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV.* AIDS. 2009; 23(7):761-9.
118. Chesebro B, Nishio J, Perryman S, Cann A, O'Brien W, Chen IS, Wehrly K. *Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages.* J Virol. 1991; 65(11):5782-9.
119. Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. *Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism.* J Virol. 1992; 66(11):6547-54.
120. Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. *Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes.* J Virol. 1996;70(12):9055-9.
121. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. *Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule.* J Virol. 1992; 66(5):3183-7.
122. Fouchier RA, Broersen SM, Brouwer M, Tersmette M, Van't Wout AB, Groenink M, Schuitemaker H. *Temporal relationship between elongation of the HIV type 1 glycoprotein 120 V2 domain and the conversion toward a syncytium-inducing phenotype.* AIDS Res Hum Retroviruses. 1995; 11(12):1473-8.
123. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. *Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1.* Science. 1991; 253(5015):71-4.
124. Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. *Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene.* Nature. 1991; 349(6305):167-9.
125. De Jong JJ, Goudsmit J, Keulen W, Klaver B, Krone W, Tersmette M, de Ronde A. *Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity.* J Virol. 1992; 66(2):757-65.
126. Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. *Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop.* J Virol. 2002; 76(8):3852-64.
127. Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. *Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks.* Virology. 2001; 288(1):51-62.

128. Xiao L, Owen SM, Goldman I, Lal AA, deJong JJ, Goudsmit J, Lal RB. *CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage.* *Virology.* 1998; 240(1):83-92.
129. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. *Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution.* *J Virol.* 1992; 66(11):6777-80.
130. Milich L, Margolin B, Swanstrom R. *V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability.* *J Virol.* 1993; 67(9):5623-34.
131. Schuitemaker H, Kootstra NA, de Goede RE, de Wolf F, Miedema F, Tersmette M. *Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture.* *J Virol.* 1991; 65(1):356-63.
132. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. *Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection.* *J Virol.* 1999; 73(12):10489-502.
133. Tersmette M, Lange JM, de Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J, Miedema F. *Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality.* *Lancet.* 1989; 1(8645):983-5.
134. Koot M, Schellekens PT, Mulder JW, Lange JM, Roos MT, Coutinho RA, Tersmette M, Miedema F. *Viral phenotype and T cell reactivity in human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic men treated with zidovudine.* *J Infect Dis.* 1993; 168(3):733-6.
135. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population.* *J Virol.* 1992; 66(3):1354-60.
136. Koot M, van Leeuwen R, de Goede RE, Keet IP, Danner S, Eeftink Schattenkerk JK, Reiss P, Tersmette M, Lange JM, Schuitemaker H. *Conversion rate towards a syncytium-inducing (SI) phenotype during different stages of human immunodeficiency virus type 1 infection and prognostic value of SI phenotype for survival after AIDS diagnosis.* *J Infect Dis.* 1999; 179(1):254-8.
137. Poveda E, Briz V, Quiñones-Mateu M, Soriano V. *HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors.* *AIDS.* 2006; 20(10):1359-67.
138. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. *Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy.* *J Virol.* 2003; 77(21):11708-17.
139. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection.* *Nat Med.* 1997; 3(12):1369-75.
140. Correa R, Muñoz-Fernández MA. *Viral phenotype affects the thymic production of new T cells in HIV-1-infected children.* *AIDS.* 2001; 15(15):1959-63.
141. Nishimura Y, Brown CR, Mattapallil JJ, Igarashi T, Buckler-White A, Lafont BA, Hirsch VM, Roederer M, Martin MA. *Resting naive CD4+ T cells are massively infected and eliminated by X4-tropic simian-human immunodeficiency viruses in macaques.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(22):8000-5.
142. Agace WW, Amara A, Roberts AI, Pablos JL, Thelen S, Ugucioni M, Li XY, Marsal J, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Ebert EC, Moser B, Parker CM. *Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation.* *Curr Biol.* 2000; 10(6):325-8.
143. Pöhlmann S, Leslie GJ, Edwards TG, Macfarlan T, Reeves JD, Hiebenthal-Millow K, Kirchhoff F, Baribaud F, Doms RW. *DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus: virus binding and transfer are dissociable functions.* *J Virol.* 2001; 75(21):10523-6.
144. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. *DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection.* *Immunity.* 2002; 16(1):135-44.
145. Briz V, Poveda E, del Mar González M, Martín-Carbonero L, González-González R, Soriano V. *Impact of antiretroviral therapy on viral tropism in HIV-infected patients followed longitudinally for over 5 years.* *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(2):405-10.
146. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. *HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells.* *Nature.* 2002; 417(6884):95-8.
147. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H et al. *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus.* *Nat Med* 1997; 3(2):205-211.
148. Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfaffert K, Leslie A, Chetty S, Thobakgale C, Honeyborne I, Crawford H, Matthews P, Pillay T, Rousseau C, Mullins JI, Brander C, Walker BD, Stuart DI, Kiepiela P, Goulder P. *Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1.* *J Virol.* 2006; 80(7):3617-23.
149. Cheingsong-Popov R, Callow D, Beddows S, Shaunak S, Wasi C, Kaleebu P, Gilks C, Petrascu IV, Garaev MM, Watts DM, et al. *Geographic diversity of human immunodeficiency virus type 1: serologic reactivity to env epitopes and relationship to neutralization.* *J Infect Dis.* 1992; 165(2):256-61.
150. Moog C, Spenlehauer C, Fleury H, Heshmati F, Saragosti S, Letourneur F, Kirn A, Aubertin AM. *Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro.* *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997; 13(1):19-27.
151. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. *The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein.* *Nature.* 1998; 393(6686):705-11.
152. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT. *HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem.* *Nat Immunol.* 2004; 5(3):233-6.

153. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:657-700.
154. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003; 422(6929):307-12.
155. Pognard P, Saphire EO, Parren PW, Burton DR. *gp120: Biologic aspects of structural features.* *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:253-74.
156. Ezzell C. AIDS drug gets green light. *Nature.* 1987; 329(6142):751.
157. Volberding PA, Lagakos SW, Grimes JM, Stein DS, Rooney J, Meng TC, Fischl MA, Collier AC, Phair JP, Hirsch MS, et al. A comparison of immediate with deferred zidovudine therapy for asymptomatic HIV-infected adults with CD4 cell counts of 500 or more per cubic millimeter. *AIDS Clinical Trials Group.* *N Engl J Med.* 1995; 333(7):401-7.
158. Sterling TR, Chaisson RE, Moore RD. Initiation of highly active antiretroviral therapy at CD4+ T lymphocyte counts of >350 cells/mm³: disease progression, treatment durability, and drug toxicity. *Clin Infect Dis.* 2003; 36(6):812-5.
159. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999; 340(21):1614-1622
160. Plana M, Garcia F, Gallart T, Miro JM, Gatell JM. Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after 1 year of highly active antiretroviral treatment in early HIV-1 disease. *Immunology Study Group of Spanish EARTH-1 Study.* *Lancet* 1998; 352(9135):1194-1195.
161. Garcia F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13(11):F79-F86.
162. Giovannetti A, Pierdominici M, Marziali M, Mazzetta F, Caprini E, Russo G et al. Persistently biased T-cell receptor repertoires in HIV-1-infected combination antiretroviral therapy-treated patients despite sustained suppression of viral replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34(2):140-154.
163. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science.* 2009; 323(5919):1304-7.
164. Martinez E, Mocroft A, Garcia-Viejo MA, Perez-Cuevas JB, Blanco JL, Mallolas J et al. Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* 2001; 357(9256):592-598.
165. Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 2003; 9:861-866.
166. Autran, B., Carcelain, G., Combadiere, B., Debre, P. Therapeutic vaccines for chronic infections. *Science* 2004; 305: 205-208.
167. Castro P, López A, Fumero E, Nomdedeu M, Guilà M, Oliva , Climent N, García F. Vacunas terapéuticas e inmunoterapia en la infección por VIH. *AIDS Cyber J* 2005; 8(3)
168. Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG, Scadden DT, Connick E, Downs MT et al. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 2000; 96(3):785-793.
169. Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, Diem K, Spach D, Greenberg PD et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death. *J Clin Invest* 2000; 105:1407-1417.
170. Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, Jiyamapa D, Krieger J, Corey L et al. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells. *Nat Med* 1999; 5(1):34-41.
171. Koenig S, Conley AJ, Brewah YA, Jones GM, Leath S, Boots LJ et al. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat Med* 1995; 1(4):330-336.
172. Lieberman J, Fabry JA, Shankar P, Beckett L, Skolnik PR. Ex vivo expansion of HIV type 1-specific cytolytic T cells from HIV type 1-seropositive subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(2):257-271.
173. Levy J, Youvan T, Lee ML. Passive hyperimmune plasma therapy in the treatment of acquired immunodeficiency syndrome: results of a 12-month multicenter double-blind controlled trial. *Blood* 1994; 84:2130-2135.
174. Vittecoq D, Chevret S, Morand-Joubert L, Heshmati F, Audat F, Bary M et al. Passive immunotherapy in AIDS: a double-blind randomized study based on transfusions of plasma rich in anti-human immunodeficiency virus 1 antibodies vs transfusions of seronegative plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 1994:1195-1199.
175. Kuritzkes DR, Jacobson J, Powderly WG, Godofsky E, DeJesus E, Haas F et al. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* 2004; 189(2):286-291.
176. Karpas A, Hewlett IK, Hill F, Gray J, Byron N, Gilgen D et al. Polymerase chain reaction evidence for human immunodeficiency virus 1 neutralization by passive immunization in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(19):7613-7617.
177. Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, Falloon J, Davey RT, Jr., Walker RE et al. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1996; 335(18):1350-1356.
178. Jacobson EL, Pilaro F, Smith KA. Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(19):10405-10410.
179. Aladdin H, Ullum H, Dam NS, Espersen C, Mathiesen L, Katzenstein TL et al. Granulocyte colony-stimulating factor increases CD4+ T cell counts of human immunodeficiency virus-infected patients receiving stable, highly active antiretroviral therapy: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 2000; 181(3):1148-1152.
180. Brites C, Gilbert MJ, Pedral-Sampaio D, Bahia F, Pedroso C, Alcantara AP et al. A randomized, placebo-controlled trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and nucleoside analogue therapy in AIDS. *J Infect Dis* 2000; 182(5):1531-1535.
181. Alston B, Ellenberg JH, Standiford HC, Muth K, Martinez A, Greaves W et al. A multicenter, randomized, controlled trial of three preparations of low-dose oral alpha-interferon in HIV-infected patients with CD4+ counts between 50 and 350 cells/mm³. Division of AIDS Treatment Research Initiative (DATRI) 022 Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 22(4):348-357.
182. Angel JB, Jacobson MA, Skolnik PR, Giordano M, Shapiro L, LeBeaut A et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-10 in HIV-infected subjects. *AIDS* 2000; 14(16):2503-2508.

183. Jacobson MA, Hardy D, Connick E, Watson J, DeBruin M. Phase 1 trial of a single dose of recombinant human interleukin-12 in human immunodeficiency virus-infected patients with 100-500 CD4 cells/microL. *J Infect Dis* 2000; 182(4):1070-1076.
184. Kanai T, Thomas EK, Yasutomi Y, Letvin NL. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. *J Immunol* 1996; 157(8):3681-3687.
185. Truong MJ, Darcissac EC, Hermann E, Dewulf J, Capron A, Bahr GM. Interleukin-16 inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in macrophages and in dendritic cells. *J Virol* 1999; 73(8):7008-7013.
186. Napolitano, L., Grant, R.M., Deeks, S. et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001; 7: 73-79.
187. Hellinger JA, Iwane MK, Smith JJ, Fleishman AN, Torres RA, Schrader S et al. A randomized study of the safety and antiretroviral activity of hydroxyurea combined with didanosine in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. American Foundation for AIDS Research Community-Based Clinical Trials Network. *J Infect Dis* 2000; 181(2):540-547.
188. Garcia F, Plana M, Arnedo M, Ortiz GM, Miro JM, Lopalco L et al. A cytostatic drug improves control of HIV-1 replication during structured treatment interruptions: a randomized study. *AIDS* 2003; 17(1):43-51.
189. Andrieu JM, Lu W, Levy R. Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year. *J Infect Dis* 1995; 171(3):523-530.
190. Rizzardi GP, Vaccarezza M, Capiluppi B, Tambussi G, Lazzarin A, Pantaleo G. Cyclosporin A in combination with HAART in primary HIV-1 infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14(1):79-81.
191. Chapuis A, Rizzardi P, D'Agostini C, Attinger A, Knabenhans C, Fleury S et al. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nat Med* 2000; 6:762-768.
192. Garcia F, Plana M, Arnedo M, Brunet M, Castro P, Gil C et al. Effect of mycophenolate mofetil on immune response and plasma and lymphatic tissue viral load during and after interruption of highly active antiretroviral therapy for patients with chronic HIV infection: a randomized pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36(3):823-830.
193. Jacobson JM, Greenspan JS, Spritzler J, Ketter N, Fahey JL, Jackson JB et al. Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1997; 336(21):1487-1493.
194. Ruiz L, Ribera E, Bonjoch A, Romeu J, Martinez-Picado J, Paredes R et al. Role of structured treatment interruption before a 5-drug salvage antiretroviral regimen: the Retrogene Study. *J Infect Dis* 2003; 188(7):977-985.
195. Ruiz L, Carcelain G, Martinez-Picado J, Frost S, Marfil S, Paredes R et al. HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15(9):F19-F27.
196. Garcia F, Plana M, Ortiz GM, Bonhoeffer S, Soriano A, Vidal C et al. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15(9):F29-F40.
197. Patterson BK, Carlo DJ, Kaplan MH, Marecki M, Pawha S, Moss RB. Cell-associated HIV-1 messenger RNA and DNA in T-helper cell and monocytes in asymptomatic HIV-1-infected subjects on HAART plus an inactivated HIV-1 immunogen. *AIDS* 1999; 13(13):1607-1611.
198. Kinloch-de Loes S, Hoen B, Smith DE, Autran B, Lampe FC, Phillips AN et al. Impact of therapeutic immunization on HIV-1 viremia after discontinuation of antiretroviral therapy initiated during acute infection. *J Infect Dis* 2005; 192(4):607-617.
199. Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001; 292(5514):69-74.
200. Lisiewicz J, Bakare N, Lori F. Therapeutic vaccination for future management of HIV/AIDS. *Vaccine* 2003; 21(7-8):620-623.
201. Buge SL, Murty L, Arora K, Kalyanaraman VS, Markham PD, Richardson ES et al. Factors associated with slow disease progression in macaques immunized with an adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) envelope priming-gp120 boosting regimen and challenged vaginally with SIVmac251. *J Virol* 1999; 73(9):7430-7440.
202. Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shapero MH, Dupuis M, van Schooten WC, Eibl M, Merigan TC. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998; 14(7):551-60
203. Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 2004; 10(12):1359-1365.
204. Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcamí J, Morente V, Alós L, Ruiz A, Setoain J, Fumero E, Castro P, López A, Cruceta A, Piera C, Florence E, Pereira A, Libois A, González N, Guilà M, Caballero M, Lomeña F, Joseph J, Miró JM, Pumarola T, Plana M, Gatell JM, Gallart T. Therapeutic Immunization with Dendritic Cells Loaded with Heat-Inactivated Autologous HIV-1 in Patients with Chronic HIV-1 Infection. *J Infect Dis* 2005; 191(10):1680-1685.
205. Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, Iwamoto A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial. *J Med Virol*. 2006; 78(6):711-8
206. Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected Individuals. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(2):284-92
207. Oxenius A, Price DA, Gunthard HF, Dawson SJ, Fagard C, Perrin L et al. Stimulation of HIV-specific cellular immunity by structured treatment interruption fails to enhance viral control in chronic HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21):13747-13752.
208. Plana M, Garcia F, Oxenius A, Ortiz GM, Lopez A, Cruceta A et al. Relevance of HIV-1-specific CD4+ helper T-cell responses during structured treatment interruptions in patients with CD4+ T-cell nadir above 400/mm3. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 36(3):791-799.
209. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, Robbins GK, D'Aquila RT, Goulder PJ, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*. 2000;407(6803):523-6.

210. Dybul M. *Structured Treatment Interruption: Approaches and Risks*. *Curr Infect Dis Rep* 2002; 4(2):175-180.
211. Ananworanich J, Hirschel B. *Interrupting highly active antiretroviral therapy in patients with HIV*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; 3(1):51-60.
212. Lawrence J, Mayers DL, Hullsiek KH, Collins G, Abrams DI, Reisler RB et al. *Structured treatment interruption in patients with multidrug-resistant human immunodeficiency virus*. *N Engl J Med* 2003; 349(9):837-846.
213. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, El-Sadr WM, Lundgren JD, Neaton JD, Gordin F, Abrams D, Arduino RC, Babiker A, Burman W, Clumeck N, Cohen CJ, Cohn D, Cooper D, Darbyshire J, Emery S, Fätkenheuer G, Gazzard B, Grund B, Hoy J, Klingman K, Losso M, Markowitz N, Neuhaus J, Phillips A, Rappoport C. *CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment*. *N Engl J Med*. 2006; 355(22):2283-96.
214. Danel C, Moh R, Minga A, Anzian A, Ba-Gomis O, Kanga C, Nzunetu G, Gabillard D, Rouet F, Sorho S, Chaix ML, Eholié S, Menan H, Sauvageot D, Bissagnene E, Salamon R, Anglaret X; Trivacan ANRS 1269 trial group. *CD4-guided structured antiretroviral treatment interruption strategy in HIV-infected adults in west Africa (Trivacan ANRS 1269 trial): a randomised trial*. *Lancet*. 2006; 367(9527):1981-9.
215. Ananworanich J, Gayet-Ageron A, Le Braz M, Prasithsirikul W, Chetchothisakd P, Kiertiburanakul S, Munsakul W, Raksakulkarn P, Tansuphasawasdikul S, Sirivichayakul S, Cavassini M, Karrer U, Genné D, Nüesch R, Vernazza P, Bernasconi E, Leduc D, Satchell C, Yerly S, Perrin L, Hill A, Perneger T, Phanuphak P, Furrer H, Cooper D, Ruxrungtham K, Hirschel B; Staccato Study Group; Swiss HIV Cohort Study. *CD4-guided scheduled treatment interruptions compared with continuous therapy for patients infected with HIV-1: results of the Staccato randomised trial*. *Lancet*. 2006; 368(9534):459-65.
216. Harrigan PR, Whaley M, Montaner JS. *Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy*. *AIDS* 1999; 13(8):F59-F62.
217. Colven R, Harrington RD, Spach DH, Cohen CJ, Hooton TM. *Retroviral rebound syndrome after cessation of suppressive antiretroviral therapy in three patients with chronic HIV infection*. *Ann Intern Med* 2000; 133(6):430-434.
218. Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M, Karanicolas R, Allers K, Joos B et al. *Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions*. *J Infect Dis* 2003; 188(10):1433-1443.
219. Pappasavvas E, Grant RM, Sun J, Mackiewicz A, Pistilli M, Gallo C et al. *Lack of persistent drug-resistant mutations evaluated within and between treatment interruptions in chronically HIV-1-infected patients*. *AIDS* 2003; 17(16):2337-2343.
220. Schweighardt B, Ortiz GM, Grant RM, Wellons M, Miralles GD, Kostrikis LG et al. *Emergence of drug-resistant HIV-1 variants in patients undergoing structured treatment interruptions*. *AIDS* 2002; 16(17):2342-2344.
221. Dybul M, Nies-Kraske E, Daucher M, Hertogs K, Hallahan CW, Csako G et al. *Longcycle structured intermittent versus continuous highly active antiretroviral therapy for the treatment of chronic infection with human immunodeficiency virus: effects on drug toxicity and on immunologic and virologic parameters*. *J Infect Dis* 2003; 188(3):388-396.
222. Yerly S, Fagard C, Gunthard HF, Hirschel B, Perrin L. *Drug resistance mutations during structured treatment interruptions*. *Antivir Ther* 2003; 8(5):411-415.
223. Nüesch R, Ananworanich J, Sirivichayakul S, Ubolyam S, Siangphoe U, Hill A et al. *Development of HIV with drug resistance after CD4 cell count-guided structured treatment interruptions in patients treated with highly active antiretroviral therapy after dual-nucleoside analogue treatment*. *Clin Infect Dis* 2005; 40(5):728-734.
224. Thiebaut R, Pellegrin I, Chene G, Viillard JF, Fleury H, Moreau JF et al. *Immunological markers after long-term treatment interruption in chronically HIV-1 infected patients with CD4 cell count above 400 x 10(6) cells/l*. *AIDS* 2005; 19(1):53-61.
225. Fernandez Guerrero ML, Rivas P, Molina M, Garcia R, De Gorgolas M. *Long-term follow-up of asymptomatic HIV-infected patients who discontinued antiretroviral therapy*. *Clin Infect Dis* 2005; 41(3):390-394.
226. Tebas P, Henry K, Mondy K, Deeks S, Valdez H, Cohen C et al. *Effect of prolonged discontinuation of successful antiretroviral therapy on CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus-infected patients: implications for intermittent therapeutic strategies*. *J Infect Dis* 2002; 186(6):851-854.
227. Markowitz M, Jin X, Hurley A, Simon V, RAMRATNAM B, Louie M et al. *Discontinuation of antiretroviral therapy commenced early during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection, with or without adjunctive vaccination*. *J Infect Dis* 2002; 186(5):634-643.
228. McGregor RR, Ginsberg R, Ugen KE, Baine Y, Kang CU, Tu XM et al. *T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev*. *AIDS* 2002; 16(16):2137-2143.
229. McGregor RR, Boyer JD, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, Weiner DB. *Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type 1 env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data*. *J Infect Dis* 2000; 181(1):406.
230. Schooley RT, Spino C, Kuritzkes D, Walker BD, Valentine FA, Hirsch MS et al. *Two double-blinded, randomized, comparative trials of 4 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope vaccines in HIV-1-infected individuals across a spectrum of disease severity: AIDS Clinical Trials Groups 209 and 214*. *J Infect Dis* 2000; 182(5):1357-1364.
231. Smith D, Gow I, Colebunders R, Weller I, Tchamouroff S, Weber J et al. *Therapeutic vaccination (p24-VLP) of patients with advanced HIV-1 infection in the pre-HAART era does not alter CD4 cell decline*. *HIV Med* 2001; 2(4):272-275.
232. A Moss RB, Giermakowska WK, Savary JR, Theofan G, Daigle AE, Richieri SP, Jensen FC, Carlo DJ. *primer on HIV type 1-specific immune function and REMUNE*. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998; 14 Suppl 2:S167-75.
233. Robbins GK, Addo MM, Troung H, Rathod A, Habeeb K, Davis B et al. *Augmentation of HIV-1-specific T helper cell responses in chronic HIV-1 infection by therapeutic immunization*. *AIDS* 2003; 17(8):1121-1126.
234. Lederman MM, Douek DC. *Sometimes help may not be enough*. *AIDS* 2003; 17(8):1249-1251.
235. Kahn JO, Cherng DW, Mayer K, Murray H, Lagakos S. *Evaluation of HIV-1 immunogen, an immunologic modifier, administered to patients infected with HIV having 300 to 549 x 10(6)/L CD4 cell counts: A randomized controlled trial*. *JAMA* 2000; 284(17):2193-2202.
236. Dorrell L, Yang H, Iversen AK, Conlon C, Suttill A, Lancaster M, Dong T, Cebere I, Edwards A, Rowland-Jones S, Hanke T, McMichael AJ. *Therapeutic immunization of highly active antiretroviral therapy-treated HIV-1-infected patients: safety and immunogenicity of an HIV-1 gag/poly-epitope DNA vaccine*. *AIDS*. 2005;19(12):1321-3.

237. Wilson CC, Newman MJ, Livingston BD, MaWhinney S, Forster JE, Scott J, Schooley RT, Benson CA. *Clinical phase 1 testing of the safety and immunogenicity of an epitope-based DNA vaccine in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects receiving highly active antiretroviral therapy*. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(6):986-94.
238. Hanke T, Goonetilleke N, McMichael AJ, Dorrell L. *Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction*. J Gen Virol. 2007; 88(Pt 1):1-12. Erratum in: J Gen Virol. 2008; 89(Pt 2):609.
239. Belshe RB, Stevens C, Gorse GJ, Buchbinder S, Weinhold K, Sheppard H, Stablein D, Self S, McNamara J, Frey S, Flores J, Excler JL, Klein M, Habib RE, Duliege AM, Harro C, Corey L, Keefer M, et al. *Safety and immunogenicity of a canarypox-vectored human immunodeficiency virus Type 1 vaccine with or without gp120: a phase 2 study in higher- and lower-risk volunteers*. J Infect Dis. 2001; 183(9):1343-52.
240. McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G et al. *Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans*. Nat Med 2003; 9(6):729-735.
241. Lisiewicz J, Trocio J, Xu J, Whitman L, Ryder A, Bakare N et al. *Control of viral rebound through therapeutic immunization with DermaVir*. AIDS 2005; 19(1):35-43.
242. Lu W, Wu X, Lu Y, Guo W, Andrieu JM. *Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS*. Nat Med 2003; 9(1):27-32.
243. Lapenta C, Santini S, Logozzi M, Spada M, Andreotti M, Pucchio T et al. *Potent Immune responses against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha*. J Exp Med 2003; 198:361-367.
244. Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M et al. *Induction of protective immune responses against R5 Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intraesplenic immunization with HIV-1 pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4+ T-cell origin*. J Virol 2003; 77:8719-8728.
245. Walsh SR, Bhardwaj N, Gandhi RT. *Dendritic cells and the promise of therapeutic vaccines for human immunodeficiency virus (HIV)-1*. Curr HIV Res. 2003; 1(2):205-16.
246. Rinaldo CR. *Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine*. J Intern Med. 2009; 265(1):138-58.
247. Banchereau J, Steinman RM. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature. 1998; 392(6673):245-52.
248. Klechevsky E, Liu M, Morita R, Banchereau R, Thompson-Snipes L, Palucka AK, Ueno H, Banchereau J. *Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines*. Hum Immunol. 2009; 70(5):281-8.
249. Lu W, Andrieu JM. *In vitro human immunodeficiency virus eradication by autologous CD8(+) T cells expanded with inactivated-virus-pulsed dendritic cells*. J Virol. 2001; 75(19):8949-56.
250. Climent N, Martinez-Navio JM, Gil C, Garcia F, Rovira C, Hurtado C, Miralles L, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. *Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV*. Immunol Cell Biol. 2009; 87(8):634-9.
251. Frank I, Santos JJ, Mehlhop E, Villamide-Herrera L, Santisteban C, Gettie A, Ignatius R, Lifson JD, Pope M. *Presentation of exogenous whole inactivated simian immunodeficiency virus by mature dendritic cells induces CD4+ and CD8+ T-cell responses*. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003; 34(1):7-19.
252. Lifson JD, Rossio JL, Piatak M Jr, Bess J Jr, Chertova E, Schneider DK, Coalter VJ, Poore B, Kiser RF, Imming RJ, Scarzello AJ, Henderson LE, Alvord WG, Hirsch VM, Benveniste RE, Arthur LO. *Evaluation of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of whole inactivated simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins*. AIDS Res Hum Retroviruses. 2004; 20(7):772-87.
253. Klooverpris H, Karlsson I, Bonde J, Thom M, Vinner L, Pedersen AE, Hentze JL, Andresen BS, Svane IM, Gerstoft J, Kronborg G, Fomsgaard A. *Induction of novel CD8+ T-cell responses during chronic untreated HIV-1 infection by immunization with subdominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes*. AIDS. 2009; 23(11):1329-40.
254. Gandhi RT, O'Neill D, Bosch RJ, Chan ES, Bucy RP, Shopis J, Baglyos L, Adams E, Fox L, Purdue L, Marshak A, Flynn T, Masih R, Schock B, Mildvan D, Schlesinger SJ, Marovich MA, Bhardwaj N, Jacobson JM; AIDS Clinical Trials Group A5130 team. *A randomized therapeutic vaccine trial of canarypox-HIV-pulsed dendritic cells vs canarypox-HIV alone in HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy*. Vaccine. 2009; 27(43):6088-94.
255. Routy JP, Boulassel MR, Yassine-Diab B, Nicolette C, Healey D, Jain R, Landry C, Yegorov O, Tcherepanova I, Monesmith T, Finke L, Sékaly RP. *Immunologic activity and safety of autologous HIV RNA-electroporated dendritic cells in HIV-1 infected patients receiving antiretroviral therapy*. Clin Immunol. 2010; 134(2):140-7.
256. Mohri H, Singh MK, Ching WT, Ho DD. *Quantitation of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the blood of treated and untreated patients*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(1):25-9.
257. Nájera I, Richman DD, Olivares I et al. *Natural occurrence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of HIV-1 isolates*. AIDS Res Hum Retrov 1994; 10:1475-1484
258. Nájera I, Holguin A, Quinones-Mateu ME, Munoz-Fernandez MA, Najera R, Lopez-Galindez C, Domingo E. *Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy*. J Virol. 1995 Jan;69(1):23-31.
259. Hecht FM, Gran RM, Petropoulos CJ, et al. *Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple RT and protease inhibitors*. N Engl J Med 1998; 339:307-331
260. Imrie A, Beveridge A, Genn W, et al. *Transmission of HIV-1 resistant to nevirapine and zidovudine: Sydney primary HIV infection Study Group*. J Infect Dis 1997; 175:1502-1506
261. Levy JA. *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Microbiol Rev 1993 Mar;57(1):183-289.
262. Leitner T, Kumar S, Albert J. *Tempo and mode of nucleotide substitutions in gag and env gene fragments in human immunodeficiency virus type 1 populations with a known transmission history*. J. Virol. 1997; 71:4761-4770.
263. Günthard HF, Frost SD, Leigh-Brown AJ, Ignacio CC, Kee K, Perelson AS, Spina CA, Havlir DV, Hezareh M, Looney DJ, Richman DD, Wong JK. *Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy*. 1999; J. Virol. 73(11): 9404-9412.

264. Dybul M, Daucher M, Jensen MA, Hallahan CW, Chun TW, Belson M, Hidalgo B, Nickle DC, Yoder C, Metcalf JA, Davey RT, Ehler L, Kress-Rock D, Nies-Kraske E, Liu S, Mullins JI, Fauci AS. *Genetic characterization of rebounding human immunodeficiency virus type 1 in plasma during multiple interruptions of highly active antiretroviral therapy.* J Virol. 2003; 77(5):3229-37.
265. Joos B, Fischer M, Kuster H, Pillai SK, Wong JK, Böni J, Hirschel B, Weber R, Trkola A, Günthard HF; Swiss HIV Cohort Study. *HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(43):16725-30.
266. Engelmayer J, Larsson M, Lee A, Lee M, Cox WI, Steinman RM, Bhardwaj N. *Mature dendritic cells infected with canarypox virus elicit strong anti-human immunodeficiency virus CD8+ and CD4+ T-cell responses from chronically infected individuals.* J Virol. 2001; 75(5):2142-53.
267. Arnedo-Valero M, Plana M, Mas A, Guilà M, Gil C, Castro P, Garcia F, Domingo E, Gatell JM, Pumarola T. *Similar HIV-1 evolution and immunological responses at 10 years despite several therapeutic strategies and host HLA Types.* J Med Virol. 2004; 73(4):495-501.
268. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.* Molecular Biology and Evolution. 2007; 24:1596-1599.
269. Xia X, Xie Z. *DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution.* J Hered. 2001; 92(4):371-3.
270. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. *Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences.* J Virol. 2003; 77(24):13376-88.
271. Labernardiere J, Lebel-Binary S, Faudon J et al. *Tropism determination and performance of Phenoscript HIV-1 entry inhibitors assay.* Antivir Ther. 2004; 9 Suppl: 141.
272. Fares MA. *SWAPSC: sliding window analysis procedure to detect selective constraints.* Bioinformatics. 2004; 20(16):2867-8.
273. Yang Z. *PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood.* Mol Biol Evol. 2007; 24(8):1586-91.
274. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. *Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development.* Indian J Med Res. 2005;121(4):287-314.
275. Domingo E, Martin V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. *Viruses as quasispecies: biological implications.* Curr Top Microbiol Immunol. 2006; 299:51-82.
276. Briones C, de Vicente A, Molina-París C, Domingo E. *Minority memory genomes can influence the evolution of HIV-1 quasispecies in vivo.* Gene. 2006; 384:129-38.
277. Briones C, Domingo E. *Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications.* AIDS Rev. 2008; 10(2):93-109.
278. Martínez-Picado J, Frost SD, Izquierdo N, Morales-Lopetegui K, Marfil S, Puig T, Cabrera C, Clotet B, Ruiz L. *Viral evolution during structured treatment interruptions in chronically human immunodeficiency virus-infected individuals.* J Virol. 2002; 76(23):12344-8.
279. Joos B, Trkola A, Fischer M, Kuster H, Rusert P, Leemann C, Böni J, Oxenius A, Price DA, Phillips RE, Wong JK, Hirschel B, Weber R, Günthard HF; Swiss HIV Cohort Study. *Low human immunodeficiency virus envelope diversity correlates with low in vitro replication capacity and predicts spontaneous control of plasma viremia after treatment interruptions.* J Virol. 2005; 79(14):9026-37.
280. Silva WP, Santos DE, Leal E, Brunstein A, Sucupira MC, Sabino EC, Diaz RS. *Reactivation of ancestral strains of HIV-1 in the gp120 V3 env region in patients failing antiretroviral therapy and subjected to structured treatment interruption.* Virology. 2006; 354(1):35-47.
281. Mascola JR, Montefiori DC. *The role of antibodies in HIV vaccines.* Annu Rev Immunol. 2010; 28:413-44.
282. Fox DG, Balfe P, Palmer CP, May JC, Arnold C, McKeating JA. *Length polymorphism within the second variable region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein affects accessibility of the receptor binding site.* J Virol. 1997; 71(1):759-65.
283. Groenink M, Fouchier RA, Broersen S, Baker CH, Koot M, van't Wout AB, Huisman HG, Miedema F, Tersmette M, Schuitemaker H. *Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration.* Science. 1993; 260(5113):1513-6.
284. Mani, I., P. Gilbert, J. L. Sankale, G. Eisen, S. Mboup, and P. J. Kanki. *Intrapatient diversity and its correlation with viral setpoint in human immunodeficiency virus type 1 CRF02_AG-IbNG infection.* J. Virol. 2002; 76:10745-10755.
285. Markham, R. B., W. C. Wang, A. E. Weisstein, Z. Wang, A. Munoz, A. Templeton, J. Margolick, D. Vlahov, T. Quinn, H. Farzadegan, and X. F. Yu. *Patterns of HIV-1 evolution in individuals with differing rates of CD4 T-cell decline.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998; 95:12568-12573.
286. Bagnarelli, P., F. Mazzola, S. Menzo, M. Montroni, L. Butini, and M. Clementi. *Host-specific modulation of the selective constraints driving human immunodeficiency virus type 1 env gene evolution.* J. Virol. 1999; 73:3764-3777.
287. Chun TW, Davey RT Jr, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, Fauci AS. *Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active antiretroviral therapy.* Nat Med. 2000; 6(7):757-61.
288. Zhang L, Chung C, Hu BS, He T, Guo Y, Kim AJ, Skulsky E, Jin X, Hurley A, Ramratnam B, Markowitz M, Ho DD. *Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy.* J Clin Invest. 2000; 106(7):839-45.
289. Imamichi H, Crandall KA, Natarajan V, Jiang MK, Dewar RL, Berg S, Gaddam A, Bosche M, Metcalf JA, Davey RT Jr, Lane HC. *Human immunodeficiency virus type 1 quasi species that rebound after discontinuation of highly active antiretroviral therapy are similar to the viral quasi species present before initiation of therapy.* J Infect Dis. 2001; 183(1):36-50.
290. García F, Climent N, Assoumou L, Gil C, González N, Alcami J, León A, Romeu J, Dalmau J, Martínez-Picado J, Lifson J, Autran B, Costagliola D, Clotet B, Gatell JM, Plana M, Gallart T; DCV2/MANON07- AIDS Vaccine Research Objective Study Group. *A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection.* J Infect Dis. 2011; 203(4):473-8.
291. Schockmel GA, Yerly S, Perrin L. *Detection of low HIV-1 RNA levels in plasma.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997; 14(2):179-83.

ANNEX MÈTODES
(Protocols)

1. OBTENCIÓ DE PLASMA DE SANG PERIFÈRICA

Per a la separació del plasma de la sang total es parteix d'una extracció de sang perifèrica del pacient en tubs *vacutainer* amb EDTA com anticoagulant (no es pot utilitzar heparina degut a que aquest anticoagulant pot inhibir les posteriors reaccions de PCR).

1.1 REACTIUS I EQUIPS

- Cabina de flux laminar tipus Biolla
- Centrífuga amb rotor apte per tubs *vacutainer*
- Pipetes pasteur estèrils

1.2 PROCEDIMENT

- Centrifugar els tubs de sang amb EDTA 10 minuts a 1500 rpm.
- Extreure el sobrenedant (plasma lliure de cèl·lules) dels tubs amb EDTA i transferir-lo amb una pipeta pasteur estèril a un tub de 15 mL retolat adequadament.
- Centrifugar el plasma 10 minuts a 2000 rpm, per eliminar les plaquetes.
- Recollir el plasma amb una pasteur estèril i al·licotar 1 mL en tubs de rosca de 1.5 mL estèrils prèviament retolats amb la paraula PLASMA, el codi del pacient, el número de toma, la data de l'extracció i el tipus d'anticoagulant emprat (en aquest cas, EDTA).
- Guardar les alíquotes de plasma a -80°C en cas de no utilitzar-les a continuació.

2. QUANTIFICACIÓ DE L'ARN VIH-1 EN EL PLASMA SANGUINI

La concentració de l'ARN del VIH-1 en plasma es va determinar emprant la tècnica de RT-PCR quantitativa mitjançant l'assaig comercial Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultra Sensitive Specimen Preparation Protocol Ultra Direct Assay (Roche Molecular Systems, Somerville, NJ, USA) seguint les instruccions del fabricant amb un límit de quantificació de 20 còpies/mL. Les mostres amb una quantificació <20 còpies/mL es van tornar a analitzar emprant un mètode descrit per Schockmel i col·laboradors ^[291] amb un límit de detecció de 5 còpies/mL, detallat a continuació.

- Centrifugar 1 mL de plasma a 4°C durant 80 minuts a 50.000g.
- Preparar el volum del tampó de lisi i els estàndards interns (IQS) necessaris per l'experiment (150 µL per tub), ajustar la quantitat de l'IQS per aconseguir la mateixa concentració que l'estàndard d'Amplicor per la reacció de PCR (per exemple: 8.8 mL tampó de lisis + 100 µL d'IQS).
- Descartar el sobrenedant amb una punta de filtre per aerosols estèril deixant aproximadament 100 µL.
- Afegir 150 µL del tampó de lisi que conté l'IQS.
- Afegir 450 µL del tampó de lisi sense l'IQS.
- Agitar 5 seg i incubar 10 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 650 µL d'isopropanol 100% i agitar.
- Centrifugar 15 min a 16.000 rpm.
- Descartar el sobrenedant i afegir 1mL d'etanol 70% i agitar.
- Centrifugar 5 min a 16.000 rpm.
- Descartar el sobrenedant. Fer un pols a la centrífuga i descartar novament el sobrenedant emprant una punta estèril amb filtre per evitar aerosols.
- Afegir 55 µL del tampó eluent i agitar.
- Utilitzarem 10 µL d'ARN per fer l'amplificació i detecció.

3. OBTENCIÓ DE L'ARN VIRAL DE PLASMA SANGUINI

L'objectiu d'aquesta tècnica és aïllar, a partir d'una mostra de 1 mL de plasma sanguini, l'ARN del VIH circulant.

3.1 REACTIUS I EQUIPS

- QIAamp® Viral RNA Extraction Kit (Cat# 29504 QIAgen)
- Etanol absolut
- Aigua destil·lada estèril
- Bloc termoestàtic a 56°C
- Ultracentrífuga refrigerada amb rotor apte per tubs de 1.5 mL
- Cabina de flux laminar (recomanable)
- Vòrtex
- Puntetes estèrils amb filtre

3.2 PREPARACIÓ

- Afegir l'etanol necessari als Buffers AW1 i AW2.
- Afegir el Carrier RNA al Buffer AVL.
- Escalfar el Buffer AVL en un termoblock a 56°C per desfer els cristalls, agitant-lo de tant en tant.

3.3 PROCEDIMENT (modificat del protocol del kit comercial)

- Ultracentrifugar 1 mL de plasma 1 hora a 23000 rpm 4°C.
- Descartar el sobrenedant pipetejant (deixar uns 50-100 µL en el tub per no emportar-se gens de pèl·let de virus)
- Afegir 330 µL de Buffer de Lisi AVL. Vòrtex.
- Incubar 10 min a temperatura ambient. Pols.

- Afegir 280 µL d'Etanol Absolut. Vòrtex. Pols.
 - Transferir el volum total a la columna (que es troba dins d'un tub col·lector).
 - Centrifugar 2 min a 13000 rpm temperatura ambient.
 - Descartar el contingut del col·lector i inserir la columna en un altre col·lector nou.
- Rentar amb 500 µL de Buffer AW1.
- Centrifugar 2 min a 13000 rpm temperatura ambient.
 - Descartar el contingut del col·lector i insertar la columna en un altre col·lector nou.
- Rentar amb 500 µL de Buffer AW2.
- Centrifugar 3 min a 13000 rpm temperatura ambient.
 - Descartar el contingut del col·lector i inserir la columna en un altre col·lector nou.
- Tornar a rentar amb 500 µL de Buffer AW2.
- Centrifugar 3 min a 13000 rpm temperatura ambient.
 - Descartar el contingut del col·lector i inserir la columna en un altre col·lector nou.
- Centrifugar 1 min sense afegir res a 13000 rpm temperatura ambient per eliminar del tot les restes de buffer.
- Col·locar la columna en un tub de 1.5 mL estèril ben retolat. Afegir 25-200 µL de Buffer AVE o aigua destil·lada estèril en funció de la CV de la mostra:
- CV < 8.000 còpies/mL 25 µL
- CV 8.000-15.000 còpies/mL 50 µL
- CV 15.000-200.000 còpies/mL 100 µL
- CV > 200.000 còpies/mL 200 µL
- CV desconeguda 60 µL
- Incubar 1 min a temperatura ambient per millorar l'eficiència de l'elució.
 - Centrifugar a 1 min a 10.000 rpm.
 - Descartar la columna i passar el contingut del tub de 1.5 mL a un tub de rosca ben retolat, amb la paraula ARN, el codi del pacient, la toma i la data d'extracció.
 - Mantenir en gel si s'utilitza a continuació o bé guardar a -80°C.

4. AMPLIFICACIÓ DE LA REGIÓ C2V5 DEL GEN *env* A PARTIR D'ARN DE VIH-1

L'objectiu d'aquesta tècnica consisteix en amplificar la regió C2V5 del gen de l'envolta del VIH-1 a partir de l'ARN viral mitjançant una transcripció inversa combinada amb una reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) i una reacció en cadena de la polimerasa "nested" o interna (NT-PCR).

4.1 RT-PCR

4.1.1 Reactius i Equips:

- SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* (Cat# 10928-042, Invitrogen)
- Expand High Fidelity PCR System (Cat# 11732641001, Roche)
- Aigua destil·lada estèril
- Primers 10 μ M: C2-2S, ED12 (veure Taula 7).
- Tubs de 0,2 mL estèrils.
- Puntetes amb filtre.
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

4.1.2 Procediment:

Preparar, en fred, una mescla tamponada per duplicat per a cadascuna de les mostres d'ARN viral de cada pacient, tal com es detalla a continuació (el tampó Mix Reaction x2, que ja conté els dNTP i la mescla d'enzims RT/*Taq* polimerasa es comercialitzen en el kit Super Script One-Step RT-PCR System, mentre que la polimerasa d'alta fidelitat Expand es comercialitza en el kit Expand High Fidelity PCR System):

Mix Reaction x2	25 µL
H ₂ Od estèril	9 µL
Primer C2-2S (10µM)	2 µL
Primer ED12 (10µM)	2 µL
RT/Taq polimerasa	1 µL
Expand HF pol (3,5U/µL)	1 µL
<i>Total</i>	40 µL

Cada mostra d'ARN s'amplificarà dues vegades: una afegint 10 µL de l'ARN viral del pacient a la mescla i l'altra afegint 1 µL d'ARN més 9 µL d'aigua destil·lada estèril. El volum final de la reacció serà de 50 µL. Seguidament posar els tubs en el termociclador amb el programa següent:

45°C	45 min	
94°C	2 min	
94°C	30 seg	} 10 cicles + 20 cicles (Δ 0.5 seg extensió/cicle)
59°C	30 seg	
68°C	1 min	
68°C	10 min	
4°C	∞	

4.2 NT-PCR

4.2.1 Reactius i Equips:

- Expand High Fidelity PCR System (Cat# 11732641001, Roche)
- dNTP 10 mM equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Aigua destil·lada estèril
- Primers 10µM: C2F Mod, WEAU (veure Taula 7).
- Tubs de 0,2 mL estèrils.
- Puntetes amb filtre.
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

4.2.2 Procediment:

Preparar, en fred, una mescla tamponada per cadascuna de les mostres d'ADNc obtingudes per RT-PCR, tal com es detalla a continuació (el Buffer 10x, que conté 15mM de $MgCl_2$, i la polimerasa d'alta fidelitat Expand es comercialitzen en el kit Expand High Fidelity PCR System):

H ₂ O d estèril	34 μ L
Buffer x10 with 15mM $MgCl_2$	5 μ L
dNTP 10 mM	1 μ L
Primer WEAU (10 μ M)	2 μ L
Primer C2FMod (10 μ M)	2 μ L
Expand HF pol (3,5U/ μ L)	1 μ L
<i>Total</i>	45 μ L

Afegir 5 μ L de cada ADNc a la mescla tamponada anterior. El volum final de la reacció serà de 50 μ L. Seguidament posar els tubs en el termociclador amb el programa detallat a continuació:

94°C	2 min	} 10 cicles + 20 cicles (Δ 0.5 seg extensió/cicle)
94°C	30 seg	
51°C	30 seg	
68°C	1 min	
68°C	10 min	
4°C	∞	

5. COMPROVACIÓ DE L'AMPLIFICACIÓ

Per visualitzar si l'amplificació ha estat positiva, es comprova una alíquota de cada amplificació mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa 1% en tampó Tris-borat EDTA (TBE).

5.1 REACTIUS I EQUIPS:

- Agarosa D1 Baja EEO (Cat# 8014, Pronadisa)
- Tampó TBE 10x (Cat# EC-860, National Diagnostics)
- SyBr Safe DNA Gel Stain 10.000x (Cat# S33102, Invitrogen)
- Marcador 1kb Plus DNA Ladder (Cat# 10787-018, Invitrogen)
- Tampó de càrrega 10x Blue Juice (Cat# 10816-015, Invitrogen)
- Aigua destil·lada
- Font i cubeta d'electroforesi
- Microones
- Balança
- Transiluminador

5.2 PROCEDIMENT:

- Preparar el tampó TBE a concentració 1x (per un litre mesclar 100 mL de TBE 10x i 900 mL d'aigua destil·lada). Omplir la cubeta d'electroforesi amb aquest tampó.
- Preparar un gel d'agarosa al 1%; per 100 mL, pesar 1 gr d'agarosa i dispensar-lo en un matrau erlenmeier de 250 mL. Afegir 100 mL de TBE x1, mesclar bé i escalfar al microones fins que l'agarosa s'hagi dissolt completament. Deixar refredar (sense que polimeritzi) i afegir 5 µL de SyBr Safe 10.000x, mesclar bé i abocar en el motlle i deixar que polimeritzi a temperatura ambient..

- Preparar les mostres i el marcador per carregar-les en el gel: mesclar 5 μL de mostra (o marcador de pes molecular) + 4 μL d' aigua destilada + 1 μL tampó de càrrega, i mesclar. Ficar el gel d'agarosa a la cubeta i carregar les mostres. Connectar la cubeta a la font d'electroforesi i deixar córrer a ± 100 volts durant 30 min aproximadament.
- Visualitzar la presència de bandes d'ADN en un transiluminador, la banda d'interès és d'uns 650 pb.

6. PURIFICACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR

L'objectiu d'aquesta tècnica és obtenir els productes de PCR purificats, sense restes de dNTPs, primer-dimer, enzims, etc. La purificació es realitzarà a partir de la pròpia reacció de PCR (si la banda observada en el gel d'agarosa és única) o bé a partir de la banda d'interès retallada d'un gel d'agarosa de baix punt de fusió.

6.1 PURIFICACIÓ DE BANDES D'UN GEL D'AGAROSA

6.1.1 Reactius i Equips

- Agarosa Low Melting (Cat# 8051, Pronadisa)
- Tampó TBE 10x (Cat# EC-860, National Diagnostics)
- SyBr Safe DNA Gel Stain 10.000x (Cat# S33102, Invitrogen)
- Marcador 1kb Plus DNA Ladder (Cat# 10787-018, Invitrogen)
- Tampó de càrrega 10x Blue Juice (Cat# 10816-015, Invitrogen)
- Aigua destil·lada
- Font i cubeta d'electroforesi
- Microones
- Balança
- Transiluminador
- Bisturí
- Etanol 70%

6.1.2 Procediment

- Preparar el gel d'agarosa de baix punt de fusió al 1% de la mateixa manera que un gel d'agarosa normal (veure apartat 5.2 d'aquest annex) però utilitzant l'agarosa esmentada. En aquest cas deixarem córrer el gel a ± 60 volts durant 90-120 min aproximadament.
- Col·locar el gel en el transiluminador i tallar les bandes d'interès amb un bisturí netejat amb etanol 70%. Transferir cada banda a un tub de 1.5 mL estèril i retolat.
- Pesar cada banda fent tara amb un tub de 1.5 mL buit i anotar el pes a cada tub. La banda pot fer màxim 300 mg.

6.2 PURIFICACIÓ DE L'ADN AMPLIFICAT

6.2.1 Reactius i Equips

- GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Cat# 27-9602-01, Amersham)
- Etanol absolut
- Aigua destil·lada estèril
- Minicentrífuga
- Bloc termoestàtic a 60°C (només si es purifica de banda)

6.2.2 Procediment (producte PCR)

- Preparar una columna i un col·lector per mostra.
- Afegir 500 μ L de Buffer de Captura a la columna.
- Afegir els 45 μ L de reacció de PCR a la columna y mesclar pipetejant 4-6 vegades.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.

- Descartar el contingut del col·lector i reinserir la columna.
- Afegir 500 µL de Buffer de Rentat (al que prèviament s'ha afegit etanol, segons instruccions del fabricant) a la columna.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Descartar el contingut del col·lector i reinserir la columna.
- Sense afegir res, centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Dispensar la columna dins un tub de 1.5 mL estèril i retolat.
- Afegir 25 µL de Buffer d'Elució o aigua destil·lada estèril a la columna, xopant la membrana d'aquesta.
- Deixar incubar 1 min a temperatura ambient per millor l'eficiència de l'elució.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Guardar l'ADN eluït a -20°C si no s'utilitza a continuació.

6.2.3 Procediment (banda de agarosa)

- Preparar una columna i un col·lector per mostra.
- Afegir tants µL de Buffer de Captura com mg tingui la banda (per exemple: 100mg, 100 µL).
- Incubar a 60°C fins que l'agarosa s'hagi fos (màxim 10 min).
- Transferir el volum a una columna.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Descartar el contingut del col·lector i reinserir la columna.
- Afegir 500 µL de Buffer de Rentat (al que s'ha afegit Etanol absolut, segons instruccions del fabricant) a la columna.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Descartar el contingut del col·lector i reinserir la columna.
- Sense afegir res, centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Dispensar la columna dins un tub de 1.5 mL estèril i retolat.

- Afegir 25 µL de Buffer d'Elució o aigua destil·lada estèril a la columna, xopant la membrana d'aquesta.
- Incubar 1 min a T^a ambient per millorar l'eficiència d'elució.
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm a temperatura ambient.
- Guardar l'ADN eluït a -20°C si no s'empra seguidament.

6.3 QUANTIFICACIÓ DE L'ADN PURIFICAT

6.3.1 Reactius i Equips

- Agarosa D1 Baja EEO (Cat# 8014, Pronadisa)
- Tampó TBE 10x (Cat# EC-860, National Diagnostics)
- SyBr Safe DNA Gel Stain 10.000x (Cat# S33102, Invitrogen)
- Marcador quantitatiu Lambda DNA/HindIII (Cat# G1711, Promega)
- Tampó de càrrega 10x Blue Juice (Cat# 10816-015, Invitrogen)
- Aigua destil·lada
- Font i cubeta d'electroforesi
- Microones
- Balança
- Transiluminador

6.3.2 Procediment

- Preparar un gel d'agarosa a l'1% tal com s'explica a l'apartat 5.2 d'aquest annex.
- Preparar les mostres i el marcador quantitatiu per carregar-les en el gel: mesclar 3 µL de mostra + 6 µL d' aigua destilada + 1 µL tampó de càrrega; 1 µL de marcador (1 µg/µL) + 8 µL d' aigua destilada + 1 µL tampó de càrrega. Ficar el gel d'agarosa a la cubeta i carregar el marcador quantitatiu i les mostres.

Connectar la cubeta a la font d'electroforesi i deixar córrer a ± 100 volts durant 30 min aproximadament.

- Visualitzar les bandes d'ADN en un transiluminador, i estimar la seva concentració en funció de la seva intensitat i la del marcador quantitatiu (es coneix la concentració en ng/ μ L de cada banda del marcador).

7. LLIGACIÓ DELS INSERITS I EL VECTOR *pGEM-T Easy*

L'objectiu és inserir els fragments d'interès (productes de PCR purificats o inserits) en el vector *pGEM-T Easy* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), modificant el protocol del fabricant per escurçar el temps de la tècnica. La proporció molar òptima per la lligació de 50 ng de *pGEM-T Easy* amb els fragments de C2V5 és de vector:inserir 1:5, per tant, per calcular la quantitat d'inserir adequat s'utilitza la fórmula següent:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{pb inserit}}{\text{pb vector}} \times 5 = \frac{50 \text{ ng} \times 650 \text{ pb}}{3015 \text{ pb}} \times 5 = \sim 55 \text{ ng inserit}$$

7.1 REACTIUS I EQUIPS

- *pGEM-T Easy System I* (Cat# A1360, Promega)
- Rapid DNA Ligation (Cat# 1635379, Roche)
- Aigua destil·lada estèril

7.2 PROCEDIMENT

- Preparar per cada mostra i en aquest ordre:

	Mostra	Control +	Control -
1) Buffer 5x (kit ligasa)	2 µL	2 µL	2 µL
2) <i>pGEM T-easy</i> vector 50 ng/µL (kit vector)	1 µL	1 µL	1 µL
3) Aigua destil·lada estèril	(6-x) µL*	4 µL	6 µL
4) Inserir	x µL*	0 µL	0 µL
5) Inserir Control 512 pb (kit vector)	0 µL	2 µL	0 µL
6) 2x Rapid Ligation Buffer (kit vector)	10 µL	10 µL	10 µL
7) Rapid DNA Ligase (kit ligasa)	1 µL	1 µL	1 µL

* x, µL corresponents a ~55 ng d'inserir, depenent de la concentració d'aquest (estimada segons l'apartat 6.2.3 d'aquest annex).

- Incubar 5 min a temperatura ambient, i guardar a -20°C si no s'utilitza seguidament.

8. TRANSFORMACIÓ DE LES LLIGACIONS EN BACTÈRIES DH5 α

L'objectiu és introduir el plasmidi que conté el fragment d'interès (l·ligació) en bacteries competents amb la fi d'aconseguir colònies discretes que ens permetran obtenir per separat els diferents clons moleculars compresos dins la mostra inicial de plasma VIH-1+.

8.1 REACTIUS I EQUIPS

- Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells (Cat# 18265-017, Invitrogen)
- LB Broth (Cat# L3022, Sigma)
- LB Agar (Cat# L2897, Sigma)
- Ampicil·lina (Cat# A9518, Sigma)
- IPTG (*isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside*), (Cat# I6758, Sigma)
- X-Gal (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside*) (Cat# V3941, Promega)
- Bunsen
- Bany termoestàtic a 37°C
- Incubador (shacker) a 37°C
- Estufa a 37°C
- Nanses de Digrafsky estèrils (Cat#612-1561, VWR)
- Nanses d'inoculació d'un sol ús (Cat#8175C510H, Gibco)

8.2 PREPARACIÓ DELS REACTIUS I MEDIS

8.2.1 Ampicil·lina 50 mg/mL (100 mL)

- Dissoldre 5 gr d'ampicil·lina en 100 mL d'aigua destil·lada estèril.
- Esterilitzar per filtració i aliquotar fraccions de 1 mL en tubs de 1.5 mL estèrils retolats.
- Conservar a -20°C.

8.2.2 IPTG 0.1M

- Dissoldre 2,4 gr d'IPTG en 100 mL d'aigua destil·lada estèril.
- Esterilitzar per filtració i aliquotar fraccions de 1 mL en tubs de 1.5 mL estèrils retolats.
- Conservar a -20°C.

8.2.3 LB líquid amb Ampicil·lina (1 Litre)

- Dissoldre, en un matrau de 2 litres, 20 gr de LB Broth en 1 L d'aigua destil·lada.
- Autoclavar 20 min a 121°C.
- Quan s'hagi refredat afegir 1 mL d'Ampicilina 50 mg/mL (concentració final al medi 50 µg/mL).
- Conservar a 4°C.

8.2.4 Plaques de LB Agar + Amp + X-gal + IPTG (15-20 plaques)

- Dissoldre, en un matrau de 2 litres, 35 gr de LB Agar en 1 L d'aigua destil·lada.
- Autoclavar 20 min a 121°C.
- Quan estigui a uns 50°C afegir 1 mL d'ampicil·lina 50 mg/mL 1 mL X-Gal 50 mg/mL i 2 mL d' IPTG 0.1M.
- Mesclar i aliquotar en plaques de Petri sota la flama del bunsen.

- Deixar polimeritzar a temperatura ambient.
- Conservar a 4°C.

Les concentracions finals a la placa són de 50 µg/ml d'ampicil·lina, 50 µg/ml de X-Gal i 0,2 µM d'IPTG. El X-Gal és un substrat cromogènic per la β-galactosidasa que produeix un color blau intens que es detecta visualment d'una manera molt clara. L'IPTG és un inductor de l'activitat β-galactosidasa en diferents bactèries. S'uneix al repressor *lacI*, inhibint-lo, doncs funciona com un anàleg d'aquest. L'IPTG i el X-Gal són utilitzats per diferenciar els plasmidis recombinants dels no recombinants en estratègies de clonatge basades en vectors que contenen el gen *lacZ*.

8.3 PROCEDIMENT

- Descongelar suaument les bactèries DH5-α en gel i fer alíquotes de 50 µL en tubs de 1.5 mL estèrils, mantenint-les en gel.
- Afegir 5 µL de lligació sense pipetejar en excés (mesclar amb la punta de la pipeta sense pujar i baixar).
- Incubar en gel 30 min.
- Fer un xoc tèrmic de 20 segons en un bany termoestàtic a 37°C.
- Posar ràpidament en gel i deixar-ho refredar 2 minuts.
- Dispensar 950 µL de medi SOC (proveït amb les bactèries) a temperatura ambient en tubs de 15 mL i afegir-hi la transformació.
- Incubar 1 hora màxim a 37°C con agitació forta (250 rpm).
- Centrifugar 10 min a 3000 rpm (aprox) y decantar el sobrenedant.
- Ressuspendre el pèl·let amb el medi que quedi en el tub després de decantar.
- Sembrar en plaques LB + Amp + X-gal + IPTG per duplicat: 20 i 200 µL amb nanses de Digralsky estèrils.

- Incubar las plaques durant tota la nit en una estufa a 37°C.
- Abans de picar les colònies deixar a 4°C 1 hora com a mínim perquè el color de les colònies es defineixi millor.
- Picar 20 colònies individuals que continguin el plasmidi amb l'insert (de color blanc) amb nanses estèrils. Descartar les colònies blaves (plasmidi sense insert o relligats).
- Inocular cada colònia en un tub que contingui 3 mL de medi LB líquid amb ampicil·lina.
- Incubar durant tota nit a 37°C amb agitació forta (250 rpm).
- Centrifugar 30 min a 3000 rpm (aprox) a 4°C y decantar el sobrenedant.
- Congelar el pèl·let a -20°C si no s'utilitza seguidament.

9. OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC A PETITA ESCALA (MINIPREPS)

L'objectiu de la tècnica és la purificació del ADN plasmídic a partir de bactèries transformades, mitjançant una lisi alcalina. El plasmidi purificat obtingut es denominarà a partir d'ara, miniprep.

9.1 REACTIUS I EQUIPS

- QIAprep Spin Minipreps (Cat# 27106, QIAGEN)
- Etanol Absolut
- Aigua destil·lada estèril
- Minicentrífuga

9.2 PROCEDIMENT

- Ressuspendre bé el pèl·let de bactèries transformades amb 250 µL de Buffer de Ressuspenió P1 (assegurar-se que conté la RNasa A proveïda pel fabricant).
- Transferir aquesta mescla a un tub de 1.5 mL estèril.
- Afegir 250 µL de Buffer de Lisi P2. Mesclar per inversió. No fer vòrtex. No sobrepassar els 5 minuts d'incubació.
- Añadir 350 µL de Buffer de Neutralització N3. Mesclar per inversió immediatament. No fer vòrtex.
- Centrifugar 10 min a màxima velocitat a temperatura ambient.
- Dispensar les columnes dins els tubs col·lectors.
- Transferir amb una pipeta el sobrenedant dins la columna (descartar el pèl·let).
- Centrifugar 1 min a màxima velocitat a temperatura ambient.
- Buidar el tub col·lector. Dispensar la columna dins el col·lector de nou.
- Afegir 750 µL de Buffer de Rentat PE (assegurar-se que conté l'etanol absolut indicat pel fabricant).
- Centrifugar 1 min a màxima velocitat a temperatura ambient.

- Buidar el tub col·lector. Dispensar la columna dins el col·lector de nou.
- Sense afegir res, tornar a centrifugar a màxima velocitat 1 minut.
- Dispensar la columna dins un tub de 1.5 mL estèril.
- Afegir 50 μ L de H₂O destil·lada estèril en el centre de la columna.
- Incubar 1 minut a temperatura ambient.
- Eluir el DNA centrifugant a màxima velocitat 1 minut.
- Descartar la columna i guardar a -20°C si no s'utilitzés a continuació.

10. COMPROVACIÓ DE LA PRESENCIA D'INSERIT EN LES MINIPREPS

L'objectiu d'aquesta tècnica és comprovar que les minipreps contenen l'inserit d'interès clonat, mitjançant una reacció senzilla de PCR.

10.1 REACTIUS I EQUIPS

- Go Taq Green Master Mix (Cat# M7112, Promega)
- Primers M13Fw y M13Rv (10 μ M) (veure Taula 7)
- Aigua destil·lada estèril
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

10.2 PROCEDIMENT

Preparar, en fred, una mescla tamponada per cadascuna de les minipreps, tal com es detalla a continuació (La GoTaq Mix x2 és una mescla tamponada de polimerasa, dNTPs i $MgCl_2$):

GoTaq Mix x2	12,5 μ L
Primer M13Fw (10 μ M)	0,5 μ L
Primer M13Rv (10 μ M)	0,5 μ L
Aigua destil·lada estèril	9,5 μ L
<i>Total</i>	23 μ L

Afegir 2 μ L de miniprep a la mescla tamponada anterior. El volum final de la reacció serà de 25 μ L. Seguidament posar els tubs en el termociclador amb el programa següent:

94°C 5 min
94°C 10 seg }
50°C 10 seg } 40 cicles
60°C 2 min }
72°C 10 min }
4°C ∞

10.3 VISUALITZACIÓ DE LA PCR DE COMPROVACIÓ

Per visualitzar si l'amplificació ha estat positiva, és a dir, que la miniprep conté l'inserit d'interès, es comprova una alíquota de cada amplificació mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 1% (veure apartat 5.2 d'aquest annex). En aquest cas, però, no cal afegir tampó de càrrega a les mostres, ja que la pròpia GoTaq Mix proporciona la viscositat adequada a la PCR per poder carregar directament les mostres en el gel. Carregar directament 5 µL de la PCR; la banda d'interès es visualitza a uns 850 pb aproximadament mentre la banda corresponent a la miniprep sense inserit es troba a uns 250 pb (*lacZ*).

11. SEQÜENCIACIÓ DELS CLONS MOLECULARS

L'objectiu és obtenir la seqüència de nucleòtids dels inserits, ja que corresponen als diferents clons moleculars del VIH-1 plasmàtics d'un pacient en un moment determinat.

11.1 REACTIUS I EQUIPS

- BigDye Terminator RR-100 v.3.1 (Cat# 4337455, Applied Biosystems)
- Primers M13Fw y M13Rv (10 µM) (Veure Taula 7)
- Aigua destil·lada estèril
- Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit (Cat# LSKS09624, Millipore)
- Film adhesiu per precintat plaques (Cat# G040, AttendBio)
- Plaques 96 pous per injecció al seqüenciador (Cat# PCR-96M2-HS-C, Bonsai Technologies)
- Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Aparell de buit amb adaptador per plaques SEQ96
- Vòrtex amb adaptador per plaques

11.2 REACCIÓ DE SEQÜENCIACIÓ

Preparar, en fred, una mescla tamponada de cada per cadascuna de les minipreps, tal com es detallen a continuació (El BigDye Terminator, que conté la polimerasa i els fluoronucleòtids, i el Buffer 5x es comercialitzen en el kit BigDye Terminator RR-100 v.3.1):

H ₂ O d	5 µL	H ₂ O	5 µL
Buffer 5x	1.5 µL	Buffer 5x	2 µL
Primer M13Fw (10 µM)	0.5 µL	Primer M13Rv (10 µM)	0.5 µL
BigDyeTerminator v3.1	1 µL	BigDyeTerminator v3.1	1 µL
<i>Total</i>	<i>8 µL</i>	<i>Total</i>	<i>8 µL</i>

Afegir 2 μL de cada miniprep a cadascuna de les 2 mescles tamponades anteriors. El volum final de la reacció serà de 10 μL . Seguidament posar els tubs en el termociclador amb el programa següent:

94°C 5 min	} 40 cicles
94°C 10 seg	
50°C 10 seg	
60°C 2 min	
72°C 10 min	
4°C ∞	

Un cop finalitzada la reacció de seqüenciació guardar protegit de la llum si no s'eliminen els terminadors a continuació.

10.3 ELIMINACIÓ DE TERMINADORS

L'objectiu d'aquest pas és la purificació de les seqüències per poder ser llegides en el seqüenciador (les plaques de purificació SEQ₉₆ i l'Injection Buffer son proveïdes pel kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup).

- Diluir les reaccions de seqüenciació afegint 20 μL de Injection Solution.
- Barrejar pipetejant 3-5 vegades.
- Transferir les reaccions diluïdes al fons de cada pouet de la placa SEQ₉₆.
- Posar la placa SEQ₉₆ a l'aparell de buit.
- Aplicar buit fins a 23-25" Hg. Mantenir el buit fins que la solució s'hagi eluït per complet (2-3 min). Continuar mantenint el buit durant 15-30 segons després que l'últim pouet s'hagi buidat.
- Tancar el buit i treure la placa SEQ₉₆ de l'aparell.
- Assecar l'excés de líquid del fons de la placa SEQ₉₆ pressionant sobre paper absorbent.

- Afegir 20 μ L de Injection Solution al fons de cada pouet de la placa SEQ96.
- Posar la placa SEQ96 a l'aparell de buit. Aplicar buit fins a 23-25" Hg. Mantenir el buit fins que la solució s'hagi eluït per complet (2-3 min). Continuar mantenint el buit durant 15-30 seg després que l'últim pouet s'hagi buidat.
- Tancar el buit i treure la placa SEQ96 de l'aparell. Assecar l'excés de líquid del fons de la placa pressionant sobre paper absorbent.
- Tornar a afegir 20 μ L de Injection Solution al fons de cada pouet de la placa SEQ₉₆.
- Ressuspendre els productes de seqüenciació purificats amb Injection Solution pipetejant 20 vegades amb una pipeta automàtica. Alternativament, al tenir un gran nombre de mostres, el DNA pot ser ressuspès per agitació en un shaker de plaques (vòrtex amb adaptador), per tant es precinta la placa SEQ₉₆ amb film adhesiu i es col·loca en el shaker 10 min amb agitació moderada.
- Transferir els productes de seqüenciació purificats a una placa d'injecció apropiada. Mantenir a 4°C i a les fosques mentre no s'injectin al seqüenciador.

ANNEX RESULTATS

Referència		1	10	20	30	
		CTRPNNNTRKSIINIGPGRIFYTTGEIIGDIRQAHC				
46_BS_A	83%	HM...KVL.A..D.....			
46_BS_B	11%	HM...KVL.A..D.V..V....			
46_BS_C	6%	S.....HM...KVL.A..D.....			
46_S1_A	55%	G.H...KVL.A..D.....			
46_S1_B	20%	HM...KV..A..D..N.....			
46_S1_C	5%	RM...KV..A..D..N.....			
46_S1_D	5%	G.H...KVL.A..D..N.....			
46_S1_E	5%	D...G.H...KVL.A..D.....			
46_S1_F	5%	H...KVL.A..D.....			
46_S1_G	5%	S.....HM...KV..A..D.....			
46_S2_A	91%	G.H...KVL.A..D..N.....			
46_S2_B	9%	G.H...KV..A..D..N.....			
185_BS_A	56%	G.H.....A.-D.....			
185_BS_B	44%	G.H.....A.-D..N.....			
185_S1_A	53%	G.H.....A.-D.....			
185_S1_B	47%	G.H.....A.-D..E.....			
185_S2_A	95%	G.H.....A.-D..E.....			
185_S2_B	5%	G.H.....V..A.-D..N.....			
262_BS_A	88%	G.H.....A.....			
262_BS_B	12%	H...G.H.....A.....			
262_S1_A	45%	I..G.H.....A.....			
262_S1_B	15%	G.H.....A..N.....			
262_S1_C	10%	I..G.H.....A..D.....			
262_S1_D	10%	S...G.H.....A..D.....			
262_S1_E	5%	G.H.....A.....			
262_S1_F	5%	DI..G.H.....A..G.....			
262_S1_G	5%	I..G.H.....A.....Y.			
262_S1_H	5%	S...G.H.....A.....			
262_S2_A	38%	D...H.....A..D.T.....			
262_S2_B	22%	G.H.....A..N.....			
262_S2_C	11%	G.H.....A..G.....Y.			
262_S2_D	11%	G.H.....A..D.T.....			
262_S2_E	6%	H.....A..D.T.....			
262_S2_F	6%	D...H.....A..G.....Y.			
262_S2_G	6%	D...G.H.....A..D.T.....Y.			
269_BS_A	50%	A.....A...-.....			
269_BS_B	20%	M.....T.....A..G.....			
269_BS_C	20%	A.....A...-.....			
269_BS_D	10%	M.....A.....A...-.....			
269_S1_A	30%	M.....T.....A..G.....			
269_S1_B	30%	A.....A..D.....			
269_S1_C	10%	T.....A..G.....			
269_S1_D	10%	T.....A..D.....			
269_S1_E	10%	A.....A..G.....			
269_S1_F	10%	T.....IA..D.....			
269_S2_A	94%	M.....T.....A..G.....			
269_S2_B	6%	T.....A..G.....			
33_S1_A	70%	T..HL.....A..D..N.....			
33_S1_B	15%	T..H.....A..D.....R...			
33_S1_C	5%	G...T..HL.....A..D..N.....			
33_S1_D	5%	T..H.....A..D.....			
33_S1_E	5%	G...T.....A..D..N.....			
33_S2_A	94%	T.....A..D.....R...			
33_S2_B	6%	T.....A..D.....RT...			
158_BS_A	83%	I.....G.HL...QTW.A..D..N.....			
158_BS_B	11%	I.....G.HL...QTW.A.....T.....			
158_BS_C	6%	I.....G.HL...QTW.A..D.....			
158_S1_A	40%	I.....G.HL...QTW.A..D..N.....			
158_S1_B	30%	I.....G.HL...QTW.A..D.....Y.			
158_S1_C	10%	I.....I..G.HL...QTW.A..D.....Y.			
158_S1_D	10%	I.....G.HL...TW.....TK.....			
158_S1_E	10%	I.....G.HL...QTW.A..D.....			
158_S2_A	55%	I.....G.HL...QTW.A..D.....Y.			
158_S2_B	27%	I.....G.HL...QTW.A..D.....			
158_S2_C	18%	I.....HL...QTW.A..D..N...Y.			

Figura S1 Aliniaments de totes les variants de V3 obtingudes de cada mostra de l'estudi. S'indica en cada seqüència el codi del pacient_població_número de variant i la freqüència (%) que ocupa dins la població. BS: basal, S1: stop 1, S2: Stop 2. (.) indica que en aquella posició hi ha el mateix nucleòtid que a la seqüència de referència (-) indica una deleció en aquella posició respecte a la seqüència de referència (V3 del virus BaL, de tropisme R5).

Referència		1	10	20	30
		-----	-----	-----	-----
		C	T	R	P
		N	N	T	R
		K	S	I	N
		I	G	P	G
		R	A	F	Y
		T	T	G	E
		I	I	G	D
		R	Q	A	H
		C	A		
168_BS_A	58%	.	.	T.	.
168_BS_B	42%	.	.	.	D.T.
168_S1_A	82%	.	.	.	D.T.
168_S1_B	6%	.	.	H.	D.T.
168_S1_C	6%	.	.	G.	D.T.
168_S1_D	6%	.	.	T.	K.
168_S2_A	66%	.	.	.	D.T.
168_S2_B	13%	.	.	T.	D.T.
168_S2_C	7%	.	.	T.	K.
168_S2_D	7%	.	.	K.	T.
168_S2_E	7%	.	.	.	D.T.
201_BS_A	50%	.	.	R.VHA.	L.-D.N.
201_BS_B	20%	.	.	I.	R.VHV.G.L.-DV.N.
201_BS_C	15%	.	.	I.	R.VHV.S.L.-D.
201_BS_D	5%	.	.	R.VHV.	G.L.-D.N.L.
201_BS_E	5%	.	.	R.VHV.	G.L.-D.N.
201_BS_F	5%	.	.	I.	R.VHV.G.L.-D.N.
201_S1_A	94%	.	.	R.VHV.	L.-D.K.
201_S1_B	6%	.	.	R.VHV.	L.-D.R.K.
201_S2_A	100%	.	.	R.VHV.	L.-D.T.
207_BS_A	73%	.	.	HM.	LF.S-D.
207_BS_B	27%	.	.	HM.	LF.S-D.T.
207_S1_A	53%	.	.	HM.	LF.SK-
207_S1_B	41%	.	.	HM.	LF.LN-
207_S1_C	6%	.	.	HM.	LF.SA-
207_S2_A	58%	.	.	HM.	LF.LN-
207_S2_B	25%	.	.	HM.	LF.SH-V.
207_S2_C	17%	.	.	HM.	LF.SH-
213_BS_A	100%	.	.	S.	G.HM.L.
213_S1_A	44%	.	.	S.	G.HM.L.N.
213_S1_B	33%	.	.	S.	G.HM.L.T.N.
213_S1_C	17%	.	.	S.	G.HM.L.
213_S1_D	6%	.	.	S.	G.HM.L.VT.N.
213_S2_A	65%	.	.	S.	G.HM.L.T.N.
213_S2_B	20%	.	.	S.	G.HM.L.T.N.
213_S2_C	10%	.	.	S.	G.HM.L.G.
213_S2_D	5%	.	.	S.	G.HM.L.G.
261_BS_A	56%	.	.	H.	A.D.
261_BS_B	38%	.	.	HM.L.	A.D.
261_BS_C	6%	.	.	A.	H.A.D.
261_S1_A	84%	.	.	H.	A.D.
261_S1_B	8%	.	.	G.	H.A.D.
261_S1_C	8%	.	.	T.	H.A.D.
261_S2_A	54%	.	.	H.	A.D.
261_S2_B	27%	.	.	H.	A.D.R.
261_S2_C	13%	.	.	R.	H.A.D.
261_S2_D	6%	.	.	H.	A.D.G.
265_BS_A	73%	.	.	S.	P.FA.Q.
265_BS_B	13%	.	.	S.	P.FA.VQ.
265_BS_C	7%	.	.	P.	F.A.Q.
265_BS_D	7%	.	.	S.	P.T.FA.Q.
265_S1_A	69%	.	.	P.	L.A.N.
265_S1_B	11%	.	.	P.	L.A.
265_S1_C	5%	.	.	P.	LCA.N.
265_S1_D	5%	.	.	P.	F.A.Q.
265_S1_E	5%	.	.	S.	S.FA.Q.
265_S1_F	5%	.	.	P.	L.A.N.T.
265_S2_A	86%	.	.	P.	L.A.N.
265_S2_B	14%	.	.	L.	P.L.A.N.

Referència		1	10	20	30
		-----	-----	-----	-----
		C	T	R	P
		N	N	T	R
		K	S	I	N
		I	G	P	G
		R	A	F	Y
		T	T	G	E
		I	I	G	D
		I	R	Q	A
		H	C		
105_BS_A	44% R Q L K A D			
105_BS_B	39% H G D			
105_BS_C	11% S R Q L K A D			
105_BS_D	6% R Q L K V D			
105_S1_A	100% R Q L K A D			
105_S2_A	90% H G D			
105_S2_B	5% R Q L K A D			
105_S2_C	5% H G G			
228_BS_A	88% I P A D K			
228_BS_B	6% I P A D K G			
228_BS_C	6% I P L A D K			
228_S1_A	91% I P A D K			
228_S1_B	9% I S A D K			
228_S2_A	38% I P A D E Y			
228_S2_B	23% I P A D E			
228_S2_C	15% I P A D E T			
228_S2_D	15% I P K A D N			
228_S2_E	8% I P A D K			
282_BS_A	82% R H A N Y			
282_BS_B	18% L R H A N Y			
282_S1_A	58% R H A N Y			
282_S1_B	42% H A N Y			
282_S2_A	85% H A N Y			
282_S2_B	15% D H A N Y			
296_BS_A	28% Y R G H A K			
296_BS_B	18% Y R G H A R			
296_BS_C	18% Y H A K Q			
296_BS_D	12% Y R G H G K			
296_BS_E	12% Y R G H A K T			
296_BS_F	6% Y R G H G A K			
296_BS_G	6% Y R G H A K R			
296_S1_A	61% Y R G H A			
296_S1_B	33% Y R G H A K			
296_S1_C	6% Y R G H A T V			
296_S2_A	53% Y S H A K			
296_S2_B	20% Y H A			
296_S2_C	13% Y G H G A K Q			
296_S2_D	7% Y R G H			
296_S2_E	7% Y H A N			

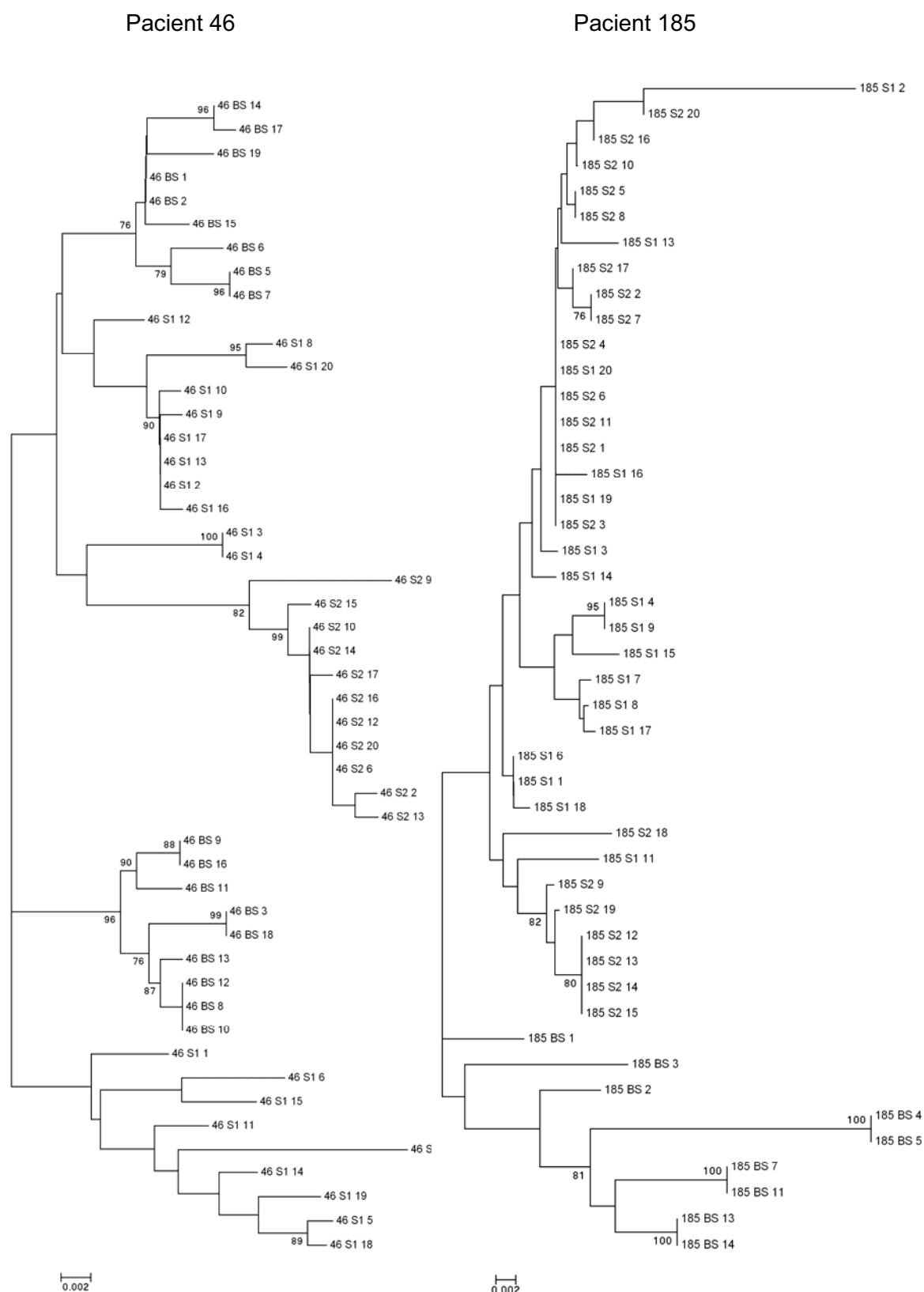
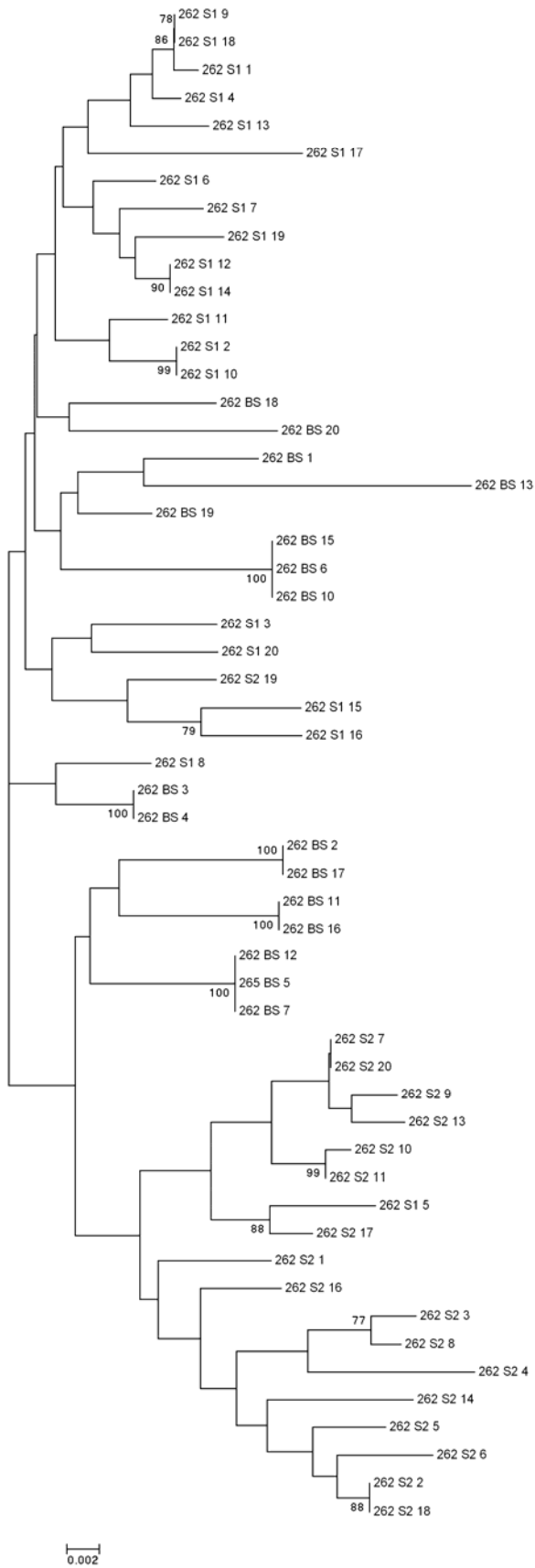
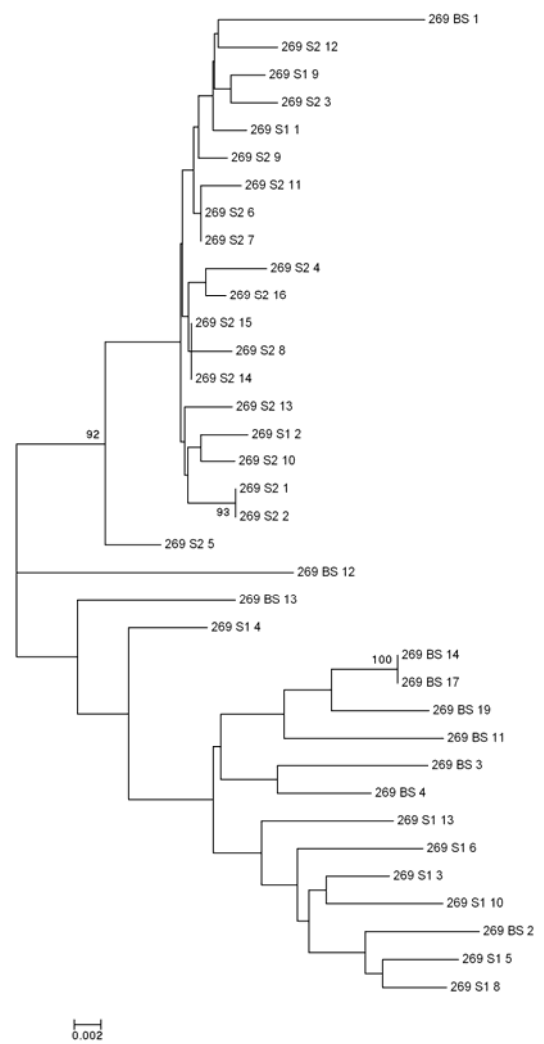


Figura S2 Arbres filogenètics consens obtinguts per cada pacient de l'estudi. Es van analitzar totes les seqüències nucleotídiques de la regió C2V5 de l'envolta del VIH-1 de cada pacient, introduint la matriu de distàncies Kimura dos-paràmetres dins l'algorisme de construcció d'arbres *neighbor-joining*. Per comprovar la consistència dels arbres es va emprar el mètode *bootstrap* de remostreig, realitzant 1000 rèpliques aleatòries de la mostra inicial. Les llagades de les branques s'han representat a escala. S'indica el nom de cada clon: BS, clons de la població basal; S1, clons del stop 1; i S2, clons del stop 2. S'indiquen els valors de *bootstrap* superiors al 75% en les branques corresponents.

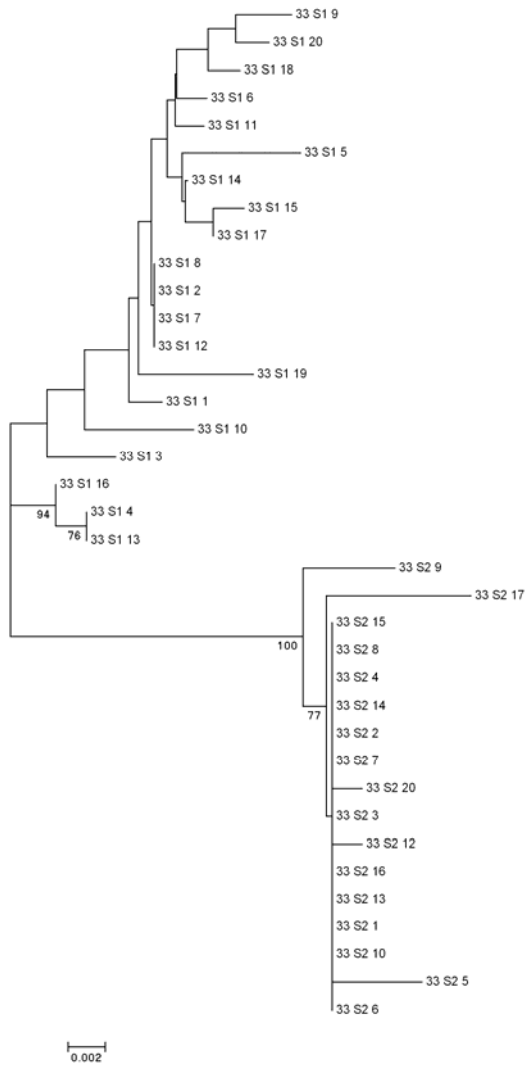
Pacient 262



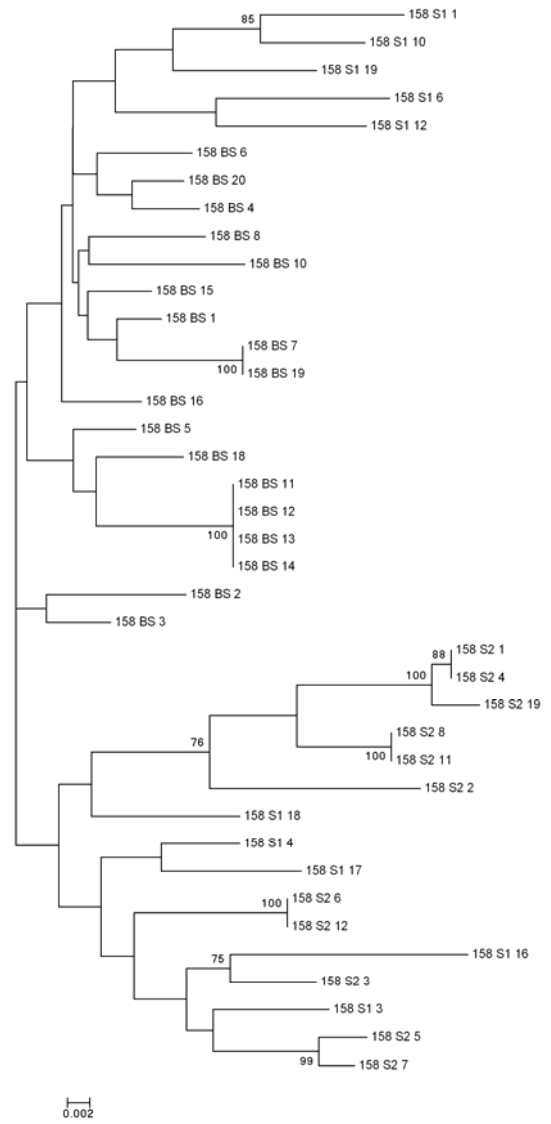
Pacient 269



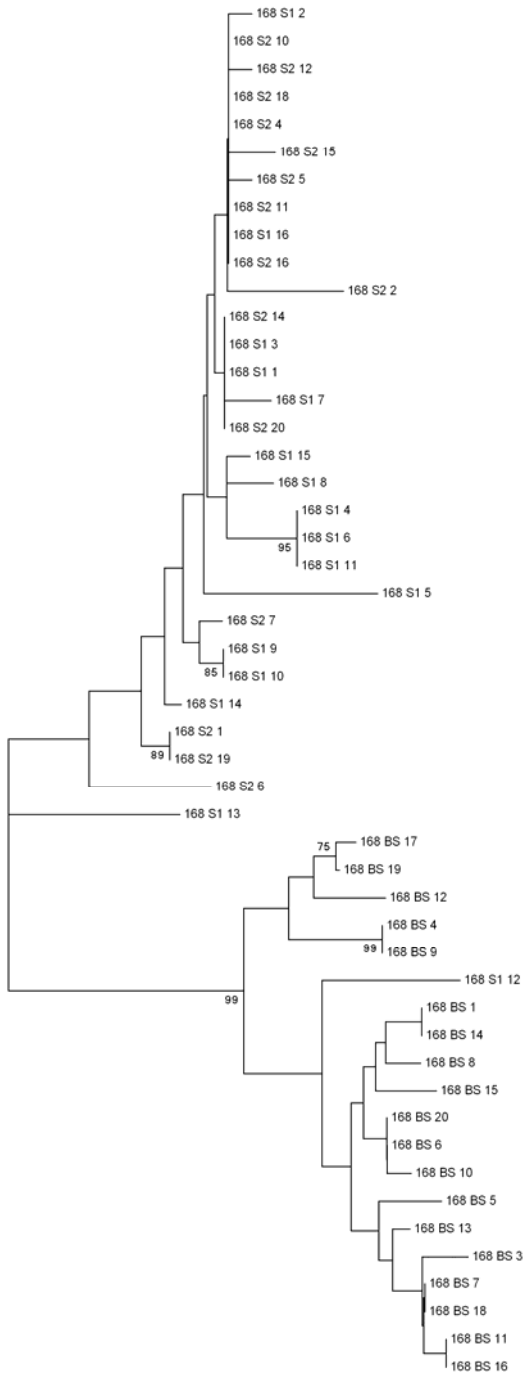
Pacient 33



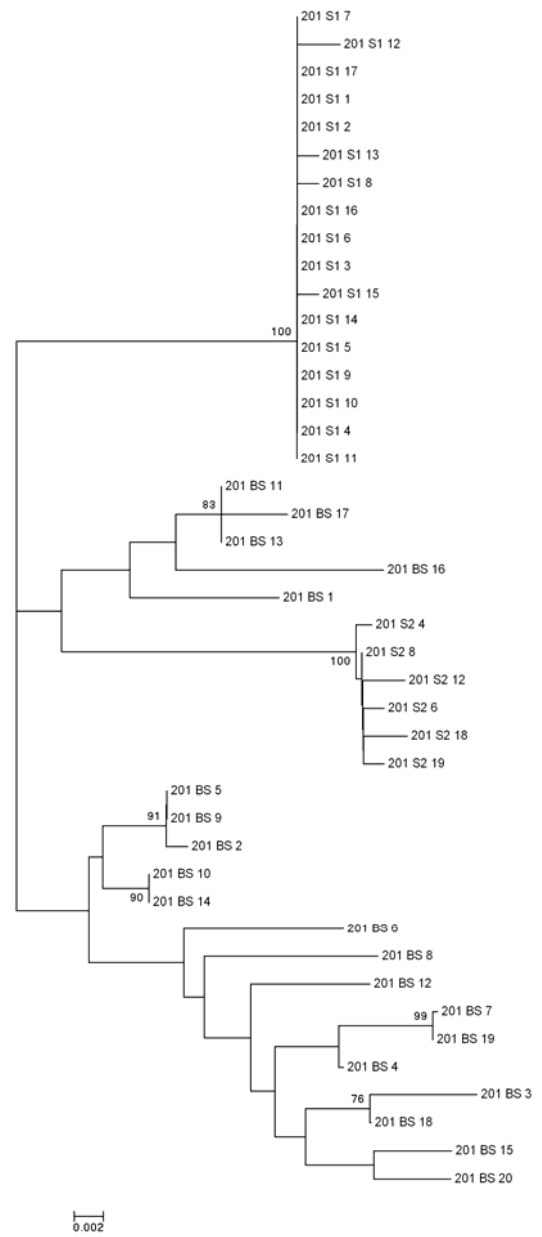
Pacient 158



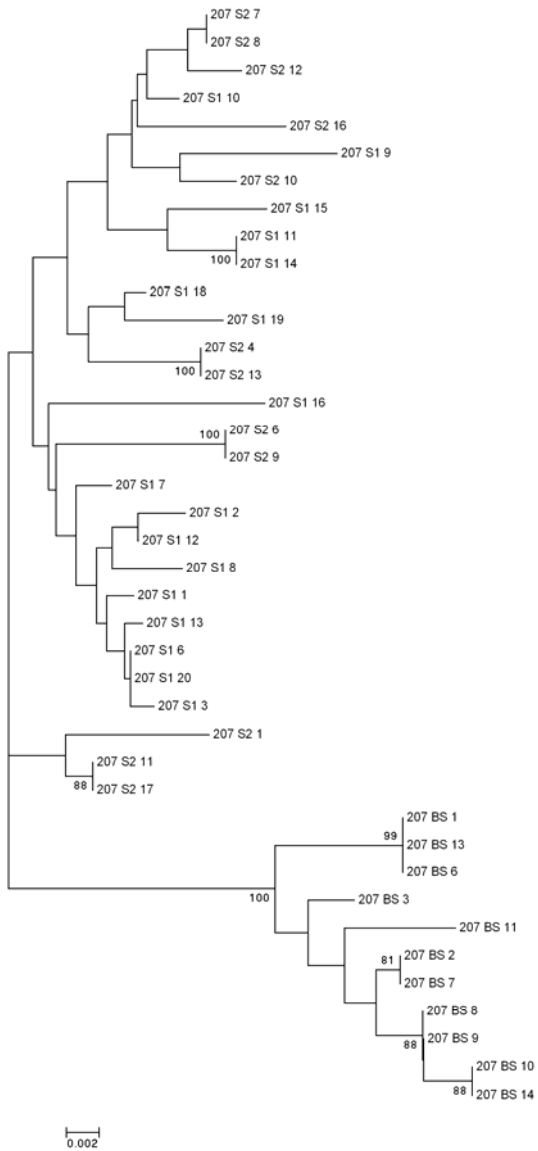
Pacient 168



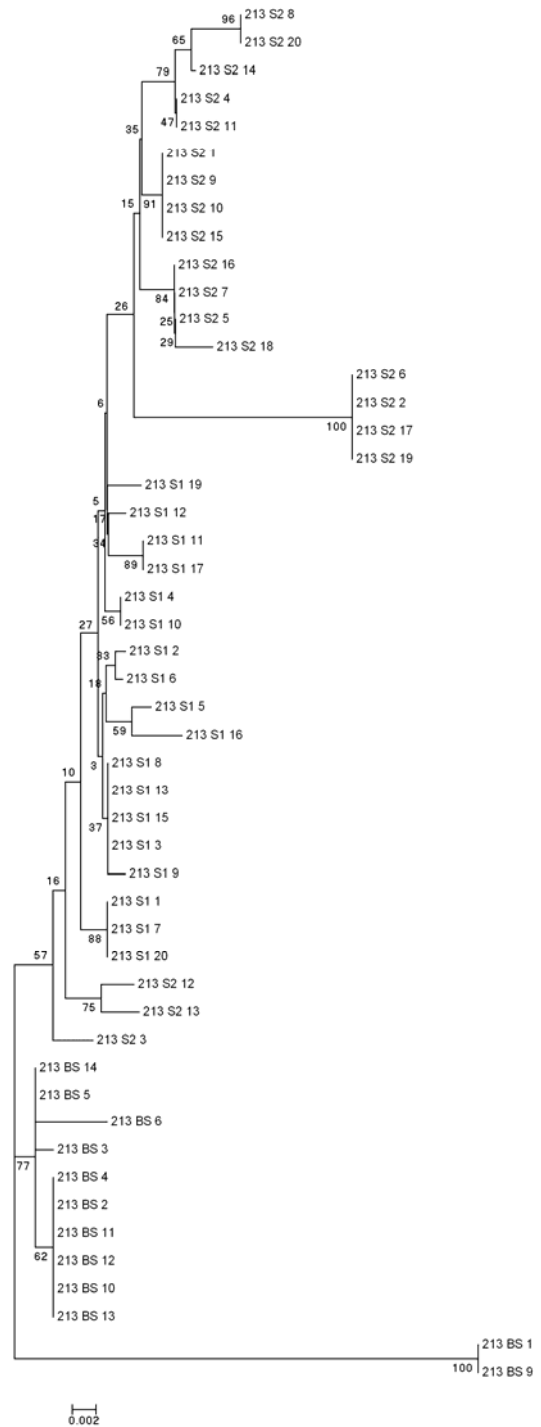
Pacient 201



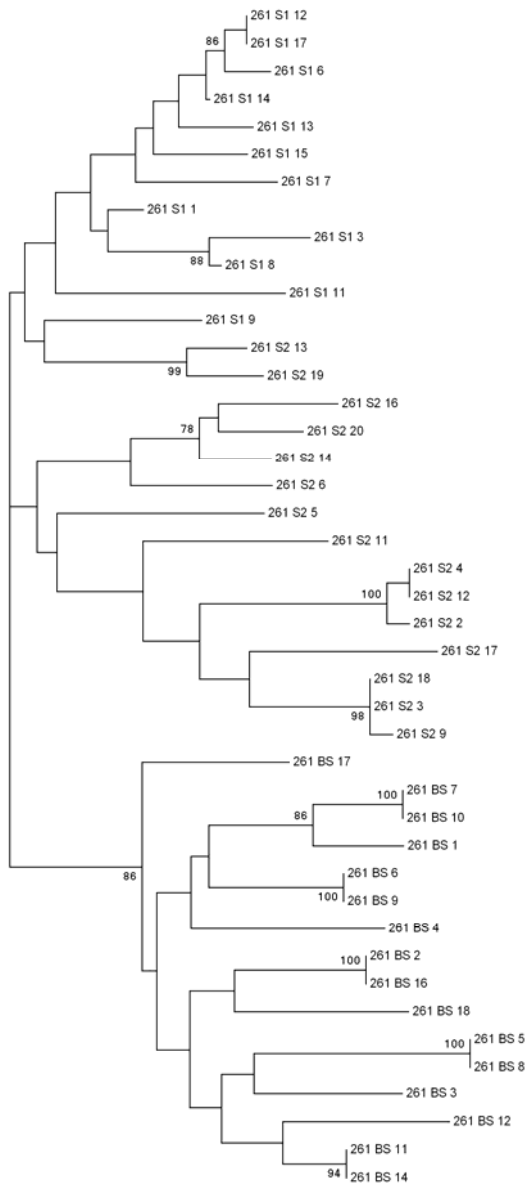
Pacient 207



Pacient 213

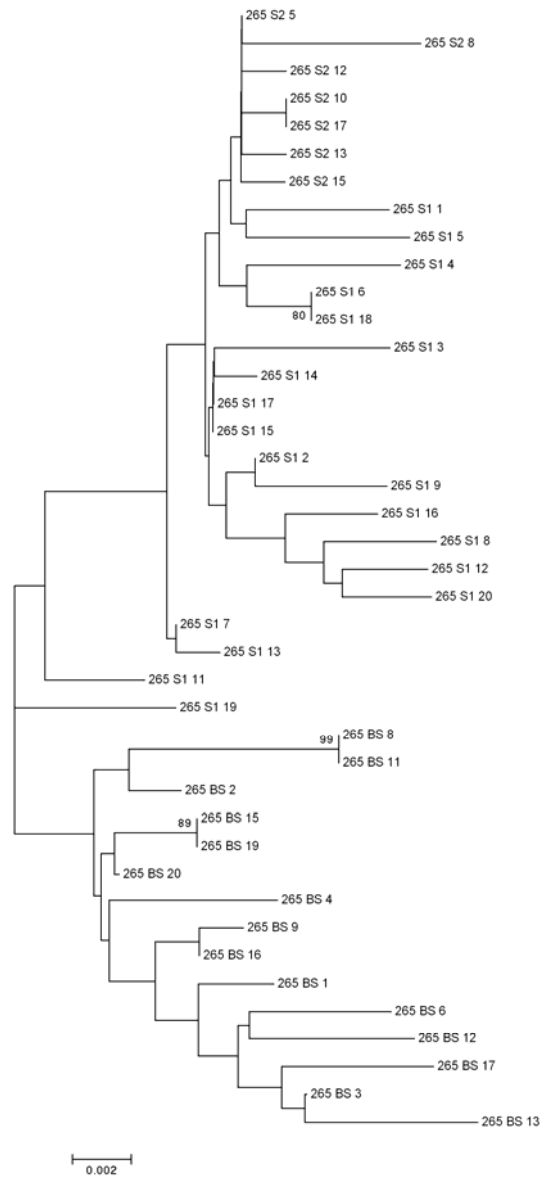


Pacient 261



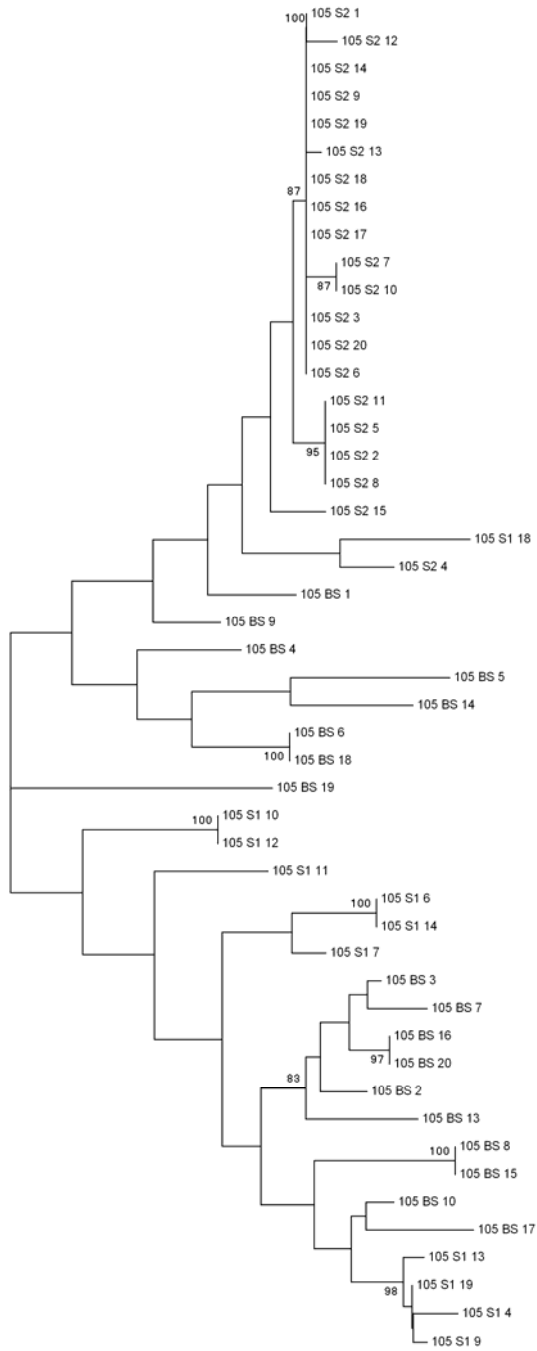
0.002

Pacient 265



0.002

Control 105



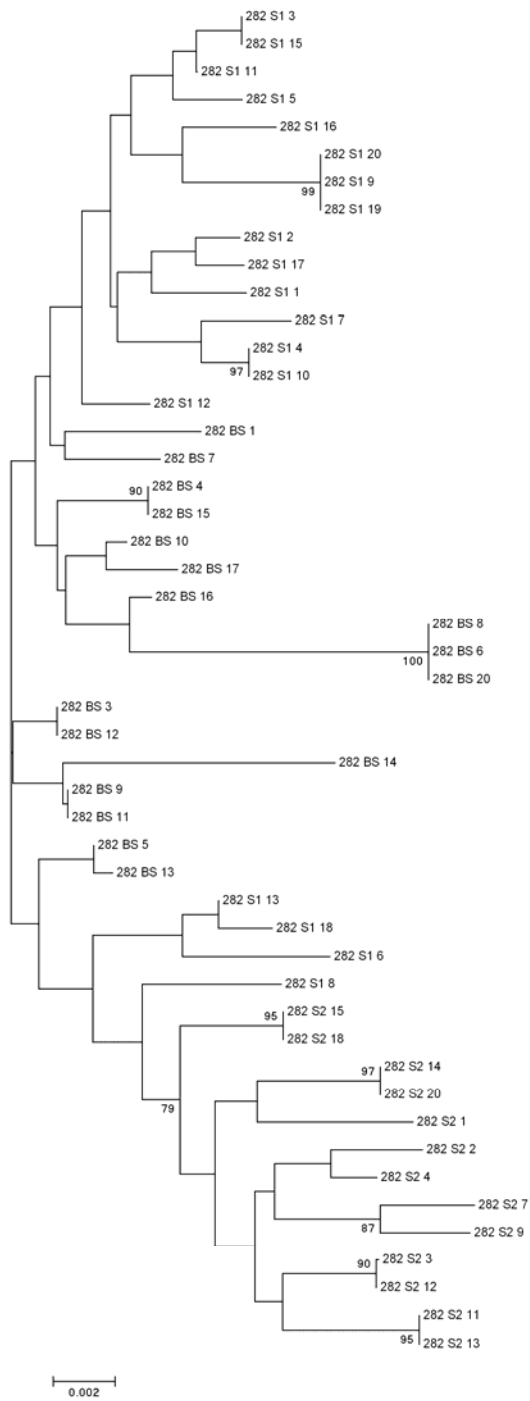
0.002

Control 228

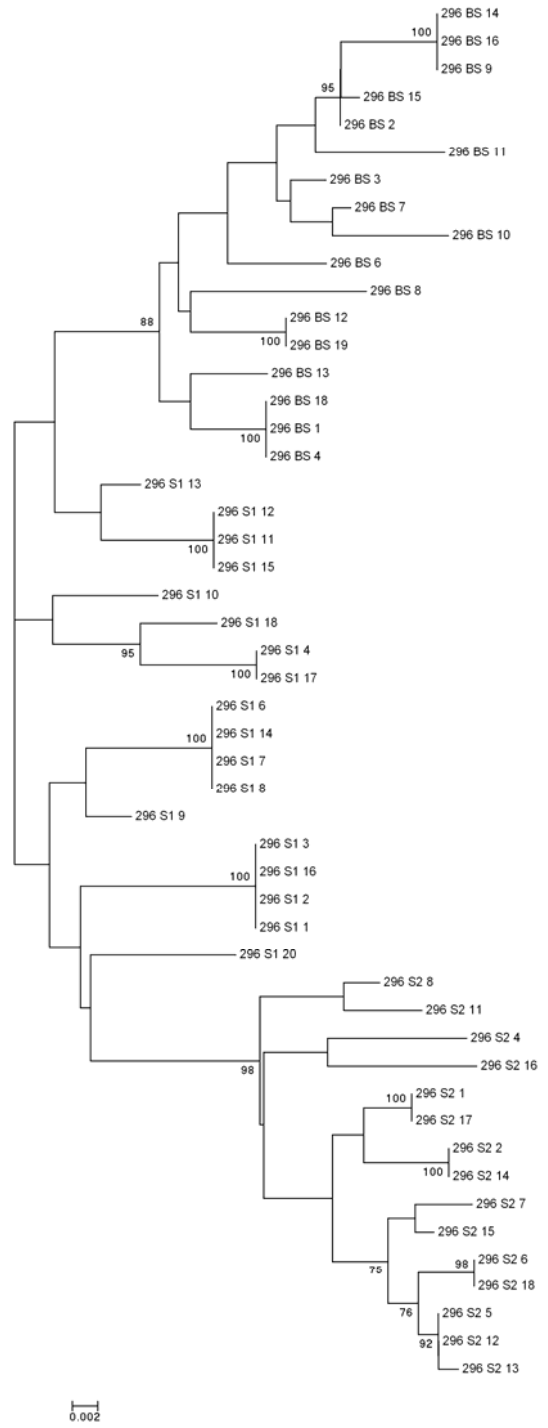


0.002

Control 282



Control 296



BRIEF REPORT

Therapeutic Immunization with Dendritic Cells Loaded with Heat-Inactivated Autologous HIV-1 in Patients with Chronic HIV-1 Infection

Felipe García,¹ Merylene Lejeune,² Nuria Climent,² Cristina Gil,³ José Alcamí,³ Vanessa Morente,⁴ Lluçia Alós,⁴ Alba Ruiz,⁵ Javier Setoain,⁵ Emilio Fumero,¹ Pedro Castro,¹ Anna López,² Anna Cruceta,¹ Carlos Píera,⁵ Eric Florence,¹ Arturo Pereira,⁵ Agnes Libois,¹ Nuria González,⁸ Meritxell Guilá,³ Miguel Caballero,⁷ Francisco Lomeña,⁵ Joan Joseph,¹ José M Miró,¹ Tomás Pumarola,³ Montserrat Plana,² José M Gatell,¹ and Teresa Gallart²

¹Infectious Diseases Unit, ²Immunology Laboratory, ³Microbiology Laboratory, ⁴Pathology Department, ⁵Nuclear Medicine Department, ⁶Hemotherapy Department, and ⁷Otorhinolaryngology Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, and ⁸Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Therapeutic immunization with autologous monocyte-derived dendritic cells (DCs) loaded with heat-inactivated autologous human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in 12 patients with chronic HIV-1 infection who were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) was feasible, safe, and well tolerated. Virus was obtained during an initial interruption of HAART (hereafter, "stop 1") so that DCs could be pulsed. After immunization and a second interruption of HAART (hereafter, "stop 2"), set-point plasma viral load (PVL; 24 weeks after stop 2) decreased $\geq 0.5 \log_{10}$ copies/mL relative to baseline PVL in 4 of 12 patients. We observed a significant lengthening in mean doubling time of PVL rebound and significant decreases in the area under the curve and the mean peak of PVL rebound after stop 2, compared with those after stop 1. This response was associated with changes in HIV-1-specific CD4⁺ lymphoproliferative and CD8⁺ T cell responses. These changes were not observed in a group of nonimmunized control patients.

It has been suggested that ex vivo-generated dendritic cells (DCs) might be the most potent cellular adjuvant for a ther-

apeutic HIV-1 vaccine. Although HIV-1 infection can adversely affect DC function, monocyte-derived DCs (MD-DCs) isolated from patients with HIV-1 infection and grown in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4 for 1 week were mostly uninfected and functionally intact [1, 2]. Mature DCs isolated from chronically infected individuals and infected with canarypox virus elicited strong anti-HIV CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in vitro [3], and intravenous infusion of allogeneic DCs pulsed with recombinant HIV-1_{MN} gp160 or synthetic peptides in HIV-1-infected patients was safe and enhanced the immune response to HIV-1 (although it was unable to control viral replication) [4]. It was recently reported that therapeutic immunization with autologous DCs in antiretroviral-naïve patients chronically infected with HIV-1 elicited effective cellular immune responses [5]. In the present study, we assessed the safety of and the virological and HIV-1-specific immune responses after therapeutic vaccination with autologous MD-DCs loaded with autologous heat-inactivated HIV-1 in patients with nonadvanced chronic HIV-1 infection who were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART).

Patients, materials, and methods. Eighteen patients from the SCAN study [6] with nonadvanced chronic HIV-1 infection who had baseline and nadir CD4⁺ T cell counts of >500 cells/ μ L and baseline plasma viral loads (PVLs) of >5000 copies/mL before receipt of any HAART and with PVLs of <20 copies/mL for at least 104 weeks while receiving HAART were randomized (2:1) either to be immunized with autologous MD-DCs pulsed ex vivo with whole autologous heat-inactivated HIV-1 (hereafter, "DC vaccine") ($n = 12$) or to be a control patient ($n = 6$). Seventy-eight weeks before the first immunization, HAART was interrupted (hereafter, "stop 1"); when PVL peaked, 3 plasmaphereses were performed, to obtain autologous virus so that DCs could be pulsed. We did not find any specific patient characteristic that predicted the level of PVL rebound after stop 1. Thereafter, HAART was reinitiated, and PVLs decreased to <20 copies/mL in all patients within 12 weeks. After 78 weeks, 5 immunizations were performed at intervals of 6 weeks. One week before each immunization, plasma monocytes were obtained and cultured for 8 days under

Received 29 September 2004; accepted 3 December 2004; electronically published 11 April 2005.

Reprints or correspondence: Dr. Felipe García, Infectious Diseases Unit, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain (fgarcia@clinic.ub.es).

The Journal of Infectious Diseases 2005;191:1680-5

© 2005 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2005/19110-0014\$15.00

Financial support: Fondo de Investigación para el SIDA en España, a nonprofit foundation supported by the Spanish Ministry of Health, Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp, and Dohme and Roche (grants 3118/00, 3074, and 01/36259); SAF (grants 98/0021, 0037, and 01/2591); Red Temática Cooperativa de Grupos de Investigación en SIDA del Fondo de Investigación Sanitaria (grant 01/1595); Marató de TV3; Objectif Recherche Vaccin SIDA; European AIDS Clinical Society (to E.F. and A.L.); Ministerio de Ciencia y Tecnología (to N.G.).

clinical-grade good manufacturing practice conditions, to develop MD-DCs as described elsewhere [3]. After virus inactivation for 30 min at 56°C, these DCs (median, 2×10^6 cells) were pulsed with the autologous virus 24 h before being injected subcutaneously (mean, 5×10^6 virions/immunization; see table 1). The first immunization was a negative control (mock) immunization with MD-DCs not pulsed with HIV-1. Six weeks after the last dose of DC vaccine was administered (week 30), HAART was interrupted again (hereafter, "stop 2"), and the patients were followed for at least 24 weeks. In previous *in vitro* experiments, we assessed the adequate maturation of MD-DCs (data not shown) and found that MD-DCs from patients with nonadvanced chronic HIV-1 infection who were receiving HAART, when loaded with a heat-inactivated whole laboratory strain of HIV-1 or recombinant HIV-1 proteins, were able to strongly induce the activation of autologous CD4⁺ and CD8⁺ T cells (data not shown).

The main end points of the present study were tolerance and the proportion of patients with a set-point PVL decrease of $\geq 0.5 \log_{10}$ copies/mL 24 weeks after stop 2 (week 54), relative to the baseline PVL (before receipt of any HAART). The patients' baseline PVLs and CD4⁺ cell counts (table 1) were calculated as the median of all measurements (median, 6 measurements; range, 3–8 measurements) available for the 2 years preceding the initiation of any HAART. Secondary end points were the dynamics of PVL rebound after the immunizations with DC vaccine and stop 2, compared with those after stop 1; HIV-1-specific immune responses (Th1 cell levels, cytotoxic T lymphocyte [CTL] levels, and serum neutralizing-antibody titers); and changes in lymphoid tissue, which were assessed as described elsewhere [7–9]. Tonsillar biopsies were performed in immunized patients who had accessible tonsillar tissue (8/12) at week 0 (before the initial mock immunization with non-pulsed DCs) and week 30 (6 weeks after the last dose of DC vaccine was administered); no biopsies were performed in control patients. All patients provided written, informed consent, and the present study was approved by the institutional ethics review board.

Quantitative data were compared between groups by use of the Wilcoxon matched-pairs test. Changes in PVL over a period of 12 weeks after stop 1 and stop 2 were analyzed by use of an area-under-the-curve (AUC) measurement. Spearman rank order correlations were performed on quantitative data. $P < .05$ was considered to be statistically significant.

Results. The baseline characteristics of the patients are shown in table 1. There were no clinically important or statistically significant differences between the immunized patients and the control patients, except in baseline PVL, which was lower in the control patients. Two control patients left the study, 1 because of relocation and 1 because of a diagnosis of lung cancer. Overall, the tolerance of the DC vaccine was good. There were no local

reactions. Two of the 12 immunized patients developed mild flu-like reactions 24 h after immunization. Injections of the DC vaccine were not associated with any clinical or serologic evidence of autoimmunity in the patients (data not shown).

There was no significant change in mean PVL between baseline (before receipt of any HAART) and the set point reached 24 weeks after stop 2 ($P = .53$) (figure 1 and table 1). However, there was a decrease in set-point PVL of $\geq 0.5 \log_{10}$ (defined as a "virological response") in 4 of the 12 immunized patients (change, -0.94 , -0.68 , -0.72 , and $-0.67 \log_{10}$ copies/mL in patients 1, 2, 3, and 4, respectively). No virological responses were observed in the control patients (table 1). There was no significant difference in the proportion of patients with a virological response between the immunized patients and the control patients ($P = .51$). In lymphoid tissue, the mean \pm SE tonsillar tissue viral load decreased from $3.35 \pm 0.42 \log_{10}$ copies/mg of tissue at week 0 to $2.76 \pm 0.5 \log_{10}$ copies/mg of tissue at week 30 ($P = .10$).

The dynamics of PVL rebound during the first 12 weeks after stop 1 and stop 2 were also evaluated and compared between groups. We observed a significant lengthening in mean doubling time of PVL rebound ($P = .01$) and significant decreases in the AUC ($P = .02$) and the mean peak of PVL rebound ($P = .004$) after stop 2, compared with those after stop 1 (table 1). No virological changes in the dynamics of PVL rebound occurred in the control patients.

The serum neutralizing-antibody titers did not change significantly after the series of immunizations (data not shown). Both the magnitude and the breadth of the total HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses (defined as the sum of individual responses per patient) decreased progressively during the series of immunizations. The median frequencies of the total HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses at week 0 and after vaccination at weeks 6, 12, 18, 24, and 30 were 1347, 1482, 1456, 948, 548, and 504 spot-forming cells/ 1×10^6 peripheral-blood mononuclear cells, respectively ($P = .0008$). The breadth of the total HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses (defined as the number of peptides recognized per patient) decreased from a median of 6 peptides (range, 1–17 peptides) at week 0 to a median of 2 peptides (range, 0–9 peptides) at week 30 ($P = .0008$). When pools of overlapping peptides (p24, p17, and p2p7p1p6 proteins) were tested, a similar pattern of changes in the median frequency of total HIV-1 Gag-specific T cell responses were observed during the series of immunizations (data not shown). CD8⁺ T cell responses recovered progressively after stop 2. No changes in CD8⁺ T cell responses were observed in the control patients. The decrease in the magnitude of the CD8⁺ T cell responses in the patients with a virological response (hereafter, "the responders") was similar to that in the patients without a virological response (hereafter, "the nonresponders"). Conversely, the greater the decrease in the magnitude of the total

Table 1. Characteristics of immunized and control patients, changes in plasma viral load (PVL), and quantity of HIV-1 (obtained by plasmapheresis of 1800 mL of plasma from immunized patients) that was used for loading dendritic cells (DCs).

Category, patient (sex, age in years)	Baseline CD4 ⁺ T cell count, cells/ μ L ^a	HIV-1 RNA for pulsing DCs, log ₁₀ copies	PVL, log ₁₀ copies/mL		PVL rebound					
			Baseline ^a	Week 54	Doubling time, days		AUC ^b		Peak, log ₁₀ copies/mL	
					After stop 1	After stop 2	After stop 1	After stop 2	After stop 1	After stop 2
Immunized patients										
1 (M, 29)	793	7.19	4.24	3.30	1.89	2.33	3.39	2.52	5.16	5.30
2 (M, 45)	707	7.90	4.58	3.90	1.76	3.95	3.28	1.40	5.07	3.09
3 (M, 56)	614	8.22	4.51	3.79	2.67	3.36	3.67	2.61	5.75	4.56
4 (F, 32)	628	8.20	5.10	4.43	1.78	2.59	3.47	3.07	5.00	4.55
5 (M, 30)	781	7.07	4.12	4.12	2.23	2.80	2.29	3.20	4.94	4.46
6 (M, 54)	588	7.42	3.94	3.92	1.79	3.46	2.82	2.40	5.40	4.51
7 (M, 37)	1005	7.63	4.15	4.67	1.96	5.02	3.16	2.15	4.89	4.93
8 (M, 48)	763	7.56	4.65	4.80	1.37	1.83	3.48	2.96	6.37	4.92
9 (M, 47)	764	7.14	4.02	4.03	1.77	2.73	3.27	3.04	5.35	4.67
10 (M, 28)	759	9.11	5.22	5.03	1.82	1.69	4.03	3.93	6.15	5.67
11 (M, 31)	948	7.49	4.60	4.63	1.54	1.78	3.55	3.11	5.70	5.42
12 (M, 48)	706	7.98	4.11	4.70	2.76	2.30	3.32	3.36	5.14	4.96
Mean	754	7.74	4.44	4.27	1.95	2.82	3.32	2.87	5.41	4.75
SE	36	0.16	0.12	0.15	0.12	0.28	0.13	0.19	0.14	0.18
Control patients										
1 (F, 43)	879	...	3.07	3.01	6.51	5.14	1.93	1.76	3.86	4.23
2 (M, 58)	619	...	3.74	3.43	5.55	4.95	1.67	1.56	3.89	4.08
3 (M, 35)	900	...	3.64	3.36	4.70	4.08	2.15	2.61	3.96	3.80
4 (M, 39)	504	...	3.73	3.54	2.70	2.56	2.48	3.33	5.19	5.09
Mean	725	...	3.54	3.34	4.86	4.18	2.06	2.31	4.22	4.30
SE	97	...	0.16	0.11	0.81	0.58	0.17	0.41	0.32	0.28

NOTE. Boldface indicates those 4 patients with a PVL decrease of ≥ 0.5 log₁₀ copies/mL between baseline (before receipt of any highly active antiretroviral therapy [HAART]) and week 54 (after immunization and 24 weeks after the second interruption of HAART [stop 2]); these patients were defined as having a virological response. AUC, area under the curve; stop 1, first interruption of HAART.

^a Medians of all measurements available for the 2 years preceding the initiation of any HAART.

^b Calculated with data from the first 12 weeks after stop 1 and stop 2.

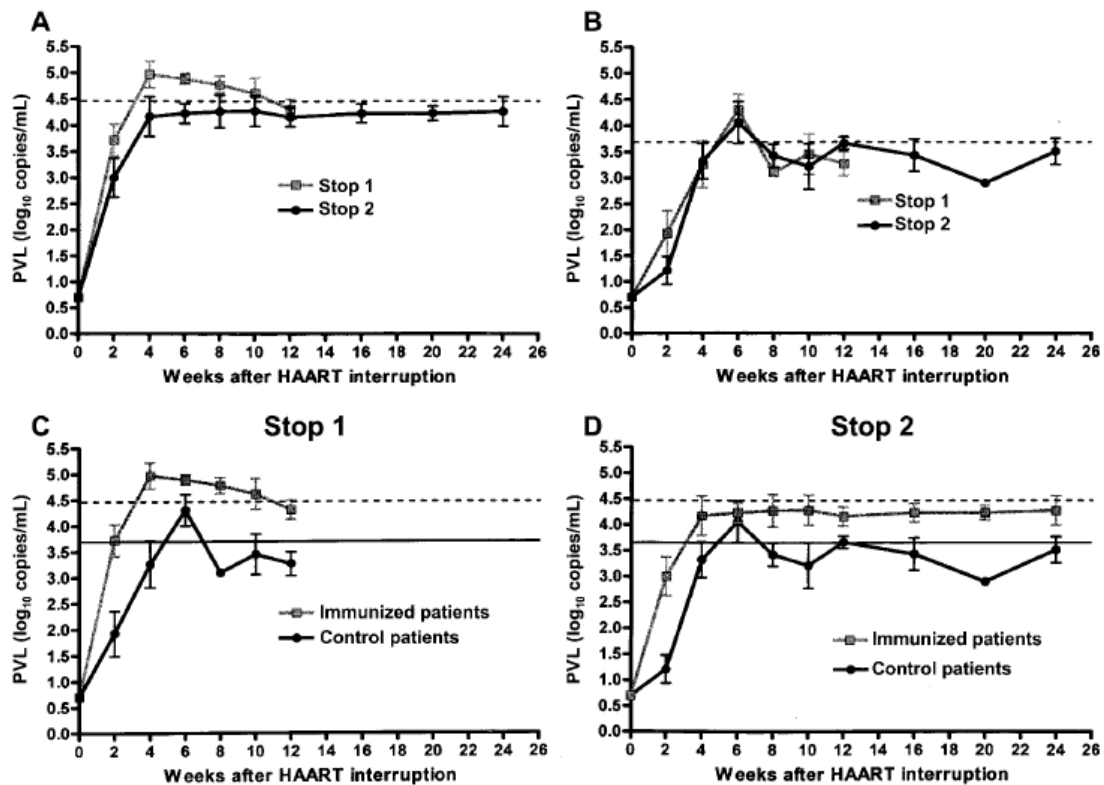


Figure 1. Plasma viral load (PVL) rebound after the first (stop 1) and second (stop 2) interruptions of highly active antiretroviral therapy (HAART). The dashed and continuous lines represent the mean baseline PVLs (before receipt of any HAART) of immunized patients (who were immunized between stops 1 and 2) and control patients, respectively. *A*, Mean PVLs of immunized patients. *B*, Mean PVLs of control patients. *C*, Mean PVLs of immunized patients and control patients after stop 1. *D*, Mean PVLs of immunized patients and control patients after stop 2.

CD8⁺ T cell responses, the greater the lengthening of the doubling time of PVL rebound from stop 1 to stop 2 ($r = -0.77$; $P = .004$). In lymphoid tissue, we found a significant increase in total CTL level (CD8⁺ and granzyme B⁺ cells) in the intra-follicular area, from a mean \pm SE of 7.2 ± 1.9 cells/high-power field (HPF) at week 0 to a mean \pm SE of 12.5 ± 3.8 cells/HPF at week 30 ($P = .05$). The increase in total CTL level was directly correlated with the lengthening of the doubling time of PVL rebound from stop 1 to stop 2 ($r = 0.85$; $P = .03$).

HIV-1-specific CD4⁺ lymphoproliferative response (LPR) to p24 antigen increased slightly and nonsignificantly after the first 2 doses of DC vaccine were administered (analyzed at weeks 12 and 18). The median total stimulation indices at week 0 and after vaccination at weeks 6, 12, 18, 24, and 30 were 2.66, 2.18, 3.75, 4.73, 2.89, and 1.88, respectively ($P = .26$). The responders had a weak but significant increase in LPR during the series of immunizations, compared with that in the nonresponders (change in stimulation index, mean \pm SE of 3.09 ± 1.7 and -0.21 ± 0.44 , respectively) ($P = .03$). The increase

in LPR was directly correlated with the amount of HIV-1 that was obtained during plasmapheresis and that was used for pulsing DCs ($r = 0.55$; $P = .05$). After stop 2, the increase in LPR in the responders was not maintained. No change in LPR was observed in the control patients.

CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts did not change significantly during the series of immunizations or after stop 2 (data not shown). However, at week 0, the responders had a higher CD4/CD8 index ($P = .001$), a higher naive CD4⁺ T cell count ($P = .001$), and a lower memory CD4⁺ T cell count ($P = .001$) than did the nonresponders. There were no differences at week 0 in the counts of other lymphocyte subsets or in HIV-1-specific immune responses between the responders and the nonresponders. At baseline (before receipt of any HAART), at week 30, and after stop 2, there were no differences in any immunologic parameters between the responders and the nonresponders.

Discussion. In the present study, we found that a vaccine comprising autologous MD-DCs pulsed ex vivo with heat-inactivated autologous HIV-1 was feasible, safe, and well tolerated

and elicited weak Th1 and HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses that were associated with a partial and transient control of viral replication. It could be argued that this vaccine did not elicit specific anti-HIV-1 immune responses at all; however, some data argue against this conclusion. First, we observed a very clear and consistent decrease in HIV-1-specific CD8⁺ T cell responses during the series of immunizations, indicating that the patients were developing immunity. In fact, this decrease was not observed after the mock immunization at week 0. The reasons for this decrease in the number of circulating HIV-1-specific CD8⁺ T cells are unclear, but others have reported similar results with respect to the immunization of patients with metastatic melanoma [10]. It has been speculated that this phenomenon might involve increased CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity, the induction of HIV-1-specific CD8⁺ regulatory T cells, increased apoptosis of activated CD8⁺ T cells, or the trafficking of sensitized CD8⁺ reactive T cells out of the peripheral blood [10, 11]. This last explanation is supported by the present findings—we observed that the increase in the number of total intrafollicular CTLs in lymphoid tissue and the decrease in the magnitude of the total CD8⁺ T cell responses after immunization was correlated with the lengthening of the doubling time of PVL rebound from stop 1 to stop 2.

Second, virological response was associated with a weak but statistically significant increase in HIV-1-specific CD4⁺ LPR. This increase in LPR was correlated with the amount of HIV-1 that was obtained during plasmapheresis and that was used for pulsing DCs, suggesting an antigen dose-related response. Therefore, we hypothesize that this induced helper response could permit CD8⁺ T cells to recover the ability to proliferate [12] and could promote the differentiation of CD8⁺ T cells into cytotoxic effectors [13] that migrate to lymphoid tissue at sites of HIV-1 replication and cell death [14], allowing partial control of viral replication in lymphoid tissue.

Although we found that DC vaccine did elicit cellular immune responses against HIV-1—even if weak and transient—the results of the present study are quite disappointing in terms of immunological and virological responses. It is unclear whether our findings resulted from DC dysfunction due to HIV-1 infection [15] or to technical aspects of the preparation of the DCs; these explanations are unlikely, however, because MD-DCs pulsed with a heat-inactivated whole laboratory strain of HIV-1 or recombinant HIV-1 proteins were able to induce the activation of autologous CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro (data not shown). Other potential explanations could be found via a comparison of the present study with another recent study, one that was conducted in a population of HAART-naïve patients with chronic HIV-1 infection and that included a schedule of therapeutic immunizations very similar to ours and autologous DCs pulsed with whole aldrithiol-2 (AT-2)-inactivated virus [5]. This study found that, after administration of 3 im-

munizations, PVL decreased by >90% for at least 1 year in 8 of 18 patients. This decrease in PVL was associated with strong and sustained HIV-1-specific cellular responses. The most important differences between the 2 protocols were as follows: (1) to pulse DCs, Lu et al. used a quantity of simian immunodeficiency virus that was 1000-fold higher than the quantity of HIV-1 we used; (2) Lu et al. inactivated virus with AT-2, whereas we inactivated virus with heat; and (3) Lu et al. obtained virus by culture, whereas we obtained virus by plasmapheresis. Whether these marked differences are relevant with respect to virological and immunological outcome should be answered in future trials.

Acknowledgments

We thank Brigitte Autran and Caroline Gregoire of Objectif Recherche Vaccin SIDA, for provision of HIV-1-overlapping Gag peptides, and Brigitte Autran and Anthony S. Fauci, for critical reading of the manuscript.

References

1. Choungnet C, Cohen SS, Kawamura T, et al. Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy. *J Immunol* **1999**; *163*:1666–73.
2. Sapp M, Engelmayer J, Larsson M, Granelli-Piperno A, Steinman R, Bhardwaj N. Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol Lett* **1999**; *66*:121–8.
3. Engelmayer J, Larsson M, Lee A, et al. Mature dendritic cells infected with canarypox virus elicit strong anti-human immunodeficiency virus CD8⁺ and CD4⁺ T-cell responses from chronically infected individuals. *J Virol* **2001**; *75*:2142–53.
4. Kundu SK, Engleman E, Benike C, et al. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1998**; *14*:551–60.
5. Lu W, Arraes L, Ferreira W, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **2004**; *10*:1359–65.
6. Garcia F, Knobel H, Sambat MA, et al. An open randomized study comparing d4T plus ddI and nevirapine (QD) vs d4T plus ddI and nevirapine (BID) in antiretroviral naïve chronic HIV-1 infected patients in very early stages. Spanish SCAN Study. *AIDS* **2000**; *14*:2485–94.
7. Plana M, Garcia F, Oxenius A, et al. Relevance of HIV-1-specific CD4⁺ T helper cell responses during structured treatment interruption in patients with a nadir CD4 T cells above 400/mm³. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2004**; *36*:791–9.
8. Garcia F, Plana M, Arnedo M, et al. A cytostatic drug improves control of HIV-1 replication during structured treatment interruptions: a randomized study. *AIDS* **2003**; *17*:43–51.
9. Alós L, Navarrete P, Morente V, et al. Immunoarchitecture of lymphoid tissue in HIV-infection during antiretroviral therapy correlates with viral persistence. *Mod Pathol* **2005**; *18*:127–36.
10. Phan G, Touloukian C, Yang J, et al. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother* **2003**; *26*:349–56.
11. Dhodapkar MV, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8⁺ regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* **2002**; *100*:174–7.
12. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG, et al. Loss of HIV-1-specific CD8⁺ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4⁺ T cells. *J Exp Med* **2004**; *200*: 701–12.

13. Janssen E, Lemmens E, Wolfe T, Christen U, Herrath M, Schoenberger S. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **2003**; 421:852–6.
14. Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death. *J Clin Invest* **2000**; 105:1407–17.
15. Carbonneil C, Donkova-Petrini V, Aouba A, Weiss L. Defective dendritic cell function in HIV-infected patients receiving effective highly active antiretroviral therapy: neutralization of IL-10 production and depletion of CD4⁺CD25⁺ T cells restore high levels of HIV-specific CD4⁺ T cell responses induced by dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J Immunol* **2004**; 172:7832–40.

