

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR i

ANATOMIA PATOLÒGICA

***ESTUDI DE LA RESPOSTA IMMUNE EN
PACIENTS INFECTATS PEL VIH-1 SOTMESOS
A TERÀPIES IMMUNOMEDIADES***

Tesi Doctoral presentada per

Anna López Plana

Per optar al grau de

Doctora en Farmàcia per la Universitat de Barcelona

Directora de la tesi: Doctora Montserrat Plana Prades

Tutor: Doctor Carles Enrich Bastús

Barcelona, Novembre 2008



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari

IDIBAPS

Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer

La Doctora MONTSERRAT PLANA PRADES, investigadora FIS al grup de recerca de Malalties Infeccioses i SIDA del IDIBAPS, i el Doctor CARLES ENRICH BASTÚS professor titular del Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica 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 LA RESPOSTA IMMUNE EN PACIENTS INFECTATS PEL VIH-1 SOTMESOS A TERÀPIES IMMUNOMEDIADES" presentada per Anna López Plana, 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 Farmàcia per la Universitat de Barcelona.

I per tal que quedi constància, signem aquest document a Barcelona, el 3 d'Octubre del 2008.

Dra. Montserrat Plana Prades (Directora)

Dr. Carles Enrich Bastús (Tutor)

Als meus pares

A la família López-Baquer

Al Marc, per TOT

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
AUC	“Area under the curve” (Àrea sota la corba)
BSA	Albúmina bovina
CAF	“Cellular antiHIV factor” (Factor cel·lular anti-VIH)
CD	Cèl·lules dendrítiques
Ci	Curi (unitat de radioactivitat)
CMV	Citomegalovirus
CPA	Cèl·lula presentadora d'antigen
cpm	Comptes per minut
CTL	“Cytotoxic T lymphocyte” (limfòcit T citotòxic o resposta citotòxica)
CV	Càrrega viral
CVP	Càrrega viral plasmàtica
Da	Dalton (unitat de pes molecular)
EDTA	Àcid tetraacètic d'etilendiamina
ELISPOT	“Enzyme-linked immunospot”
EVB	Virus d'Epstein-Barr
GM-CSF	“Granulocyte and monocyte colony-stimulating factor” (factor estimulant de colònies granulocítiques i monocítiques)
GMP	Good Manufacturing Practice
HCV	Virus de l'hepatitis C
HLA	“Human lymphocyte antigen” (antígens d'histocompatibilitat)
IFN	Interferó
IL	Interleucina

IP	Inhibidor de la transcriptasa
Kb	Kilobase
LTNP	“Long-term non-progressor”
LTR	“Long terminal repeat”
MALT	“mucosal-associated lymphoid tissue” (teixit limfoide associat a mucoses)
mDC	Cèl·lules dendrítiques mieloides
MHC	“Major histocompatibility complex” (complex major d’histocompatibilitat)
MIP	“Macrophage inflammatory protein”
mg	miligram
mL	Mililitre
mm³	Milímetre cúbic
nm	Nanòmetre
NK	“Natural Killer”
PAMP	“Pathogen-associated molecular patterns”
PD-1	“Programmed Death-1”
pDC	Cèl·lules dendrítiques plasmocitoides
PHA	“Phytohemagglutinin” (Fitohemaglutinina)
PRR	“Evolutionary conserved pattern recognition receptors”
PVDF	Polivinilidenofluoruro
PWM	“Pokeweed mitogen”
RANTES	“Regulated-upon-activation normal T-expressed and secreted”
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa
SFC	“Spot forming cells” (cèl·lules formadores d’spots)
SI	“Stimulation Index” (Índex d’estimulació)
SIDA	Síndrome de la immunodeficiència adquirida
SIV	“Simian immunodeficiency virus” (Virus de la immunodeficiència del simi)
TARGA	Tractament antiretroviral de gran activitat

TBE	Tris borat EDTA
TCR	"T-cell receptor" (receptor de les cèl·lules T)
TI	Transcriptasa inversa
TNF	Factor de necrosi tumoral
Treg	Cèl·lula T reguladora
TT	Toxoide tetànic
VIH	Virus de la immunodeficiència humana

1	<u>INTRODUCCIÓ</u>	3
	1.1. EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (VIH)	4
	1.1.1 Característiques principals i estructura del VIH	4
	1.1.2 Cicle biològic del VIH	6
	1.1.3 Història natural per la infecció del VIH	10
	1.2. RESPOSTA IMMUNITÀRIA CONTRA EL VIH	12
	1.2.1 Immunitat innata	12
	1.2.1.1 Cèl·lules natural killer (NK)	12
	1.2.1.2 Cèl·lules dendrítiques (CD)	13
	1.2.1.2.1 Mètodes de captació de l'antigen	14
	1.2.1.2.2 Maduració i migració de les cèl·lules dendrítiques	15
	1.2.1.2.3 Processament i presentació de l'antigen: MHC-I i II	16
	1.2.2 Immunitat adaptativa	17
	1.2.2.1 Resposta humoral	17
	1.2.2.2 Resposta cel·lular	18
	1.2.2.2.1 Resposta CD4	18
	1.2.2.2.2 Resposta CD8	20
	1.2.2.2.3 Paper de les cèl·lules CD4 sobre les cèl·lules CD8	
	22	
	1.3. PER QUÈ EL SISTEMA IMMUNOLÒGIC NO POT CONTROLAR LA REPLICACIÓ VIRAL?	24
	1.3.1 Depleció de les respostes CD4	24
	1.3.2 Alteració de les cèl·lules CD4	25
	1.3.3 Alteració de les cèl·lules CD8	25
	1.3.4 Alteració en la funció presentadora de l'antigen	26

1.3.5 Hiperactivació i esgotament del sistema immunitari	27
1.3.6 Escapament viral	27
1.4. RESPOSTA AL TRACTAMENT ANTIRETROVIRAL	28
1.4.1 Efectes sobre la càrrega viral	28
1.4.2 Efecte sobre els limfòcits. Repoblació cel·lular	29
1.4.3 Efectes sobre la resposta immunitària cel·lular contra el VIH	
30	
1.5. TERÀPIES IMMUNOMEDIADES EN EL TRACTAMENT DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1	32
1.5.1 Fonaments	32
1.5.2 Bases patogèniques que donen suport a l'ús de les estratègies immunomediades	33
1.5.2.1 Existència de respostes eficaces en el control de la replicació viral	33
1.5.3 Tipus de teràpies immunomediades	34
1.5.3.1 Interrupcions estructurades del tractament	36
1.5.3.1.1 Estratègies d'interrupció	36
1.5.3.2 Vacunes terapèutiques	38
1.5.3.3 Citocines	40
1.5.3.4 Immunoteràpia passiva	41
1.5.3.5 Immunomoduladors	42
2 <u>HIPÒTESI DE TREBALL</u>	48
3 <u>OBJECTIUS</u>	52

3.1	INTERRUPCIONS ESTRUCTURADES DEL TRACTAMENT	52
3.2	VACUNES TERAPÈUTIQUES	52
4	<u>PACIENTS, MATERIALS I MÈTODES</u>	56
4.1	DISSENY DE L'ESTUDI I PACIENTS	56
4.1.1	Estudi de les interrupcions estructurades del tractament	56
4.1.2	Estudi de la vacuna terapèutica	57
4.2	OBTENCIÓ I PROCESSAMENT DE MOSTRES SANGUÍNIES	58
4.2.1	Obtenció de cèl·lules mononuclears sang perifèrica	58
4.2.2	Obtenció del plasma	60
4.2.3	Obtenció del sèrum	60
4.2.4	Obtenció del <i>pellet</i>	60
4.2.5	Criopreservació de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	60
4.2.6	Obtenció de biòpsia	61
4.3	ESTUDI DE LA CÀRREGA VIRAL PLASMÀTICA	61
4.4	TIPATGE HLA	61
4.5	CITOMETRIA DE FLUX	62
4.5.1	Estudi de les subpoblacions limfocitàries T	62
4.5.2	Marcatge amb tetràmers	63
4.5.3	Marcatge intracel·lular amb perforina	63
4.6	ESTUDI DE LA RESPOSTA PROLIFERATIVA (CD4+)	64

4.7 ESTUDI DE LES RESPOSTES CD8+ ESPECÍFIQUES ANTI-VIH-1	66
4.8 SEQÜENCIACIÓ DEL VIRUS AUTÒLEG	73
4.8.1 Extracció de l'ADN proviral	73
4.8.2 Amplificació dels fragments p17 i p24 del gen <i>gag</i> del VIH-1	73
4.8.3 Clonació de les regions p17 i p24 del gen <i>gag</i> del VIH-1	74
4.8.4 Obtenció de la seqüència nucleotídica de les p17 i p24 del gen <i>gag</i>	76
4.8.5 Anàlisi de les seqüències	76
4.9 ANÀLISI ESTADÍSTIC	77
4.9.1 Estudi de les interrupcions estructurades del tractament	77
4.9.2 Estudi de la vacuna terapèutica	77
5 RESULTATS	
5.1 ESTUDI DE LES INTERRUPCIONS ESTRUCTURADES DEL TRACTAMENT	82
5.1.1 Característiques dels pacients	82
5.1.2 Efectes de les interrupcions estructurades del tractament sobre la càrrega viral	82
5.1.3 Efectes de les interrupcions estructurades del tractament sobre el sistema immune	83
5.1.3.1 Subpoblacions limfocitàries	83
5.1.3.2 Resposta limfoproliferativa	90
5.1.3.3 Respostes CD8+ específiques contra el VIH	93
5.1.4 Variables virològiques i immunològiques	95

5.2 ESTUDI VACUNA TERAPÈUTICA	96
5.2.1 Característiques dels pacients	96
5.2.2 Efectes de la vacuna terapèutica de cèl·lules dendrítiques sobre la càrrega viral	98
5.2.3 Efectes de la vacuna terapèutica de cèl·lules dendrítiques sobre els limfòcits T	99
5.2.3.1 Subpoblacions limfocitàries	99
5.2.3.2 Resposta limfoproliferativa	99
5.2.3.3 Respostes CD8+ específiques contra el VIH	102
5.2.4 Característiques fenotípiques i funcionals de les cèl·lules T CD8 VIH-específiques després d'immunització terapèutica amb la vacuna de cèl·lules dendrítiques	104
5.2.4.1 Característiques fenotípiques de les cèl·lules T CD8+ VIH-específiques	104
5.2.4.2 Estudi de les cèl·lules T CD4+ CD25+	110
5.2.4.3 Resposta CD8+ específiques contra el VIH-1	110
5.2.5 Efectes de la vacuna terapèutica sobre la seqüència dels epítops immunodominants	113
5.2.5.1 p17 Gag	113
5.2.5.2 p24 Gag	117
6 <u>DISCUSSIÓ</u>	123
6.1 INTERRUPCIONS ESTRUCTURADES DEL TRACTAMENT	123
6.2 VACUNES TERAPÈUTIQUES	133
7 <u>CONCLUSIONS</u>	145

8	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	150
9	<u>ANEXE</u>	173