

Los linfocitos de la memoria inmunológica como reservorios del VIH durante HAART y sus implicaciones en el control o en la erradicación del virus

SILVIO ARANGO-JARAMILLO, DVM, MSc, PhD.

Departamento de Microbiología Molecular & Inmunología
Universidad de Johns Hopkins. Baltimore, Maryland, USA.

El VIH puede permanecer relativamente escondido para la maquinaria inmunológica en los llamados santuarios o áreas del organismo de difícil acceso para los efectores de la respuesta inmunitaria y para los propios medicamentos antirretrovirales, tales como ciertas áreas del sistema nervioso central, más allá de la barrera hematoencefálica, ciertas regiones del aparato genital, etc. Para empeorar el panorama, estudios recientes muestran cómo la infección por VIH-1 persiste en forma latente en linfocitos T CD4+ en estado de reposo, aún luego de prolongados tratamientos antirretrovirales tipo HAART hasta por períodos de 30 meses. Estos reservorios latentes representan un obstáculo más para la posibilidad de erradicación de este agente en una persona infectada.

Los linfocitos de la memoria aparentemente son capaces de vivir por períodos muy largos en ausencia de estímulo antigénico. Estas células son funcionalmente consideradas como en reposo ya que no producen moléculas efectoras de funciones inmunológicas, a menos que sean estimuladas de nuevo por el antígeno o inmunógeno. No se conoce cuál es exactamente el mecanismo por el cual las células T y B se convierten en células de memoria o en células efectoras. Las células de la memoria inmunológica son cruciales en los procesos de vacunación como sistema que provee inmunidad de larga duración contra la respectiva infección. Son morfológicamente idénticas a las células efectoras hasta donde la presente tecnología puede discernir, pero presentan un marcador de membrana diferente del que poseen los linfocitos no sensibilizados o vírgenes que aún no han hecho contacto con el antígeno respectivo. Las células vírgenes o no sensibilizadas (naive) expresan una molécula proteica en la superficie que tiene 200 kD y se denomina CD45, la cual contiene un segmento codificado por un exon designado A. Por consiguiente estas células no sensibilizadas, vírgenes o “naive” se denominan por este sistema de marcación como CD45RA+ o sea restrictivas del producto del exon A. Este marcador se reconoce mediante reacción inmunológica con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el producto del exon A. En contraste, la mayoría de los linfocitos de memoria y aquellos activados expresan una proteína de 180 kD en la cual el exon A ha sido eliminado por “splicing”. Este marcador por consiguiente se denomina CD45R0. Los linfocitos activados presentan además el marcador HLA-DR+.

Varios estudios demuestran que luego de prolongados tratamientos, incluso hasta de 72 semanas de duración, con la terapia antirretroviral combinada altamente activa (HAART), provocan descensos espectaculares de la carga viral en plasma sanguíneo, hasta colocarse por debajo de los límites de capacidad de hallazgo de copias del genoma viral por mililitro de plasma, (50 a 500) de las más sofisticadas pruebas de laboratorio. Esto se ha observado en pacientes que reciben simultáneamente inhibidores tanto de la transcriptasa reversa como de la proteasa. Sin embargo, el hecho de no poderse encontrar con estas técnicas el genoma viral en el plasma de la sangre periférica no parece ser garantía de supresión completa de la replicación o de la sobrevivencia del VIH, no solamente en el tejido sanguíneo sino también en otras localizaciones tisulares o compartimientos menos accesibles, tales como el tejido linfóide, nervioso o algunas zonas particulares del tracto genital. Estos últimos sitios mencionados podrían constituir santuarios para la sobrevivencia y la posibilidad de replicación del virus.

Diversos grupos de investigación han enfrentado concretamente este tópico del estudio de la sobrevivencia del virus a pesar del tratamiento con HAART, con el fin de vislumbrar las posibilidades de erradicación del VIH inicialmente a nivel de individuo para luego poder dar el salto hacia el problema de poblaciones. Algunos de estos trabajos han sido publicados por grupos como el de Joseph Wong, Douglas Richman y colaboradores en la Universidad de California, San Diego en La Jolla, David Ho y colaboradores en la Fundación Aaron Diamond en el Centro de Investigación de SIDA en la Universidad Rockefeller de Nueva York y Alan Perelson en el Laboratorio Nacional Los Alamos en Nuevo México, Winston Cavert y Ashley Haase en la Universidad de Minnesota en Minneapolis, Anthony Fauci y colaboradores en los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en Bethesda y Robert Siliciano y colaboradores en la Universidad de Johns Hopkins en Baltimore, entre otros.

En esta reseña, me concentraré mucho más en los trabajos efectuados en la Universidad de Johns Hopkins. Estos estudios han sido en gran parte colaborativos con el grupo de David Ho en la Universidad Rockefeller y el de Anthony Fauci en NIH.

Sabemos que los linfocitos CD4+ son las células blanco por excelencia del ataque del VIH. Las células de tipo monocito-macrófago son también susceptibles a la infección, aunque en un porcentaje menor. Las células dendríticas juegan un papel crucial en el establecimiento inicial de la infección y son susceptibles a ser infectadas por el VIH. Así mismo, conocemos que uno de los requerimientos fundamentales para la efectiva replicación del virus en la célula es su estado de activación. El virus quizás se adhiera y penetre a una célula en fase de reposo o inactivación pero regularmente no es muy eficiente el proceso de integración del genoma viral en el celular y por tanto el inicio de la replicación viral en este tipo de células no se produce. Un gran número de linfocitos T CD4+ recirculan continuamente entre la sangre periférica y el tejido linfóide. Esto probablemente aumenta enormemente la probabilidad de encuentro de las CD4 con el VIH en comparación con otras subpoblaciones celulares.

El primer grupo de estudio acá en la Universidad de Johns Hopkins en cuanto a la infección latente o latencia del VIH-1 se ha orientado hacia células CD4⁺ en estado de reposo o G₀. Esta infección latente puede ocurrir por dos mecanismos. El primero comprende la presencia de DNA del VIH-1 parcial o completamente transcrito, utilizando la transcriptasa reversa a partir del genoma viral. Este DNA viral puede estar en el citoplasma de las células T CD4⁺ infectadas pero en estado de reposo, como resultado de bloqueo en la transcripción reversa o en el traslado hacia el núcleo de la célula. El segundo mecanismo es aquel que involucra un verdadero provirus o sea un DNA viral integrado al genoma celular. Este segundo caso es considerado por tanto como un caso de reservorio latente más estable. Los estudios se realizaron en 14 personas VIH-1 positivas, asintomáticas cuyos conteos de linfocitos T CD4⁺ fluctúan entre 200 y 700 por uL. Siete de ellos recibían terapia antirretroviral con análogos de nucleósidos.

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ en estado de reposo, a partir de sangre periférica y nódulos linfáticos, para determinar la frecuencia de células infectadas en estado de latencia con DNA del VIH integrado. El provirus DNA fue medido cuantitativamente por una reacción de PCR inversa, la cual utiliza una digestión inicial del DNA de células CD4⁺ en estado de reposo con el enzima PstI, seguida de circulación utilizando una ligasa T4 y de la amplificación que utiliza “primers” o cebadores en regiones conservadas de LTR y gag, los cuales reconocen secuencias muy cercanas y amplifican en dirección opuesta, siguiendo el genoma circularizado. De tal modo que la amplificación del gen gag viral y del DNA celular, se produce entre el sitio de integración del provirus y el sitio de corte de PstI más cercano, aguas arriba de la terminación 5’ del provirus integrado. Seguidamente se realiza PCR anidado o “nested” seguido de hibridización con una sonda específica de provirus VIH-1. Toda esta metodología permite específicamente determinar DNA del VIH integrado, con un límite de 16 copias por millón de células. Las frecuencias encontradas no fueron muy diferentes en sangre o en nódulos linfáticos y no correlacionaba con número de CD4⁺, carga viral en plasma medida por presencia de genoma viral RNA, ni tampoco con la terapia empleada. Esto sugiere que en la infección asintomática se establece un relativamente estable estado sistémico, en el cual una fracción muy diminuta (menor de 0.05%) de la subpoblación de CD4⁺ en reposo, porta el provirus integrado en su genoma. Esta baja frecuencia podría reflejar el hecho que CD4⁺ activadas e infectadas productivamente, raramente sobreviven los efectos citopáticos del virus y los mecanismos citolíticos inmunológicos, por un período suficiente, el cual les permita revertir al estado de memoria y reposo. Aquellas que sobrevivan deberían mostrar un fenotipo de memoria como efectivamente se comprobó en 3 de 4 muestras examinadas.

De este primer grupo de experimentos podemos decir que los resultados sugieren, que la mayoría del DNA viral encontrado en células CD4⁺ en reposo, posee su longitud total normal, es lineal y no está integrado, pero carece de terminaciones romas reconocibles por la integrasa viral. Sólo una pequeña fracción de VIH-1 DNA en este tipo de células, resultó competente para la replicación y pudo ser recuperado por cultivo cuantitativo de CD4⁺ en reposo purificadas. Para ello, las células fueron activadas inmediatamente luego del

aislamiento. Estos ensayos mostraron todo tipo de formas replicativas del virus incluyendo formas lábiles y persistentes. Los valores fueron mucho más bajos que aquellas frecuencias de células portadoras de DNA viral determinadas por PCR. Esa diferencia refleja el hecho que sólo una pequeña fracción de DNA viral no integrado, es competente para replicarse, lo cual es consistente con los ensayos moleculares. Estos estudios moleculares encontraron sólo algunas moléculas con terminaciones romas reconocibles por la integrasa viral.

En conclusión, la infección con VIH-1 durante el estado asintomático persiste y progresa a pesar de que en determinado momento sólo una muy pequeña fracción de la población de células susceptibles son infectadas establemente, como pudo determinarse por la presencia de provirus integrado. Esta conclusión es válida para células CD4+ tanto activadas como en estado de reposo y para macrófagos localizados en tejido linfoide. El reservorio de células T CD4+ en estado de reposo con provirus integrado es menor de 0.05% de la población de células en reposo con CD4+. Esto probablemente se debe a que células infectadas productivamente mueren rápidamente debido a los efectos citopáticos del virus o a la actividad citolítica de los linfocitos T citotóxicos CTL. Los resultados fueron similares en sangre periférica y en nódulos linfáticos, lo cual es consistente con el continuo tráfico de estas células entre varios compartimientos del tejido linfoide. Debe tenerse en cuenta que la mayoría del DNA viral encontrado por los procedimientos estándar de PCR es probablemente de la variante no integrada, linear y de longitud total o muy cercana. La mayoría de esas moléculas no integradas se encuentran como círculos de 1 ó 2 LTRs y el resto son compuestos lineares con terminales defectuosos, probablemente resultantes de los errores en la transcripción reversa o de la actividad de nucleasas del huésped. Estas formas no integradas son probablemente lábiles y una terapia antirretroviral efectiva debe rápidamente reducir la carga viral de viriones asociados a células. Por lo tanto, el PCR estándar no distingue entre virus integrado y no integrado. Aunque las células CD4+ infectadas latentemente están presentes en frecuencias muy bajas, la importancia de este pequeño reservorio no debe despreciarse o subestimarse, para efectos de la posibilidad de búsqueda de la erradicación del VIH de una persona infectada.

El segundo grupo de estudios acá en la Universidad de Johns Hopkins se concentró en la identificación de reservorios para el VIH-1 en pacientes sometidos a terapia HAART. Para ello se estudiaron 22 pacientes, los cuales estuvieron bajo HAART por un período de hasta 30 meses. Se recobró virus competente para replicación a partir de linfocitos CD4+ en estado de reposo. La frecuencia de estas células portando el VIH-1 latente, fluctuó entre 0.2 hasta 16.4×10^6 células. Este patrón no se modificó con el incremento de tiempo de terapia. El virus recobrado no mostró generalmente la presencia de mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos antirretrovirales. Este reservorio consistente en virus latente que parece no evolucionar debe tenerse muy en cuenta para las decisiones concernientes a la terminación de la terapia en pacientes que están respondiendo eficientemente al tratamiento HAART. En pacientes bajo HAART, el virus en plasma cae a niveles no medibles en unos dos a cuatro meses y es difícilísimo recuperar el virus en cultivo a partir de sangre periférica. Este grupo de trabajos se enfocó hacia la determinación de si virus

competente de replicación puede persistir en células CD4+ en estado de reposo, en pacientes bajo tratamiento HAART, quienes no presentan evidencia de replicación activa.

Los criterios de selección para los 22 pacientes estudiados fueron los siguientes:

1. Tanto el paciente como su médico dieron testimonio de adherencia estricta al régimen de terapia HAART, compuesto típicamente por 3 ó 4 medicamentos, incluyendo un inhibidor de proteasa.
2. Presencia de una caída rápida de la carga viral en plasma (menos de 200 copias por mililitro) medida por la técnica competitiva cuantitativa que busca el genoma RNA viral por RT-PCR (PCR por transcripción reversa).
3. Continuación de la aparición de resultados negativos con esta prueba a través del estudio.

Los resultados sugieren que en todos los pacientes se presentó una supresión prolongada de la replicación viral, siendo negativos los resultados de carga viral en plasma. Así mismo se observó un ascenso gradual de los recuentos de linfocitos CD4+ y carencia de evolución viral. Luego se aislaron células altamente purificadas del tipo de linfocitos CD4+ en estado de reposo, a partir de la sangre periférica de estos pacientes. Después de la eliminación de monocitos por el sistema de adherencia y la selección negativa con anticuerpos monoclonales y esferas magnéticas, se pudo remover tanto CD8+, como linfocitos B, monocitos y células asesinas naturales. Además, células CD4+ activadas fueron removidas utilizando anticuerpos anti CD25, CD69 y HLA-DR. Una purificación adicional fue lograda por selección por citometría de flujo de linfocitos pequeños expresando CD4 pero no HLA-DR, el cual es manifiesto en las células activadas. Este sistema múltiple de purificación produjo una pureza de 97% y la contaminación fue menor de 1% con células CD4+ activadas.

Como el hecho crítico era encontrar virus competente para replicación luego o durante la terapia HAART, se procedió a activar subpoblaciones purificadas de CD4+ en estado de reposo. Para ello se utilizaron procedimientos estandar con fitohemaglutinina y además células mononucleares periféricas irradiadas provenientes de donantes negativos para VIH-1. El día después de la activación y 7 días más tarde, se añadieron células mononucleares en estado blástico y separadas de linfocitos CD8+ procedentes de donantes negativos a VIH-1 como un sistema adicional para amplificación del posible virus presente. En cada uno de los 18 casos intentados se pudo aislar virus competente de replicación.

Parece ser que estos virus competentes para replicación corresponden a formas integradas. Cuando las células en reposo se infectan *in vitro* y se incuban durante 6 días, se torna difícil recuperar virus por activación de dichas células. Viriones que permanecen adheridos a la superficie de la célula o moléculas de DNA viral no integradas formadas en dichas células, no fueron capaces de iniciar infección productiva luego de la incubación.

Cuando células en reposo procedentes de pacientes bajo HAART fueron preincubadas antes de la activación, las frecuencias medidas fueron muy similares a aquellas obtenidas por activación inmediata, indicando que el virus recuperado era derivado de células portadoras de formas virales integradas. La existencia de un pequeño pero estable compartimiento de células latentemente infectadas, debe ser considerada seriamente para las decisiones relativas a la suspensión del tratamiento HAART en pacientes sin ninguna otra evidencia de virus residual.

Sigue siendo muy controversial el asunto de la infección *in vitro* de células en reposo, puesto que es muy bien conocido de la necesidad de activación que requieren las células para ser infectadas por el VIH-1. Algunos investigadores consideran que existe un verdadero gradiente de subpoblaciones entre el estado total de reposo y el pleno de activación y que los marcadores de membrana para células activadas no son garantía para la determinación del estado preciso en el cual se encuentran las células desde este punto de vista. De otra parte el grupo de Anthony Fauci ha propugnado por la búsqueda de medicamentos que impidan la acción de la integrasa viral, para evitar la instalación de provirus y formas latentes en las células infectadas.

Con estos hallazgos de virus competente para la replicación en personas bajo terapia de tipo HAART por tiempo prolongado, se percibe claramente la necesidad de desarrollar nuevos y más eficaces antirretrovirales, con menos efectos dañinos colaterales y de bajo costo, si se decide aspirar a la erradicación del virus a nivel de individuos inicialmente. Desde el punto de vista práctico, los actuales medicamentos provocan un impacto sustancial en cuanto a cambios de estilo de vida, problemas de toxicidad, etc., los cuales hacen difícil la adherencia por tiempo prolongado a este tipo de terapia.

Algunos estudios comienzan a mostrar cómo pacientes bajo HAART inician un proceso de restauración, así sea parcial, de la respuesta inmunitaria hacia diversos agentes. Esto se puede demostrar en algunos casos por medio de ensayos *in vitro* pero también se está observando *in vivo*, con marcado descenso de infecciones oportunistas en pacientes avanzados. Infortunadamente no parece presentarse evidencia de reconstitución inmunológica en VIH positivos con infección crónica. Parece que la respuesta inmune específica contra VIH se pierde muy al comienzo de la infección primaria con el virus y aparentemente si la terapia HAART se inicia tempranamente, o sea al momento del pico de viremia inicial, quizás se pueda preservar la respuesta inmune específica mediada por linfocitos CD4+. Infortunadamente, desde el punto de vista práctico, la identificación de este estado de infección primaria con el primer pico de viremia se logra solamente en aproximadamente 1% de los casos.

Basado en todas las consideraciones anteriores, comienza a surgir consenso sobre la necesidad de desarrollar estrategias de intervenciones sobre la respuesta inmunitaria, de tal forma que pueda potenciarse la inmunidad presente y más aún, se induzca una respuesta inmune específica “de novo” contra el VIH. Cabe mencionar que la terapia HAART

continúa siendo la intervención primaria en la infección por este virus, pero no hay mucha duda que la complementación de la terapia HAART con una intervención basada en la respuesta inmunitaria, o la terapia génica, debe ser la vía que pueda conducir al control eficiente de la replicación viral, aun cuando más adelante la ausencia de la quimioterapia se haga necesaria por razones bien conocidas. Esta combinación poderosa de HAART con inmunidad y terapia génica podría abrir las puertas para conducirnos hacia una estrategia de erradicación del virus a nivel de pacientes individuales. Así que el hallazgo de vacunas eficaces, prácticas de inmunomodulación y sistemas de corrección a nivel de genes y genomas, colocaría la palabra erradicación en un escenario más realista.

Algunas referencias

Wong J. K., **et al.** *Science*, 278, 1291-1295, 1997.

Chun T. W., **et al.** *Nature*, 387, 183-188, 1997.

Finzi D., **et al.** *Science*, 278, 1295-1300, 1997.

Perelson A. L., **et al.** *Nature*, 387, 188-191, 1997.

Pantaleo G. and Perrin L., *AIDS*, 12, supplement A., S175-S180, 1998.