

20.278

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



\* 5 3 0 9 5 4 1 5 6 1 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES Y MECANISMOS AUTOINMUNES EN  
LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESPERANZA FEIJOO BLANCO**

1994



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)  
28040 - MADRID

TELEFONO  
544 16 00 - 544 1  
549 10 07 - 549

Dña Rosa María García Delgado, Doctora en Ciencias Biológicas y Jefe Asociado del Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz

**CERTIFICA:** que la presente Tesis Doctoral titulada :**"Inmunocomplejos circulantes y mecanismos autoinmunes en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana"** ha sido realizada bajo mi dirección por Esperanza Feijó Blanco y reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Madrid, a 29 de Julio de 1994

Fdo. Rosa García Delgado

Esperanza Feijó

A mi padre, de quien siempre guardaré un  
entrañable recuerdo.

A mi madre, por su fortaleza y dedicación  
a sus hijos.

A mis hermanos, por su cariñoso apoyo.

Una mañana de Julio de 1994:

Ya casi he terminado de escribir mi tesis por eso me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de algún modo, han influido en su realización.

A Rosa, por haberme ayudado a descifrar mis resultados, perdidos y desordenados en miles de cuadernos, a los que ella se refería como malditos, con un gran sentido del humor. ¡Gracias por todo!.

Al Dr. Ortiz, de quien siempre recordaré su gran calidad humana y sus clases de Inmunología; le agradezco su ayuda durante todo este tiempo que he trabajado en el Departamento.

A M<sup>a</sup> Angeles Muñoz, por su colaboración en la resolución de algunos de los análisis realizados en esta tesis.

Al Dr. Fernández-Guerrero, por su ayuda en la valoración clínica de los pacientes.

A Gemma, con quien he recorrido prácticamente todo el sur de Inglaterra bajo un viento conocido en aquellas zonas como galera y una lluvia interminable; a Pepe, a quien siempre recordaré al oír un ritmo brasileño; a Lorena, por haberme enseñado la cultura boliviana y a Carmen, por todos los momentos que compartimos en el laboratorio, quiero agradecerles su gran amistad y su apoyo incondicional como amigos.

A Val, por haberme hecho partícipe de sus clases en los colegios y haber despertado mi interés por la enseñanza.

A Dolores, por todas las dosis de "optimina" y sentido del humor que me ha ofrecido durante estos últimos meses, de quien espero que escriba una gran tesis sobre alguna de las miles de hipótesis que se plantea.

A Ana por mostrar un gran compañerismo en todas las horas de trabajo que hemos compartido.

A Eduardo, por haber realizado todas las determinaciones de Inmunoglobulinas que he necesitado a pesar de sus quejas por el poco volumen de mis muestras, y a todos los que compartimos el espacio del laboratorio 6, especialmente a Aurora, por revisar las primeras hojas que escribí de mi tesis, a Pablo, Ana del Amo, Susana, M<sup>o</sup> José y a Pilar.

Por último, a todos mis compañeros del Departamento por su disposición en todo momento a resolver alguna de mis dudas. Todos estos años que he pasado en el laboratorio formarán parte de mis recuerdos que con el paso del tiempo se desdibujarán al evocarlos, como escribió Pablo Neruda al describir sus memorias en su libro "Confieso que he vivido", pero de los que siempre me acordaré con gran cariño.

Esta tesis ha sido realizada en el Dpto. de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, bajo la dirección de la Dra. García Delgado, con una ayuda recibida por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 90/227).

## Indice

Abreviaturas	i
<b>1.- INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1.- BIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS HIV.	1
1.1.1.- Filogenia y estructura.	2
1.1.2.- Organización genómica.	3
1.1.3.- Interacción con la molécula CD4.	4
1.1.4.- Ciclo biológico.	6
1.2.- CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA INFECCION.	8
1.3.- ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN EL SIDA.	12
1.3.1.- Disminución de linfocitos T CD4+.	12
1.3.2.- Alteración de los linfocitos B.	15
1.3.3.- Alteración de los Monocitos.	16
1.3.4.- Alteración de las células NK.	17
1.4.- CONTROL INMUNOLOGICO DEL HIV.	17
1.4.1.- Respuesta humoral.	17
1.4.2.- Respuesta celular.	18
1.5.- IMPLICACION DE LOS INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES EN LA INFECCION.	19
<b>2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.</b>	<b>22</b>
<b>3.- MATERIAL Y METODOS.</b>	<b>24</b>
3.1.- MATERIAL.	24
3.2.- METODOS.	25
3.2.1.- Análisis inmunológicos realizados para el diagnóstico de la infección y seguimiento de los pacientes infectados.	25
3.2.2.- Aislamiento de Inmunocomplejos circulantes del suero de pacientes infectados: Niveles y concentración.	25
3.2.3.- Composición: Detección de antígeno p24 y anticuerpos anti-HIV.	26
3.2.4.- Disociación de los Inmunocomplejos.	27
3.2.5.- Determinación de actividad anti-CD4 en los Inmunocomplejos por:	
3.2.5.6.- Unión a una molécula CD4 recombinante soluble.	27
3.2.5.7.- Unión a la molécula CD4 expresada en extractos de membrana de una línea linfoblástica T humana CD4+.	28

3.2.6.- Unión de los Inmunocomplejos a linfocitos de sangre periférica.	31
3.2.7.- Inhibición de la proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos de sangre periférica por Inmunocomplejos.	32
3.2.8.- Infección <i>in vitro</i> de linfocitos de sangre periférica por Inmunocomplejos.	34
3.2.8.1.- Cuantificación de niveles de antígeno p24 en el sobrenadante de los cultivos celulares.	34
3.2.8.2.- Detección de ADN proviral integrado en el genoma celular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	35
3.2.9.- Estudio de la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8+ de pacientes infectados frente a linfocitos T CD4+ mediante ensayos de liberación de Cr <sup>51</sup> .	40
3.2.10.- Métodos estadísticos.	42
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>43</b>
4.1.- PAPEL PATOGENICO DE LOS ICC EN LA INFECCION POR HIV.	43
4.1.1.- Asociación entre la progresión de la infección y las siguientes características de los Inmunocomplejos:	
4.1.1.1.- Frecuencia de niveles elevados en suero de pacientes infectados.	43
4.1.1.2.- Composición.	46
4.1.1.3.- Actividad anti-CD4.	54
4.1.2.- Potenciación de la infección por Inmunocomplejos.	65
4.1.2.1.- Unión de los ICC a linfocitos de sangre periférica.	65
4.1.2.2.- Implicación de los ICC en la inhibición del crecimiento celular.	71
4.1.3.- Capacidad infectiva de los Inmunocomplejos.	74
4.2.- PRESENCIA DE LINFOCITOS T CD8+ EN PACIENTES INFECTADOS CAPACES DE LISR LINFOCITOS T CD4+ ESTIMULADOS CON PHA.	78
<b>5.- DISCUSION FINAL.</b>	<b>86</b>
5.1.- IMPLICACION DE LOS INMUNOCOMPLEJOS EN LA INFECCION.	86
5.2.- MECANISMOS AUTOINMUNES IMPLICADOS EN LA DEPLECION DE LINFOCITOS T CD4+.	90
<b>6.- CONCLUSIONES.</b>	<b>92</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>93</b>

---

AcM	Anticuerpo monoclonal
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ARN	Acido ribonucleico
BSA	Albúmina de suero bovino
CDC	Centros de Control de Enfermedades de Atlanta
CLH-Gly	Acido clorhídrico-Glicina
CMV	Citomegalovirus
CPM	Cuentas por minuto
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EBV	Virus de Epstein Barr
FITC	Fluoresceína
FLS	Tamaño celular
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HTLV-I	Virus linfotrópico T humano tipo I
ICC	Inmunocomplejos circulantes
IL-2	Interleuquina 2
Kd	Kilodalton
LRFL	Intensidad de fluorescencia roja
L90LS	Complejidad celular
LGFL	Intensidad de fluorescencia verde
LTR	Secuencias de repetición largas terminales
MHC	Sistema principal de Histocompatibilidad
NK	Células "Natural Killer"
NP-40	Nonidet-p40
OPD	Orto-fenildiamina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBL	Linfocitos de sangre periférica
PBS	Solución salina
PGL	Linfadenopatía generalizada persistente
PHA	Fitohemaglutinina
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
PE	Ficoeritrina
PO	Peroxidasa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	Virus de la inmunodeficiencia en simios
STF	Suero de ternera fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
TCR	Receptor de linfocitos T
TRIS	Hidroximetil-amino-metano

## **1.- INTRODUCCION**

## 1.- BIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.

Fue a finales de 1981 cuando se publicó el primer caso de SIDA, a pesar de que en aquel momento no se sabía la etiología de esta enfermedad (1). Se trataba de un joven homosexual americano con neumonía que presentaba un estado grave de inmunodeficiencia.

A partir de este año se empezaron a observar más casos de jóvenes, no solamente americanos sino también europeos, pertenecientes a dos grupos de riesgo, homosexuales y drogadictos, que padecían enfermedades infecciosas o neoplasias muy poco frecuentes en la población normal, como Sarcoma de Kaposi, Tuberculosis o Neumonía por *Pneumocystis carinii*.

La evaluación inmunológica inicial de estos pacientes demostró una marcada deficiencia de la función celular y una pérdida selectiva de linfocitos T CD4+. Como resultado de esta inmunodeficiencia, estos pacientes eran víctimas de patógenos que podrían ser fácilmente controlados por un Sistema Inmune normal. Este estado, en su forma más avanzada, ha sido denominado Síndrome de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (SIDA).

Fueron dos investigadores, Robert C. Gallo y Luc Montagnier, quienes en 1983 demostraron por primera vez que el agente que inducía un estado de inmunodeficiencia en el hombre era un retrovirus (2), denominado actualmente virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). Se trataba entonces de una enfermedad devastadora causada por una clase de agentes infecciosos, los retrovirus, detectados no hace mucho tiempo en seres humanos como responsables de ciertas patologías.

El primer retrovirus humano se descubrió en 1980 y fue denominado Virus Linfotrópico T humano de tipo I (HTLV-I) porque se demostró que podía infectar linfocitos T humanos. Este virus causa un tipo de leucemia, conocida como Leucemia de células T en adultos (LAT), endémica de algunas áreas del Japón, Africa y el Caribe, aunque actualmente se ha extendido a otras regiones del mundo. Dos años después se descubrió el HTLV-II, implicado probablemente en algunos casos de Leucemias de células T, Leucemia de las células peludas y algunos linfomas crónicos.

En un principio se pensó que el agente etiológico del SIDA podía ser un retrovirus relacionado con el HTLV-I, pero cuando se aisló y se estudiaron sus características morfológicas y su genoma, se demostró que estaba más relacionado con un grupo de virus citopáticos no transformantes denominados Lentivirus (3,4).

El descubrimiento del HIV, como agente que causaba el SIDA, facilitó la aparición de una prueba para determinar la presencia de anticuerpos frente al HIV. Los resultados consecuentes a este análisis revelaron que se trataba de una infección con un periodo de latencia muy largo y que el número de personas infectadas era mucho mayor que el de las personas que presentaban un Síndrome de Inmunodeficiencia. Esta diferencia implicaba que existía un estado de pandemia.

La mayoría de las personas infectadas eran homosexuales, drogadictos, o bien, niños nacidos de madres seropositivas. Estas observaciones sirvieron para definir las tres vías de transmisión del virus, sexual, intravenosa y materno-fetal.

En la población del Oeste de Africa, en 1985, se aisló un nuevo virus relacionado con el primer virus de la Inmunodeficiencia Humana aislado, HIV-1, al que se le denominó HIV-2. Este nuevo virus estaba también asociado a un Síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA, aunque menos agresivo (5).

#### 1.1.1.- Filogenia y estructura.

El origen filogenético del virus es difícil de determinar debido a la gran variación que existe entre las secuencias de nucleótidos de las cepas virales estudiadas hasta el momento, procedentes de pacientes infectados de diferentes países, y a la carencia de datos epidemiológicos anteriores a los primeros casos de SIDA diagnosticados.

Con los datos evolutivos que existen hasta ahora, en los que se han comparado distintas secuencias del ARN de retrovirus característicos de los primates, se ha sugerido que ambos tipos de virus, el HIV-1 y el HIV-2, podrían haber evolucionado de un antecesor común hace 40 años, relacionado con el Virus de la Inmunodeficiencia en simios, SIV (6).

Por otro lado, estudios realizados para determinar analogías entre las proteínas de distintos virus, basados en la detección de reacciones cruzadas de los anticuerpos del suero de los organismos infectados, han apoyado la hipótesis de la relación del HIV con el virus que causa un Síndrome de Inmunodeficiencia en los simios (SIV). De hecho, el SIV<sub>mac</sub>, responsable de una forma de inmunodeficiencia y encefalopatía en los monos presenta una homología de un 75% en la secuencia de nucleótidos con el virus HIV-2 (7) y en ambos virus la organización de los genes estructurales y reguladores es virtualmente idéntica.

Actualmente se cree que el HIV-1 se originó en Africa Central y que su gran expansión pudo haber sido debida a la aparición del virus en grupos de alto riesgo de transmisión como la población africana, los homosexuales y los drogadictos de Europa y Estados Unidos.

Por microscopía electrónica de alta resolución se pudo describir la forma casi esférica del virión, cuyo diámetro oscila entre los 80 y 110 nm. Actualmente se conoce perfectamente la estructura del virus, constituida por una cubierta externa, o envoltura, formada por una doble capa de moléculas lipídicas, procedente de las membranas de las células infectadas, y una nucleocápside en el interior. En la bicapa lipídica están ancladas proteínas de origen humano como moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y de clase II, y las glicoproteínas del virus gp120 y gp41, situadas en el exterior e inmersa en la membrana respectivamente (8,9). Estas proteínas de la envoltura juegan un papel decisivo en la infección de sus células diana, los linfocitos T CD4+, ya que están implicadas en la entrada del virus a estas células. Debajo de la cubierta del virus se encuentra una capa de proteína matricial, p17, que rodea al núcleo o cápside, cuya forma se asemeja a un cono truncado y hueco. La cápside está compuesta por una proteína, denominada p24, que protege el material genético del virus, dos moléculas de ARN de una longitud de 9.200 nucleótidos, las enzimas transcriptasa inversa, integrasa, proteasa y endonucleasa, y las proteínas p6 y p7.(Fig. 1.1).

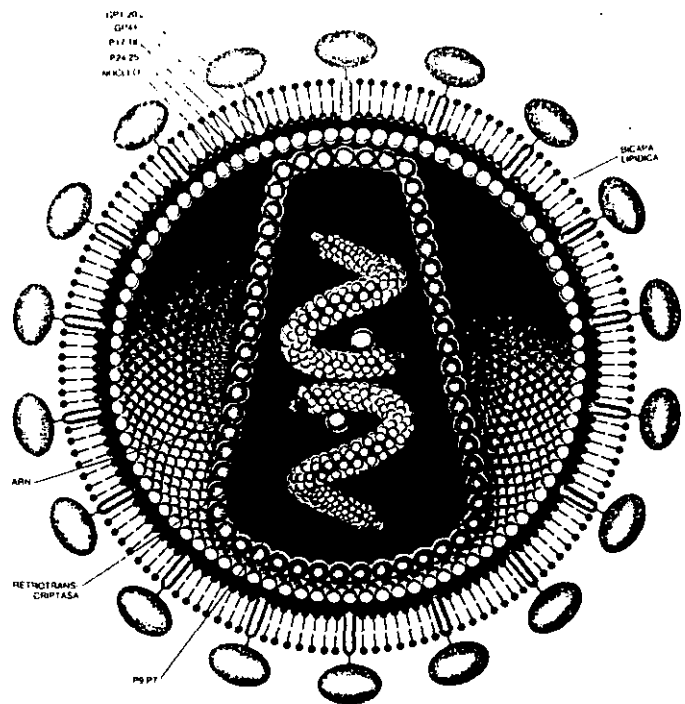


Fig.1.1.- Estructura del HIV.

### 1.1.2.- Organización genómica.

A pesar de que la estructura del genoma del HIV-1 es la típica que aparece en todos los retrovirus, en cuanto a la presencia de dos elementos de repetición largos en cada extremo y tres genes estructurales, su organización genómica parece ser única entre este grupo. Esta peculiaridad se debe a que, además de los genes característicos estructurales *gag*, *pol* y *env*, los cuales codifican las proteínas del core o nucleocápside, la transcriptasa inversa y las proteínas de la envoltura respectivamente, presenta otros genes específicos (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) (HIV-1) o (*vpx*) (HIV-2), implicados en distintas funciones. (Fig. 1.2).

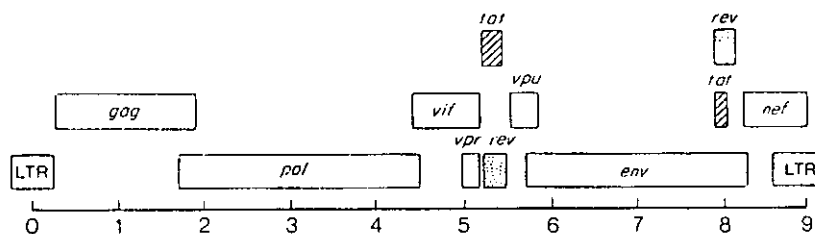


Fig. 1.2.- Genoma del HIV. La escala numérica inferior representa el tamaño de los genes en Kilobases.

Al inducir mutaciones dirigidas o deleciones en el ARN del virus, se ha demostrado que los genes *tat*, *rev* y *nef* juegan un papel importante en la regulación de la expresión viral. Los genes *tat* y *rev*, son genes transactivadores que codifican proteínas esenciales para la regulación transcripcional y post-transcripcional (10).

El gen *nef* codifica a una proteína asociada a la membrana de 27 Kd que funciona como un regulador negativo de la transcripción (11). En el ensamblaje de las proteínas de los nuevos viriones está implicada una proteína de 23 Kd codificada por el gen *vif*, cuya mutación no afecta a la replicación viral sino que altera la infectividad de los nuevos virus (12).

El gen *vpr* codifica una proteína reconocida por anticuerpos del suero de personas infectadas, pero su función es aún desconocida (13). Respecto al gen *vpu* se ha comprobado codifica una proteína aislada en muchas variantes del HIV-1, pero no del HIV-2 ni del SIV, que parece estar implicada en el proceso de salida de viriones de las células infectadas al exterior (14).

### 1.1.3.- Interacción con la molécula CD4.

El virus interactúa con su célula diana mediante la unión de la glicoproteína de la envoltura viral, gp120, con la molécula CD4, expresada en la superficie de los linfocitos T cooperadores (15). Esta molécula está presente, en concentraciones altas, en la superficie de esta subpoblación linfocitaria, pero también aparece en una menor proporción en monocitos, macrófagos y células dendríticas (16) y por experimentos *in vitro*, se ha demostrado que el HIV también puede infectar estas células. Ante la capacidad del virus de infectar macrófagos se ha postulado la hipótesis de que estas células podrían actuar como reservorios del virus, ya que éste no presenta un efecto citopático sobre ellas, y su infección explicaría la presencia del virus en otras regiones del organismo, entre ellas el cerebro, donde podría ser el responsable de algunas de las patologías neurológicas que aparecen en algunos pacientes seropositivos (17).

Al utilizar una forma soluble de la molécula CD4 se determinó que la afinidad que muestran tanto el HIV-1 como el HIV-2, por su receptor, es muy elevada, del orden de  $10^{-9}M$  (18) y con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la molécula de CD4 se demostró que la unión entre el virus y la célula diana se producía por la interacción de la proteína gp120 con una región de la molécula CD4, V1, localizada en el dominio terminal (19).

Estudios más específicos han demostrado que la interacción parece localizada entre los residuos 413 y 456 de la proteína gp120. Este fragmento incluye tres regiones discontinuas que se situarían en una zona muy próxima en el espacio debido al plegamiento de la proteína. De este modo, se establecen múltiples interacciones con ciertas regiones de la molécula CD4, localizadas entre los residuos 37-53, en la zona variable V1, y otra posible región en V2 (20).(Fig. 1.3).

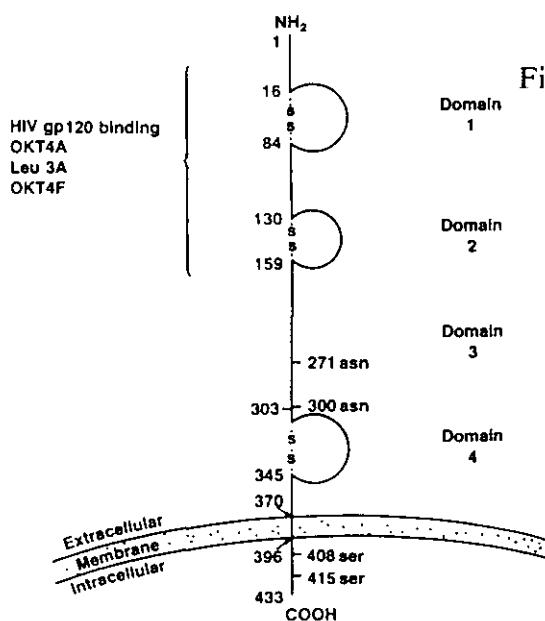


Fig. 1.3.-

Esquema de la estructura de la molécula CD4, una glicoproteína de 433 aminoácidos con cuatro dominios extracelulares. La región entre los aminoácidos 16 y 159, comprende los principales sitios de unión con la proteína gp120 del HIV y los Anticuerpos monoclonales OKT4a, Leu3a y OKT4f.

Respecto a la zona de interacción con CD4 en la proteína gp120, se ha demostrado que la región variable V3 de esta proteína es crítica para que se produzca la infección. Mutaciones en esta región modifican el tropismo celular del virus, generándose viriones con una reducida afinidad, y alteran también la capacidad de formación de sincitios in vitro (21, 22).

Aunque anteriormente no había evidencias de una alteración en la región V3 de gp120 durante la entrada del virus, algunas observaciones sugirieron que esta región podía interactuar con una molécula accesoria de la superficie celular con actividad proteasa. Como modelo de estas moléculas se propuso una proteína de la superficie celular similar a la tripsina, denominada TL2 (23).

A pesar de la variabilidad del virus, en la región V3 de gp120 de diferentes cepas de HIV y SIV se han detectado repeticiones de dipeptidos altamente conservadas, RP, KP y GP (24). Estas regiones están implicadas en la especificidad que presenta la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), denominada CD26 (25).

De hecho, recientemente se ha demostrado, mediante ensayos experimentales, que CD26 actúa como cofactor de CD4 debido a su interacción con la región V3 de la proteína gp120. En estos ensayos se utilizó un anticuerpo monoclonal (AcM 1F7), dirigido frente a CD26, que inhibió, en un 89%, la entrada del HIV a las células diana (26).

También se ha observado que proteínas de la superficie celular pueden unirse a gp41 y como consecuencia de este reconocimiento se ha sugerido que su unión condicionaría la entrada del virus, aunque su papel en la infección aún no está claro (27).

#### 1.1.4.- Ciclo biológico.

El ciclo biológico comienza cuando una partícula viral se une a la superficie externa de su célula diana. La unión se produce por la interacción de la molécula CD4 de un linfocito T con la proteína gp120 del virus (28). *In vitro* se ha demostrado que después del reconocimiento de la célula diana, el HIV no penetra en el interior de la célula por un proceso de endocitosis mediado por su receptor. Este mecanismo es utilizado por otros retrovirus que reconocen moléculas específicas de la superficie celular. En el caso del HIV, la entrada se produce por un proceso independiente de la acidificación de los endosomas (29). Además, mutaciones provocadas en la región interna de CD4, supuestamente responsable de la internalización del virus, no inhiben la infección (30).

Estos argumentos fueron decisivos para sugerir un mecanismo de entrada del virus de la Inmunodeficiencia humana diferente en el que, después de la interacción gp120-CD4, se produce una fusión de la membrana del virus y de la célula. En este proceso se cree también que la proteína gp41 del virus juega un papel esencial y se ha sugerido un modelo en el que una vez que se ha producido la interacción de gp120 con CD4 se produce un cambio conformacional en la proteína gp120 que permite que el extremo hidrofóbico aminoterminal de la proteína gp41 se inserte en la membrana celular, iniciando el proceso de fusión (31).

Su ciclo biológico recuerda al ciclo característico de todos los retrovirus porque se pueden distinguir las mismas etapas en su ciclo biológico. La primera mitad del ciclo comprende cuatro fases: unión al receptor, entrada, transcripción inversa e integración, y la segunda mitad, cinco: transcripción, procesamiento del ARNm, síntesis de proteínas, ensamblaje de las partículas víricas y proceso de gemación (Fig. 1.4).

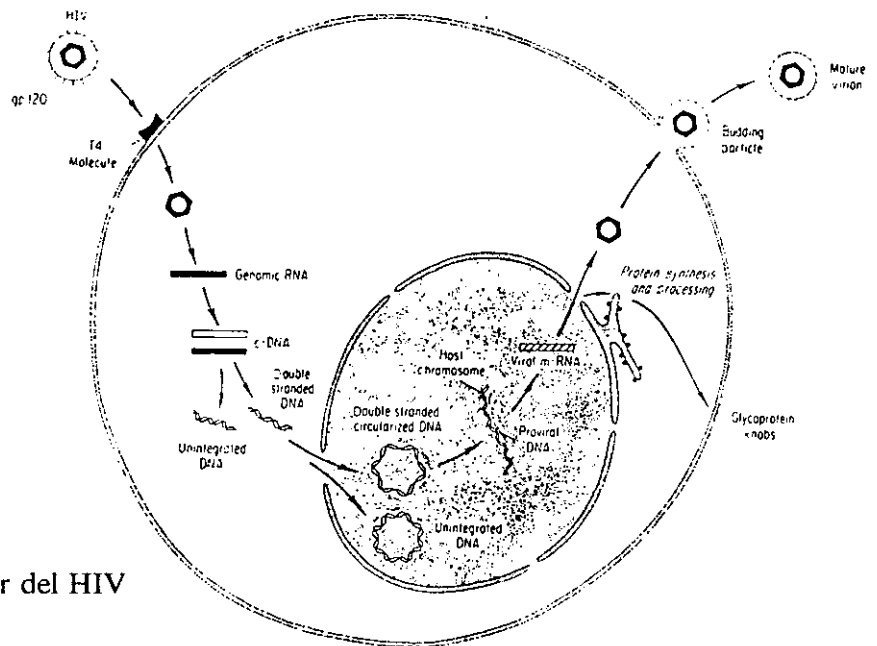


Fig. 1.4.- Ciclo celular del HIV

Cuando se produce la fusión del virus con la membrana celular, la nucleocápside viral se introduce en el interior de la célula y en el citoplasma tiene lugar la liberación del ARN y su transcripción a una doble cadena de ADN. La transcripción la lleva a cabo la transcriptasa inversa del virus, complejo enzimático, característico solo de los retrovirus, formado por tres enzimas, una polimerasa, una ribonucleasa y una integrasa.

Aunque la mayoría de las moléculas de ADN transcritas permanecen en el citoplasma de la célula huésped, algunas de estas moléculas son transportadas hacia el núcleo, donde se circularizan e integran en el genoma celular. En este proceso interviene la integrasa del virus.

A partir de ese momento, el ADN vírico integrado, denominado provirus, se duplicará conjuntamente con los genes de la célula cada vez que ésta se divida. Esto significa que de alguna forma, la eliminación del virus del organismo supone la destrucción de las células infectadas y que una persona infectada, tarde o temprano, puede sufrir las complicaciones clínicas asociadas al SIDA, debido a la capacidad de este virus de permanecer en un estado latente durante un largo periodo de tiempo.

Como consecuencia de la capacidad del virus para permanecer en un estado latente, la producción de nuevas partículas virales ocurre esporádicamente y solo en algunas células infectadas. *In vitro* se ha demostrado que la replicación del ADN-proviral tiene lugar después de la activación de la célula, ya que la estimulación de células infectadas con mitógenos, antígenos o por una exposición alogénica, conduce a la generación de nuevos viriones capaces de producir un efecto citopático en las células de estos cultivos (32). En relación con estos resultados experimentales, se ha observado que una infección productiva en linfocitos mantenidos en cultivos está favorecida al estimular su proliferación con Interleuquina 2 (IL-2) y Fitohemaglutinina (PHA) (33).

La transcripción del ADN-proviral comienza cuando ciertos nucleótidos de las secuencias LTR son activados por la unión de enzimas nucleares, como NF-kB, producidas durante la activación de las células inmunitarias para fomentar su propia transcripción (34). Son proteínas reguladoras presentes en prácticamente todas las células humanas que intensifican la actividad transcripcional de muchos genes. Otros mecanismos, observados *in vitro*, que inducen una replicación viral, están relacionados con la infección por otros virus, como Adenovirus, Herpes simple (35), o el virus de la Hepatitis B. Este último, estimula la infección en cultivos mediante la unión de la proteína X, un trans-activador transcripcional, a las regiones LTR del virus (36).

Algunas de las moléculas de ARN transcritas formarán el material genético de una nueva generación de virus y otras actuarán de mensajeros, traducándose en las distintas proteínas y enzimas específicas del virus. El ensamblaje de las nuevas partículas víricas tiene lugar a nivel de la membrana celular y en la maduración de los nuevos viriones está directamente implicado el proceso de gemación, en el cual, durante la salida de los viriones, parte de la membrana celular se utiliza para formar la envoltura de los nuevos virus.

## 1.2.- CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA INFECCION POR HIV.

La infección inicial en un individuo puede ser clínicamente silente o presentar un cuadro transitorio de fiebre, linfadenopatía, faringitis o manifestaciones neurológicas (37). Este cuadro generalmente remite al mismo tiempo que se detecta una respuesta de anticuerpos en el suero del paciente.

Posteriormente la infección puede entrar en una fase latente o persistir con una baja replicación viral durante años, antes de que el Sistema Inmune esté lo suficientemente dañado para que aparezca una sintomatología.

Entre las alteraciones neurológicas más frecuentes observadas en los pacientes infectados por HIV destaca la demencia inducida por el propio virus. En estos pacientes se ha observado una marcada disfunción cognitiva y una memoria deteriorada. Mediante cultivos celulares se ha sugerido que el virus puede replicarse en el cerebro, particularmente en células microgliales. Este tropismo que muestra podría explicar este cuadro neurológico (38). Aunque también existen evidencias de que mecanismos indirectos, como la producción de factores neurotóxicos, podrían estar implicados en algunas de las alteraciones neurológicas observadas en la infección (39). Una de las características clínicas más llamativas en los pacientes infectados es la aparición de infecciones oportunistas y tumores después de que su Sistema Inmune ha sido severamente comprometido (40,41). Estas manifestaciones clínicas son las que definen un Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida en estos pacientes.

Una de las infecciones oportunistas más frecuentes es una neumonía producida por *Pneumocystis carinii*, cuya frecuencia en pacientes con SIDA es superior a la que se detecta en pacientes con otro tipo de inmunodeficiencia celular T. Aunque el tratamiento con antibióticos puede disminuir la mortalidad debida a esta infección en estos pacientes (42), existen otras infecciones problemáticas, producidas por *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans* o *Cytomegalovirus*, responsables, en algunas ocasiones, de alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC), que requieren una terapia más compleja.

Algunos agentes antivirales utilizados para el tratamiento de algunas infecciones, como el DHPG (1,3-dihidro-2-propoximetilguanina), suministrado a pacientes infectados por *Cytomegalovirus*, pueden causar una gran citotoxicidad en la médula ósea y de esta manera pueden contribuir al agravamiento de su estado de inmunodeficiencia (43).

Otras infecciones frecuentes son las producidas por *Cryptosporidium* o *Mycobacterium avium-intracelulare*, asociadas a un cuadro de diarrea severa y una enfermedad pulmonar respectivamente.

Aunque muchas de las infecciones que padecen estos pacientes pueden ser tratadas, a medida que empeora su estado de inmunodeficiencia, aparecen otras infecciones. Estas frecuentemente causan su muerte (44), incluso aunque algunas de las infecciones estén producidas por patógenos de baja virulencia.

Las infecciones que padecen son el resultado de la interacción entre las alteraciones inmunológicas del paciente infectado y el ambiente microbiano en el que vive. De este modo, la frecuencia relativa de algunas infecciones en los pacientes con SIDA varía en las distintas partes del mundo. Por ejemplo, en Africa, la neumonía producida por *Pneumocystis carinii* es muy poco frecuente, mientras que enfermedades gastrointestinales e infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y *Cryptococcus neoformans* son más frecuentes (45). Otro ejemplo sería la infección por *Isospora belli* en Haití.

Además de padecer infecciones oportunistas, producidas por virus, bacterias o parásitos, algunos pacientes infectados desarrollan tumores como el Sarcoma de Kaposi, linfomas B de alto grado o carcinomas de células escamosas (46). El Sarcoma de Kaposi es una alteración proliferativa multicéntrica del endotelio linfático, que aparece con mayor frecuencia en los pacientes homosexuales con SIDA. Esta diferencia con respecto a otros pacientes con SIDA, pertenecientes a otros grupos de riesgo, es un rasgo epidemiológico que aún permanece inexplicable. Se ha relacionado con varios cofactores, especulándose que podría estar relacionado con la infección por CMV, el uso de nitritos, drogas, factores genéticos, e incluso con otras enfermedades de transmisión sexual.

Se ha sugerido que las lesiones del Sarcoma de Kaposi podrían ser causadas en parte por factores solubles producidos por células endoteliales. Estas células estarían a su vez sometidas a una estimulación por factores de crecimiento sintetizados por células T infectadas por retrovirus (47).

También son frecuentes los Linfomas B de alto grado, la mayoría extranodulares y de localización en el Sistema Nervioso Central (48).

Los pacientes infectados pueden desarrollar también una variada serie de alteraciones hematológicas, como trombocitopenia (49), u otras citopenias, algunas de las cuales podrían ser el resultado, al menos en parte, de la producción de anticuerpos citotóxicos (50).

Respecto a la infección por HIV en niños, ésta difiere de la infección que aparece en adultos y generalmente se caracteriza por un grave defecto humoral, responsable de una mayor incidencia de infecciones bacterianas en los niños infectados (51).

La última revisión del Sistema de Clasificación de la Infección por HIV, realizada a finales de Diciembre, en 1993, por los Centros del Control de Enfermedades Americanos (CDC), incluye tres categorías clínicas en la infección (52):

\* Categoría A: Infección asintomática, primoinfección o PGL.

Incluye uno o varios de los criterios enumerados a continuación en un adulto o adolescente ( $\geq 13$  años) infectado por HIV:

- Infección HIV asintomática.
- Linfadenopatía persistente generalizada (PGL).
- Primoinfección sintomática.

\* Categoría B: Infección sintomática, excluidas las categorías A o C.

Manifestaciones clínicas en un adulto o adolescente infectado por HIV, no incluídas en la categoría C, y que responden al menos a una de las condiciones siguientes:

- Estar ligadas al HIV o ser indicativas de un déficit inmunitario.
- Tener una evolución clínica o requerir un tratamiento que se vea complicado por la infección por HIV.

Algunas de las enfermedades que forman parte de esta categoría se citan a continuación:

- Angiomatosis bacilar.
- Candidiasis orofaríngea.
- Candidiasis vulvovaginal persistente.
- Displasia del cuello uterino, carcinoma cervical in situ.
- Síntomas generales como fiebre (38,5° C) o diarrea severa.
- Leucoplasia vellosa de la lengua.
- Herpes zóster recidivante.
- Púrpura trombocitopénica idiopática.
- Neuropatía periférica.

\* Categoría C: Enfermedades indicativas de SIDA.

Cuando una persona infectada presenta alguna de las enfermedades incluidas en la siguiente lista, queda clasificada definitivamente en la categoría C:

- Infecciones bacterianas múltiples en niños > 13 años.
- Candidiasis de los brónquios, tráquea o pulmones.
- Candidiasis esofágica.
- Cáncer invasivo del cuello del útero.
- Coccidioidomicosis diseminada o extrapulmonar.
- Criptococosis extrapulmonar.
- Criptosporidiosis intestinal con diarrea.
- Enfermedad por citomegalovirus, no del hígado, bazo o ganglios.
- *Retinitis por citomegalovirus (con pérdida de visión).*
- Encefalopatía relacionada con el HIV.
- Herpes simple: úlcera crónica, bronquitis, neumonitis.
- *Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar.*
- Isosporidiasis intestinal con diarrea.
- Sarcoma de Kaposi.
- Neumonía intersticial linfóide en niños.
- Linfoma de Burkitt.
- Linfoma inmunoblástico.
- Linfoma primario del cerebro.
- Infección diseminada o extrapulmonar por *Mycobacterium avium*.
- Infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*.

- Infección extrapulmonar por *Mycobacterium tuberculosis*.
- Neumonía por *Pneumocystis carinii*.
- Neumonía recurrente.
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
- Septicemia recurrente por Salmonella (no tifoidea).
- Toxoplasmosis cerebral.
- Síndrome consuntivo debido al HIV.

Cada una de las tres categorías ha sido subdividida en otras tres, A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2 y C3, según el número de linfocitos CD4+ circulantes:

- 1. ( $\geq 500$ ) células /  $\mu\text{l}$
- 2. (200-499) " / "
- 3. ( $\leq 200$ ) " / "

Esta última revisión ha incluido como casos de SIDA todos aquellos sujetos infectados que presenten menos de 200 linfocitos T CD4+ /  $\mu\text{l}$ . Este último criterio no ha sido aún aceptado por los países europeos, en los que para diagnosticar un caso de SIDA es necesario que el paciente presente algún cuadro clínico asociado a este síndrome de inmunodeficiencia (53).

### 1.3.- ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN EL SIDA.

#### 1.3.1.- Disminución de Linfocitos T CD4+ en la infección por HIV.

Actualmente no hay ninguna duda acerca de que el rasgo más característico del SIDA es la reducción del número de linfocitos T CD4+ circulantes. Sin embargo, aún no existe un acuerdo respecto a cómo el HIV conduce a la destrucción de estas células, críticas para el funcionamiento del Sistema Inmune.

La explicación más simple para comprender la pérdida de estos linfocitos sería el propio efecto citopático del virus, en el que se destruyen las células infectadas por la generación y liberación de las nuevas partículas víricas (54). Además, también se ha demostrado que la acumulación de ADN viral en el citoplasma de una célula infectada conduce a la muerte celular (55). Otro mecanismo implicado en la eliminación de los linfocitos T4, observado *in vitro*, sería la formación de sincitios, células gigantes multinucleadas, formadas por la unión de células infectadas, con antígenos virales en su superficie, y no infectadas, mediante la interacción de la proteína gp120 viral y la molécula CD4 (56).

Por otro lado, la respuesta inmune celular, mediada por Linfocitos T citotóxicos, CTLs, como mecanismo del organismo para controlar la infección, también conduciría a una muerte directa de los linfocitos T CD4+ infectados. De hecho, *in vitro*, se ha observado la lisis de células que presentan proteínas virales en su superficie por CTLs específicos (57). Por lo tanto, estos linfocitos citotóxicos, además de controlar la infección viral, es posible que jueguen un papel patogénico, al contribuir en la destrucción de estas células claves para el funcionamiento del Sistema Inmune.

Una de las paradojas más llamativas de la infección, es que solamente se puede detectar, por técnicas de hibridación *in situ*, una pequeña fracción de células infectadas. En etapas precoces de la infección solo se observa que uno de cada 10.000 linfocitos T CD4+ está infectado y que, incluso, en pacientes cuya infección se encuentra en etapas muy avanzadas, con linfocitos T CD4+ en su circulación sanguínea muy bajos, la proporción de sus linfocitos T mantenidos en cultivo que está infectada es muy pequeña. En estos cultivos, uno de cada 40 linfocitos aproximadamente es capaz de producir nuevos viriones (58).

Estas observaciones han hecho pensar a muchos investigadores que estos mecanismos citopáticos directos, descritos anteriormente, no son suficientes para explicar la disminución tan drástica de linfocitos T CD4+ en el SIDA y, basándose en datos experimentales, han propuesto otros mecanismos indirectos que podrían estar implicados en la disminución de esta subpoblación celular.

Uno de estos mecanismos implica la destrucción de linfocitos T CD4+ que presentan la proteína gp120 unida al receptor CD4. Estos linfocitos pueden unir, procesar y presentar gp120 soluble asociada a antígenos DR, y por ello podrían ser potenciales células dianas para linfocitos citotóxicos específicos de gp120, restringidos por moléculas del MHC de clase II. Esta hipótesis está basada en la observación *in vitro* de clones T citotóxicos capaces de lisar células T CD4+ que pasivamente han adsorbido gp120 en su superficie (59). Teniendo en cuenta estos experimentos y que *in vivo* se ha detectado la proteína gp120 libre en circulación, se ha sugerido que esta citotoxicidad específica de gp120 puede ser un mecanismo sustancial implicado en la disminución de los linfocitos T4.

En este sentido, tampoco se podría excluir que anticuerpos anti-HIV puedan mediar la lisis por Complemento o por células citotóxicas, de células CD4+ no infectadas que presenten gp120 de una forma pasiva en su superficie.

De forma similar, también se ha descrito que anticuerpos que reconocen el sitio de unión a CD4 en la proteína gp120 podrían provocar la generación de anticuerpos anti-idiotipo que presentasen la imagen interna de ese epítipo. Estos anticuerpos serían entonces capaces de imitar la proteína gp120 e interactuar con la molécula CD4 expresada en linfocitos T, induciendo una entrada de  $Ca^{+2}$  y una alteración en la función de estas células (60).

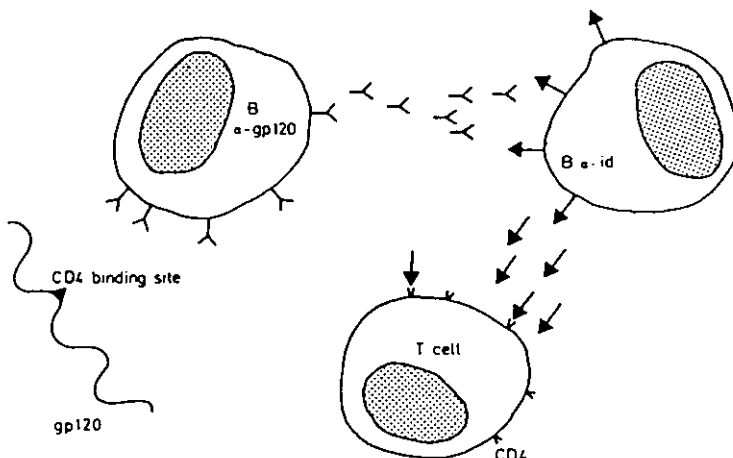


Figura 1.5.- Generación de una reactividad anti-CD4 en sujetos seropositivos. Anticuerpos dirigidos frente al idiotipo de anticuerpos específicos que reconocen el sitio de unión a CD4 en la proteína gp120 podrían interactuar con la molécula CD4 nativa, expresada en la superficie de células T.

Determinaciones experimentales actuales han sugerido la apoptosis como otro potencial mecanismo para explicar la disminución de linfocitos T CD4+. La muerte programada de la célula es un mecanismo suicida fisiológico, esencial en muchos procesos, como la maduración de las células del Sistema Inmune. Este proceso aparece concretamente en las células T intratímicas y es esencial en la destrucción de clones celulares autoreactivos (61).

En la activación *in vitro* de células T, de un individuo infectado asintomático, inducida por anticuerpos frente a su receptor, TCR, se pudo observar este fenómeno de apoptosis en una fracción de células T CD4+ (62). También se ha demostrado esta muerte celular inducida después de una activación con complejos de moléculas del MHC de clase II y superantígenos bacterianos (63). La apoptosis de linfocitos T4 también se ha observado en cultivos estimulados de linfocitos de sangre periférica que presentan en su superficie gp120 unida a CD4 y anticuerpos específicos de gp120 (64).

Ante la demostración de que las proteínas del HIV, gp120 y gp41, tienen características similares a los antígenos de histocompatibilidad, ya que comparten algunas regiones homólogas, se ha sugerido que un mecanismo autoinmune podría estar implicado en la disminución de los linfocitos T CD4+. Como consecuencia de esta homología podrían generarse entonces anticuerpos dirigidos frente a estas proteínas que fuesen capaces de atacar y alterar a los antígenos de histocompatibilidad, deteriorando la función inmunitaria (65).

A parte de estos mecanismos indirectos, existen otros mecanismos directos, observados recientemente, en los que el virus estaría directamente implicado en el daño celular. Uno de ellos está basado en la observación de que el HIV parece afectar preferentemente a las células T de memoria, implicadas en la respuesta frente a una segunda exposición antigénica (66).

También se ha determinado que existe una alteración en la respuesta celular en la que podría estar implicado directamente el virus, ya que en la respuesta de células T durante el estado asintomático de la infección aparece una deplección o anergia de la población Th1, relacionada con la inmunidad celular, con mayor frecuencia que de la población Th2, asociada a una inmunidad humoral. Esta alteración ha sido observada también en algunas infecciones producidas por parásitos (67). Este fenómeno podría ayudar a explicar la activación persistente de las células B durante la infección.

Por último, también se ha sugerido que precursores de los linfocitos T en el timo podrían ser infectados, y que su infección produciría una alteración en la proliferación y diferenciación de la población de células T CD4+ maduras (68).

Todos estos mecanismos estarían implicados en la disminución de los linfocitos T CD4+, cuya alteración afectaría a toda la homeostasis de las poblaciones celulares.

### **1.3.2.- Alteración de los linfocitos B en la infección.**

Aunque inicialmente todos los estudios sobre la inmunopatogénesis de la infección por HIV estaban dirigidos hacia el estudio del estado de inmunodeficiencia celular que se producía en los pacientes infectados, al poco tiempo de conocerse este Síndrome de Inmunodeficiencia, se observó también que estos pacientes presentaban una alteración en su Sistema Inmune humoral.

Algunas de las patologías o procesos observados en estos pacientes, asociados a una respuesta humoral alterada, son hipergammaglobulinemia, presencia de células B activadas circulantes, Inmunocomplejos circulantes (69), autoanticuerpos y paraproteínas (70, 71).

A pesar de que existe una hiperactivación de las células B, mediante cultivos celulares se ha comprobado que los pacientes con SIDA presentan una incapacidad muy marcada en generar una respuesta de anticuerpos frente a nuevos antígenos (48). Esta incapacidad de reacción es el principal problema que aparece en niños con SIDA, quienes todavía no han desarrollado anticuerpos frente a la mayor parte de los patógenos ambientales, y como consecuencia de esta incapacidad de respuesta, en ellos aparecen frecuentemente infecciones bacterianas (72). Se han propuesto algunos mecanismos, basados en estudios experimentales, que podrían contribuir a la hiperactividad de las células B en los individuos infectados por HIV. Por ejemplo, la presencia del virus, o glicoproteínas virales purificadas en cultivos, puede inducir una estimulación policlonal de las células B (73). Otro argumento que apoya esta hipótesis es la detección en la proteína gp120 de una secuencia homóloga a la neuroleuquina, factor que estimula las células B (74).

Entre los factores propuestos para explicar la estimulación de células B en el SIDA se incluye también la infección de un gran número de células B por el virus de Epstein-Barr, EBV (75). Las células B transformadas por este virus pueden ser también infectadas por HIV en algunas condiciones experimentales y permitir una replicación activa del virus sin ser destruidas, de modo que podrían actuar de reservorio para el HIV en el organismo (76).

Por otro lado, los pacientes con SIDA desarrollan con frecuencia linfomas B de alto grado, como el Linfoma de Burkitt. Estos linfomas pueden desencadenarse por una pérdida del control de las células T sobre las células B, una estimulación antigénica crónica o un aumento de células B infectadas por EBV. En relación a este último hallazgo, se ha encontrado en algunos linfomas desarrollados en pacientes con SIDA, antígenos del EBV (77).

### **1.3.3.- Alteración de Monocitos en la infección.**

A pesar de que los linfocitos T CD4+ son las principales células diana del HIV, otras células como células B transformadas por EBV, monocitos, células de la médula ósea, células endoteliales, células gliales y células epiteliales de la vagina pueden ser también infectadas (78, 79, 80, 81). El HIV puede permanecer latente dentro de los monocitos y en este sentido, estas células pueden actuar como reservorios, permitiendo la distribución del virus a otros lugares del organismo, como el Sistema Nervioso Central, evitando que se lleve a cabo una respuesta inmune efectiva (82). La vía de entrada en estas células puede estar mediada por el receptor CD4 (83), pero se ha sugerido una segunda vía de entrada a través de la unión de complejos anticuerpo-virus a los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas, FcR, expresados en los monocitos (84).

Aunque se han observado alteraciones en la función de los monocitos, como una quimiotaxis defectiva o una disminución en la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ), en los pacientes con SIDA (85), estas alteraciones no pueden ser explicadas totalmente por un efecto directo del virus ya que solo se observa una pequeña fracción de los monocitos infectada. Esta alteración podría ser más bien, una consecuencia de una interacción defectuosa con las células T o una deficiencia en factores implicados en la estimulación de monocitos.

#### **1.3.4.- Alteración de las células NK en el SIDA.**

Además de las alteraciones descritas anteriormente respecto a la función de las células T, B y Monocitos, se han detectado otras alteraciones, en la respuesta inmune mediada por células, en pacientes con SIDA. Por ejemplo, la función de las células Natural Killer está disminuida en estos pacientes (86). In vitro se ha demostrado que esta actividad puede elevarse al añadir al medio de cultivo Interleuquina 2 (IL-2), lo cual sugiere que estos defectos podrían ser secundarios a la alteración de las células T CD4+.

### **1.4.- CONTROL INMUNOLOGICO DEL HIV.**

#### **1.4.1.- Respuesta humoral.**

Al estudiar la respuesta humoral en los pacientes infectados por HIV frente a las distintas proteínas virales se han observado diferencias cuantitativas que han sido estudiadas para determinar su asociación con la progresión de la infección hacia un estado de SIDA. Particularmente se ha demostrado que la respuesta de anticuerpos frente a las proteínas de la envoltura, gp120 y gp41, se mantiene durante todo el curso de la infección (87), mientras que la especificidad frente a la proteína de la nucleocápside, p24, disminuye en los pacientes que se encuentran en un estadio terminal (88).

Un análisis de la frecuencia de alteraciones de varios parámetros inmunológicos en sangre periférica de un grupo de 200 pacientes infectados, remitidos al laboratorio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, reveló que la disminución de linfocitos T CD4+, el aumento de IgA, la ausencia de anticuerpos anti-gag y la presencia de antígenos virales (p24), aparecían con una frecuencia significativamente mayor en los sujetos clínicamente afectados que en los asintomáticos. Esta valoración conjunta arrojó un índice de riesgo relativo de 25,5 (89). Sin embargo, así como los anticuerpos anti-env permanecen estables en la infección, no todos los pacientes con alto riesgo de desarrollar el SIDA carecen de anticuerpos anti-p24, y no todos los sujetos asintomáticos muestran niveles elevados de estos anticuerpos (90).

No existe todavía ninguna explicación ante la diferente respuesta humoral frente a las distintas proteínas virales que se observa a lo largo de la infección, aunque se ha sugerido que la respuesta frente a las proteínas gp120 y gp41 sea una respuesta B Timo-independiente y que en la respuesta frente a las proteínas p24 y p27 estén implicados los linfocitos T cooperadores.

También se ha publicado, al estudiar la asociación entre el estado clínico del paciente, y la presencia y evolución de anticuerpos frente a otras proteínas del virus, que la pérdida de anticuerpos frente a la proteína p17 está asociada a la progresión de la enfermedad (91) y que la aparición de anticuerpos dirigidos frente a proteínas reguladoras, como p27, codificada por el gen *nef*, tiene lugar al principio de la seroconversión (92).

Durante la infección, en la respuesta humoral, se genera una gran variedad de anticuerpos frente a las proteínas de la envoltura del virus, sin embargo, solo una fracción de esos anticuerpos son capaces de neutralizar la infectividad del virus (93). El epítipo inmunodominante en la proteína gp120 parece estar localizado en una región conservada en el extremo COOH terminal (94). Por el contrario, el sitio de unión a CD4 en la proteína gp120 está en un hueco que parece ser un sitio antigénico inaccesible para la producción de anticuerpos. También se ha propuesto que la formación de anticuerpos neutralizantes podría estar inhibida por un proceso de autotolerancia, ya que existe una similitud entre las proteínas de la envoltura del HIV y estructuras del MHC que se unen a CD4 (95).

#### **1.4.2.- Respuesta celular.**

Al contrario de la gran diversidad de estudios que se han realizado sobre la respuesta de anticuerpos en los pacientes infectados por HIV, la documentación de respuestas específicas de células T ha sido, de alguna manera, más difícil y más tardía. No obstante, si se ha observado, desde que empezaron a publicarse los primeros casos de SIDA, que durante el curso de la infección aparece una intensa respuesta de células T citotóxicas y que ésta disminuye en los pacientes con SIDA (96).

También se ha observado que las células T CD8+ de pacientes con SIDA mantienen una función citolítica normal a pesar de haber perdido su respuesta citotóxica específica frente al HIV (97).

Durante estos últimos años se han identificado respuestas específicas de células T citotóxicas, CTLs, frente a proteínas estructurales del virus que forman parte de la envoltura o de la nucleocápside (98,99), e incluso frente a la transcriptasa inversa (100).

También se han demostrado otros mecanismos citotóxicos mediados por células T en los que no existe una restricción por moléculas de clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), en los que estarían implicados factores solubles (101).

La respuesta celular juega un papel muy importante en el control de la infección. Sin embargo, al desarrollarse un estado de SIDA se produce una rápida caída de la función inmune asociada a un aumento de la replicación viral (102).

En los estadios más avanzados de la infección se produce un aumento de los niveles de antígeno p24 en el suero de los pacientes, cuyos niveles, al principio de la infección, son generalmente indetectables. Este aumento y la pérdida de anticuerpos anti-p24 en el suero, aunque éstos podrían estar formando parte de Inmunocomplejos (103-105), supone una intensa replicación viral. Esta podría deberse a la disminución del control inmunológico del virus, aunque también se ha propuesto que podría ser el resultado de la aparición de variantes virales más agresivas en el mismo individuo (106). (Fig. 1.6).

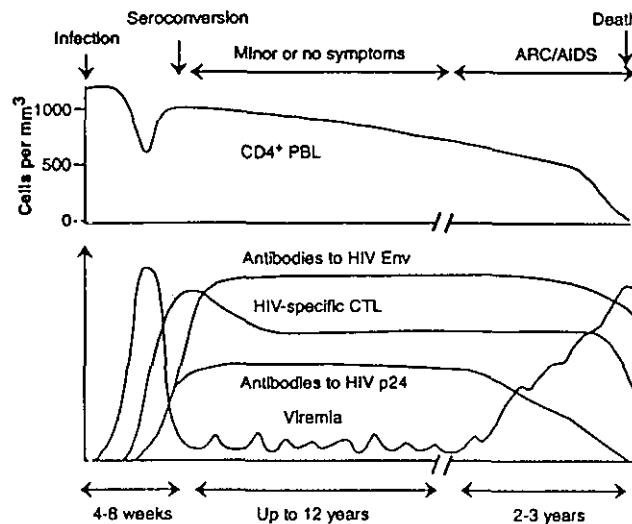


Fig. 1.6.- Esquema del curso de la infección en un paciente que desarrolla el SIDA en función de las alteraciones de su Sistema Inmunológico.

### 1.5.- IMPLICACION DE LOS ICC EN LA INFECCION.

Después de las primeras descripciones acerca de una gran alteración de las células B en sujetos infectados por HIV, se sugirió que los linfocitos B podrían estar implicados en la patogénesis del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (46), y actualmente, la posibilidad de que estas células participen en la alteración del Sistema Inmune durante la infección es cada día más relevante.

*In vitro* se ha demostrado la síntesis espontánea de Inmunoglobulinas por células B de sujetos seropositivos (48). Sin embargo, en esta actividad tan intensa de las células B, de naturaleza policlonal, la respuesta frente al HIV constituye el principal componente (69).

La respuesta específica frente al virus y el total de la síntesis de IgG muestran una correlación significativa, ya que del 20 al 50% de las Inmunoglobulinas producidas están dirigidas frente a antígenos virales (107).

Todos estos datos soportan la hipótesis de que una fuerte respuesta hacia antígenos del HIV, más que una activación policlonal indiscriminada, es el resultado de la hiperactividad que aparece en las células B de sujetos seropositivos.

Un reflejo de esta alteración de los linfocitos B en la infección es la presencia en el suero de muchos sujetos infectados de elevados niveles de Inmunocomplejos circulantes (ICC) (108).

Los Inmunocomplejos se forman *in vivo* cuando anticuerpos específicos se unen a determinados antígenos como consecuencia de una respuesta inmune. Estos complejos son normalmente eliminados de la circulación por células que presentan receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas, FcR, las cuales están distribuidas por todo nuestro Sistema linfoide.

Sin embargo en muchas enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas, los inmunocomplejos se acumulan y causan daños patológicos, como inflamación, inmunosupresión y trombocitopenia.

En la infección por HIV se ha descrito, que algunas veces los inmunocomplejos pueden contribuir al desarrollo de ciertas manifestaciones clínicas que aparecen en los pacientes infectados, como trombocitopenia púrpura autoinmune o glomerulonefritis (109, 110) y otras alteraciones como altralgias, mialgias o vasculitis (111).

A pesar de que se puede demostrar la presencia de inmunocomplejos circulantes en un porcentaje elevado de pacientes infectados por HIV (112), no todos los pacientes con niveles elevados de inmunocomplejos presentan una patología debida a su presencia. De esta forma, se ha sugerido que la infección por HIV, además de predisponer al paciente a padecer sucesivas enfermedades infecciosas, producidas por otros agentes infecciosos, así como el desarrollo de enfermedades neoplásicas, puede inducir la aparición de fenómenos autoinmunes (113).

Respecto a este último fenómeno se ha postulado que anticuerpos anti-HIV pueden dañar células no infectadas por reacciones cruzadas con constituyentes de la superficie celular.

Este fenómeno de mimicidad molecular podría actualmente constituir la base de la generación de un mecanismo autoinmune en pacientes seropositivos (114). A favor de esta hipótesis se han documentado determinantes no polimórficos de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de clase II que muestran cierta homología con proteínas virales, presencia de anticuerpos anti-DR en el suero de sujetos infectados y alguna homología de epítomos virales con moléculas de clase I, aunque anticuerpos dirigidos frente a estos antígenos no han sido aún descritos (115, 116, 117).

Estudios realizados acerca de la composición de los inmunocomplejos, han revelado que presentan isotipos específicos de Inmunoglobulinas y que la presencia de IgA en los inmunocomplejos está asociada con la progresión del estado clínico del paciente (118).

Algunos investigadores han demostrado la presencia de antígenos virales en inmunocomplejos y han observado, en distintos grupos de pacientes infectados por HIV, que la disminución de anticuerpos anti-p24 está asociada a la aparición y detección en el suero de antígeno p24. Estos autores han sugerido que la elevada producción de antígeno p24 en los estadios terminales de la infección, conduciría a la formación de complejos que reducirían la detección de anticuerpos frente a p24 en el suero de estos pacientes (119).

Sin embargo, otros investigadores han observado en pacientes tratados con AZT, en los que se ha inducido una supresión de la antigenemia, que ésta no va acompañada de un aumento de anticuerpos anti-p24, con lo cual, han sugerido que la disminución de anticuerpos frente a p24 podría deberse simplemente a una respuesta humoral alterada (120).

También se ha sugerido que la presencia de inmunocomplejos circulantes en el suero de pacientes infectados podría estar implicada en la disminución de receptores C3b, observada en eritrocitos de algunos pacientes (121).

Estas observaciones han dirigido a algunos investigadores a mostrar cierta inquietud respecto al daño inmunológico que podrían causar los inmunocomplejos circulantes durante la infección.

Ante la observación *in vitro* de que complejos de anticuerpo-virus podían inducir la infección de monocitos y macrófagos, mediante la entrada del virus por mediación del receptor para Inmunoglobulinas (122), algunos investigadores sostienen que los inmunocomplejos podrían incrementar la infectividad del HIV.

Todos los resultados experimentales descritos anteriormente han sido considerados para reflexionar sobre el papel de la respuesta celular B en la infección por HIV, bien por su implicación en el control de la expansión del virus, o bien por su papel patogénico al participar en el agravamiento de la infección (123).

## **2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

La progresión de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana hacia un estado de SIDA varía mucho en los pacientes infectados. Algunos pacientes desarrollan el síndrome completo en pocos meses mientras que otros permanecen asintomáticos durante un largo período de tiempo.

Los factores que influyen en la progresión del Síndrome de Inmunodeficiencia Humana adquirida no se conocen muy bien, aunque sí se han descrito varios factores inmunológicos que se asocian con un peor pronóstico del sujeto infectado, como la disminución del número de linfocitos T CD4+ en sangre periférica o la disminución de anticuerpos frente a la proteína viral p24, que indican un grado de infección bastante avanzado.

Actualmente se están estudiando diferentes parámetros inmunológicos cuya evolución permita distinguir entre los sujetos infectados, quienes van a desarrollar la enfermedad en un plazo más o menos breve, lo cual sería enormemente importante a la hora de aplicar actuales medidas terapéuticas, dado que éstas conllevan riesgos colaterales y suponen un elevado coste.

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estas consideraciones, los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

- 1.- *Estudio del significado patológico de los inmunocomplejos circulantes en la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana, dada la elevada prevalencia de niveles elevados en el suero de pacientes infectados.*
- 2.- *Estudio de una respuesta citotóxica frente a linfocitos T CD4+ de sujetos sanos mediada por células T CD8+ de pacientes infectados.*

## PLAN DE TRABAJO

1.- Para determinar el papel patogénico de los inmunocomplejos circulantes en la infección, así como su implicación en la progresión hacia un estado de SIDA, se realizaron los siguientes estudios:

- 1.1.- Determinación de niveles de inmunocomplejos en el suero de pacientes seropositivos por precipitación con Sulfato amónico 1,04 M.
- 1.2.- Análisis de la composición de los inmunocomplejos en función de su contenido en antígenos virales y de anticuerpos específicos frente a las distintas proteínas del virus mediante ensayos inmunoenzimáticos y Western Blot.
- 1.3.- Actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos. Esta actividad fue valorada mediante ensayos inmunoenzimáticos, en función de la capacidad de los inmunocomplejos circulantes de unirse a una molécula CD4 recombinante soluble o a esta molécula expresada en la superficie celular de una línea linfoblástica T humana CD4+.
- 1.4.- Potenciación de la infección. Para inferir si los inmunocomplejos pueden inducir un daño inmunológico *in vivo*, se estudió su capacidad de unión a la superficie de linfocitos T CD4+ por citometría de flujo y su capacidad de alterar la función de esta población celular, inhibiendo su proliferación en cultivos estimulados con Fitohemaglutinina.
- 1.5.- Capacidad infectiva de los inmunocomplejos. Esta valoración se realizó mediante ensayos *in vitro*, en cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con Fitohemaglutinina en presencia de inmunocomplejos, en los que se cuantificó la presencia de antígeno p24 en el sobrenadante de los cultivos y se analizó la presencia de ADN proviral en el genoma de las células por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.- La determinación de una respuesta en la infección mediada por células T sobre linfocitos T CD4+ no infectados, se valoró estudiando la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8+, aislados de sangre periférica de pacientes seropositivos, sobre células T CD4+ de sujetos normales, estimuladas con PHA y marcadas con Cr<sup>51</sup>.

### **3.- MATERIAL Y METODOS**

### 3.1.- MATERIAL.

Todas las muestras de Suero, Inmunocomplejos circulantes y linfocitos de sangre periférica se obtuvieron de pacientes infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

Estos pacientes fueron remitidos al Dpto. de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz para su control inmunológico, desde distintos servicios de la Fundación Jiménez Díaz, principalmente desde el Departamento de Infecciosas, en donde se realizó un reconocimiento clínico exhaustivo de estos pacientes.

Los pacientes fueron incluidos en las distintas categorías de la infección, A, B y C, definidas por los Centros de Control de Enfermedades de Atlanta. En la última revisión de 1993, el nuevo sistema de clasificación se añadieron tres condiciones clínicas más para el diagnóstico de SIDA: tuberculosis pulmonar, neumonía recurrente y cáncer cervical invasivo.

Además se ha ampliado el diagnóstico de SIDA a todas aquellas personas infectadas que presenten menos de 200 linfocitos CD4+ /  $\mu$ l en sangre (52).

Respecto a esta última revisión, merece la pena destacar que en países europeos se decidió que los pacientes seropositivos asintomáticos no podían ser diagnosticados en un estado de SIDA solamente por sus niveles de linfocitos T CD4+ (124).

Las muestras utilizadas como controles se obtuvieron de pacientes seronegativos que presentaban otras patologías o de sujetos sanos.

Los cultivos celulares se realizaron a partir de linfocitos de sangre periférica de sujetos sanos y de células de una línea linfoblástica T humana CD4+, denominada JM, cedida por el Dpto. de Inmunología del Hospital de La Princesa.

### **3.2.- METODOS**

#### **3.2.1. Análisis inmunológicos realizados para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes infectados.**

En este estudio se efectuaron las siguientes valoraciones:

##### **Serología:**

- Presencia de Anticuerpos específicos anti-HIV y Antígeno HIV (p24) en suero, por ensayos inmunoenzimáticos (Abbott recombinant HIV-1/HIV-2 3rd generation y Abbott HIV Ag-1).
- Detección de anticuerpos frente a proteínas específicas de la envoltura y la nucleocápside (Abbott, envacor HIV-1, EIA), utilizado como test de confirmación.

##### **Estudio inmunológico del paciente:**

- Niveles de linfocitos CD2+, CD4+, CD8+ y CD19+ en sangre periférica, por Citometría de flujo (Epics C, Coulter). Para su determinación se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para identificar estas subpoblaciones linfocitarias (Coulter).
- Pruebas cutáneas frente a antígenos del Tétanos, Difteria, Estreptococo (Grupo C9), Tuberculina, Glicerina, Cándida (*albicans*), Trichophyton, y Proteus (*mirabilis*). (División Merieux).

El seguimiento clínico de estos pacientes fue llevado a cabo en el Dpto. de Infecciosas de la Fundación Jiménez Díaz, cuyas Historias Clínicas han sido de gran ayuda para evaluar todos los resultados de esta Tesis.

#### **3.2.2.- Aislamiento de inmunocomplejos circulantes del suero de los pacientes infectados:**

Para el aislamiento de los inmunocomplejos se utilizó una técnica puesta a punto en nuestro laboratorio basada en la precipitación de los complejos del suero con Sulfato amónico 1,04 M.

##### **\* Determinación de niveles de inmunocomplejos circulantes en Suero**

- a. Previamente se centrifugaron las muestras de suero a 11000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga (Hereaus, Sepatech).

- b. En tubos de cristal de 8 ml se mezclaron: 3,5 ml de Solución salina pH 7.2, 0,5 ml de Suero y 1,4 ml de Sulfato Amónico 4M.
- c. Posteriormente se mantuvieron los tubos 1 hora en un baño a 37° C y se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente.
- e. Después se centrifugaron durante 20 minutos a 1400 g, a Tª ambiente.
- f. Se decantó el sobrenadante, dejando escurrir el tubo boca abajo de 5 a 10 minutos y secando el interior de la pared del tubo con papel de filtro, sin tocar el sedimento.
- g. Los inmunocomplejos se disolvieron en 3 ml de PBS con 20 µl de NaOH 1N.
- h. La concentración de proteínas fue calculada a partir de la densidad óptica obtenida del precipitado redisolto, medida en un espectrofotómetro (Beckman DU-5) a 280 nm frente a un blanco de solución salina - NaOH 1N. Se consideró 1,4 el coeficiente de extinción, media aproximada del coeficiente de extinción que muestran las Inmunoglobulinas humanas. Los resultados se dieron en µg/ml.

En la valoración de niveles de inmunocomplejos circulantes en el suero de personas sanas se obtuvo un valor medio de  $36,05 \pm 22,8$  µg/ml, con un valor máximo de 81,6 µg/ml.

Los niveles superiores a 200 µg/ml fueron considerados elevados a efectos clínicos.

**\* Concentración de los inmunocomplejos:**

*Para concentrar los inmunocomplejos se siguieron los primeros pasos descritos anteriormente, desde a) hasta g). Los inmunocomplejos se resuspendieron después en 1,5 ml de Solución salina y 0,5 ml de Sulfato amónico 4 M. Posteriormente se dejaron toda la noche a Tª ambiente. Al día siguiente se centrifugaron durante 20 minutos a 1400 g.*

*Por último se decantaron los sobrenadantes y los inmunocomplejos se resuspendieron en 0,5 ml de Solución salina y 4 µl de NaOH 1N. Estas muestras se guardaron a -20° C.*

**3.2.2.- Composición de los ICC: Detección de antígeno p24 y anticuerpos anti-HIV.**

El análisis de la composición de los inmunocomplejos circulantes se realizó en función de la presencia de anticuerpos anti-HIV y de antígeno p24 mediante ensayos inmunoenzimáticos (ABBOTT Recombinant HIV-1/HIV-2 3rd generation EIA y ABBOTT HIVAg-1).

Los distintos anticuerpos frente al HIV presentes en los inmunocomplejos circulantes se detectaron por Western-Blot (New Lav-Blot 1, PASTEUR Diagnostic).

La cuantificación de las Inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA en los inmunocomplejos se determinó por nefelometría (Array, Beckman). Esta misma técnica se utilizó para valorar la concentración de inmunoglobulinas en el suero de estos pacientes.

#### **3.2.4.- Disociación de los inmunocomplejos:**

La técnica utilizada para disociar los ICC está basada en el método descrito por Kesten et al. (1988) (124). 200  $\mu$ l de las muestras de ICC fueron sometidos a un tratamiento ácido con 40  $\mu$ l de ClH-Gly 1M (pH 2) (Panreac), en presencia de 0,05% de SDS, durante 10 minutos a 37<sup>o</sup> C. Posteriormente las muestras fueron neutralizadas con 30  $\mu$ l de TRIS 1M (Sigma) y resuspendidas en un volumen de 300  $\mu$ l de PBS (pH 7,2).

#### **3.2.5.- Determinación de Actividad anti-CD4 en los ICC.**

La determinación de una actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos se valoró en base a la capacidad de los inmunocomplejos de unirse a una molécula CD4 recombinante soluble, o bien, a esta molécula expresada en la superficie celular. Ambas valoraciones se llevaron a cabo mediante ensayos inmunoenzimáticos.

##### **3.2.5.6.- Unión de los inmunocomplejos a una molécula CD4 recombinante soluble:**

En este análisis se valoró la presencia de actividad anti-CD4 de los inmunocomplejos por su capacidad de unirse a una molécula CD4 soluble recombinante (1.600 U/ml, T Cell Science,INC.) fijada en placas de poliestireno de fondo plano.

- Descripción del ensayo inmunoenzimático:

- a. Para obtener una concentración de 16 U/pocillo de la molécula CD4 soluble recombinante diluida en solución salina (1600 U/ml), se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo en placas de alta adherencia, de 96 pocillos (Costar).
- b. Las placas se mantuvieron 2 horas a 37<sup>o</sup> C y 12 horas a 4<sup>o</sup>C.
- c. Posteriormente se lavaron 3 veces con solución salina y Tween-20 0,05% (Difco laboratorios).
- d. Se dispensaron 100  $\mu$ l de inmunocomplejos (30-40  $\mu$ g/ml) en cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a 37<sup>o</sup> C y 24 horas a 4<sup>o</sup> C.
- e. Después se lavaron 3 veces con solución salina.

- f. 100 µl de Anticuerpo monoclonal de cabra frente a IgG humana (1/1000), conjugado con peroxidasa (GAHu-PO, Sera-lab), se incubaron durante 1 hora a 37° C, lavándose las placas después con solución salina.
- g. Se añadieron 100 µl de solución de revelado, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con OPD ( o-fenildiamina, Abbott) durante 20 minutos.
- h. La reacción se detuvo con 50 µl de Acido sulfúrico 1N (SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, 96% Panreac).
- i. La lectura de absorbancias se realizó a 492 nm (A<sub>492</sub>), utilizando un lector de placas de micropocillos (SLT 210, Kontron).

.- Cálculo de resultados:

La valoración de la presencia o ausencia de Actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos se determinó aplicando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Activ. anti-CD4} = ( A_{492} \text{ Muestra} / A_{492} \text{ Blanco} ) \times 100$$

Se consideró esta actividad como positiva cuando fue  $\geq 262\%$ , ya que en el grupo control analizado, formado por 10 inmunocomplejos no relacionados, aislados del suero de 6 pacientes con Artritis reumatoide y 4 con Hepatitis B, se obtuvo un valor medio de  $132 \pm 65 \%$ .

### 3.2.5.7.- Unión de los ICC a la molécula CD4 expresada en membranas celulares:

La presencia de actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos circulantes se valoró en este caso por la unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 expresada en la superficie celular.

Para ello se utilizó un ensayo inmunoenzimático descrito por Silvestris et al. (125) con algunas modificaciones, en el que se utilizó para obtener el extracto de membranas, células de una línea linfoblástica T humana CD4+.

#### \* Mantenimiento de la línea linfoblástica T humana CD4+:

Los cultivos de la línea celular se realizaron con Medio RPMI 1640 suplementado con Suero de ternera fetal al 10%, cuyo complemento había sido inactivado por calentamiento a 56° C durante 30 minutos, L-Glutamina 2mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina.

Al añadir estos reactivos se utilizaron filtros de 0,22 µm (Millex-GS). La preparación del medio de cultivo así como el manejo de los cultivos, fueron realizados bajo condiciones estériles, en una Campana de flujo horizontal (Telstar).

Las células se mantuvieron en frascos esterilizados (Costar), en un volumen de 10 ml de medio completo, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C. Para el seguimiento de la proliferación celular se utilizó un Microscopio de contraste de fases (Olympus IM).

A medida que la concentración celular aumentaba, superando una concentración de  $5 \times 10^6$  células/10 ml, se iban haciendo pases sucesivos a nuevos recipientes, realizándose una dilución 1/2 con medio de cultivo completo.

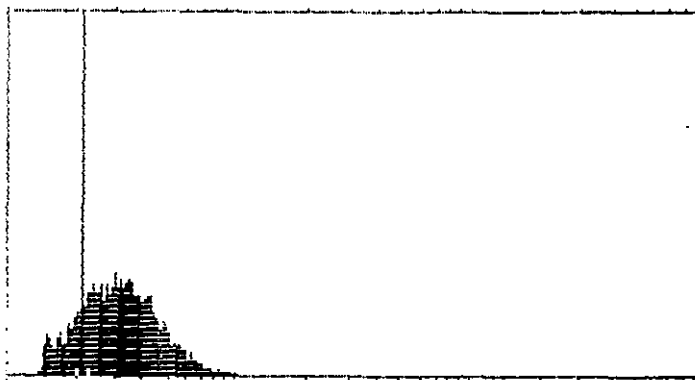
En la congelación de las células se utilizó Medio RPMI suplementado con DMSO (Sigma) al 20% y STF al 40%.

En criotubos de 1,8 ml (Nunk) se congelaban de 2 a  $4 \times 10^6$  células en 0,5 ml del Medio de congelación y 0,5 ml del Medio RPMI. Primero se guardaban en un congelador a  $-40^\circ\text{C}$  y posteriormente se almacenaban en contenedores con Nitrógeno líquido.

La descongelación de las células se hacía en un baño a  $37^\circ\text{C}$  y previamente al cultivo se lavaban tres veces por centrifugaciones sucesivas, a 300 g, con medio RPMI. La viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante Azul tripan.

La expresión de CD4 en la línea linfoblástica se confirmó por citometría de flujo, con un anticuerpo monoclonal específico de CD4, conjugado con Ficoeritrina (Dako).

**Fenotipo de la línea celular: CD4+ (82,9%)**



LRFL

#### **Preparación del ensayo inmunoenzimático:**

##### **\* Obtención del extracto de membrana:**

Las células de la línea celular linfoblástica T humana ( $2 \times 10^6$ ) se resuspendieron en 1 ml de solución salina (pH 7.2) con NP-40 al 0,5%, PMSF 2 mM e Inhibidor de Tripsina 1 U/ml, obtenido de clara de huevo de gallina, y se incubaron durante 1 hora, en hielo, con agitación ocasional.

Posteriormente se centrifugaron a 400 g durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , en una Centrifuga Modelo CS-6R de Beckman, para eliminar el núcleo. A continuación se sometieron a ultracentrifugación (100.000 g) durante 30 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ , en una Centrifuga Modelo J2-21 de Beckman, para eliminar la fracción correspondiente al citoesqueleto.

### Determinación de la concentración de proteínas en las muestras de extractos de membrana:

Después de resuspender el extracto de membrana en 1 ml de solución salina se valoró la concentración de proteínas de esta solución por colorimetría (Método de BIO-RAD), basado en el cambio que se produce en la absorbancia máxima de una solución ácida del colorante Azul Coomassie G-250 cuando se une a proteínas.

Esta absorbancia varía de 465 nm a 595 nm. El cambio de color del colorante que se produce está relacionado con la concentración de proteínas de la muestra.

La lectura se efectuó a 595 nm en un espectrofotómetro modelo DU-5 de Beckman. Para construir la curva patrón y calcular la concentración de proteínas de la muestra obtenida del extracto de membranas se realizaron diluciones seriadas de una muestra inicial de Albúmina bovina (1 mg/ml), (BSA, SIGMA). La concentración de proteínas obtenida en los extractos de membrana variaba en cada aislamiento, pero en todos los casos se obtuvo una concentración  $\geq$  a 0,180 mg/ml al partir de una concentración celular de  $2 \times 10^6$  células/ml.

Los extractos de membrana se guardaron en alícuotas de 500  $\mu$ l a  $-80^\circ$  C.

#### **\* Ensayo inmunoenzimático:**

Previamente se valoró la concentración óptima de proteínas del extracto de membrana unido al fondo de los pocillos de placas de alta adherencia en la que se podía detectar la molécula CD4. Esta valoración se realizó utilizando un ensayo inmunoenzimático en el que se comprobó la presencia de esta molécula con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 humano conjugado con peroxidasa (CellFree), y en el que se observó que una concentración de 3  $\mu$ g/pocillo de las proteínas del extracto de membrana era suficiente para detectar una unión específica del anticuerpo anti-CD4.

Para la preparación de las placas de alta adherencia de fondo plano con el extracto de membrana (3  $\mu$ g/pocillo), se dispensaron 200  $\mu$ l del extracto diluido en una solución con carbonato sódico pH 9,3. La placa se incubó a  $4^\circ$  C durante toda la noche. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS-Tween-20 0,05% (Difco) y se bloqueó con PBS-BSA 3%, manteniendo la placa a  $37^\circ$  C durante 1 hora, y después a  $4^\circ$  C durante toda la noche.

La presencia de CD4 en los extractos de membrana fijados a la placa se confirmó mediante un ensayo inmunoenzimático con anticuerpos específicos (anti-CD4 humano de ratón purificado, T Cell Sciences) y (anti-IgG ratón conjugado con peroxidasa, Sera-Lab).

Una vez fijado el extracto de membrana en la placa se dispensaron 100  $\mu$ l de los inmunocomplejos (200  $\mu$ g/ml) por pocillo, por duplicado, incubando la placa durante tres horas a temperatura ambiente.

Después de lavar la placa se añadieron 100  $\mu$ l del anticuerpo conjugado  $\alpha$ -IgG hu-PO (1/5x10<sup>4</sup>) (Sera-Lab) a cada pocillo, dejando la placa a 37<sup>o</sup> C durante 1 hora.

Para revelar la reacción enzimática se utilizó solución de sustrato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con OPD como cromógeno (Abbott), 100  $\mu$ l/pocillo, durante 20 minutos.

La reacción enzimática se paró con 50  $\mu$ l de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 1 N (Panreac) y la lectura se llevó a cabo a una longitud de onda de 492 nm en un espectrofotómetro de placas (Kontrol Analytical, STL-210), frente a un blanco de solución salina.

Cálculo de los resultados:

$$\% \text{ Actividad anti-CD4} = ( A_{492} \text{ Muestra} / A_{492} \text{ Blanco} ) \times 100$$

Como control de la unión de los inmunocomplejos a CD4 se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (T-Cell Sciences) en ensayos inmunoenzimáticos de competición indirectos.

### **3.2.6.- Unión de los inmunocomplejos a linfocitos de sangre periférica:**

La unión de los *inmunocomplejos a la superficie de linfocitos de sangre periférica* se estudió por Citometría de flujo. En este ensayo indirecto se valoró la inhibición que se producía en el marcaje con  $\alpha$ -CD4-FITC (DAKO) de linfocitos de sangre periférica incubados con diferentes muestras de inmunocomplejos. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

#### **\*. Aislamiento de linfocitos de sangre periférica en un gradiente de Ficoll:**

- a) 5 ml de sangre periférica con heparina 1% (Rovi) de sujetos sanos se diluyeron con 5 ml de solución salina, pH 7.2.
- b) En tubos de 10 ml con 2,5 ml de Ficoll (Lymphoprep, Nicomed) se añadieron 5 ml de la sangre diluida evitando que se mezclase con el Ficoll. Estos se centrifugaron a 400 g, durante 20 minutos.
- c) Del gradiente que se forma se recogió con una pipeta Pasteur la capa de linfocitos que se localiza entre el Ficoll y el plasma.

- d) Las células se lavaron con solución salina mediante sucesivas centrifugaciones a 500 g, durante 7 minutos.
- e) El recuento de células se realizó en una placa de Neubauer con Azul Tripán para ver también la viabilidad de estas células, en un Microscopio óptico (Nikon), y ajustar la suspensión celular a una concentración de  $10^6$  células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 (Bio-Wittaker) o Solución isotónica de Cloruro Sódico al 0,9% (Braun Medical).

**\* Detección de ICC sobre linfocitos de sangre periférica:**

- a) Cultivo de linfocitos de sangre periférica,  $10^6/200$   $\mu$ l, durante 2 horas, a 37<sup>o</sup>, en presencia de 100  $\mu$ l de inmunocomplejos, concentrados aproximadamente a 200  $\mu$ g/ml.
- b) Lavado de las células con solución salina en una Microfuga (Hereaus).
- c) Marcaje con 20  $\mu$ l de anti-CD4-FITC (Dako) durante 20 minutos a 4<sup>o</sup> C.
- d) Lavado y resuspensión de la células en 300  $\mu$ l de PBS.
- e) Determinación de la fluorescencia en un Citómetro EPICS-C, COULTER.

Como control se consideró en cada ensayo el % de células marcadas con anti-CD4 de PBLs que no habían sido incubados con inmunocomplejos. El valor obtenido en todos los casos estaba en un rango entre un 30 y 37%.

Para confirmar la unión de los complejos a la superficie celular se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a IgG humana conjugado con fluoresceína (Dako).

**3.2.7.- Inhibición de la proliferación de linfocitos de sangre periférica por inmunocomplejos, en cultivos:**

Para determinar la capacidad de los inmunocomplejos de inhibir el crecimiento celular se hicieron cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de sujetos normales, estimulados con PHA (1mg/ml), en presencia de diferentes inmunocomplejos aislados del suero de pacientes infectados por HIV.

Como control se utilizaron inmunocomplejos aislados del suero de pacientes no infectados con patologías autoinmunes, como Artritis Reumatoide, o enfermedades infecciosas, como Hepatitis B, en las que se detectan con frecuencia elevados niveles de inmunocomplejos.

**\* Ensayo de inhibición de la proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA en presencia de inmunocomplejos.**

Para valorar si la presencia de ICC en los cultivos de linfocitos estimulados con PHA influía en su proliferación se aislaron linfocitos de sangre periférica de sujetos normales.

El aislamiento de linfocitos se realizó mediante un gradiente de centrifugación con Ficoll (Nycomed Farmacia). Una vez purificados se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  en medio completo RPMI-1640 (Flow), suplementado con 10% de Suero de ternera fetal (Flow), L-Glutamina 2mM (Flow), 50 U/ml de penicilina (Flow) y 50  $\mu$ g/ml de estreptomina (Flow).

100  $\mu$ l de esta suspensión se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar) que se mantuvieron en cultivo a 37° C, en una atmósfera de CO<sup>2</sup> al 5%, durante 72 horas.

Los cultivos se estimularon con 10  $\mu$ l de Fitohemaglutinina (1 mg/ml) (Gibco), dosis que previamente se había determinado como óptima, y se realizaron en presencia de inmunocomplejos (200  $\mu$ g/ml) aislados del suero de pacientes infectados por HIV y sujetos no infectados con niveles elevados de ICC en suero.

La proliferación celular se determinó por la incorporación de Timidina H<sup>3</sup> en el DNA de las células. Para ello se añadió a cada pocillo 1  $\mu$ Ci de Timidina H<sup>3</sup> (Amershan) durante las últimas 18 horas.

Las células se recogieron utilizando un colector de células automático (Skatron, Noruega).

La precipitación del DNA de estas células se llevó a cabo con H<sub>2</sub>O destilada sobre papel de filtro. Una vez que los filtros correspondientes a los distintos pocillos de la placa se secaron, se colocaron en viales minipoli-Q (Beckman) con 2ml de Líquido de centelleo (Fórmula 989, Dupont) para efectuar su lectura en un Contador de centelleo Beta (Beckman LS 2800).

**\* Resultados:**

La valoración de la inhibición del crecimiento celular por ICC se determinó por la disminución de incorporación de Timidina H<sup>3</sup> en el DNA de las células, en un contador Beta (cpm).

El porcentaje de inhibición del crecimiento celular por los ICC se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh.} = 100 - ((\text{cpm PHA} - \text{cpm ICC}) / \text{cpm PHA}) \times 100$$

cpm PHA= Timidina H<sup>3</sup> incorporada por el ADN de las células estimuladas con PHA.

cpm ICC= Timidina H<sup>3</sup> incorporada por el ADN de las células estimuladas con PHA, en presencia de inmunocomplejos.

Se consideró un porcentaje de inhibición significativo cuando éste era  $\geq 22\%$ , ya que ICC no relacionados, de pacientes seronegativos, presentaban un porcentaje de inhibición del crecimiento celular inferior a un 22%.

### **3.2.8.- Infección in vitro de linfocitos de sangre periférica por ICC:**

Primero se aislaron linfocitos de sangre periférica de sujetos sanos por un gradiente de densidad con Ficoll.  $2 \times 10^6$  linfocitos/ml se incubaron en placas de 24 pocillos (Costar) con medio RPMI (Flow), suplementado con suero de ternera fetal al 10% (Flow), penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50  $\mu\text{g/ml}$  y L-Glutamina 2 mM (Flow).

Las células se activaron con 20  $\mu\text{l}$  de PHA (1mg/ml) (Gibco) durante 72 horas, en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, a 37° C. A los tres días de cultivo se eliminó parte del sobrenadante de los cultivos y las células se incubaron con los diferentes inmunocomplejos aislados, a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ , resuspendidos en medio de cultivo RPMI.

Para mantener los cultivos durante más de una semana se añadió al medio IL-2 recombinante (100 U/ml, Amersham).

A los dos, cuatro, seis y diez días de cultivo se recogieron los sobrenadantes de los distintos cultivos para medir la concentración de antígeno p24.

La viabilidad celular a lo largo del cultivo se valoró por exclusión del colorante Azul tripan.

#### **3.2.8.1.- Cuantificación de niveles de antígeno p24 en el sobrenadante de los cultivos celulares.**

La determinación de niveles de antígeno p24 tanto en el suero y los inmunocomplejos de los pacientes infectados, así como en los sobrenadantes de los cultivos celulares, se realizó por un ensayo inmunoenzimático (Abbott).

### 3.2.8.2.- Detección de ADN proviral integrado en el genoma celular por técnicas de PCR.

La detección de HIV-1 en ADN genómico supuso en primer lugar la extracción de ADN y, en segundo lugar, la amplificación de dos segmentos diana, correspondientes a las regiones *env* y *pol* del ADN proviral, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### 1) Extracción del ADN:

El ADN fue aislado de linfocitos de sangre periférica cultivados en presencia de diferentes inmunocomplejos de pacientes infectados. La extracción se efectuó por precipitación salina, técnica descrita por Miller, S. A. et al., en 1988, con algunas modificaciones.

Los linfocitos de cada cultivo se resuspendieron en 1 ml de solución de lisis (STMT), compuesta por sacarosa 0.32 M, Tris-ClH 1 mM, pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Tritón X-100 al 1%.

Posteriormente se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos y el precipitado obtenido, correspondiente a los núcleos celulares, se resuspendió de nuevo en 0,5 ml de la solución STMT, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones.

El ADN se liberó de los núcleos mediante un tratamiento de 18 horas a 37° C, con 300 µg/ml de proteinasa K (Sigma), en una solución de ClNa 75 mM, EDTA 24 mM y SDS al 0.5%. Las proteínas se eliminaron mediante precipitación con ClNa saturado y centrifugación a 1500 g, de 15 a 30 minutos.

El sobrenadante obtenido se mezcló suavemente con un volumen igual de isopropanol, hasta obtener una masa compacta de ADN, transferida a un tubo tipo eppendorf, con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 3000 g durante 2 minutos y después de eliminar el sobrenadante, el precipitado de ADN se secó al vacío durante 10 segundos. Posteriormente se resuspendió en 100 µl de Tampón Electrolito (Tris-ClH 0.01 M, pH 7.5 y EDTA 0.001 M, pH 8), calentándose a 50° C para disolver el ADN, y procediéndose a continuación a su cuantificación.

#### 2) Cuantificación del ADN:

Para calcular la cantidad de ADN extraída, se midió la absorbancia de varias diluciones de la muestra a 260 nm, en un espectrofotómetro UV/V DU-5 (Beckman). La concentración se obtiene al utilizar la siguiente reacción:

$$\text{ADN } \mu\text{g/ml} = A_{260} (\text{inversa de la dilución}) \times 50$$

Es aconsejable también medir la Absorbancia a 280 nm, ya que siempre que el índice  $A_{260} / A_{280}$  sea muy diferente a 1.5, es posible que exista una contaminación con proteínas.

### 3) Electroforesis en geles de agarosa:

Para comprobar que el ADN extraído no está degradado, la muestra se somete a una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Previamente el agar se disuelve con calor y agitación, en el tampón electrolito TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). Una vez que la solución alcanza el punto de ebullición, se deja enfriar por debajo de 60<sup>o</sup> C y se añade una concentración final de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma), que permite visualizar el ADN una vez llevada a cabo la electroforesis.

El gel se deja polimerizar en frío y posteriormente se introduce en la cubeta de electroforesis que contiene solución TAE.

Las muestras de ADN se diluyen en un volumen igual de la solución TAE y se dejan migrar en el gel a 60 V durante 30 minutos, en una cubeta horizontal (BRL). Una vez que ha terminado la electroforesis, el ADN se observa en un visualizador de geles con luz ultravioleta incorporada, Fotodyne (Iberlabo).

### 4) Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADN de los linfocitos fue amplificado para su estudio, mediante la reacción en cadena de la enzima Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer cetus, Norwalk, CT), técnica que permite, aprovechando la naturaleza termoestable de esta enzima, la expansión exponencial del segmento a amplificar, mediante la repetición de tres pasos básicos (desnaturalización de la muestra, alineamiento de los cebadores o iniciadores y extensión del ADN) (126).

En este caso los fragmentos a amplificar, para poder inferir la presencia de ADN proviral integrado en el genoma celular, pertenecían a las regiones *env* y *pol* del HIV-1.

Un problema de la alta sensibilidad de la PCR es que una mínima contaminación de la muestra o de los reactivos por la secuencia diana de ADN se amplificaría y podría dar lugar, a la hora de interpretar los resultados para el diagnóstico de la infección, a falsos positivos.

Para evitar cualquier posibilidad de contaminación, la preparación de las muestras de PCR se realizan en una cabina de flujo laminar y nunca se utilizan en el mismo sitio de trabajo plásmidos o productos de PCR, utilizándose las precauciones recomendadas por Knok et al. (127).

Previamente, para comprobar que el lisado obtenido se podía amplificar se hicieron PCRs con iniciadores específicos de la β-globina humana.

Para detectar ADN viral se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar las regiones *pol* (JA17/JA20) y *env* (JA13/JA16). La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en dos reacciones, la primera con un par de oligonucleótidos externos (JA13/JA16) y (JA17/JA20) y la segunda con un par de oligonucleótidos internos (JA18/JA19) y (JA14/JA15) (Nested PCR).

A) REGION ENV gp41

1ª PCR (primers: JA13 JA16)

Condiciones de reacción:

- Termociclador Perkin Elmer 9600
- Volumen final 50 µl:
  - 5 µl 10x PCR buffer (Tris 10 mM final pH 8,3)
  - 14 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM (7 mM final)
  - 0,25 µl dNTP 10 mM (200 µM)
  - 1,25 µl de cada primer a 10 pmoles/µl
  - 29 µl H<sub>2</sub>O DEPC
  - 2,5 U Taq pol (Perkin Elmer)
  - Añadir 2 µg de ADN genómico en 10 µl
  - Cubrir con aceite mineral ligero
  - Ciclos:
    - 95º C 5 minutos
    - 24 ciclos: 95º C 20 s
    - 45º C 20 s
    - 72º C 20 s (+ 2 s. por ciclo)
    - 72º C 5 minutos

2ª PCR (primers: JA14 JA15)

Condiciones de reacción:

- 5 µl del producto de la primera amplificación.
- 4 µl 10x PCR buffer (Tris 10 mM final pH 8,3)
- 8 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM (7 mM final)
- 0,25 µl dNTP 10 mM (200 µM)
- 1,25 µl de cada primer a 10 pmoles/µl
- 30,25 µl H<sub>2</sub>O DEPC
- 2,5 U Taq pol (Perkin Elmer)
- Cubrir con aceite mineral ligero
- Ciclos:
  - 95º C 5 minutos
  - 24 ciclos: 95º C 20 s
  - 50º C 20 s
  - 72º C 20 s (+ 2 s. por ciclo)

## B) REGION POL

### 1ª PCR (primers: JA17 JA20)

#### Condiciones de reacción:

- Termociclador Perkin Elmer 9600
- Volumen final 50 µl:
  - 5 µl 10x PCR buffer (Tris 10 mM final pH 8,3)
  - 14 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM (7 mM final)
  - 0,25 µl dNTP 10 mM (200 µM)
  - 1,25 µl de cada primer a 10 pmoles/µl
  - 29 µl H<sub>2</sub>O DEPC
  - 2,5 U Taq pol (Perkin Elmer)
  - Añadir 2 µg de ADN genómico en 10 µl
  - Cubrir con aceite mineral ligero
  - Ciclos:
    - 95º C 5 minutos
    - 24 ciclos: 95º C 20 s
    - 41º C 20 s
    - 72º C 20 s (+ 2 s. por ciclo)

### 2ª PCR (primers: JA18 JA19)

#### Condiciones de reacción:

- 5 µl del producto de la primera amplificación.
- 4 µl 10x PCR buffer (Tris 10 mM final pH 8,3)
- 7,5 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM (3 mM final)
- 0,25 µl dNTP 10 mM
- 1,25 µl de cada primer a 10 pmoles/µl
- 30,25 µl H<sub>2</sub>O DEPC
- 2,5 U Taq pol (Perkin Elmer)
- Cubrir con aceite mineral ligero
- Ciclos:
  - 95º C 5 minutos
  - 24 ciclos: 95º C 20 s
  - 41º C 20 s
  - 72º C 20 s (+ 2 s. por ciclo)
- 72º C 20 s. (+ 2 s. por ciclo)

En todos los experimentos se pusieron controles negativos, sin ADN, sometidos exactamente al mismo proceso, para detectar alguna posible contaminación.

## 5) Análisis de los productos amplificados:

Para comprobar que la amplificación ha sido correcta se analizó el 20% del producto amplificado, en este caso 10  $\mu$ l del 2º amplificado, en geles de agarosa al 1.5% en el tampón electrolito TAE, previamente descrito. La tinción se realizó con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml).

Para comparar el tamaño del producto amplificado se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (0X 174 digerido con HaeIII, Stratagene).

Los productos amplificados tienen 172 pb (región *env*, correspondiente a gp41) y 129 pb (región *pol*).

### Descripción de los primers utilizados:

PRIMER	SECUENCIAS (5'-3')	GENES Y LOCALIZACION
JA13	TTCCTTGGGTTCTTGGGAGC	<i>env</i> (8004-8023)
JA14	GCAGCAGGAAGCACTATGGG	<i>env</i> (8022-8041)
JA15	CCAGGACTCTTGCCTGGAGC	<i>env</i> (8194-8175)
JA16	AGGTATCTTTCCACAGCCAG	<i>env</i> (8209-8190)
JA17	TACAGGAGCAGATGATACAG	<i>pol</i> (2431-2450)
JA18	GGAAACCAAAAATGATAGGG	<i>pol</i> (2481-2500)
JA19	ATTATGTTGACAGGTGTAGG	<i>pol</i> (2610-2591)
JA20	CCTGGCTTTAATTTTACTTGG	<i>pol</i> (2697-2678)

### **3.2.9.- Estudio de la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8+ de pacientes infectados frente a linfocitos T CD4+ mediante ensayos de liberación de Cr<sup>51</sup>.**

Estos ensayos fueron utilizados para determinar la presencia en pacientes infectados por HIV de células T citotóxicas capaces de reconocer determinantes antigénicos en la superficie de linfocitos no infectados.

Como **células diana** se utilizaron linfocitos de sangre periférica de individuos normales y en algunos casos de pacientes infectados, estimulados con PHA (1mg/ml, BioWittaker). Durante siete días se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con un 10% de STF, L-Glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomicina, a 37° C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

El aislamiento de PBLs se realizó en un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque.

Como **células efectoras** se seleccionaron linfocitos T CD8+ de PBLs aislados de pacientes infectados, mediante separación inmunomagnética (Dynabeads M-450 CD8).

Las células fueron aisladas de sangre periférica mediante esferas inmunomagnéticas (Dynabeads, Dynal), cubiertas con un anticuerpo monoclonal frente a CD8. Posteriormente se aislaron por aplicación de un imán (Separador de partículas magnéticas, Dynal). Se lavaron tres veces con PBS frío con un 2% (v/v) de STF y se separaron de las esferas con un anticuerpo anti-Fab' (DetachaBead, Dynal).

Posteriormente se comprobó por Citometría de flujo que la población seleccionada estaba constituida en su mayor parte por linfocitos T CD8+ (89%), encontrándose en todas las muestras analizadas una contaminación mínima por células NK ≤ 1%.

Por último las células fueron congeladas con medio RPMI, 20% de DMSO y 40% de STF en criotubos de 2ml y conservadas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

#### **\* Determinación de la respuesta citotóxica:**

La cuantificación de la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+ se realizó mediante ensayos de liberación de Cr<sup>51</sup>, en los que se siguieron los siguientes pasos:

**1.-** Marcaje de las células diana (0,5 x 10<sup>6</sup>), resuspendidas en 100 µl de STF, con 100 µCi de <sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, New England Nuclear, en tubos de 12 ml cónicos (Costar), durante una hora en un baño a 37°C.

Para eliminar el exceso de cromo las células se lavan 4 veces con Medio RPMI con STF al 5% por sucesivas centrifugaciones a 1700 rpm.

Posteriormente se cuentan las células, se hace una viabilidad y se comprueba la radiactividad incorporada. Para el ensayo de citotoxicidad se utilizan 2000 células diana, con una incorporación de cromo de aproximadamente 500 cpm.

En el caso de los linfocitos esta relación fue la que se obtenía normalmente en cada ensayo, pero en el caso de las células de la línea linfoblástica, la incorporación de cromo fue menor y por lo tanto se utilizó un mayor número de células diana, 4000 a 5000, para obtener un marcaje igual.

2.- Dispersión en placas de 96 pocillos con el fondo en forma de V (Costar) de las células diana, entre 2000 y 4000 células en 100 µl de Medio RPMI y de las células efectoras en distintas concentraciones, en un volumen de 0,1 ml, para tener distintas relaciones célula efectora - célula diana (E:D): (10:1), (5:1), (2:1) y (1:1). Cada ensayo se valoró por triplicado.

Para que las células queden lo suficientemente próximas se centrifuga la placa a 80 g durante 5 minutos.

La placa de citotoxicidad se incuba durante 4 horas a 37° C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al cabo de ese tiempo se recoge el sobrenadante (100 µl) para determinar el porcentaje de Cr<sup>51</sup> liberado en tubos de plástico. La lectura se efectuó en un contador gamma (Cobra II, Izasa).

#### **Cálculo de los resultados:**

El porcentaje de lisis específica se calcula para cada población de linfocitos citotóxicos, de cada paciente infectado por HIV estudiado, con la siguiente fórmula:

$$[ (\text{Lib. exp. cpm} - \text{Lib. esp. cpm}) / (\text{Lib. máx. cpm} - \text{Lib. esp. cpm}) ] \times 100$$

Liberación experimental:

Liberación de Cr<sup>51</sup> por las células diana incubadas con las células efectoras.

Liberación espontánea:

Liberación de Cr<sup>51</sup> por las células diana incubadas con medio de cultivo.

Liberación máxima:

Liberación de Cr<sup>51</sup> de las células diana incubadas con CLH 0,1 N.

### **\* Inhibición de la respuesta citotóxica:**

Para determinar el fenotipo de las células efectoras y su especificidad frente a las células diana, se utilizaron anticuerpos monoclonales frente a CD8 y CD4 (Dako) respectivamente.

Previamente a los ensayos de citotoxicidad, las células efectoras se incubaron con 10 µg/ml de Anticuerpo anti-CD8 purificado, durante 30 min, a 4º C.

Para determinar un proceso de bloqueo en la lisis celular, parte de las células diana utilizadas en los ensayos, se incubaron con 10 µg/ml de Anticuerpo anti-CD4, durante 1 hora, a 37º C, durante la fase del marcaje con Cr<sup>51</sup>.

### **3.2.10.- Métodos estadísticos.**

La comparación de los resultados obtenidos en los diferentes grupos de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, establecidos para su estudio comparativo, se realizó mediante la aplicación de distintas pruebas de significación.

Se aplicó la prueba de Student para identificar la diferencia de las medias de dos grupos.

Para estudiar la asociación o independencia de dos variables cualitativas dentro de una muestra, se utilizó la prueba de chi-cuadrado, de acuerdo con la forma descrita por Bancroft et al. (128), utilizando la corrección de Yates cuando fue necesario.

Por último, para ver la fuerza de asociación entre dos variables se realizó una correlación lineal.

En todos los análisis se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor a 0,05.

#### **4.- RESULTADOS Y DISCUSION**

**4.1.- PAPEL PATOGENICO DE LOS INMUNOCOMPLEJOS CIRCULANTES  
EN LA INFECCION POR HIV.**

**4.1.1.- Asociación entre la progresión de la infección y las siguientes características de los Inmunocomplejos:**

4.1.1.1.- Frecuencia de niveles elevados en el suero de pacientes infectados.

4.1.1.2.- Composición.

4.1.1.3.- Actividad anti-CD4.

#### 4.1.1.1.- Frecuencia de niveles elevados de Inmunocomplejos circulantes en el suero de pacientes infectados por HIV.

En un primer estudio, para valorar el significado patológico de los inmunocomplejos circulantes en la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana, se analizaron los niveles de Inmunocomplejos circulantes en el suero de 69 pacientes infectados.

La determinación de los niveles de inmunocomplejos se llevó a cabo por precipitación con Sulfato amónico 1,04 M.

En función de las tres categorías definidas en la infección por HIV por los Centros del Control de Enfermedades de Atlanta, el 45% de los pacientes fue incluido en la categoría A, ya que se encontraban en un estado asintomático, mientras que el 21% y el 34% se incluyeron en las categorías B y C respectivamente, teniendo en cuenta su cuadro clínico.

En cada categoría se distinguieron tres niveles según el número de linfocitos T CD4+ que presentaban los pacientes en sangre periférica, siendo un número mayor que 500 células/ $\mu$ l equivalente a un nivel 1, un recuento entre 500 y 200, un nivel 2, y unos niveles de linfocitos menores a 200/ $\mu$ l, un nivel 3. Siguiendo este baremo, un 23% de los pacientes se incluyeron en un nivel 1, un 52% en un nivel 2 y un 25% en un nivel 3.

En total, el porcentaje de pacientes en cada grupo fue de un 16% (A1), un 23% (A2), un 6% (A3), un 4% (B1), un 10% (B2), un 7% (B3), un 3% (C1), un 19% (C2) y un 12% (C3).

Los niveles de ICC en el suero de estos pacientes fueron elevados, encontrándose en un rango de 114 a 4.100  $\mu$ g/ml.

La media de los niveles de inmunocomplejos obtenida en los tres grupos de pacientes incluidos en las categorías clínicas A, B y C fue de  $1.074 \pm 956$ ;  $947 \pm 474$  y  $791 \pm 646$   $\mu$ g/ml respectivamente.

Estos resultados indican que no existe una diferencia significativa entre los niveles de inmunocomplejos que presentan los pacientes y su estadio clínico ( $t = 1,23 / p = 0,22$ ).

Del mismo modo, tampoco existe una diferencia significativa entre la media de los niveles de inmunocomplejos correspondientes a los tres grupos de la infección realizados en función del número de linfocitos T CD4+ / $\mu$ l que presentaban los pacientes,  $745 \pm 766$  (1);  $976 \pm 625$  (2) y  $1.096 \pm 1.040$  (3), ( $t = 1,10 / p = 0,28$ ).

Niveles elevados de inmunocomplejos ( $> 500$   $\mu$ g/ml) se detectaron en 50 pacientes, lo cual supone un 72% de los casos estudiados. 24 de estos pacientes (48%) permanecían en un estado asintomático (A), mientras que el resto de los pacientes (52%) presentaba algún síntoma clínico que lo incluía en una categoría B o C ( $n = 26$ ).

Al comparar el estado clínico de los pacientes, en función de su clasificación en una categoría A, B ó C de la infección, con la presencia de niveles elevados de inmunocomplejos circulantes en suero, superiores a 500  $\mu\text{g/ml}$ , observamos que no existía una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), ya que niveles elevados de inmunocomplejos se podían encontrar con igual frecuencia en el grupo de pacientes asintomáticos y en aquellos formados por pacientes incluidos en una categoría B ó C de la infección.

Sin embargo, si se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al número de linfocitos T CD4+ que presentaban en circulación estos pacientes, ya que un 79% de los pacientes que presentaban niveles elevados de inmunocomplejos,  $> 500 \mu\text{g/ml}$ , tenían un número de linfocitos T CD4+ menor a 500 células/ $\mu\text{l}$ , mientras que el 21% de estos pacientes presentaban niveles de linfocitos en sangre periférica superiores a 500 células/ $\mu\text{l}$  (TABLA 1.I).

#### **Relación entre la presencia de niveles elevados de Inmunocomplejos circulantes ( $> 500 \mu\text{g/ml}$ ) y la detección de antígeno p24 en el suero de pacientes infectados por HIV.**

En un grupo de 42 pacientes con niveles elevados de inmunocomplejos, se hizo un estudio para determinar si este parámetro estaba o no relacionado con la presencia de antígeno p24 en suero. En este análisis se encontró que la mayoría de los pacientes con niveles de inmunocomplejos elevados ( $n=30$ ), un 72% de los casos, no presentaba niveles significativos de antígeno p24 en suero.

En 14 casos de este grupo de pacientes, en los que no se detectó antígeno en suero, lo cual supone un 46% de los casos analizados, sí se pudo detectar éste en los inmunocomplejos después de disociarlos a pH ácido.

Esto último implica que en algunos casos de la infección se podría estar encubriendo la presencia de antígenos virales mediante la formación de complejos antígeno-anticuerpo, siendo de esta forma indetectables en el suero.

TABLA 1.I.- Asociación entre la presencia de niveles elevados de ICC (>500 µg/ml) en pacientes infectados por HIV, su estadio clínico y sus niveles de linfocitos T CD4+ en sangre periférica.

Pacientes n=69	Estado Clínico		p	Niveles lin. T4		p
	A n=31	B/C n=38		> 500/µl n=16	< 500/µl n=53	
Niveles ICC > 500 µg/ml	24	26	X <sup>2</sup> =0,31	8	42	X <sup>2</sup> =3,9
Niveles ICC < 500 µg/ml	7	12	p=0,57	8	11	p<0,05

#### 4.1.1.2.- Análisis de la composición de los ICC.

En un segundo estudio, en el que se analizó la composición de los inmunocomplejos correspondientes a 141 pacientes, se observó que la clase de inmunoglobulina IgG estaba presente en el 80% de los casos analizados, mientras que IgM se detectó en un 15%, e IgA solo en el 5%. La media de las concentraciones de estas inmunoglobulinas en los inmunocomplejos fue de  $6,3 \pm 5,9$  (IgG),  $2,9 \pm 2,1$  (IgM) y  $1,4 \pm 0,2$  mg/dl (IgA).

Se observó que no existía una correlación entre los niveles de inmunocomplejos y los de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA en el suero de los pacientes ( $r = 0,4$ ,  $r = 0,03$  y  $r = 0,2$ ), ni entre los niveles de IgG en los inmunocomplejos y en el suero ( $r = 0,5$ ).

Posteriormente se determinó la composición de los inmunocomplejos en función de la presencia de anticuerpos frente al virus de la Inmunodeficiencia Humana y de antígenos virales, fundamentalmente p24. Este estudio se llevó a cabo en un grupo de 66 pacientes, incluidos por su estado clínico y sus niveles de linfocitos CD4+ en los siguientes grupos: A1 (9), A2 (16), A3 (4), B1 (2), B2 (6), B3 (6), C1 (2), C2 (12) y C3 (9). En este análisis fueron definidos cuatro variantes en los Inmunocomplejos circulantes : (Ac+Ag+), (Ac+Ag-), (Ac-Ag+) y (Ac-Ag-).

#### \* Análisis de la composición de los ICC en relación con la progresión de la infección.

Al tener en cuenta solamente una de las dos variables siguientes, presencia o no de anticuerpos anti-HIV o de antígeno p24 en los inmunocomplejos, no se observó ninguna *diferencia significativa entre una composición determinada de los inmunocomplejos y el estado clínico* en el que se encontraban los pacientes, asintomáticos o incluidos en una categoría B ó C ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2.I).

Sin embargo, si se observó una diferencia significativa entre la presencia o ausencia en los inmunocomplejos de anticuerpos frente al virus o antígeno p24 con respecto a los niveles de linfocitos T CD4+ que presentaban estos pacientes, observándose que la presencia en los inmunocomplejos de antígeno p24 era mayor en pacientes con niveles de linfocitos inferiores a  $500/\mu\text{l}$ , ( $p < 0,05$ ), (Tabla 2.II).

La frecuencia con la que aparecían las distintas variantes de inmunocomplejos, definidas en función de su composición, se analizó en distintos grupos de pacientes, establecidos en función del estado clínico de los pacientes, asintomático o sintomático, incluidos en las categorías B ó C de la infección, o bien, teniendo en cuenta los niveles de linfocitos T CD4+ que presentaban en sangre periférica, superiores a  $500/\mu\text{l}$ , entre 200 y  $500/\mu\text{l}$  o inferiores a  $500/\mu\text{l}$ .

En este análisis se observó que los inmunocomplejos en los que se detectaron anticuerpos anti-HIV y antígeno p24, (Ac+Ag+), aparecían con mayor frecuencia en pacientes que se encontraban en un estadio más avanzado C (46%), mientras que inmunocomplejos Ac+Ag- eran más frecuentes en pacientes asintomáticos (50%). Los inmunocomplejos Ac- Ag+ se observaron con una frecuencia mayor en pacientes incluidos en una categoría A (50%) (Tabla 2.III).

Con respecto al estado inmunocomprometido de los pacientes, se observó que ICC con una composición (Ac+Ag+) solo aparecían en pacientes con unos niveles de linfocitos T CD4+ circulantes menores a 500/ $\mu$ l (Tabla 2.IV).

Según estos datos la presencia conjunta de anticuerpos frente al HIV y antígeno p24 en los inmunocomplejos podría significar un mayor riesgo de progresión en la infección hacia un estado de SIDA y la presencia de este tipo de inmunocomplejos en la circulación podría considerarse como un parámetro de mal pronóstico.

También se realizó un estudio comparativo en 59 de estos pacientes para determinar si la presencia de antígeno p24 en los inmunocomplejos o en el suero estaba asociada al grado de infección o con los niveles de linfocitos T CD4+ que presentaban estos pacientes.

En este análisis se observó que no existía una asociación entre la presencia o no en los inmunocomplejos y en el suero de antígeno p24 con el estado clínico del paciente, ya que las variantes estudiadas (AgICC+/AgS+), (AgICC-/AgS+), (AgICC+/AgS-) y (AgICC-/AgS-), aparecían con igual frecuencia en pacientes incluidos en una categoría A o en las categorías B ó C (Tabla 2.V).

Pero sí se observó que la presencia de antígeno p24 tanto en el suero como en los inmunocomplejos circulantes era más frecuente en aquellos pacientes con niveles de linfocitos T CD4+ en circulación inferiores a 500/ $\mu$ l (Tabla 2.VI).

**\* Análisis de la especificidad de los anticuerpos frente a las distintas proteínas virales observada en ICC de pacientes infectados por HIV.**

Las diferentes especificidades de los anticuerpos frente al HIV presentes en aquellos inmunocomplejos en los que se había determinado previamente anticuerpos anti-HIV por ensayos inmunoenzimáticos se analizaron por Western Blott.

Esta valoración se llevó a cabo en 17 pacientes, incluidos en las siguientes categorías de la infección : A (8), B (4) y C (5), de los cuales, 11 presentaban un número de linfocitos T CD4+ menor a 200/ $\mu$ l.

Lo más significativo de este estudio es que se observaron anticuerpos frente a gp160 en todas las muestras de inmunocomplejos analizadas y que la presencia de anticuerpos frente a la proteína gp41 sólo pudo ser detectada en inmunocomplejos de pacientes con alguna manifestación clínica, incluidos en una categoría B ó C de la infección (Tabla 2.VII).

En este análisis también se observó que la frecuencia de anticuerpos frente a la proteína p24 era mayor en aquellos pacientes con niveles de linfocitos T CD4+ en circulación inferiores a 200 células/ $\mu$ l (Tabla 2.VIII).

Estos resultados sugieren que en la infección por HIV se podría valorar por Western Blot la aparición o disminución de anticuerpos con una determinada especificidad frente a las distintas proteínas del virus como parámetro de cierto pronóstico en la infección.

TABLA 2.I.- Asociación entre la presencia de Anticuerpos frente al HIV o Antígeno p24 en los inmunocomplejos analizados y el estado clínico que muestran los pacientes.

Composición ICC	Categoría A (n=29)	Categorías B/C (n=37)	p
Ac+	11	16	$X^2 = 0,03$
Ac-	18	21	$p = 0,85$
Ag+	8	13	$X^2 = 0,14$
Ag-	21	24	$p = 0,69$

TABLA 2.II.- Asociación entre la presencia de Anticuerpos anti-HIV o Antígeno p24 en los inmunocomplejos y los niveles de linfocitos T CD4+ que muestran los pacientes.

Composición ICC	CD4+ >500/ $\mu$ l n = 13	CD4+ <500/ $\mu$ l n = 53	p
Ac+	3	24	$X^2 = 1,3$
Ac-	10	29	$p = 0,25$
Ag+	1	20	$X^2 = 4,8$
Ag-	12	23	$p < 0,05$

TABLA 2.III.- Frecuencia de los distintos tipos de inmunocomplejos definidos en función de su composición en los tres grupos de pacientes analizados, establecidos por el estadio clínico que muestran los pacientes.

ICC	Cat. A	Cat. B	Cat. C
Ac+ Ag+	31%	23%	46%
Ac+ Ag-	50%	35%	15%
Ac- Ag+	50%	12%	38%
Ac- Ag-	45%	16%	39%

TABLA 2.IV.- Frecuencia de los distintos tipos de inmunocomplejos definidos en función de su composición en los tres grupos de pacientes analizados, establecidos por los niveles de linfocitos T CD4+ que presentan los pacientes en sangre periférica.

Composición ICC	CD4/ $\mu$ l > 500	CD4/ $\mu$ l 200-500	CD4/ $\mu$ l < 200
Ac+ Ag+	0%	69%	31%
Ac+ Ag-	21%	50%	29%
Ac- Ag+	12%	62%	26%
Ac- Ag-	29%	42%	29%

TABLA 2.V.- Relación entre la presencia de Antígeno p24 en los ICC y/o en el suero de pacientes infectados por HIV y su estado clínico.

Ag ICC	Ag suero	Cat. A	Cat. B/C
+	+	8%	9%
+	-	23%	24%
-	+	19%	18%
-	-	50%	49%

TABLA 2.VI.- Relación entre la presencia de Antígeno p24 en los ICC y/o en el suero de pacientes infectados por HIV y sus niveles de linfocitos T CD4+.

Ag ICC	Ag suero	CD4/ $\mu$ l > 500	CD4/ $\mu$ l < 500
+	+	0%	11%
+	-	17%	25%
-	+	33%	15%
-	-	50%	49%

TABLA 2.VII.-

Frecuencia de las distintas especificidades de los anticuerpos frente a las diferentes proteínas del virus observada en inmunocomplejos de pacientes infectados por HIV, clasificados en dos grupos en función de la categoría de la infección en la que fueron incluidos.

Ac HIV	Cat. A	Cat. B/C
$\alpha$ -gp160	100%	100%
$\alpha$ -gp120	75%	89%
$\alpha$ -p68	25%	44%
$\alpha$ -p55	37%	55%
$\alpha$ -p52	37%	44%
$\alpha$ -gp41	0%	44%
$\alpha$ -p40	25%	33%
$\alpha$ -p34	12%	22%
$\alpha$ -p24	50%	55%
$\alpha$ -p18	12%	11%

TABLA 2.VIII.-

Frecuencia de las distintas especificidades de los anticuerpos frente a las diferentes proteínas del virus observada en inmunocomplejos de pacientes infectados por HIV, clasificados en dos grupos en función de los niveles de linfocitos T CD4+ que presentaban en circulación.

Ac HIV	CD4/ $\mu$ l > 200	CD4/ $\mu$ l < 200
$\alpha$ -gp160	100%	100%
$\alpha$ -gp120	72%	100%
$\alpha$ -p68	27%	50%
$\alpha$ -p55	45%	50%
$\alpha$ -p52	45%	33%
$\alpha$ -gp41	27%	16%
$\alpha$ -p40	27%	33%
$\alpha$ -p34	18%	16%
$\alpha$ -p24	45%	66%
$\alpha$ -p18	9%	16%

#### **4.1.1.3.- Detección de actividad anti-CD4 en Inmunocomplejos circulantes aislados del suero de pacientes infectados por HIV.**

Actualmente existen muchos indicios para pensar que durante la infección por HIV puede aparecer una respuesta de origen autoinmune.

No solamente esta hipótesis esta basada en la observación en algunos pacientes de enfermedades en las que pueden estar implicados fenómenos autoinmunes, como una púrpura trombocitopénica idiopática, sino también por algunos datos inmunológicos detectados en pacientes infectados (112).

Recientemente se ha descrito la presencia de complejos gp120/anti-gp120 en inmunocomplejos circulantes aislados del suero de pacientes infectados por HIV, capaces de unirse a la molécula CD4 expresada en linfocitos de sangre periférica, que podrían estar implicados en potenciar la infección (129).

En nuestro trabajo nos propusimos determinar si en las muestras que teníamos de inmunocomplejos correspondientes a pacientes infectados, existía una actividad anti-CD4. Para determinar esta actividad se valoró la unión de los inmunocomplejos a una molécula CD4 recombinante soluble o bien, a esta molécula expresada en extractos de membrana de una línea linfoblástica T humana CD4+. Ambos estudios se realizaron por ensayos inmunoenzimáticos.

#### **Valoración de la unión de los Inmunocomplejos a una molécula CD4 recombinante soluble.**

Este estudio fue llevado a cabo en un grupo de 74 pacientes. Siguiendo la clasificación utilizada por los Centros de Control de Enfermedades de Atlanta, los pacientes fueron incluidos en las siguientes categorías de la infección: 34 (A), 14 (B), y 26 (C).

Dentro de cada categoría se han definido tres niveles en función del número de linfocitos T CD4+ que muestran los pacientes en sangre periférica. Siguiendo este criterio, los pacientes se incluyeron en un nivel 1 (17), un 2 (37) y un 3 (20).

La determinación de actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos se valoró en función de su capacidad de unirse a una molécula CD4 recombinante soluble fijada en placas de poliestireno. Esta unión se reveló en ensayos inmunoenzimáticos con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa y los resultados obtenidos en densidades ópticas se reflejaron en porcentajes de actividad anti-CD4 (Tabla 3.I).

En este estudio se determinó que 12 pacientes presentaban inmunocomplejos con actividad anti-CD4 (Figura 3.1), lo cual supone un 16% de los casos.

Aunque la presencia de esta actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos no está relacionada con el grado de la infección, ya que fue detectada con una similar frecuencia en inmunocomplejos aislados del suero de pacientes asintomáticos (47%) y de aquellos incluidos por su estadio clínico en una categoría B ó C de la infección (53%), la mayoría de estos pacientes (n=8), presentaba niveles de linfocitos T CD4+ en sangre periférica inferiores a 500/ $\mu$ l.

La existencia de esta actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos fue observada en un porcentaje relativamente bajo de los pacientes analizados y tan solo en un caso se pudo diagnosticar como patología autoinmune, una púrpura trombocitopénica idiopática. Pero aún así, no se puede descartar la hipótesis de que esta actividad tenga algún significado patogénico en la infección de algunos pacientes.

De hecho, en un caso, en el que se pudo valorar la evolución de la infección del paciente, se observó un cambio en la actividad anti-CD4 de sus inmunocomplejos. En este caso se analizaron distintas muestras de inmunocomplejos recogidas a lo largo de dos años, detectándose un cambio en la actividad anti-CD4 de los inmunocomplejos aislados a finales del segundo año. Este cambio coincidió con una progresión de la infección, así como con una disminución de los niveles de linfocitos T CD4+ en sangre periférica del paciente (Figura 3.2).

Con estos resultados no se podría utilizar de una forma generalizada la presencia de actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos como un parámetro de mal pronóstico de la infección, aunque si se podría tener en cuenta en aquellos casos en los que se observe una disminución de linfocitos T CD4+, ya que los inmunocomplejos podrían estar implicados en este proceso.

Esta actividad frente a la molécula CD4, detectada en los inmunocomplejos, podría deberse a la presencia de antígeno gp120 o de anticuerpos antiidiotipo dirigidos frente a anticuerpos anti-gp120 en los inmunocomplejos. Esta última idea podría apoyarse en cierta manera, en la observación de que en el 28% de los inmunocomplejos que presentaban esta actividad no se detectó antígeno p24 formando parte de los inmunocomplejos, lo cual podría reflejar la no existencia de otros antígenos virales como consecuencia de la ausencia de una fase replicativa del virus en la infección.

TABLA 3.I.- Datos referentes a los inmunocomplejos utilizados en la determinación de actividad anti-CD4.

ICC	% Act. $\alpha$ CD4	CLINICA	CD4/ $\mu$ l
I-310	Neg. 158%	C2	239
I-315	Pos. 731%	B2	385
I-327	Neg. 113%	A1	901
I-349	Neg. 254%	C3	154
I-285	Neg. 259%	A2	315
I-301	Neg. 204%	B1	629
I-303	Neg. 114%	C3	63
I-371	Neg. 253%	C3	32
I-372	Pos. 272%	A2	396
I-373	Neg. 193%	A3	266
I-374	Neg. 71%	A2	448
I-375	Neg. 124%	A1	648
I-386	Pos. 812%	C2	252
I-359	Pos. 375%	A2	396
I-358	Pos. 312%	B2	378
I-355	Neg. 172%	A2	290
I-356	Neg. 229%	A3	176
I-361	Neg. 73%	C2	365
I-362	Neg. 85%	C1	507
I-364	Neg. 144%	A1	640
I-365	Neg. 175%	C2	288
I-366	Neg. 190%	C2	312
I-367	Neg. 80%	C3	120
I-376	Neg. 96%	C3	99

ICC  
% Act.  $\alpha$ CD4  
CD4/ $\mu$ l

(Identificación de la muestra)  
(% de actividad anti-CD4)  
(Linfocitos T CD4+ circulantes)

TABLA 3.I.- Continuación

ICC	%Act. αCD4	CLINICA	CD4/μl
I-378	Neg. 89%	A2	238
I-380	Neg. 84%	B3	60
I-381	Neg. 162%	A2	434
I-382	Neg. 21%	A1	990
I-383	Neg. 140%	A2	390
I-387	Neg. 64%	A1	702
I-388	Neg. 20%	C3	135
I-389	Neg. 27%	C2	280
I-390	Neg. 29%	A1	882
I-391	Neg. 76%	A1	609
I-230	Neg. 77%	A2	313
I-237	Neg. 93%	B2	340
I-239	Neg. 138%	A2	204
I-261	Neg. 75%	B3	143
I-263	Neg. 69%	A2	266
I-264	Neg. 206%	A1	600
I-279	Neg. 21%	A2	210
I-281	Neg. 85%	A2	456
I-287	Neg. 86%	A3	133
I-288	Neg. 88%	B3	180
I-289	Neg. 91%	B2	342
I-290	Neg. 83%	A1	600
I-291	Neg. 100%	B2	306
I-292	Neg. 52%	B3	143
I-298	Neg. 228%	A2	416

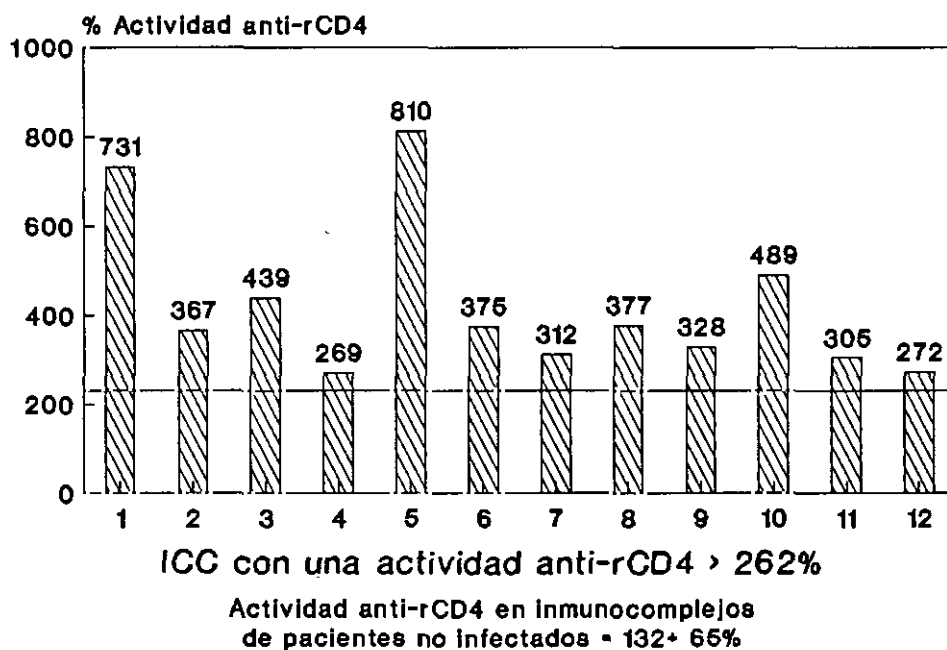
TABLA 3.I.- Continuación

ICC	%Act. $\alpha$ CD4	CLINICA	CD4/ $\mu$ i
I-304	Neg. 83%	A2	304
I-305	Neg. 50%	C2	225
I-306	Neg. 68%	C1	962
I-307	Neg. 128%	B2	224
I-308	Neg. 102%	C2	364
I-309	Neg. 90%	C2	247
I-311	Neg. 92%	B1	760
I-313	Neg. 122%	C2	336
I-314	Neg. 120%	A2	227
I-317	Neg. 97%	C2	440
I-328	Pos. 328%	A1	799
I-331	Neg. 124%	A2	227
I-335	Neg. 115%	C2	323
I-336	Pos. 367%	B3	143
I-338	Pos. 269%	C3	24
I-339	Pos. 377%	A1	779
I-340	Pos. 489%	A1	583
I-341	Neg. 195%	C3	154
I-342	Pos. 439%	A1	595
I-343	Neg. 241%	C3	39
I-344	Pos. 305%	B3	120
I-348	Neg. 213%	C3	102
I-350	Neg. 54%	A3	276
I-352	Neg. 99%	C2	208
I-354	Neg. 79%	C2	290

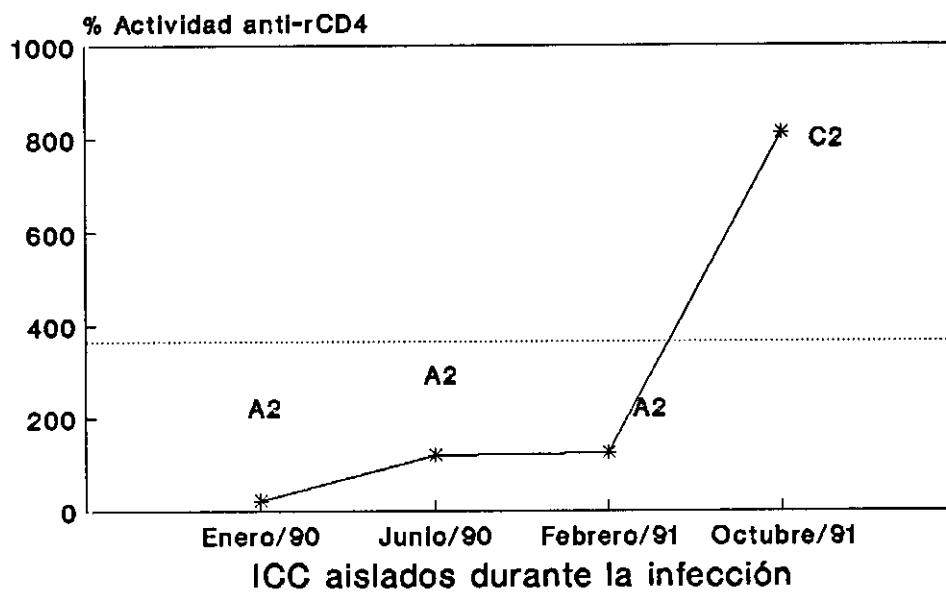
TABLA 3.II.- Frecuencia de inmunocomplejos con actividad anti-rCD4 en pacientes infectados por HIV, divididos en función de su estadio clínico y sus niveles de linfocitos T CD4+ en sangre periférica.

% Act. anti-rCD4	Estado	Clínico	Niveles lin.CD4	
	A	B/C	> 500/ $\mu$ l	< 500/ $\mu$ l
POS.	47%	53%	28%	72%

**FIGURA 3.1**  
Actividad anti-rCD4 en inmunocomplejos de pacientes infectados por HIV



**FIGURA 3.2**  
Cambio de la actividad anti-rCD4 en los  
inmunocomplejos de un paciente.



**\* Unión de los Inmunocomplejos circulantes a la molécula CD4 presente en extractos de membrana de una línea linfoblástica T humana CD4+.**

Para determinar si los inmunocomplejos aislados del suero de pacientes infectados eran también capaces de unirse a la molécula CD4 expresada en la superficie celular se utilizaron extractos de membrana de una línea linfoblástica T humana CD4+.

Al igual que en el estudio anterior, en el que se valoró la unión de los inmunocomplejos a una molécula CD4 recombinante soluble, la unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 presente en los extractos de membrana, fijados en placas de poliestireno, se llevó a cabo con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa.

Los resultados en densidades ópticas se transformaron también en porcentajes de actividad anti-CD4, considerándose una actividad positiva cuando fue  $\geq 210\%$ , ya que en el grupo control analizado, formado por 11 muestras de inmunocomplejos no relacionados, aislados del suero de pacientes con Artritis reumatoide, se detectó un % de actividad media de  $110 \pm 50\%$ .

El estudio se llevó a cabo con muestras de inmunocomplejos aisladas del suero de 33 pacientes infectados, incluidos en función de su estado clínico, en una categoría A (57%), B (18%) y C (25%). En base a sus niveles de linfocitos T CD4+ se agruparon en tres niveles: 1 (32%), 2 (48%) y 3 (20%).

En un 28% de los inmunocomplejos se detectó esta actividad anti-CD4, con un valor medio de  $318,7 \pm 123\%$ , mientras que en el 72% de los inmunocomplejos no fue detectada.

Aunque no se reflejó una relación entre la presencia de actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos y el estado clínico de los pacientes, ya que un 57% de los inmunocomplejos con actividad anti-CD4 correspondía a pacientes asintomáticos y un 43% a aquellos incluidos en una categoría B ó C, se observó que estos inmunocomplejos pertenecían mayoritariamente (85%) a pacientes con niveles de linfocitos inferiores a  $500/\mu\text{l}$  (Tabla 3.III).

Sin embargo, al comparar la media de los niveles de linfocitos T CD4+, ( $349 \pm 180$  células/ $\mu\text{l}$ ), de pacientes cuyos inmunocomplejos tenían una actividad anti-CD4, con la media obtenida, ( $424 \pm 269$  células/ $\mu\text{l}$ ), en aquellos pacientes con inmunocomplejos sin esta actividad, se observó que no existía una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

En un posterior análisis, realizado en tres pacientes infectados, cuyos inmunocomplejos presentaban una actividad anti-CD4, se comprobó que esta actividad también aparecía en el suero y en los inmunocomplejos disociados.

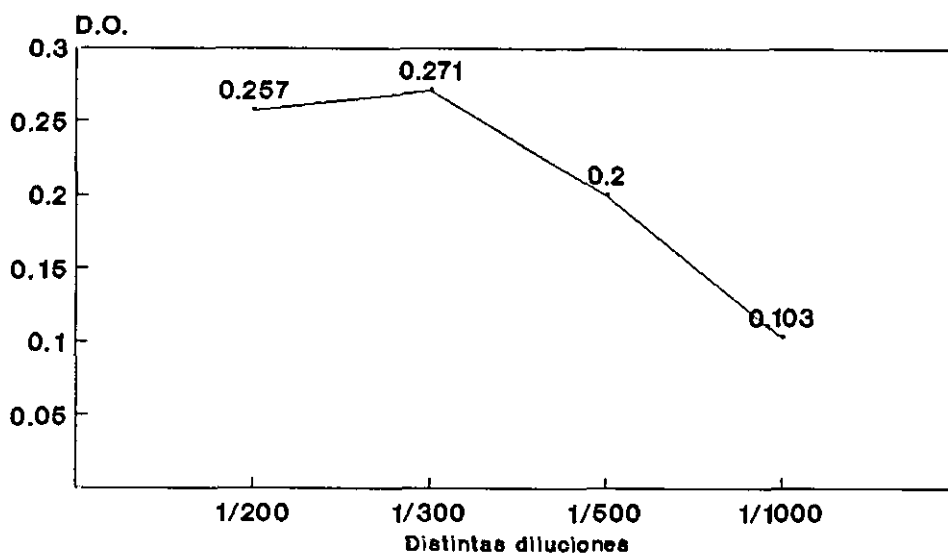
Por último, en la valoración de la unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 expresada en extractos de membrana, se realizaron dos pruebas de control, en las que se analizó la disminución de la actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos al realizar, por un lado, diluciones seriadas de los inmunocomplejos (Figura 3.3), y por otro lado, por el efecto competitivo de la unión de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 humano de ratón a la molécula CD4 (Figura 3.4).

TABLA 3.III.-

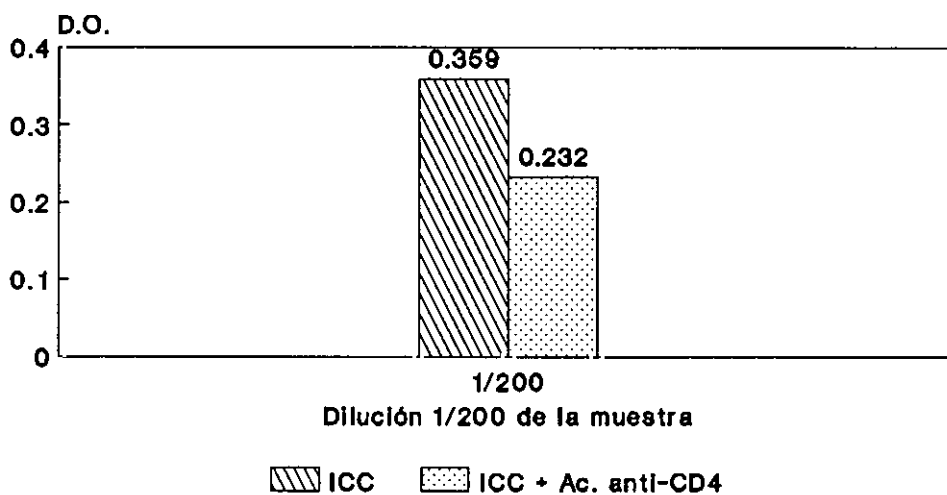
Frecuencia de inmunocomplejos con actividad anti-CD4 en pacientes infectados por HIV, divididos en función de su estadio clínico y sus niveles de linfocitos T CD4+ en sangre periférica.

	Estado Clínico		Niveles lin.CD4	
Act. anti-CD4	A	B/C	> 500/ $\mu$ l	< 500/ $\mu$ l
POS.	57%	43%	15%	85%

**FIGURA 3.3**  
Disminución de la actividad anti-CD4 detectada en uno de los inmunocomplejos



**FIGURA 3.4**  
Inhibición de la actividad anti-CD4  
por anticuerpos frente a la molécula CD4



Inhibición debida a la unión de un  
Ac. monoclonal anti-CD4 a la molécula  
CD4, expresada en extractos de membrana.

**4.1.2.- Potenciación de la infección por los Inmunocomplejos.**

4.1.2.1.- Unión de los ICC a linfocitos de sangre periférica.

4.1.2.2.- Implicación de los ICC en la inhibición del crecimiento celular.

#### 4.1.2.1.- Unión de Inmunocomplejos circulantes a linfocitos de sangre periférica.

Una vez comprobada la capacidad de los inmunocomplejos circulantes, aislados del suero de pacientes infectados, para unirse a una molécula CD4 recombinante soluble o expresada en extractos de membrana, se estudió la capacidad de los inmunocomplejos de unirse a la molécula nativa, expresada en linfocitos T CD4+ de sangre periférica.

La unión de los inmunocomplejos a la superficie de estos linfocitos podría inducir una respuesta citotóxica mediada por células T dependiente de anticuerpos (ADCC), observada *in vitro* por Lyerly et al. (59) con anticuerpos citotóxicos frente a antígenos virales expresados en la membrana celular. Esto supondría el agravamiento del estado de inmunodeficiencia del paciente infectado.

La valoración de la unión de los inmunocomplejos a CD4 se llevó a cabo en doce inmunocomplejos de sujetos seropositivos, en los que previamente se había detectado una actividad anti-CD4 por su capacidad de unión a una molécula CD4 soluble recombinante, y cinco inmunocomplejos aislados del suero de individuos no infectados, utilizados como control.

El análisis de la capacidad de estos inmunocomplejos de unirse a linfocitos de sangre periférica de sujetos normales se realizó indirectamente, por citometría de flujo, valorando la inhibición de la unión de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 conjugado con fluoresceína, (Acm anti-CD4-FITC), a linfocitos de sangre periférica de sujetos sanos.

De este grupo de inmunocomplejos, tan solo tres de ellos inhibieron de una forma significativa, superior a un 50 % de inhibición, el marcaje de linfocitos de sangre periférica con este anticuerpo monoclonal frente a CD4, en un 60, 62 y 90 % respectivamente (Figura 4.1).

Estos inmunocomplejos fueron aislados del suero de dos pacientes asintomáticos, incluidos en una categoría A2 de la infección, y de un paciente en un estadio más avanzado C2 (Tabla 4.I).

Estos resultados sugieren que la unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 varía en función de la forma en que se encuentre esta molécula, bien en su forma soluble y recombinante, o expresada en extractos de membrana, o bien, en la superficie celular, forma que reflejaría mejor una situación *in vivo*.

En la figura 4.2 se muestran dos de los histogramas obtenidos por citometría de flujo en los que se aprecia la inhibición del marcaje de linfocitos de sangre periférica con un anticuerpo monoclonal anti-CD4-FITC cuando estas células fueron previamente incubadas con inmunocomplejos aislados del suero de un paciente infectado por HIV (1).

La unión de los inmunocomplejos a la superficie celular se comprobó mediante un ensayo directo en el que se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a la Inmunoglobulina IgG humana, conjugado con fluoresceína.

En estos ensayos se observó paralelamente una disminución del marcaje con un anticuerpo anti-CD4-PE en linfocitos de sangre periférica y un aumento del marcaje con un anticuerpo anti-IgG-hu-FITC (Figuras 4.3 y 4.4).

La unión de los inmunocomplejos a la superficie de linfocitos T CD4+ podría estar mediada por anticuerpos anti-idiotipo frente a anticuerpos anti-gp120, aunque no se puede descartar que esta unión sea debida a la presencia de antígeno gp120 en los inmunocomplejos.

En los tres inmunocomplejos se detectó la presencia de la proteína p24 del virus y en dos de ellos, se determinó la presencia de anticuerpos anti-gp120 por Western Blot (Tabla 4.I).

TABLA 4.I.- Datos referentes a los inmunocomplejos en los que se confirmó su capacidad de unión a linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo.

ICC	% de Inh. del marcate de PBLs con $\alpha$ -CD4-FITC	% Act. $\alpha$ -rCD4	ICC $\mu$ g/ml	AgICC pg/ml	ICC Ac-HIV	Cat.	CD4/ $\mu$ l
1	60%	POS.	557	50	$\alpha$ -gp120	A2	396
2	62%	POS.	255	54	Neg.	A2	238
3	90%	POS.	855	5	$\alpha$ -gp120	C2	300

ICC ( $\mu$ g/ml)

(Niveles de Inmunocomplejos circulantes en suero)

Ag ICC

(Presencia de antígeno p24 en los inmunocomplejos)

Cat.

(Categoría de la Infección por HIV)

CD4/ $\mu$ l

(Niveles de linfocitos T CD4+ circulantes)

**FIGURA 4.1**  
Inhibición del marcaje con anticuerpos anti-CD4-FITC en PBLs incubados con ICC

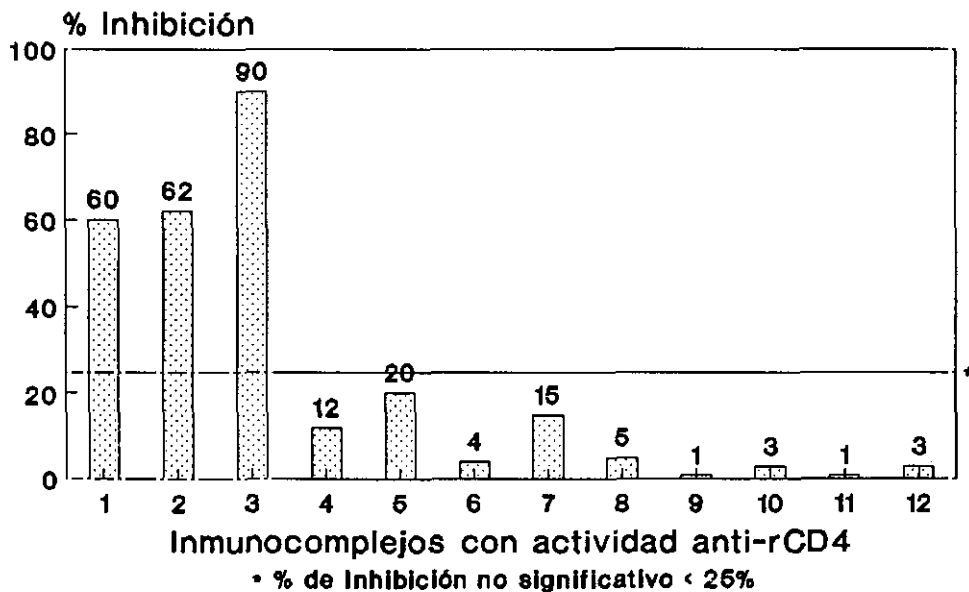
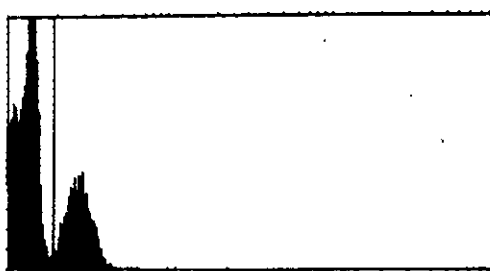
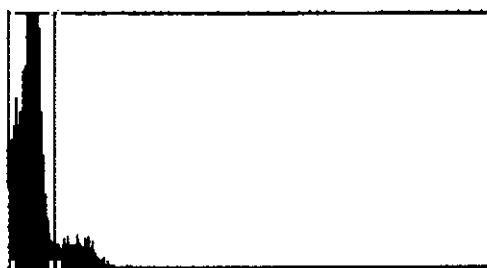


FIGURA 4.2.- Inhibición del marcaje con un anticuerpo monoclonal anti-CD4-FITC, en un 60%, en linfocitos de sangre periférica de sujetos no infectados, previamente incubados con inmunocomplejos aislados del suero de un paciente infectado (1 .



(A)

LGFL

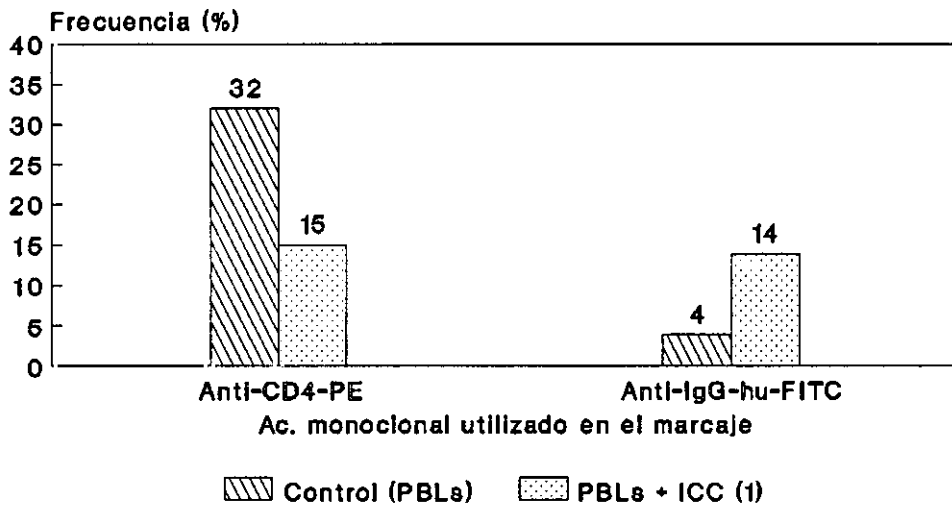


(B)

LGFL

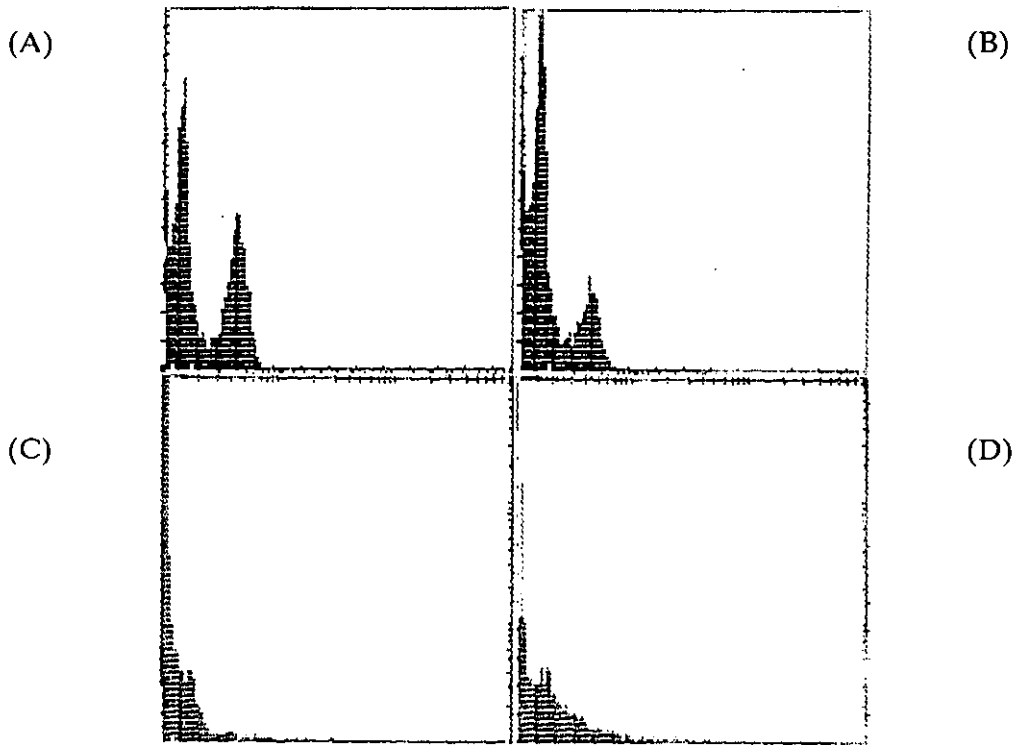
- (A) Marcaje de linfocitos de sangre periférica con anti-CD4-FITC: (30%).
- (B) Marcaje de linfocitos de sangre periférica con anti-CD4-FITC, previamente incubados con inmunocomplejos aislados del suero de un paciente infectado (1 : (12%).

**FIGURA 4.3**  
**Alteración del marcaje con anti-CD4-PE y**  
**anti-IgGhu-FITC en PBLs por ICC**



**Disminución y aumento del marcaje con Ac**  
**anti-CD4-PE y anti-IgGhu-FITC en PBLs**  
**incubados con ICC de un paciente HIV+**

FIGURA 4.4.- Alteración del marcaje con un anticuerpo anti-CD4-PE y anti-IgG-hu-FITC en linfocitos de sangre periférica previamente incubados con inmunocomplejos aislados del suero de un paciente infectado (1 .



- (A) Marcaje de linfocitos de sangre periférica con anti-CD4-PE: (32%).
- (B) Marcaje de linfocitos de sangre periférica previamente incubados con inmunocomplejos aislados del suero de un paciente infectado (1 con anti-CD4-PE: (15%).
- (C) Marcaje de linfocitos de sangre periférica con anti-IgG-hu-FITC: (4%).
- (D) Marcaje de linfocitos de sangre periférica previamente incubados con inmunocomplejos aislados del suero de un paciente infectado (1 con anti-IgG hu-FITC: (14%).

#### 4.1.2.2.- Inhibición del crecimiento celular por Inmunocomplejos circulantes.

La capacidad de los Inmunocomplejos circulantes, aislados del suero de pacientes infectados por el virus de la Inmunodeficiencia Humana, de alterar el crecimiento celular, se valoró en cultivos *in vitro*. En estos cultivos se determinó la inhibición de la proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA.

La inhibición producida por la presencia en el medio de cultivo de los inmunocomplejos se midió a las 72 horas mediante la detección de una disminución de la incorporación de Timidina H<sup>3</sup> en el ADN de los linfocitos.

En este estudio se determinó el efecto de la presencia en el medio de cultivo de siete inmunocomplejos (Z43, Z39, Z23, Z53, Z42, Z44 y Z45), aislados del suero pacientes infectados por HIV, incluidos por su estadio clínico en distintas categorías de la infección.

Con el propósito de comparar el efecto de los inmunocomplejos asociados a la infección por HIV con otros inmunocomplejos observados en pacientes con otras enfermedades, se utilizaron además cinco inmunocomplejos no relacionados, aislados del suero de pacientes con patologías diferentes, Hepatitis B (N7 y N10) y artritis reumatoide (N20, N30 y N56).

Para determinar la inhibición de la proliferación celular se calculó el % de Inhibición de la proliferación que suponía la presencia en el medio de cultivo de cada muestra de inmunocomplejos, en función de la disminución de timidina H<sup>3</sup> incorporada por el ADN de los linfocitos con respecto al control (Linfocitos estimulados con PHA sin la presencia en el medio de cultivo de inmunocomplejos).

Como resultado de este cálculo, en los ensayos de proliferación celular se confirmó que 3 de los 7 inmunocomplejos analizados, Z39, Z53 y Z42, fueron capaces de afectar el crecimiento celular, inhibiendo de forma significativa la proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA. La presencia de estos tres inmunocomplejos en los medios de cultivo supuso un % de inhibición de la proliferación celular de un 52, 40 y 69% respectivamente, mientras que la media del % de inhibición de la proliferación obtenido con inmunocomplejos asociados a otras patologías fue de un  $10,5 \pm 7,1$  % (Figura 4.5).

Los tres inmunocomplejos que inhibieron la proliferación fueron aislados del suero de pacientes infectados que por su estado clínico fueron incluidos en las categorías C3, A3 y C3 respectivamente (TABLA 4.II).

El mecanismo por el cual los inmunocomplejos pueden afectar el crecimiento celular no lo hemos analizado en este trabajo pero en éste, quizás podría estar implicada la unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4.

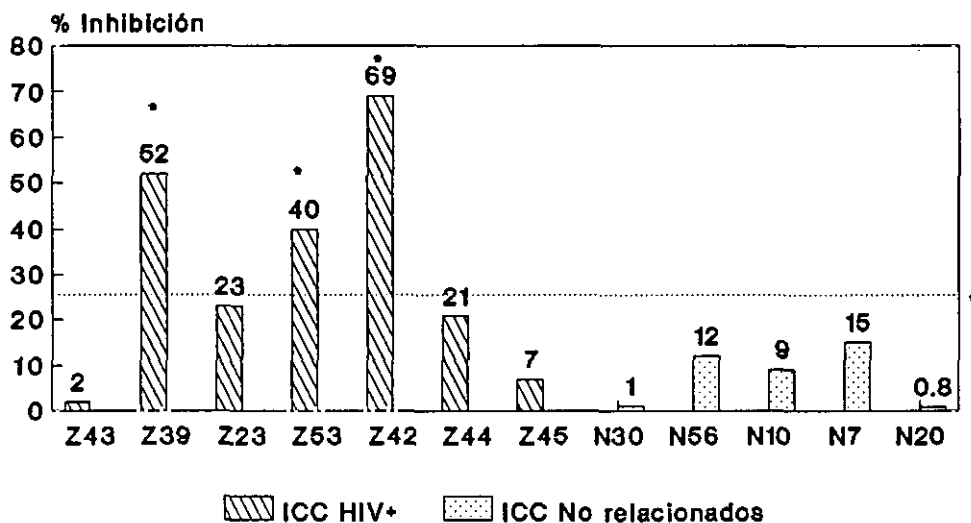
Respecto a este proceso, algunos investigadores, como Banda et al. (64), han sugerido un modelo en el que la interacción de la molécula CD4 expresada en los linfocitos T cooperadores y complejos gp120-anti-gp120 podía desencadenar un fenómeno de apoptosis y han propuesto que este fenómeno podría estar implicado en depleción de linfocitos T CD4+ durante la infección.

TABLA 4.II.- Datos referentes a los inmunocomplejos aislados del suero de pacientes infectados utilizados en ensayos de inhibición de la proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA.

ICC	CLINICA	ICC $\mu\text{g/ml}$	CD4/ $\mu\text{l}$	% Inh. Prolif.
Z 43	A2	1358	256	Neg. 2%
Z 39*	C3	2000	39	Pos. 52%
Z 23	C3	2558	195	Neg. 23%
Z 53*	A3	1179	198	Pos. 40%
Z 42*	C3	590	40	Pos. 69%
Z 44	A1	752	1064	Neg. 21%
Z 45	A2	782	429	Neg. 7%

ICC (Identificación de las muestras)  
 ICC ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Niveles de inmunocomplejos circulantes en suero)  
 CD4/ $\mu\text{l}$  (Niveles de linfocitos T CD4+ circulantes)

FIGURA 4.5  
 INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE PBLs ESTIMULADOS CON PHA POR ICC



\* Inmunocomplejos que inhibieron la proliferación de PBLs (% Inh. > 25%)

#### **4.1.3.- Capacidad infectiva de los inmunocomplejos circulantes.**

La presencia de partículas virales formando parte de los inmunocomplejos circulantes fue puesta en evidencia por Bolognesi et al. en un trabajo publicado en 1989, en el que se postuló la infección de monocitos y macrófagos vía complejos de anticuerpos y virus (122).

Estos experimentos *in vitro* sugieren que los inmunocomplejos podrían tener un papel importante en la patogénesis de la infección, en cuanto a que pueden incrementar la infectividad.

La capacidad de los inmunocomplejos de comportarse como complejos infectivos fue analizada en este trabajo en cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA y en presencia de distintos inmunocomplejos.

Para este análisis se determinó la presencia de antígeno p24 en los sobrenadantes de los cultivos por un ensayo inmunoenzimático.

Los cultivos se realizaron en presencia de diferentes inmunocomplejos aislados del suero de pacientes infectados y fueron mantenidos durante un máximo de dos semanas con PHA e Interleuquina-2 recombinante.

Los inmunocomplejos correspondían a pacientes incluidos en función de su estado clínico en las siguientes categorías de la infección: A1 (14%), A2 (5%), B1 (14%), B2 (5%), C1 (5%), C2 (19%) y C3 (38%).

De los 25 inmunocomplejos analizados, siete indujeron la síntesis de antígeno p24 en cultivos de linfocitos de sujetos sanos, obteniéndose distintas concentraciones, en un rango de 14 y 25 pg/ml, a los 6 días de cultivo (Figura 5.1). Cinco de estos inmunocomplejos pertenecían a pacientes incluidos en una categoría C de la infección.

La viabilidad celular se cuantificó por exclusión del azul tripan al inicio del cultivo y a los 4,6,8 y 10 días de cultivo, obteniéndose un 90% de viabilidad a los 4 días, un 80% a los 6 y 8 días y un 50% a los 10 días de cultivo.

Para comprobar que la síntesis de antígeno p24, detectada en el sobrenadante de los cultivos de linfocitos de sangre periférica realizados en presencia de diferentes inmunocomplejos, estaba asociada a una infección de los linfocitos, se analizó la presencia de ADN viral integrado en el genoma de estas células.

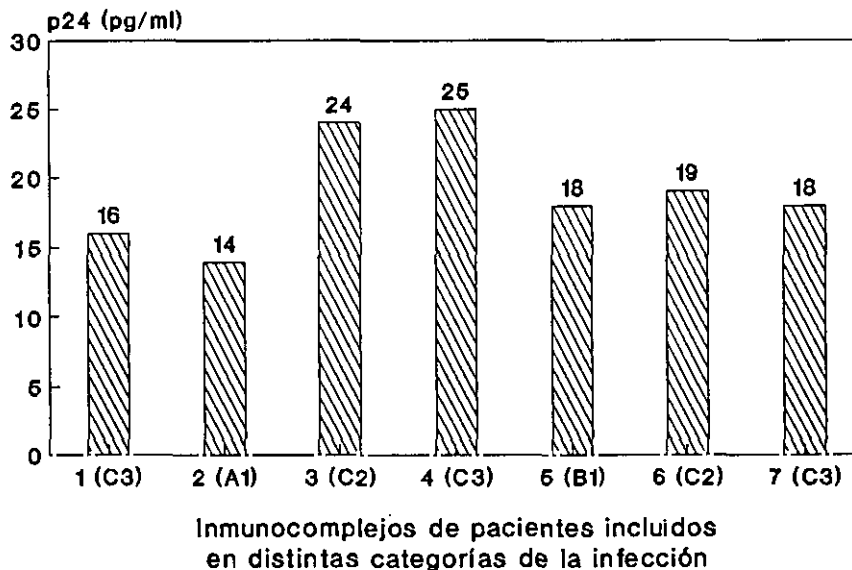
En este análisis se amplificaron dos fragmentos diana del ADN viral, correspondientes a las regiones env (gp41) y pol, con oligonucleótidos específicos, mediante la reacción en cadena de la enzima Taq ADN polimerasa.

Este ensayo se llevó a cabo en tres de los cultivos de linfocitos realizados en presencia de inmunocomplejos, detectándose en dos de los casos ADN del virus integrado en el genoma de estas células (Figura 5.2).

A pesar de que solo en uno de los cultivos se obtuvo síntesis de antígeno p24, este último ensayo apoya la hipótesis de que en Inmunocomplejos de pacientes infectados por el virus de la Inmunodeficiencia Humana pueden existir partículas virales íntegras capaces de infectar linfocitos T CD4+.

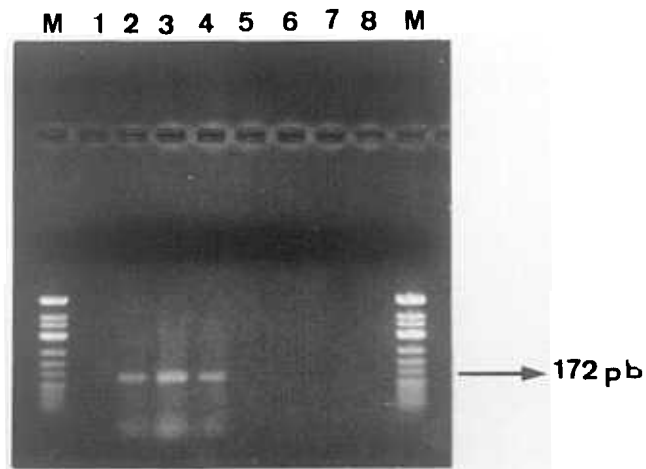
Esta capacidad infectiva de los inmunocomplejos circulantes corroboraría el papel patogénico que tendrían los inmunocomplejos circulantes en la infección.

**FIGURA 5.1**  
p24 en el sobrenadante de cultivos de PBLs realizados en presencia de ICC



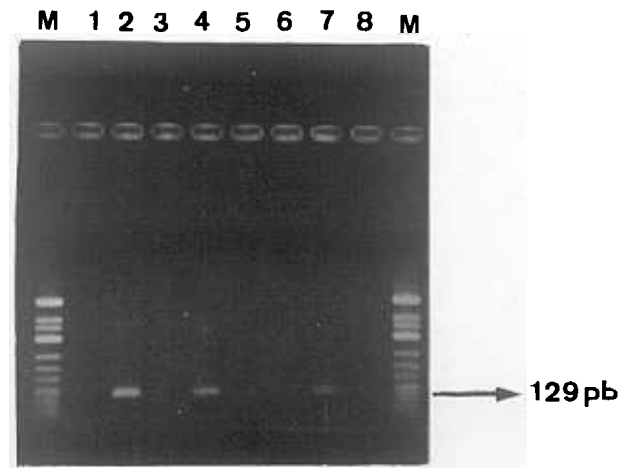
**FIGURA 5.2.- DETECCION DE HIV-1 EN ADN GENOMICO POR PCR**

A) Fragmento amplificado de ADN vírico de 172 pb, correspondiente a la región env (gp41), visualizado en geles de agarosa al 1,5%.



M ( $\phi$ X174, HaeIII); 1 (Control -, ADN de PBLs de un sujeto sano); 2 (Control +, ADN de PBLs de un paciente infectado); 3,4 y 5 (ADN de PBLs de un sujeto sano cultivados con inmunocomplejos circulantes aislados del suero de tres pacientes infectados); 6 y 7 (ADN de PBLs de dos niños nacidos de madres seropositivas); 8 (Mezcla de reacción).

- B) Fragmento amplificado de ADN vírico de 129 pb, correspondiente a la región pol, visualizado en geles de agarosa al 1,5%.



M ( $\phi$ X174, HaeIII); 1 (Control -, ADN de PBLs de un sujeto sano); 2 (Control +, ADN de PBLs de un paciente infectado); 3 y 5 (ADN de PBLs de dos niños nacidos de madres seropositivas); 4, 6 y 7 (ADN de PBLs de un sujeto sano cultivados con inmunocomplejos circulantes aislados del suero de tres pacientes infectados); 8 (Mezcla de reacción).

**4.2.- PRESENCIA DE LINFOCITOS T CD8+ EN PACIENTES INFECTADOS  
CAPACES DE LISAR LINFOCITOS T CD4+ ESTIMULADOS CON PHA.**

Ante algunos hallazgos serológicos, observados en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, como la presencia en suero de autoanticuerpos frente a antígenos linfocitarios (130), se ha sugerido que durante la infección podría generarse un fenómeno autoinmune.

Los anticuerpos observados en la infección por HIV que se han descrito hasta el momento están dirigidos frente a moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (95), la molécula CD4 (131), e incluso frente a la proteína básica de mielina (132).

Teniendo en cuenta estos datos se ha sugerido como hipótesis para explicar la depleción de linfocitos T CD4+ que otros mecanismos, además del propio efecto citopático del virus, como un mecanismo autoinmune frente al Sistema Inmune y probablemente frente al tejido nervioso (133-111), podrían también estar implicados en la disminución de esta población celular.

Esta respuesta autoinmune podría también estar mediada por linfocitos T y para su estudio decidimos analizar la respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+ de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana frente a linfocitos T CD4+ de sujetos sanos. Este análisis se llevó a cabo con ensayos de liberación de Cr<sup>51</sup>.

Como células diana se utilizaron linfocitos de sangre periférica de pacientes infectados y de personas sanas, activados con PHA durante siete días y marcados con Cr<sup>51</sup>, así como células de una línea linfoblástica T humana CD4+.

Como células efectoras se utilizaron linfocitos T CD8+ seleccionados de sangre periférica de pacientes infectados y sanos mediante esferas inmunomagnéticas cubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-CD8. El fenotipo de estas células se analizó por citometría de flujo, comprobándose que expresaban CD8 en su superficie.

Características de las células efectoras seleccionadas:

**Pureza:**  $\geq 89\%$  CD8+

**Rendimiento:** 75-80%

**Viabilidad:**  $\geq 97\%$

**Contaminación por células NK:**  $\leq 1\%$

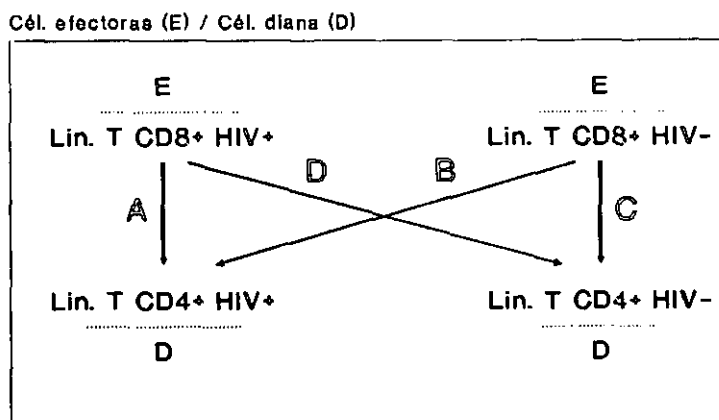
En primer lugar se realizó un estudio para comparar la respuesta citotóxica frente a una línea linfoblástica T humana CD4+, mediada por linfocitos de pacientes infectados y personas sanas. Esta respuesta se analizó en siete pacientes incluidos por su estado clínico en distintas categorías de la infección, A (2), B (2) y C (3), y cinco individuos sanos.

De los ensayos de liberación de Cr<sup>51</sup> se infirió que la respuesta citotóxica mediada por los linfocitos de los pacientes infectados frente a la línea tumoral era menor que la observada en el grupo control de sujetos sanos ( $p < 0,05$ ). La media del porcentaje de lisis correspondiente a cada grupo fue de  $10,8 \pm 6,9\%$  y  $21,4 \pm 8,9\%$  respectivamente (Figura 6.1).

Esta observación, acerca de una disminución de la respuesta citotóxica en pacientes seropositivos respecto a la capacidad citotóxica natural frente al desarrollo de tumores, mediada por células NK, también ha sido demostrada con otras líneas tumorales por otros investigadores (134).

En segundo lugar se estudió la respuesta citotóxica mediada por células T CD8+ de sujetos infectados frente a células T CD4+ procedentes de sujetos sanos o infectados, utilizando como control células T CD8+ de sujetos sanos y siguiendo el siguiente esquema de trabajo:

### DISTINTOS ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD



En los ensayos de citotoxicidad del tipo A y B, solamente se realizaron dos pruebas con linfocitos T CD8+ de un paciente infectado (Z61) y de un sujeto sano (N10), debido a que un óptimo marcaje con Cr<sup>51</sup> de las células diana, en este caso linfocitos de sangre periférica del paciente infectado, requería una previa estimulación con PHA. Esta estimulación induciría la activación del provirus en las células infectadas, lo cual dificultaría mantener una razonable viabilidad en los cultivos, necesaria para el marcaje con cromo de los linfocitos.

Además de esta dificultad, en aquellos pacientes infectados que muestren un estado de inmunodeficiencia muy avanzado, sería difícil obtener un número suficiente de linfocitos T CD4+ en la población de las células efectotas.

En estas pruebas se observó que los linfocitos T CD8+ del paciente infectado eran capaces de lisar linfocitos autólogos (% lisis = 29%), mientras que no se detectó ningún tipo de respuesta citotóxica por parte del sujeto sano.

Sin embargo, dado que nuestro interés estaba dirigido, no al estudio de CTLs específicos frente a antígenos virales, sino al estudio de la presencia de linfocitos T CD8+ frente a linfocitos T CD4+ no infectados, se realizaron los ensayos de citotoxicidad del tipo C y D.

Como células diana se utilizaron linfocitos de sangre periférica de sujetos sanos, estimulados con PHA y marcados con Cr<sup>51</sup>.

Como células efectoras se seleccionaron linfocitos T CD8+ de sangre periférica de 30 pacientes infectados incluidos en una categoría A1 (3), A2 (3), A3 (1), B1 (2), B2 (4), B3 (6), C1 (1), C2 (3) y C3 (7).

Como grupo control se utilizaron linfocitos T CD8+ de 10 sujetos sanos. Su citotoxicidad frente a linfocitos no infectados fue negativa, obteniéndose un porcentaje de lisis en todos los casos inferior al 5%.

En este estudio se observó que cuatro de los pacientes infectados seleccionados, un 14% del total, presentaban linfocitos T CD8+ capaces de lisar linfocitos estimulados con PHA de sujetos sanos. Estos pacientes se encontraban en estadios avanzados de la infección, B2, C3, C3 y C2 respectivamente (Figura 6.2).

El porcentaje de lisis obtenido en estos casos fue de un 47% (Z22), 12% (Z43), 22% (Z50) y 18% (Z52) (Figura 6.3). La relación célula efectora - célula diana, (E:D), en estos casos fue (4:1), (20:1), (3:1) y (25:1) respectivamente.

En estos ensayos de citotoxicidad se comprobó que la respuesta citotóxica estaba dirigida frente a la molécula CD4, ya que la lisis fue bloqueada en todos los casos con un anticuerpo monoclonal específico de CD4. Por otro lado, se confirmó que esta lisis estaba mediada por linfocitos T CD8+ debido a que su actividad citotóxica se podía inhibir con un anticuerpo monoclonal frente a CD8 (Figura 6.4).

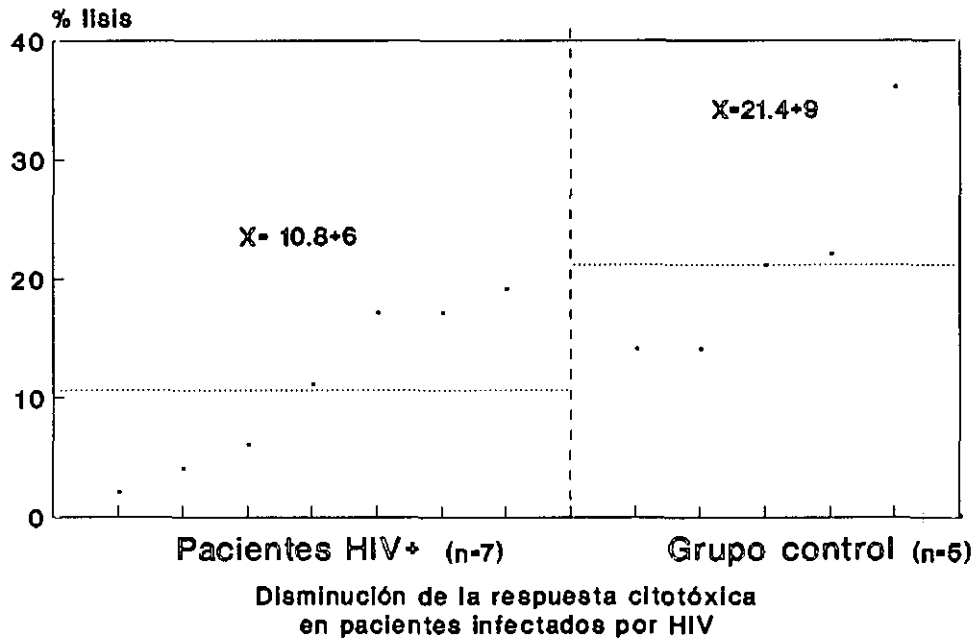
También se comprobó que esta respuesta citotóxica disminuía en función de la relación célula efectora / célula diana (E:D) (Figura 6.5).

Por último, se pudo confirmar que esta lisis no estaba dirigida frente a moléculas de clase II del Complejo mayor de Histocompatibilidad, ya que en ensayos paralelos se observó que no era inhibida con anticuerpos anti-DR. En la Figura 6.6 se muestra este ensayo en uno de los casos (Z43).

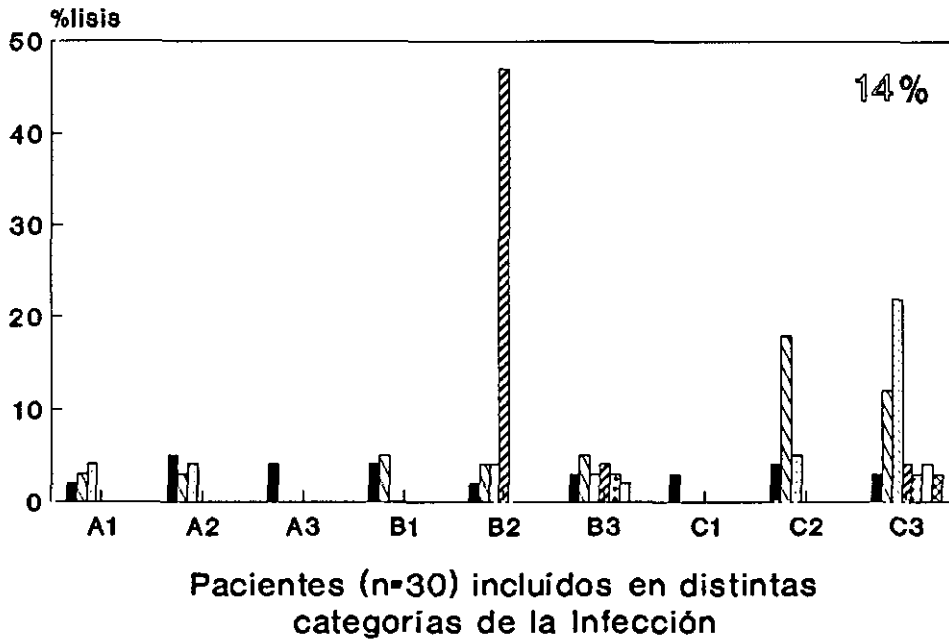
A pesar de que los cuatro pacientes, en los que se detectó esta respuesta citotóxica frente a células T CD4+ no infectadas, estaban en estadios muy avanzados de la infección y presentaban niveles de linfocitos T CD4+ en circulación menores a 400 células/ $\mu$ l, no se puede considerar que esta respuesta esté asociada a un estadio avanzado de la infección ya que no en todos los pacientes estudiados, incluidos en una categoría C, se detectó esta respuesta (Tabla 6.I).

Se trataría más bien, de un mecanismo patogénico más que aparece en algunos pacientes infectados por el virus de la Inmunodeficiencia Humana, que podría estar implicado en la depleción de linfocitos T CD4+ en estos casos.

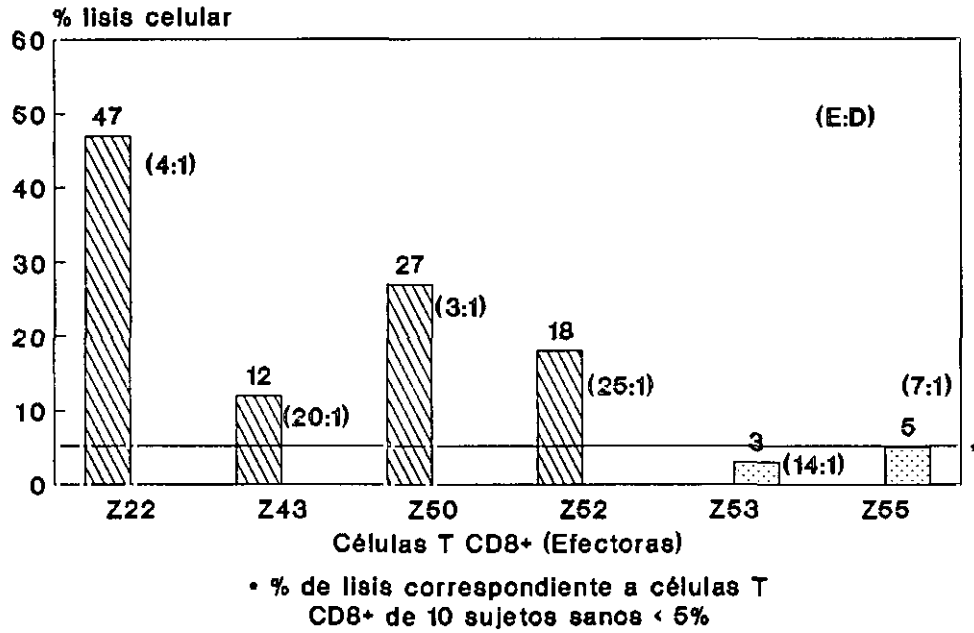
**FIGURA 6.1**  
**Respuesta citotóxica frente a una**  
**línea linfoblástica T humana CD4+**



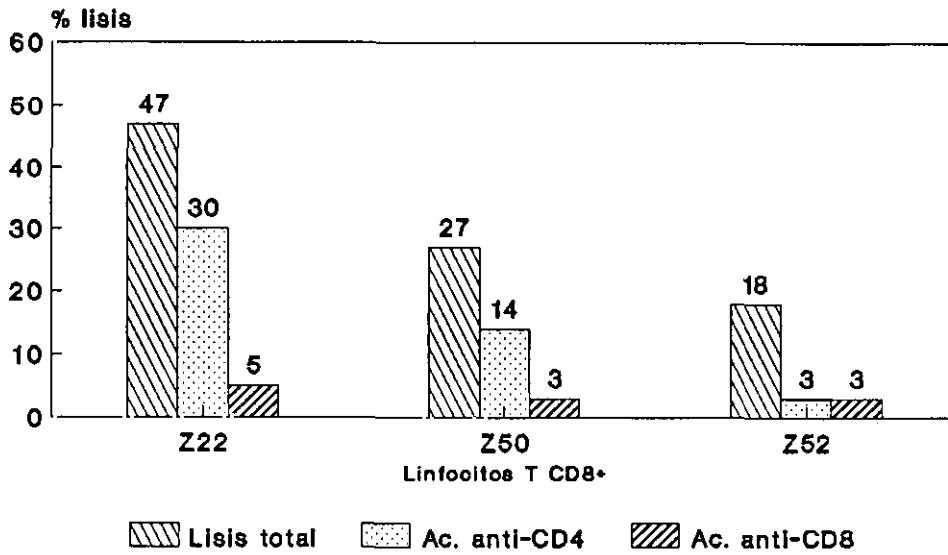
**FIGURA 6.2**  
**Incidencia de la respuesta citotóxica**  
**frente a células T CD4+ no infectadas**



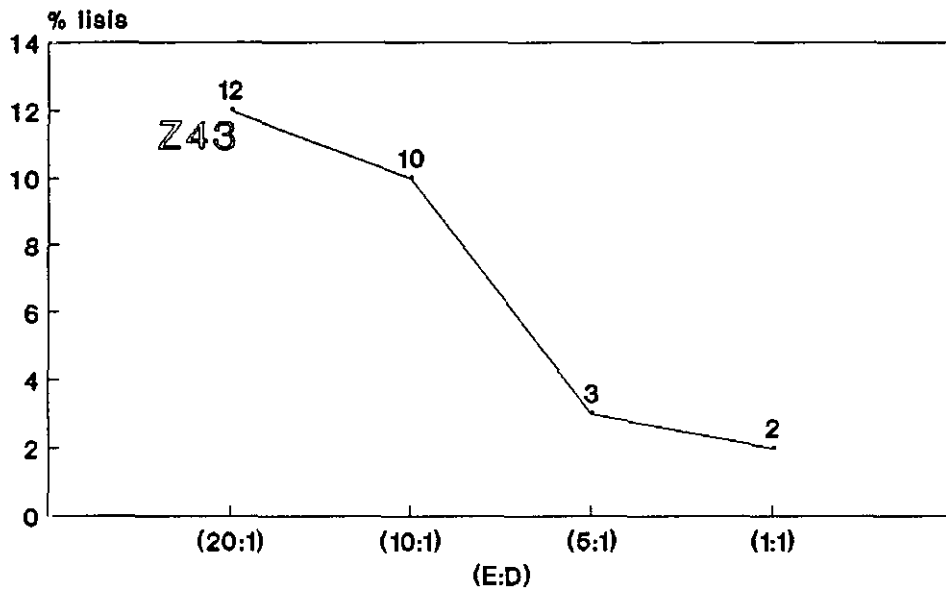
**FIGURA 6.3**  
**Respuesta citotóxica frente a PBLs**  
**por células T CD8+ de 6 pacientes**



**FIGURA 6.4**  
**Lisis inhibida por anticuerpos frente**  
**a CD4 y CD8**



**FIGURA 6.5**  
**Disminución de la lisis en función de**  
**la relación cél. efectora / cél. diana**



**FIGURA 6.6**  
**Lisis bloqueada por distintos**  
**anticuerpos monoclonales**

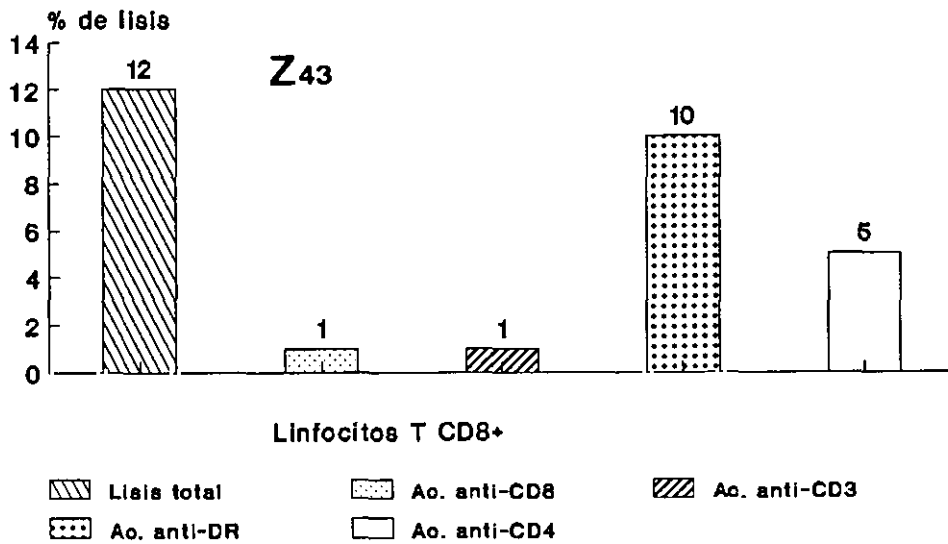


TABLA 6.I.- Datos referentes al estado de los pacientes infectados, cuyos linfocitos T CD8+ fueron utilizados como células efectoras en los ensayos de citotoxicidad celular.

Pac.	Lin. CD4+ / $\mu$ l	CLINICA	% Lisis
Z19	162	B3	Neg.
Z22	336	B2	Pos. 47%
Z36	165	B3	Neg.
Z37	315	B2	Neg.
Z40	195	B3	Neg.
Z41	114	A3	Neg.
Z42	472	A2	Neg.
Z43	7	C3	Pos. 12%
Z44	290	A2	Neg.
Z45	< 200	B3	Neg.
Z46	40	C3	Neg.
Z49	570	C1	Neg.
Z50	27	C3	Pos. 22%
Z51	240	B2	Neg.
Z52	217	C2	Pos. 18%
Z53	810	A1	Neg.
Z54	170	B3	Neg.
Z55	532	A1	Neg.
Z56	304	C2	Neg.
Z57	448	B1	Neg.
Z58	90	B3	Neg.
Z59	363	A2	Neg.
Z60	< 200	C3	Neg.
Z61	256	C2	Neg.
Z62	< 200	C3	Neg.
Z63	266	B2	Neg.
Z64	15	C3	Neg.
Z65	40	C3	Neg.
Z66	569	B1	Neg.
Z100	644	A1	Neg.

## **5.- DISCUSION FINAL**

- 5.1.- Implicación de los inmunocomplejos en la infección.
- 5.2.- Mecanismos autoinmunes implicados en la depleción de linfocitos T CD4+.

Con los resultados obtenidos se valoraron los dos objetivos planteados en esta tesis. En primer lugar, determinar la implicación de los inmunocomplejos circulantes en la infección y en segundo lugar, analizar la posible participación de un mecanismo autoinmune en la depleción de linfocitos T CD4+.

## 5.1.- IMPLICACION DE LOS INMUNOCOMPLEJOS EN LA INFECCION

Aunque el período de latencia previo al SIDA alcanza un término medio de 10 años una vez que se ha producido la infección, éste varía de una forma muy drástica de unos enfermos a otros (135).

Los factores que influyen en la progresión de la infección hacia un estado de Síndrome de Inmunodeficiencia no se conocen muy bien, a pesar de que sí se han descrito varios factores inmunológicos que se asocian con un peor pronóstico del sujeto infectado, como la disminución del número de linfocitos T CD4+ en sangre periférica o la disminución de anticuerpos anti-p24, que indican un grado de infección avanzado (89).

La elevada prevalencia de altos niveles de inmunocomplejos en el suero de pacientes infectados, remitidos al Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, fue un dato decisivo para valorar su posible implicación en la infección.

Niveles elevados de inmunocomplejos en pacientes seropositivos, determinados mediante ensayos de unión a C1q, así como defectos en el aclaramiento de éstos por el sistema retículo-endotelial, fueron inicialmente documentados en 1985 (112,136).

En este trabajo se observaron niveles elevados de inmunocomplejos ( $> 500 \mu\text{g/ml}$ ) en el 72% de los pacientes analizados, sin que la mayoría padeciese una patología asociada a Inmunocomplejos.

La presencia de niveles elevados no estaba asociada al estadio clínico del paciente, en cuanto a su relación con una de las tres categorías de la infección, pero sí existía una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar el grado de inmunodeficiencia de los pacientes, ya que de un grupo de 53 pacientes con niveles de linfocitos T CD4+ en circulación inferiores a  $500 \text{ células}/\mu\text{l}$ , 42 de ellos presentaban niveles de inmunocomplejos elevados, superiores a  $500 \mu\text{g/ml}$ , mientras que solo 11 de ellos tenían niveles de inmunocomplejos inferiores a  $500 \mu\text{g/ml}$ .

Al analizar la composición de los inmunocomplejos, en función de la presencia o no de antígeno p24, no se observó una diferencia significativa entre la detección de antígeno p24 en los inmunocomplejos y el estado clínico en el que se encontraban los pacientes ( $p > 0,05$ ).

Sin embargo, si se observó una diferencia significativa con respecto a los niveles de linfocitos en sangre periférica que presentaban los pacientes, observándose que la presencia en los inmunocomplejos de antígeno p24 es más frecuente en pacientes con niveles de linfocitos circulantes inferiores a  $500/\mu\text{l}$  ( $p < 0,05$ ).

Respecto a la presencia de antígeno p24 en los inmunocomplejos, Lange, et al., observaron que al principio de la infección el antígeno p24 circulante podía estar presente solo formando parte de los inmunocomplejos, y que en estadios más avanzados, además de detectarse antígeno p24 en los inmunocomplejos también se podía detectar libre en el suero (103). En nuestro estudio se observó que durante todo el curso de la infección se puede detectar antígeno p24 formando parte de los inmunocomplejos circulantes, ya que fue encontrado en inmunocomplejos aislados del suero de pacientes incluidos en diferentes categorías de la infección. En algunos pacientes, solo se detectó antígeno p24 en los inmunocomplejos y no en el suero.

Estos resultados indican que en algunos casos de la infección los inmunocomplejos podrían estar encubriendo la presencia de antígenos virales en circulación, al no ser detectados en suero, de tal forma que encubrirían una fase replicativa del virus.

Los inmunocomplejos en los que simultáneamente se detectaron anticuerpos frente al virus y antígeno p24, (Ac+Ag+), aparecían con mayor frecuencia en aquellos pacientes que por su estado clínico fueron incluidos en una categoría C de la infección (46%) y solamente fueron detectados en pacientes con niveles de linfocitos T CD4+ en circulación inferiores a  $500/\mu\text{l}$ .

La presencia de estos inmunocomplejos, Ac+Ag+, indicaría un mayor riesgo de progresión en la infección hacia un estado de SIDA.

Al valorar las distintas especificidades de los anticuerpos frente a las diferentes proteínas del virus, presentes en los inmunocomplejos, se determinó que anticuerpos anti-gp120 aparecían en el 100% de los casos analizados, mientras que la frecuencia de anticuerpos frente a las otras proteínas del virus era mucho menor, observándose que anticuerpos frente a gp41 solo aparecían en inmunocomplejos de pacientes con algún síntoma clínico, incluidos en una categoría B ó C de la infección.

Ante la observación en el suero de pacientes infectados de anticuerpos frente a la molécula CD4 por Muller et al. (137) y otros autoanticuerpos descritos frente a otras moléculas linfocitarias, como antígenos de clase II del Complejo mayor de Histocompatibilidad (95), se postuló la posible relevancia de un fenómeno autoinmune en la infección por HIV.

De acuerdo con estas observaciones, se analizó la presencia de actividad anti-CD4 en inmunocomplejos circulantes de pacientes infectados.

La actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos circulantes fue valorada en función de su capacidad de unirse a una molécula CD4 soluble recombinante o a esta molécula expresada en extractos de membrana de una línea linfoblástica T CD4+ humana. Respecto al primer tipo de valoración se obtuvo que un 16% de los inmunocomplejos mostraba una actividad anti-CD4.

Aunque esta actividad fue observada en un porcentaje muy bajo, y en los estudios de significación (Chi-cuadrado) no se observó una diferencia significativa entre el grado de infección y la presencia de actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos aislados de estos pacientes, no podemos descartar la hipótesis de que éstos tengan algún significado patogénico en algunos pacientes, ya que un 72% de los inmunocomplejos en los que se detectó esta actividad correspondían a pacientes con niveles de linfocitos circulantes inferiores a 500/ $\mu$ l.

La capacidad de unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 expresada en extractos de membrana celular fue observada en un porcentaje mayor de los pacientes, un 28%. Aunque no se reflejó una relación entre el estado clínico de los pacientes y la presencia de actividad anti-CD4 en los inmunocomplejos, sí se observó que la mayoría de los inmunocomplejos en los que se detectó esta actividad (85%) pertenecían a pacientes con niveles de linfocitos en sangre periférica inferiores a 500/ $\mu$ l.

La unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 podría estar mediada por la presencia en los inmunocomplejos de antígeno gp120 o bien, de anticuerpos antiidiotipo, es decir, anticuerpos dirigidos frente a anticuerpos específicos de la proteína gp120 del virus. Esta última hipótesis fue sugerida por Kowalsky, et al., al demostrar la presencia de autoanticuerpos frente a la molécula CD4 en el suero de algunos pacientes infectados (130).

Ante la observación *in vitro* de inmunocomplejos capaces de unirse a una molécula CD4 soluble recombinante o expresada en extractos de membrana, se estudió la capacidad de los inmunocomplejos de unirse a la superficie de linfocitos de sangre periférica.

De los doce casos en los que se observó una actividad frente a la molécula CD4 soluble recombinante, solo tres fueron capaces de unirse a la molécula CD4 expresada en la superficie celular.

La diferente capacidad de los inmunocomplejos de unirse a la molécula CD4, en función del estado en que se encuentre, bien en una forma recombinante soluble, expresada en extractos de membranas, o bien, en la superficie celular, podría ser debida a la diferente exposición de epítomos específicos de la molécula, que dependería de la estructura en que se encuentre la molécula, más o menos desnaturalizada.

La unión de los inmunocomplejos a la molécula CD4 y la hipótesis postulada por Morrow et al, sobre la presencia de partículas virales formando parte de los inmunocomplejos (138), son dos datos que suponen que los inmunocomplejos circulantes pueden producir en algunos casos un agravamiento de la infección al ser capaces de infectar nuevos linfocitos T CD4+.

La detección de antígeno p24 en los sobrenadantes de linfocitos de sangre periférica de sujetos sanos estimulados con PHA, cultivados en presencia de inmunocomplejos aislados del suero de pacientes infectados por HIV, confirmaría la capacidad de los inmunocomplejos de potenciar la infección. Esta capacidad de los inmunocomplejos ya fue demostrada *in vitro* por Robinson et al., quienes observaron la infección de macrófagos mediada por inmunocomplejos (84).

Estos resultados, junto a la detección por la reacción en cadena de la Taq ADN polimerasa de ADN viral integrado en el genoma de los linfocitos, fueron decisivos para adjudicar una capacidad infectiva a los inmunocomplejos.

La confirmación de ADN vírico integrado en el genoma celular se realizó previa extracción del ADN de los linfocitos cultivados en presencia de inmunocomplejos y amplificación de dos fragmentos diana del ADN viral, correspondientes a las regiones *env* y *pol*, con oligonucleótidos específicos y la enzima Taq ADN polimerasa.

Esta observación indica que los inmunocomplejos pueden estar implicados en la infección y que *in vivo*, podrían contribuir a la disminución de linfocitos T CD4+ al ser capaces de infectar nuevas células.

Al igual que en algunas infecciones, como las producidas por Herpesvirus, reovirus y flavivirus, en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana los anticuerpos producidos además de tener un papel protector, pueden ser considerados, algunas veces, como anticuerpos potenciadores de la infección (122).

La capacidad de los inmunocomplejos de inhibir el crecimiento de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA fue observada en un 33% de los casos analizados. La vía por la cual los inmunocomplejos bloquearon el crecimiento celular no ha sido analizada en este

trabajo, pero en otros trabajos, algunos investigadores han sugerido un modelo en el cual, la interacción de complejos gp120-anti-gp120 con la molécula CD4 generaría una señal a nivel de membrana que induciría un fenómeno de apoptosis (64).

Todos los resultados anteriores indican que los inmunocomplejos circulantes parecen tener un papel patogénico en la infección. Este papel supone que además de la función básica de defensa de nuestro organismo frente a microorganismos infecciosos que realizan los inmunocomplejos, la presencia de éstos en el suero puede tener también un efecto perjudicial.

Normalmente los inmunocomplejos se forman *in vivo* cuando los antígenos se unen a los anticuerpos como consecuencia de distintas reacciones inmunes. Estos complejos son eliminados de la circulación mediante células que presentan receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (RFc) en su superficie, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro Sistema linfático.

Sin embargo, en muchas enfermedades autoinmunes, infecciosas o neoplásicas, los inmunocomplejos se acumulan y causan graves alteraciones patológicas, como inflamación, inmunosupresión o trombocitopenia.

## **5.2.- MECANISMOS AUTOINMUNES IMPLICADOS EN LA DEPLECION DE LINFOCITOS T CD4+ .**

Los mecanismos patogénicos por los cuales la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana conduce a la depleción de linfocitos T CD4+ y al desarrollo de un Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida, no están suficientemente esclarecidos.

La idea de que otros mecanismos, además del propio efecto citopático del virus, estén implicados en la destrucción del Sistema Inmune de los pacientes infectados, está presente en las hipótesis que postulan muchos investigadores para explicar la disminución tan drástica de linfocitos T CD4+ que se produce en estos sujetos.

Actualmente existen algunas evidencias que sugieren un papel de la autoinmunidad en la patogénesis de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Se piensa que existe un proceso autoreactivo implicado en la inducción de un desequilibrio del Sistema Inmune de los pacientes infectados, aunque todavía no hay un acuerdo acerca del papel de este fenómeno en la patogénesis del SIDA.

Ante la detección en el suero de pacientes infectados de autoanticuerpos frente a moléculas linfocitarias (95-137), se analizó si una respuesta mediada por linfocitos T CD8+ frente a linfocitos T CD4+ no infectados podría existir o generarse durante la infección por el virus de la Inmunodeficiencia humana.

La respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos constituye un componente muy importante de la respuesta de nuestro organismo frente a muchas de las infecciones virales (139) y la disminución de una respuesta citotóxica específica frente al HIV, mediada por CTLs, asociada a la progresión de la infección (140), sugiere que esta respuesta podría tener un papel importante en la inhibición de la replicación viral.

En los ensayos de citotoxicidad realizados con linfocitos T CD8+, aislados de sangre periférica de pacientes infectados, se estudió la capacidad de estas células de lisar linfocitos no infectados de sujetos normales, estimulados con PHA. En este análisis se observó que existían linfocitos citotóxicos capaces de lisar linfocitos T CD4+ en un 14% de los pacientes estudiados.

La especificidad de esta respuesta fue comprobada inhibiendo la lisis con anticuerpos anti-CD4. Estos resultados indican que posiblemente esta respuesta esté también implicada en la patogénesis de la infección de estos pacientes.

Esta respuesta citotóxica frente a linfocitos T CD4+ no infectados sugiere que en la infección por HIV podría generarse un fenómeno autoinmune, que estaría implicado en la depleción de linfocitos T CD4+.

Una respuesta autoinmune frente a linfocitos no infectados mediada por linfocitos T citotóxicos fue observada por Zarling et al., en algunos pacientes infectados (141). Estos investigadores observaron que esta respuesta dirigida frente a alguna molécula de la superficie de linfocitos no aparecía en monos infectados y propusieron que esta respuesta citotóxica podría estar implicada en la patogénesis de la infección.

## **6.- CONCLUSIONES**

1.- Los Inmunocomplejos circulantes parecen tener un papel patogénico en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, teniendo en cuenta que niveles elevados en suero, superiores a 500 µg/ml, y la presencia de antígeno p24 formando parte de los Inmunocomplejos se asocian con una progresión de la infección hacia un estado de SIDA y que los inmunocomplejos son capaces de unirse *in vitro* a la molécula CD4, de inhibir la proliferación de linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA y de potenciar la infección de linfocitos de sujetos sanos mantenidos en cultivo.

2.- En algunos pacientes infectados aparece una respuesta citotóxica frente a linfocitos T CD4+ de sujetos sanos mediada por linfocitos T CD8+. Este hallazgo sería una evidencia más de que otros procesos, verosimilmente de naturaleza autoinmune, podrían estar implicados, además del efecto citopático del virus, en la depleción de linfocitos T CD4+.

## **7.- BIBLIOGRAFIA**

1. Gottlieb, M., Schroff, R., Schanker, H. y Weisman, J. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *N. Engl. J. Med.*, 305: 1425-1430. (1981).
2. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F. y Palker, T. J. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. *Science* 224: 500-503. (1983).
3. Gonda, M. A., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Clements, J. E., Narayan, O. y Gilden, R. V. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and Visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science*, 227: 173-177. (1985).
4. Chiu, I., Yaniv, A. y Dahlberg, J. E. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentivirus. *Nature*, 317: 366-8. (1985).
5. Clavel, F., Guetard, D. y Brun-Vezinet, F. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233: 343-6. (1986).
6. Smith, T. F., Srinivasan, A., Schochetman, G. y Marcus, M. The phylogenetic history of immunodeficiency viruses. *Nature*, 333: 573-5. (1988).
7. Chakrabarti, L., Guyader, M. y Alizon, M. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retrovirus. *Nature*, 328: 543-7. (1987).
8. Robey, W., Safai, B., Oroszlan, S., Arthur, L., Gonda, M., Gallo, R. C. y Fischinger, P. T. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science*, 228: 593-5. (1985).
9. Allan, J. S., Coligan, J., Groopman, J. y Essex, M. A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science*, 230: 810-15. (1985).
10. Fisher, A. G., Feinberg, M. B. y Joseph, A. F. The transactivator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature*, 320: 367-371. (1986).
11. Nafees, A. y Venkatesan, S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science*, 241: 1481-5. (1988).
12. Sodroski, J., Goh, W. C. y Rosen, C. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with *src* gene deletions. *Science*, 231: 1549-53. (1986).
13. Wong-Staal, F., Chanda, P. y Ghayeb, J. Human Immunodeficiency virus: the eighth gene. *Res. Hum. Retrovirus*, 3: 33-9. (1987).
14. Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Sodroski, J. G. y Haseltine, W. A. Identification of a protein encoded by the *vpu* gene of HIV-1. *Nature*, 334: 532-4. (1988).
15. McDougal, J. S., Klatzmann, D. R. y Maddon, P. J. CD4-gp120 interactions. *Immunol.*, 3: 552-8. (1991).

16. Patterson, S. y Knight, S. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, 68: 1177-1183. (1987).
17. Gyorkey, F., Melnick, J. L., Sivikovic, J. C., et al. Retrovirus resembling HTLV in macrophages of patients with AIDS. *Lancet* i, 106. (1985).
18. Deen, K. C., McDougal, J. S., e Inacker, R. A soluble form of CD4 protein inhibits AIDS virus infection. *Nature*, 331: 84-6. (1988).
19. Spickett, G. y Dalglish, A. C. Cellular immunology of HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 71: 1-7. (1988).
20. Clayton, L. K., Hussey, R. E., y Steinbrich, R. Substitution of murine for human CD4 residues identify aminoacids critical for HIV-gp120 binding. *Nature*, 335: 363-6. (1988).
21. Goudsmith, J., Debouck, C., Meloen, R. H., Smit, L. Bakker, M., Asher, D. M., et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4478. (1988).
22. Ivey-Hoyle, M., Culp, J. S., Chaikin, M. A., Hellmig, B. D., Matthews, T. J., et al. Envelope glycoproteins from biologically diverse isolates of HIV have widely different affinities for CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 512-16. (1991).
23. Qureshi, N. M., Coy, D. H., Garry, R., Henderson, L. A. Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS* 4: 553. (1993).
24. Callebaut, C., Krust, B., Jacotot, E. y Hovanessian, A. T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ Cells. *Science*, 262: 2045-2050. (1993).
25. Stephens, P. E., Clements, G., Yarranton, G. T., y Moore, J. A chink in HIV's armour?. *Nature*, 343: 219. (1990).
26. Barnett, S. W., Quiroga, M., Werner, A. Dina, D. y Levy, J. A. Distinguishing features of an infectious molecular clone of the highly divergent and noncytopathic human immunodeficiency virus type 2 UC1 strain. *J. Virol.* 67: 1006. (1990).
27. Morimoto, C. J., Torimoto, Y., Levinson, G., Rudd, C. E., Schrieber, M., Dang, N. H., et al. 1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. *J. Immunol.*, 143: 3430-9. (1989).
28. Dalglish, A., Beverly, P., Claphan, P., et al. The CD4 antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312: 763-766. (1984).
29. Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J., et al. pH-Independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*, 49: 659-668. (1987).
30. Bedinger, P., Moriarty, A., von Borstle, R., et al. Internalization of the human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4. *Nature*, 334: 162-5. (1988).

31. Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., et al. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*, 237: 1351-1355. (1987).
32. Fisher, A. G., Ratner, L., Mitsuya, H., et al. Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science*, 223: 655-9. (1986).
33. Luciw, P., Cheng-Mayer, C. y Levy, J. A. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc. Acad. Sci. USA*, 84: 1434-8. (1987).
34. Gendelman, H.E., Phrlps, W., Feigenbaum, L., et al. Transactivation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequences by DNA virus. *Nature*, 325: 67-70. (1986).
35. Jones, K.A., Kadonga, J.T., Luciw, P.A. y Tijain, R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by cellular transcription factor, SP1. *Science*, 231: 755-9. (1986).
36. Nabel, G. y Baltimore, D. An inducible transcription factor activates expression of immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, 326: 711-13. (1987).
37. Cooper, D. A., Gold, J., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T., et al. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*, i: 537-540. (1985).
38. Koeng, S., Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., DalCanto, M. C., Pezeshkpour, G. H., et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*, 223: 1089-1093. (1986).
39. Price, R. W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A., y Cleary, P. The brain in AIDS: Central Nervous System HIV-infection and AIDS dementia complex. *Science*, 239: 586-592. (1988).
40. Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onarato, I., Holzman, R. S., Wormser, G., et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.*, 305: 1431-1438. (1981).
41. Ziegler, J. L., Beckstead, J. A., Volberding, P. A., Abrams, D. I., Levine, A. M., Lukes, R. J., et al. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relationship to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Eng. J. Med.*, 311: 565-570. (1984).
42. Allegra, C. J., Chabner, B. A., Tuazon, C. U., Ogata-Aratiki, D., Baird, B., Drake, J. C., Simmons, J. T., et al. Trimetrexate for the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 317: 987-984. (1987).
43. Collaborative DHPG treatment study group: treatment of serious cytomegalovirus infection with 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil) guanina in patients with AIDS. *N. Engl. J. Med.*, 314: 801-805. (1986).

44. Fauci, A. S., Macher, A. M., Longo, D. L., Lane, H., Rook, A. H., Masur, H., y Gelmann, E. P. Acquired immunodeficiency syndrome: Epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. *Ann. Inter. Med.*, 100: 92-106. (1984).
45. Kovacs, J. A., y Masus, H. Opportunistic infections. In: *AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention*, 2nd ed., edited by DeVita, V., Hellman, S., y Rosenberg, S., pp. 199-266. Lippincott, Philadelphia. (1988).
46. Stahl, R. E., Friedman-Kien, A., Durbin, R., Marmor, M., y Zolla-Pazner, S. Immunologic abnormalities in homosexual men: Relationship to Kaposi's sarcoma. *Am. J. Med.*, 73: 171-178. (1982).
47. Ensoli, B., Biberfeld, P., Nakamura, S., Salahuddin, S. Z., Wong-Staal, F. y Gallo, R. C. Possible role of growth factors and cytokines in pathogenesis of Kaposi's sarcoma. In: *Abstracts of the IV International Conference on AIDS, Book 2, June 12-16, Stockholm, Sweden*, p. 137. (1988).
48. Lane, H. C., Masur, H., Edgar, L. C., Whalen, G., Rook, A. y Fauci, A. S. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 309: 453-458. (1983).
49. Donahue, R. E., Johnson, M. M., Zon, L. I., Clark, S. C., y Groopman, J. E. Suppression of in vitro hematopoiesis following human immunodeficiency virus infection. *Nature*, 326: 200-203. (1987).
50. Stricker, R. B., Abrams, D. I., Corash, L., y Shuman, M. A. Target platelet antigen in homosexual men with immune thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.*, 313: 1375-1380. (1985).
51. Bernstein, L. J., Krieger, B. Z., Novick, B., Sicklick, M. J., y Rubinstein, A. Bacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome in children. *Pediatr. Infect. Dis.*, 4: 472-475. (1985).
52. Centers for Disease Control and Prevention U. S. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 41 (RR-17): 1-19. (1992).
53. Acelle-Park, R. A., Stroobant, A., Smith, E., Haikala, O., Koch, M. A., et al. European AIDS definition. *Lancet*, 339:671. (1992).
54. Fauci, A. S. the human immunodeficiency virus: Infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 238: 617-622. (1988).
55. Weller, S. K., Joy, A. E., y Temin, H. M. Correlation between cell killing and massive second-round superinfection by members of some subgroups of avian leukosis virus. *J. Virol.*, 33: 494-506. (1980).
56. Lifson, J. D., Reyes, G. R., McGrath, M. S., Stein, B. S., y Engleman, E. G. AIDS retrovirus induced cytopathology: Giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science*, 232: 1123-1127. (1986).

57. Walker, B. D., Chakrabarti, S., Moss, B., et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature*, 328: 345-348. (1987).
58. Gatner, S., Markovits, P., Kaplan, M. H., Gallo, R. C. y Popovic, M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-II/LAV infection. *Science*, 233: 215-219. (1986).
59. Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T., Berman, P., y Abrignani, S. T cell can present antigens such as HIV gp120 targetted to their own surface molecules. *Nature*, 334: 530-532. (1988).
60. Kornfeld, H., Cruikshank, W. W., Pyle, S. W., Berman, J. S. y Center. D. Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature*, 335: 445-8. (1988).
61. Cohen, J. J., Duke, R. C., Fadok, V., y Sellius, K. S. Apoptosis and programed cell death in immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 10:267-93. (1992).
62. Meyaard, L., Otto, S. A., Jonker, R. R., Mijster, M. J., Keet, R. P.; y Miedema, F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science*, 257: 217. (1992).
63. Groux, H., Torpier, G., Monte, D., Mouton, Y., et al. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J. Exp. Med.*, 175: 331-40. (1992).
64. Banda, N. K., Bernier, J., Kurahara, D. K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R. P., et al. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 176: 1099. (1992).
65. Dalgleish, A. G., Wilson, S., Gompels, M., Ludlam, C., Gazzard, B., Coates, A. M., et al. T-cell receptor variable gene products and early HIV-1 infection. *Lancet*, 339: 824. (1992).
66. Schnittman, S. M., Lane, H. C., Greenhouse, J., Justement, J. S., Baseler, M. y Fauci, A. S. Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 6058. (1990).
67. Bukrinsky, M. I., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P., Stevenson, M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science*, 254: 423. (1992).
68. Germain, R. N. Antigen processing and CD4+ T cell depletion in AIDS. *Cell* 54: 441-444. (1988)
69. Yarchoan, R., Redfiel, R. R., y Broder, S. Mechanims of B cell activation in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. Contribution of antibody-producing B cells, of Epstein-Barr virus-infected B cells, and of immunoglobulin production induced by human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J. Clin. Invest.*, 78: 439-447. (1986).
70. Stricker, R. B., Mchugh, T. M., Moody, D. J., Morrow, W. J., Stites, D. P., et al. An AIDS-related cytotoxic autoantibody reacts with a specific antigen on stimulated CD4+ cells. *Nature*, 327: 710-713. (1987).

71. Heriot, K., Hallquist, A. E., y Tomar, R. H. Paraproteinemia in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or lymphadenopathy syndrome (LAS). *Clin. Chem.*, 31: 1224-1226. (1985).
72. Pahwa, R., Good, R. A., y Pahwa, S. Prematurity, hypogammaglobulinemia, and neuropathology with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3826-3830. (1987).
73. Schnittman, S. M., Lane, H. C., Higgins, S. E., Folks, T., y Fauci, A. S. Direct polyclonal activation of human B lymphocytes by the acquired immunodeficiency syndrome virus. *Science*, 233: 1084-1086. (1986).
74. Gurney, M. E., Heinrich, S. P., Lee, M. R., y Yin, H. Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotropic factor for spinal and sensory neurons. *Science*, 234: 566-574. (1986).
75. Birx, D. L., Redfield, R. R., y Tosato, G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N. Engl. J. Med.*, 314: 874-879. (1986).
76. Montagnier, L., Gruest, J., Chamaret, S., Daugnet, C., Axler, C., Guetard, D., et al. Adaptation of lymphadenopathy-associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science*, 225: 63-66. (1984).
77. Groopman; J. E., Sullivan, J. L., Mulder, C., Ginsburg, D., Orkin, S. H., O'Hara, C., Falchuk, K., et al. Pathogenesis of B cell lymphoma in patients with AIDS. *Blood*, 67: 612-615. (1986).
78. Ho, D. D., Rota,, T. R., y Hirsch, M. S. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J. Clin. Invest.*, 77: 1712-1715. (1986).
79. Folks, T. M., Kessler, S., Cottler-Fox, M., Justement, J., Orenstein, J., y Fauci, A. S. Infection and replication of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in purified CD4 negative precursor cells from normal bone marrow. In: Abstracts of the IV International Conference on AIDS, Book 1. June 12-16, Stockholm, Sweden, p 180. (1988).
80. Nelson, J. A., Wiley, C. A., Reynolds-Kohler, C., Reese, C. E., Margaretten, W., y Levy, J. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet*, 1: 259-262. (1988).
81. Pomerantz, R. J., de la Monte, S., Donegan, S. P., Rota, T. R., Vogt, M., Craven, D. E., et al. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of the uterine cervix. *Ann. Inter. Med.*, 108: 321-327. (1988).
82. Koenig, S., Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Dal Canto, M. C., Pezeshkpour, G. H. Yungbluth, M., et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*, 223: 1089-1093. (1986).

83. Moscicki, R. A., Amento, E. P., Krane, J. T., y Colvin, R. B. Modulation of surface antigens of a human monocyte cell line, U937, during incubation with T lymphocyte-conditioned medium: detection of T4 antigen and its presence on normal blood monocytes. *J. Immunol.*, 131:743-748. (1983).
84. Robinson, W. E., Montefiori, D. C., y Mitchel, W. M. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type I infection. *Lancet*, 1: 790-794. (1988).
85. Prince, H. E., Moody, D. J., Shubin, B. J., y Fahey, J. L. Defective monocyte function in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): Evidence from a monocyte-dependent T-cell proliferative system. *J. Clin. Immunol.*, 5: 21-25. (1985).
86. Rook, A. H., Masur, H., Lane, H. C., Frederick, W., Kasahara, T., Macher, A. M., et al. Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Invest.*, 72: 398- 403. (1983).
87. McDougal, J. S., Kennedy, M. S., Nicholson, J. et al. Antibody response to human immunodeficiency virus in homosexual men: Relation of antibody specificity, titre, and isotype to clinical status, severity of immunodeficiency, and disease progression. *J. Clin. Invest.*, 80: 316-24. (1987).
88. Lange, J. M., Paul, D. A., Huisman, H. G., et al. Persistent HIV antigenaemia and decline of HIV core antibodies associated with transition to AIDS. *Br. Med. J.* 293: 1459-62. (1986).
89. Sanz, F. J., García, R. y Ortiz, F. Evaluación inmunológica de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Inmunología*, Vol. 10, 3: 24-29. (1991).
90. Simmonds, P., Lainson, F., Cuthbert, R., et al. HIV antigen and antibody detection: Variable responses to infection in the Edinburgh haemophilic cohort. *Br. Med. J.* 296: 593-8. (1988).
91. Lange, J. M., de Wolf, F., Krone, W. J., et al. Decline of antibody reactivity to outer viral core protein p17 is an earlier serological marker in disease progression in human immunodeficiency virus infection than anti-p24 decline. *AIDS*, 1: 155-9. (1987).
92. Ranki, A., Valle, S., Krohn, M, et al. Long latency precedes sero-conversion in sexually transmitted HIV infection. *Lancet*, ii: 589-92. (1987).
93. Weiss, R. A., Clapham, P. R., et al. Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature*, 316: 69-72. (1985).
94. Palker, T. J., Matthews, T. J., Clark, M. E., Cianciolo, G. J., Randall, R. R., Langlois, A. J., et al. A conserved region at the COOH terminus of human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein contains an immunodominant epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2479-2483. (1987).
95. Golding, H., Rober, F. A., Gates, F. T., Linder, W., Beining, P. R., Hoffman, T., y Golding, B. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II  $\beta$  1 domain. *J. Exp. Med.*, 167: 914-923. (1988).

96. Wahren, B., Morfeldt-Manson, L., Biberfeld, G., Moberg, L., Sönnerborg, A., Ljungman, P., et al. Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.*, 61: 2017-2023. (1987).
97. Pantaleo, G., De María, A., Koenig, S., Butini, L., Moss, B., Baseler, M., et al. CD8+ lymphocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4818-4822. (1990).
98. Koenig, S., Earl, P., Powell, D., Pantaleo, G., Merli, S., Moss, B., y Fauci, A. S. Group-specific, MHC class I restricted cytotoxic responses to HIV-1 envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1 infected individual. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8638. (1988).
99. Johnson, R. P., Trocha, A., Yang, L., Mazzara, G., Panicali, D., Buchanan, T, y Walker, B. HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes recognize multiple highly conserved epitopes: fine specificity of the gag-specific responses by using unstimulated peripheral blood mononuclear cells and cloned effector cells. *J. Immunol.*, 147: 1512. (1991).
100. Walker, B. D., Flexner, C., Paradis, T., Fuller, T. C., Hirsch, M., Schooley, R., y Moss, B. HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocytes in infected individuals. *Science*, 240: 64. (1988).
101. Brinchmann, J., Gaudernack, G., y Vartdal, F. CD8+ cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J. Immunol.*, 144: 2961-2966. (1990).
102. Levy, J. A. Mysteries of HIV: Challenges for therapy and prevention. *Nature*, 333: 519-522. (1988).
103. Lange, J. M., Paul, D. A., De Wolf, F., Coutinho, R. A., Goudsmit, J., et al. Viral gene expression, antibody production and immune complex formation in human immunodeficiency virus infection. *AIDS*, 1:15-20. (1987).
104. Allain, J. P., Laurian, Y., Paul, D., Verroust, F., Leuther, M., Gazengel, M., et al. Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. Potential clinical importance. *N. Engl. J. Med.*, 317: 1114-1121. (1987).
105. Franchini, G., Robert-Guroff, M., Aldovini, A., Kan, N. C., y Wong-Staal, F. Spectrum of natural antibodies against five HTLV-III antigens in infected individuals: Correlation of antibody prevalence with clinical status. *Blood*, 69: 437-441. (1987).
106. Chent-Mayer, C., Seto, D., Tateno, M., y Levy, J. Biologic features of HIV that correlate with virulence in the host. *Science*, 240: 80-82. (1988).
107. Amadori, A., Zamarchi, R., Ciminale, V., et al. HIV-1-specific B cell activation. A major constituent of spontaneous B cell activation during HIV-1 infection. *J. Immunol.* 143: 2146-2152. (1989).

108. Pahwa, S., Quilop, M. T., Lange, M., Pahwa, R. N., y Grieco, M. H. Defective B-lymphocyte function in homosexual men in relation to the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 101: 757-763. (1984).
109. Morris, L., Distenfeld, A., Amorosi, E., y Karparkin, S. Autoimmune thrombocytopenia purpura in homosexual men. *Ann. Int. Med.*, 96: 714. (1982).
110. Walsh, C. M., Nardi, M. A., y Karparkin, S. On the mechanism of thrombocytopenic purpura in sexually active homosexual men. *N. Engl. J. Med.*, 311: 635-639. (1984).
111. Kopelman, R. G. y Zolla-Pazner, S. Association of human immunodeficiency virus infection and autoimmune phenomena. *Am. J. Med.*, 84: 82-8. (1988).
112. McDougal, J. S., Hubbard, M., Nicholson, J., Jones, B., Holman, R. C., Roberts, J., et al. Immunocomplexes in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): relationship to disease manifestation, risk group, and immunologic defect. *J. Clin. Immunol*, 5: 130-8. (1985).
113. Sonnabend, J., Witkin, S.S., y Purtilo, D. T. Acquired immunodeficiency syndrome, opportunistic infections, and malignancies in male homosexuals. A hypothesis of etiologic factors in pathogenesis. *JAMA*, 249 (17):2370-4. (1983).
114. Oldstone, M. B. A. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*, 50: 819-820. (1987).
115. Andrieu, J. M., Even, P., y Venet, A. AIDS and related syndromes as a viral-induced autoimmune disease of the immune system: an anti-MHC II disorder. Therapeutic implications. *AIDS Res.*, 2: 163. (1986).
116. Golding, H., Shearer, G. M., Hillman, K., et al. Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV) I-GP41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV 1- infected individuals. *J. Clin. Invest.* 83: 1430-1435. (1989).
117. Auffray, C. y Novotny, J. Speculations on sequence homologies between the fibronectin cell-attachment site, major histocompatibility antigens, and a putative AIDS virus polypeptide. *Hum. Immunol.*, 15: 381-390. (1986).
118. Procaccia, S., Lazzarin, A., Colucci, A., Gasparini, A., Forcellini, P. y Lazzarin, D. IgM, IgG and IgA rheumatoid factors and circulating immune complexes in patients with AIDS and AIDS-related complex with serological abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.*, 67: 236-244. (1987).
119. Lange, J. M., Paul, D. A., De Wolf, F., Coutinho, R. A. y Goudsmit, J. Viral gene expression, antibody production and immunocomplex formation in human immunodeficiency virus infection. *AIDS*, 1:15-20. (1987).
120. Weber, J., Cheingsong-Popov, R. y Panagiotide, C. HIV core proteins in AIDS pathogenesis. In *UCLA Symposium on human Retrovirus*, New York, (1989).

121. Tausk, F. A., McCutchan, J. A., Spechko, P., Scjreiber, R. D., y Gigli, I. Altered erythrocyte C3b receptor expression, immune complexes, and complement activation in homosexual men in varying risk groups for acquired immune deficiency syndrome. *J. Clin. Invest.*, 78: 977-982. (1986).
122. Bolognesi, D. AIDS. Do antibodies enhance the infection of cells by HIV?. *Nature*, 340: 431-2. (1989).
123. Amadori, A y Chieco-Bianch, L. B-cell activation and HIV infection: deeds and misdeeds. *Immunol. Today*, Vol.11, 374. (1990).
124. Kestens, L., Hoofd, G., Gigase, P. L., Deleys, R., et al. HIV antigen detection in circulating immune complexes. *J. Virol. Methods*, 31: 67-76. (1991).
125. Silvestris, F., Azzolini, C. y Dammascco, F. Differential isotype expression and binding properties of T cell-reactive antibodies in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *J. Clin. Immunol.*, 2:107-115. (1992).
126. Mullis, K. B., Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350. (1987).
127. Kwok, S., Kellogg, D. E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., y Sninsky, J. J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids. Res.*, 18: 999-1005. (1990).
128. Bancroft, H. *Introduction to Biostatistics*. New York. Eds. Hoeber-Harper. (1975).
129. Amadori, A., de Silvestro, G., Zamarchi, R., Veronese, M. L., Mazza, M. R., Schiavo, G., et al. CD4 epitope masking by gp120/anti-gp120 antibody complexes: A potencial mechanism for CD4+ cell funtion Down-Regulation in AIDS patients. *J. Immunol.*, 148: 2709-2716. (1992).
130. Kowalski, M., Blair, A., Basiripour, L., Lu, Y, Blohm, D, Haseltine, W y Sodroski, J. Antibodies to CD4 in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3346. (1989).
131. Thiriati, C., Goudsmith, J., Schellekens, P., Barin, F., Zagury, D., et al. Antibodies to sCD4 in HIV-1 infected individuals. *AIDS*, 2: 345. (1988).
132. Mathiesen, T., Sonnerborg, A., y Wahren, B. Detection of antibodies against myelin basic protein and increased level of HIV IgG antibodies and HIV antigen after stabilization of immune complexes in sera and CFS of HIV infected patients. *Viral Immunol.*, 2: 1. (1989).
133. Ziegler, J., y Stites, D. O. Hypothesis: AIDS is an autoimmune disease directed at the immune system and triggered by a lymphotropic retrovirus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 41: 305. (1986).

134. Brenner, B. G., Gryllis, C., Gornitsky, M., y Wainberg, M. A. Changes in natural immunity during the course of HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 93(2): 142-8. (1993).
135. Fauci, A. S. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann. Inter. Med.*, 114: 678-93. (1991).
136. Bender, B. S., Quinn, T. C., y Spivak, J. L. Homosexual men with thrombocytopenia have impaired reticuloendothelial system Fc receptor-specific clearance. *Blood*, 70: 392-5. (1987).
137. Müller, C., Kukel, S., y Baver, R. Relationship of antibodies against CD4+ T cells in HIV-infected patients to markers of activation and progression: autoantibodies are closely associated with CD4 cell depletion. *Immunology*, 79: 248-254. (1993).
138. Morrow, W. J., Wharton, M., Stricker, R. B. y Lavy, J. A. Circulating immune complexes in patients with acquired-immune deficiency syndrome contain the AIDS-associated retrovirus. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 40:515-524. (1986).
139. Tsubota, H., Lord, C. I., Watkins, D., Morimoto, C. and Letvin. A cytotoxic T lymphocyte inhibits AIDS virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 169: 1421. (1989).
140. Hoffenbach, A., Langlade-Demoyen, P., Dadaglio, G., Vilmer, E., Michel, F., Mayaud, C., Autran, B., y Plata, F. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Immunol.*, 142: 452. (1989).
141. Zarling, J. F., Ledbetter, J. A., Sias, J., Fultz, P., Eichberg, J., Gjeset, G., y Moran, P. HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4+ cells. *J. Immunol.*, 144: 2992-98. (1990).