

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Investigación traslacional en enfermedades infecciosas: análisis de la activación crónica del sistema inmune en la hepatitis C crónica y estudio de la actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pilar García Broncano

Directoras

Salvador Resino García
María de los Ángeles Muñoz Fernández

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Investigación traslacional en enfermedades infecciosas:
análisis de la activación crónica del sistema inmune en la
hepatitis C crónica y estudio de la actividad antiviral *in vitro* e
in vivo de nanopartículas**

Pilar García Broncano

Directores de Tesis:

Dr. Salvador Resino García

Dra. María de los Ángeles Muñoz Fernández

Laboratorio de Infección Viral e Inmunidad (ISCIII)

Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular (HGUGM)

Madrid, 2017

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Laboratorio de Infección Viral e Inmunidad del Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), bajo la dirección del Dr. Salvador Resino García y en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) de Madrid, bajo la dirección de la Dra. María de los Ángeles Muñoz Fernández. El trabajo de investigación que constituye esta Memoria ha sido realizado gracias a la financiación concedida por el 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (FIS) del Ministerio de Competitividad y Economía con número de expediente FI12/00032 en concepto de "Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación Sanitaria" (PFIS). El proyecto de investigación "Erradicación del VHC en pacientes coinfectados por VIH/VHC: efectos sobre la inflamación, el daño endotelial, la activación inmune y la aterosclerosis preclínica" con número de expediente PI11/00245FIS (2012-2016). El proyecto de investigación "Efecto de nuevas generaciones de dendrímeros con prevención dual frente al VIH/VHS-2: caracterización y prueba de concepto" con número de expediente PI16/01863 y la RED de Investigación en SIDA con los números de expediente RD16CIII/0002/0002 y RD16/0025/0019.



El Dr. Salvador Resino García, Jefe del Laboratorio de Infección Viral e Inmunidad del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III y la Dra. María Ángeles Muñoz-Fernández, Jefa de Sección del Servicio de Inmunología, Jefa del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular y Directora del BioBanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

CERTIFICAN QUE,

El trabajo de investigación y la redacción de la Tesis Doctoral titulada: **“Investigación traslacional en enfermedades infecciosas: análisis de la activación crónica del sistema inmune en la hepatitis C crónica y estudio de la actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas”** ha sido realizado por Pilar García Broncano bajo su dirección. Revisado el trabajo, los que suscriben consideran el trabajo como satisfactorio y autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que quede constancia de ello, firmamos en presente documento.

Madrid, 21 de Abril de 2017.

Fdo. Dr. Salvador Resino García

Fdo. Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

**Aprendizaje es experiencia,
todo lo demás es información**

Albert Einstein

*A mis padres
y a mi hermano,*

Agradecimientos

He de reconocer que no ha sido un camino de rosas, aunque bien es cierto que no existen rosas sin espinas. Muchas veces pensé en tirar la toalla, pero gracias a todos vosotros hoy estoy aquí, terminando una etapa que me ha hecho crecer y madurar como persona. Demasiadas veces llegué a pensar que nunca llegaría este momento, pero eso sí, algo que nunca me imagine es que estaría tan lejos de vosotros y que sería tan difícil expresar todo lo que siento, aunque con estas palabras intentaré demostraros todo mi agradecimiento por estos años apoyándome, nunca podré deciros todo lo que de verdad os merecéis y significáis para mí.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis por darme la oportunidad de trabajar con vosotros y haber apostado por mí desde el principio. Salva, gracias por la confianza que depositaste en mí y por darme la oportunidad de realizar este trabajo, a pesar de los contratiempos lo conseguimos!. M. Ángeles gracias por tu dedicación y constancia, y por abrirme las puertas de tu laboratorio cuando lo necesité, pero sobre todo gracias por tu apoyo moral que ha sido el más importante para darme fuerzas y llegar a la meta sin perder la ilusión, siempre con tus frases de ánimo para todos.

El más sincero agradecimiento a todos los pacientes que han hecho posible parte de esta Tesis, sin los cuales no se hubiera podido realizar, y a todos los grupos clínicos que han participado en el reclutamiento y seguimiento de los pacientes, así como el trabajo realizado por el BioBanco VIH HGM en relación a la recepción, procesamiento y almacenamiento de muestras.

Y como no, al igual que la tesis mi corazón está dividido entre dos laboratorios. Muchísimas gracias Amanda por todo, porque nunca dejaste que me rindiese, por tus consejos y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Nines, gracias por tu apoyo desde el principio y tu ayuda siempre que la he necesitado. Luz, muchísimas gracias por tu trabajo en el proyecto, y por tus ánimos en cada mensaje. Mónica García, Sonia, Mónica Gutiérrez, Rubén, y Dani, gracias por vuestro apoyo y darme confianza de que lo conseguiría, y como no gracias Dani por todos esos momentos compartiendo despacho. María, Elena, Alicia, Isabel, Marta, Ana y Lorena, aunque no he podido pasar mucho tiempo con vosotras ha sido un placer conoceros y que forméis parte del Lab. Verónica, nos conocimos en un Lab y acabamos juntas en el otro, muchas gracias por tu apoyo. Isidoro y Tito, gracias por vuestra ayuda.

Laura, lo que ha dado de sí el citómetro, esas charlas y confidencias interminables, gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme. Javi, gracias por todos esos momentos de risas y por tu apoyo en el Lab, aunque nuestras neuronas se inhibieran. José Luis, cuanta razón tenías, no te imaginas lo que os echo de menos, muchas gracias por toda tu ayuda y tus consejos en nuestros desayunos. Isa, gracias por estar siempre pendiente de mí, dispuesta a ayudarme en todo momento apoyándome cada día. Chusa, gracias por tu disponibilidad en todo momento y tu dedicación para hacerme todo mucho más fácil. Lola, gracias por esos consejos cuando nos visitabas en Inmuno II. Dani, aunque “maduritos” seguimos estando muy bien...; Carlos, al final nuestra música digan lo que digan... era la mejor; y Nacho, ese chico de los veranos, que llevo para quedarse, muchas gracias por vuestra ayuda y todas esas horas compartidas en el Lab. Santi, gracias por tus mensajes de ánimos tanto en el Lab como en la distancia, porque hacen que sea menos dura, qué la fuerza nos acompañe! BioBanco Team, Coral, Paula, Irene, Jorge, y Almu, gracias por vuestra paciencia con todos los contratiempos en el estudio y por vuestra

ayuda, sois un gran equipo! Raquel, Maribel, Susana, Miguel, Laura S. , Raúl, Judith y Didiana, gracias por vuestra ayuda cuando la necesité.

Rafa Correa, gracias por tu confianza, siempre creíste en mí y me ofreciste tu apoyo y tus consejos. Marjorie, gracias por tu generosidad, siempre dispuesta a ayudarme en todo los sentidos, personal y laboral. Jacobo, en quién mejor podía dejar mi legado de Miss citoquina? gracias por tus ánimos y tu ayuda. Verónica, gracias por tus mensajes de ánimo y fuerza en nuestras largas horas de citómetro. Esther, aunque hayamos coincidido poquito, mucha suerte en esta etapa! Mabela, gracias por tus ánimos y tu apoyo, y junto a Luis, gracias por acogerme en Farmacia cuando necesite de vuestra ayuda. José María, gracias por tu ayuda con las dichosas bases de datos. Y Alberto, gracias por apoyarme y animarme a esta gran aventura de cruzar el charco con tus mensajes de ánimos y experiencia.

I want to thank Xu and Mathias for all the support and the opportunity to work in their lab as a visiting PhD student, and to give me the chance to continue my career at the Ragon. I would like to express my heartfelt gratitude to Sean, Naira, Stephan, HsiaoHsuan, Guin, Navin, Xiaoming, Kevin, HsiaoRong, Sammy, Jacquie and O'young for their messages of encouragement and strength. Thanks for everything!. Quique G., que suerte tuve al encontrarte aquí, infinitas gracias por darme tanta fuerza y levantarme cada vez que me hundía y me sentía perdida, por esta siempre dispuesto a ayudarme, haciéndome todo mucho más fácil, por fin contra todo pronóstico, conseguido!.

Silvia, gracias por devolverme la ilusión de creer en lo que hacía, gracias a ti, a tus ganas, a tu motivación y a la energía que me transmitiste. Aunque ahora nos toca ser españolas por el mundo, estaremos de nuevo unidas, el laboratorio sin ti está vacío... I love you my princess!. Rafa, como todo matrimonio tuvimos que aprender a comprendernos, pero tenerte a mi lado estos años ha sido un placer, gracias por dejarme disfrutar de la ciencia a tu lado y por todo tu apoyo en lo personal y en lo profesional, mucho ánimo y a por tu tesis! My body, gracias por enseñarme tanto, has sido el mejor maestro que pudimos tener, tu saga continúa! Gracias por tus consejos en cada momento y toda tu ayuda.

Marta y Nico, gracias y miles de gracias por vuestra ayuda en todo momento y por ser mi gran apoyo ahora en la distancia, por darme esos alientos de confianza que tanto he necesitado, porque esta tesis es también parte de vosotros, ahora ya sí nos toca disfrutar de Boston!

Mis cómplices, Cris, Karla y Lau, gracias por estos años de amistad incondicional, por ser mi apoyo en los buenos pero ante todo en los malos momentos, por confiar siempre en mí y nunca dejar que me rindiera. Por todos esos momentos vividos, y los que nos quedan, siempre juntas! Ana, gracias por todos esos momentos que hemos compartido, pero ante todo que hemos disfrutado juntas. Elena y María, mis "gymgirls", gracias por estar siempre a mi lado, animándome y dándome fuerzas. Belén, casi lo cumplimos, tu a Londres y yo a... muchas gracias por tu apoyo. Os echo mucho de menos!

Mi Lore, lo que resultó ser esa aburrida mujer mayor con gafas,.. gracias por haber compartido contigo momentos tan importantes, junto a Álvaro, gracias por estar siempre a mi lado y hacer que os sienta junto a mí a pesar de este océano que nos separa. Victor, sobran las

palabras, gracias, gracias y millones de gracias, por ser siempre mi apoyo, mi llamada de socorro, por calmarme y hacerme ver el lado positivo de las cosas, y por cruzar el charco para recargarme las pilas. Carmen, ese número 14 que nos unió, es perfecto para definirte porque no eres 10, te superas! Gracias por siempre confiar en mí y estar a mi lado en todo momento, nunca existieron las distancias.

Miry y Borja, chicos gracias por ser como sois, por haberme dado tanto cariño en tampoco tiempo y hacerme sentir tan importante para vosotros, por apoyarme y mandarme fuerzas que superan los km. Raúl, gracias por estar siempre a mi lado apoyándome y poder contar contigo siempre. Javi, gracias por todos esos momentos de desconexión, por nuestras terapias en el VIPs y ante todo por tu amistad y tu cariño. Alberto, gracias por todos los momentos que hemos compartido. Elena y Fermín, cuanto echo de menos esos momentos de diversión a vuestro lado, gracias por formar parte de mi vida. Patri y Txema, gracias por que sí, porque siempre tenéis una sonrisa para darme y palabras de ánimo y fuerza para enviarme, gracias por estar siempre ahí!.

Mis niñas, Esther y Raquel, la definición más perfecta de verdadera amistad, a pesar de la distancia siempre estamos unidas, y seguiremos sumando esos momentos que montan nuestro álbum de recuerdos.

Y como no, a mis zoriteños, Anabel, Ale, Elena, Pablo, Juanma y Shey, porque nos conocemos desde que éramos unos renacuajos, y nuestra amistad sigue adelante, gracias por vuestro apoyo. Mis chicos de Leganés, Pablo, Raúl, Dani y Rafa, gracias por todas esas horas que hemos pasado juntos y vuestra fe ciega en que lo conseguiría.

Alba, Aberto, Carlos, Cristina, Diana, Dani, Laura, Luis y Nayra, gracias por haberme acogido también, habéis sido un gran apoyo para mí en la última etapa de esta tesis y el comienzo de mi aventura americana, ya se que estáis al tanto de mis andadas!

Gracias a mi familia Bostoniana, porque hacéis que la distancia duela menos, y que no me sienta sola. Chari y Dani, gracias por acogerme desde mi primera vez en suelo americano, por estar siempre dispuestos a ayudarme y darme ánimos en esta dura aventura. Elia, muchas gracias por tu mensajes de fuerza y confianza de que podía conseguirlo. Nena y Chana, las mejores roomies , gracias chicas por toda vuestra ayuda y haber sido mi mayor apoyo en esta etapa tan difícil, por vuestros constantes, Tú puedes! Kris, gracias por tu confianza en mí y tu apoyo desde que te conocí. Yuli, gracias por ser mi primer apoyo cuando vine para la estancia, y mira que bien salió.

Gracias a mi familia política, Hugo, Relfa, Relfita, Gabi y Sonny, por todo el cariño que me habéis dado desde el principio y vuestra plena confianza en mí.

Gracias a mis tíos y primos por vuestro apoyo. Peque gracias por haber sido siempre mi hermana pequeña y estar siempre a mi lado. Henar y Rafa, gracias por alegrarme cada mañana con las fotos de mi princesita Jimena, y hacer que me sienta como en casa!. Charito, que decirte... gracias y millones de gracias, desde el primer día que entre en esta facultad has estado ayudándome y dándome fuerzas ante los contratiempos. Ahora sí, por fin te dejo tranquila, se acabaron las crisis de pánico!

Gracias a mi familia porque si soy lo que soy es gracias a vosotros, sois todo para mí. A mis padres gracias por darme todo lo que tengo, y gracias a mi hermano por tu apoyo incondicional y confianza en mí, Keep Calm, you're the Best! Os echo muchísimo de menos. Os quiero!.

Michel, mi amigo, mi compañero, mi apoyo, mi amor, eres mi todo, gracias, gracias y millones de gracias por aparecer en mi vida y llenarla de color e ilusión, me has devuelto la felicidad pero sobretodo mi sonrisa. En este momento tan duro has llenado el vacío de mi familia y mis amigos que tanto extraño por la distancia y has sido mi apoyo incondicional. Eres lo mejor que me ha pasado, gracias por elegirme para ser tu protagonista de UP. Te amo cosita! .

Gracias a todos!!!

ÍNDICE

SUMMARY	VII
RESUMEN	VIII
ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCION	1
1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	1
1.1. Aspectos generales de la epidemia	1
1.2. Estructura y genoma del VIH	3
1.3. Ciclo replicativo del VIH-1	3
1.4. Desarrollo de la infección por VIH-1	5
1.4.1. Transmisión del VIH-1	5
1.4.2. Curso de la infección por el VIH-1	7
1.5. Terapia antirretroviral combinada (TARc)	8
1.6. Respuesta inmunológica frente al VIH-1: patogénesis de la infección	10
2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C	12
2.1. Aspectos generales de la infección	12
2.1.1. Prevalencia del Virus de la Hepatitis C	12
2.1.2. Genotipo viral	13
2.2. Factores de riesgo y vía de transmisión del VHC	14
2.3. Estructura y genoma del VHC	14
2.4. Heterogenicidad genética del VHC	16
2.5. Ciclo viral del VHC	16
2.6. Historia Natural de la Infección por VHC	18
2.6.1. Respuesta antiviral innata	19
2.6.2. Respuesta adaptativa antiviral	21
2.6.2.1. Respuesta humoral	21
2.6.2.2. Respuesta celular	22
2.6.2.2.1. Respuesta celular adaptativa durante la infección aguda por VHC	22
2.6.2.2.2. Respuesta celular adaptativa durante la infección crónica por VHC	23
2.7. Tratamiento antiviral contra el VHC	24
2.7.1. Monitorización antes y durante el tratamiento	24
2.7.2. Fármacos utilizados para el tratamiento de la hepatitis C crónica	24
2.7.3. Pautas de tratamiento de la hepatitis C: Recomendaciones Europeas 2016	25
2.8. Evolución natural de la infección por VHC	26
2.8.1. Infección aguda	26
2.8.2. Infección crónica	27
2.8.3. Enfermedad hepática	27
2.8.3.1. Diagnóstico de la enfermedad hepática	28
2.8.3.1.1. Evaluación histológica: Escala Metavir	28
2.8.3.1.2. Marcadores no invasivos de fibrosis	29
2.8.3.1.3. Modelos predictores del pronóstico de la enfermedad hepática	30

2.8.4. Cirrosis	31
2.8.4.1.1. Evolución progresión de la cirrosis	31
2.8.4.1.2. Síndrome de disfunción inmune asociado a cirrosis (CAID)	32
2.8.4.1.3. Inmunodeficiencia inducida por cirrosis	34
2.8.4.1.4. Papel de la inflamación sistémica en la expresión clínica de la Cirrosis	35
2.9. Coinfección VHC/VIH	36
2.9.1. Evasión de la respuesta inmune del VHC durante la coinfección	37
2.9.2. Coinfección VIH/VHC e inmunidad innata	37
2.9.3. Coinfección VIH/VHC e inmunidad adaptativa	38
2.9.4. Patogénesis de la coinfección VIH/VHC	38
3. EL VIRUS DEL HERPES SIMPLES	39
3.1. Aspectos generales de la pandemia	39
3.2. Estructura y genoma viral del VHS-2	41
3.3. Ciclo viral del VHS-2	42
3.4. Curso de la enfermedad por VHS-2	44
3.5. Patogénesis de la enfermedad	45
3.6. Confección del VIH-1 y el VHS-2	47
4. NUEVAS ESTRATÉGIAS DE PREVENCIÓN: NANOMEDICINA	48
4.1. Microbicidas	48
4.2. Nanomedicina en el desarrollo de microbicidas	50
4.3. Capacidad de los dendrímeros de detener la infección por VIH en presencia de semen	53
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	65
Sección I: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS VIH/VHC	65
1. SUJETOS DE ESTUDIO	65
1.1. Diseño del estudio	65
1.2. Ámbito del estudio	65
1.3. Aspectos éticos	65
1.4. Población de estudio	65
1.5. Recogida de datos	66
1.6. Variables del estudio y su definición	66
1.7. Elastografía de transición (FibroScan®)	68
2. TÉCNICAS DE LABORATORIO	68
2.1. Registro de muestras y datos en el BBHGM	68
2.1.1. Procesamiento de las muestras	69
2.2. Análisis fenotípico de las distintas subpoblaciones celulares T	69
2.3. Inmunoensayo de los biomarcadores plasmáticos	72
2.3.1. Ensayo Elisa multiplex	72
2.3.2. Elisa simple	74

Sección II: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 y VHS-2	74
3. MATERIALES	74
3.1. Dendrímeros	74
3.2. Nanopartículas de Oro	75
3.3. Cultivos celulares	76
3.3.1. Células primarias	76
3.3.2. Líneas celulares	76
3.4. Producción viral	77
3.5. Reactivos y Antirretrovirales	78
4. MÉTODOS	78
4.1. Estudio <i>in vivo</i> de inhibición de la infección por Virus Herpes Simple tipo 2 en ratones BALB/c	78
4.1.1. Infección vaginal	79
4.1.2. Infección rectal	79
4.2. Biodistribución del dendrímero G2-STE15-FITC <i>in vivo</i>	80
4.3. Estudio de irritación sobre el epitelio vaginal en ratones hembras BALB/c tras tratamiento durante 7 días consecutivos	81
4.4. Ensayos de infección celular en presencia o ausencia de semen	82
4.4.1. Procesamiento de las muestras de semen	82
4.4.2. Ensayo de inhibición celular	82
4.5. Estudio de la toxicidad aguda en estadios embrionarios del pez cebra (PET)	83
4.6. Ensayo de viabilidad celular: MTT	84
4.7. Ensayo de inhibición de la replicación del VIH	85
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
5.1. Sección I: Estudio del sistema inmune en pacientes coinfectados VIH/VHC	86
5.1.1. Variable predictora (x) desenlace (y) analizadas en el estudio	86
5.1.2. Análisis univariante	86
5.1.3. Análisis multivariante	87
5.2. Sección II: Estudio de microbicidas frente a infecciones de transmisión sexual: VIH-1 y VHS-2	87
4. RESULTADOS	91
Sección I: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS VIH/VHC	91
1. Características clínicas y epidemiológicas de los grupos de Estudio	91
2. Valores estimados de las subpoblaciones de células T CD4+	94
2.1. Caracterización fenotípica de las células T CD4+ en los diferentes grupos de estudio	94
2.2. Asociación de los valores de rigidez hepática y subpoblaciones de células T CD4+	97
2.3. Caracterización fenotípica de las células T CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática	98

2.4. Variación de las subpoblaciones de células T CD4+, en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificadas por estadio de fibrosis, respecto a los controles sanos y pacientes mono infectados VIH.....	102
3. Valores estimados de las subpoblaciones de células T CD8+.....	103
3.1. Caracterización fenotípica de las células T CD8+ en los diferentes grupos de estudio	103
3.2. Asociación de los valores de rigidez hepática y subpoblaciones de células T CD8+	105
3.3. Caracterización fenotípica de las células T CD8+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática.....	106
3.4. Variación de las subpoblaciones de células T CD8+, estratificadas por estadios de fibrosis en los pacientes coinfectados VIH/VHC, respecto a los controles sanos y pacientes mono infectados VIH.....	109
4. Valores estimados de los biomarcadores plasmáticos.....	110
4.1. Evaluación de los niveles plasmáticos de translocación bacteriana, riesgo cardiovascular, inflamación y citoquinas relacionadas con respuesta Th1/Th2/Th17 en los diferentes grupos de estudio	110
4.2. Asociación de los valores de rigidez hepática y los niveles de los biomarcadores plasmáticos.....	113
4.3. Análisis de los niveles de los biomarcadores plasmáticos en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática	115
4.4. Variación de los niveles de los biomarcadores plasmáticos, estratificados por estadios de fibrosis en los pacientes coinfectados VIH/VHC, respecto a los controles sanos y pacientes mono infectados VIH	117
SECCIÓN II: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 Y VHS-2	119
5. Estudio <i>in vivo</i> de la actividad antiviral de los dendrímeros polianiónicos carboxilano frente al VHS-2 en ratones BALB/c.....	119
5.1. Actividad antiherpética de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 por administración vaginal en ratones BALB/c	120
5.2. Actividad antiherpética de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 por administración rectal en ratones BALB/c.....	121
6. Biodistribución del dendrímero G2-STE15-FITC intravaginalmente.....	126
7. Viabilidad de dosis consecutivas del dendrímero G2-S16 solo y en combinación con Tenofovir en ratones hembras BALB/c	128
8. Estudio de la eficacia antiviral frente al VIH-1 de los dendrímeros polianiónicos carboxilanos combinados con antirretrovirales en presencia de las fibrillas amiloides del semen (SEVI).....	131
8.1. Perfil inhibitorio de los dendrímeros G2-STE-16 y G3-S16 en la línea celular TzM.bl.....	131
8.2. Perfil inhibitorio de los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16 y las combinaciones con ARV en células humanas primarias.....	138

9. Viabilidad del dendrímero G2-S16 en estadios embrionarios del pez cebra (PET)	140
9.1. Efectos teratogénicos del dendrímero G2-S16 a diferentes concentraciones y tiempos post-fertilización	141
9.2. Porcentaje de eclosión de los embriones en función de la concentración del dendrímero G2-S16 y el tiempo de estudio	142
9.3. Determinación de los parámetros de concentración letal 50 y concentración máxima sin efecto y mínima con efecto	143
10. Viabilidad y actividad antiviral de dendrones y nanopartículas de oro dendronizadas	144
10.1. Viabilidad de los dendrones y nanopartículas de oro analizadas	144
10.2. Actividad antiviral de los dendrones y nanopartículas de oro analizadas	147
5. DISCUSIÓN	153
6. CONCLUSIONES	173
7. BIBLIOGRAFÍA	179
8. ANEXO I	213
9. ANEXO II	220

SUMMARY

During the evolution of chronic hepatitis C virus infection, progression of liver fibrosis and cirrhosis leads to the development of specific complications of advanced liver disease. In this study, cell phenotype, immunological profiles and degree of plasma activation/inflammation were characterized in HIV/HCV coinfecting patients at different clinical stages of fibrosis and cirrhosis compared to healthy donors and HIV monoinfected patients using multiparametric flow cytometry and multiplex ELISA. HIV/HCV coinfecting patients showed higher percentages of activated T-cells and Treg, as well as higher plasma levels of bacterial translocation, inflammation, endothelial dysfunction and coagulopathy biomarkers, and higher levels of Th1 and Th2 regulatory cytokines. On the other hand, hepatic stiffness (kPa) of HIV/HCV coinfecting patients was associated with dysfunction of the immune system, defined by a positive relationship between the liver stiffness stage and several immunological parameters, such as cellular activation and senescence of immune cells, bacterial translocation, inflammation, endothelial dysfunction and coagulopathy. In contrast, an inverse relationship between hepatic stiffness (kPa) of HIV/HCV coinfecting patients and plasma cytokine values related to immune function was observed. In addition, HIV/HCV coinfecting patients with advanced cirrhosis (> 40kPa) showed higher level of immune cell dysfunction compared to the other study cohorts, and were characterized by higher percentages of activated, senescent and Treg T cells, along with higher values of bacterial translocation, inflammation, endothelial dysfunction and coagulopathy markers. These patients also showed lower plasma cytokine values related to immune function and the IL-1RA inflammatory regulatory protein compared to healthy donors and HIV monoinfected patients.

In conclusion, HIV/HCV coinfecting patients were characterized by an immune cell dysfunction which was directly related to the degree of hepatic stiffness, being more pronounced in patients with advanced cirrhosis >40kPa).

The urgent need for the development of topical microbicides to prevent new sexually transmitted infections, such as HIV-1 and HSV-2, is currently being addressed by nanotechnology. In this doctoral thesis study, we studied the antiviral effect and mechanisms of action of polyanionic carbosilane dendrimers with anti-HIV-1 activity as potential candidates for dual microbicides against STDs using *in vitro* and *in vivo experimental systems*. These dendrimers showed a synergistic activity with TFV against HSV-2 *in vitro*. In addition, vaginal or rectal administration of G1-S4 or G2-S16 dendrimers in BALB/c mice prevents the transmission of HSV-2 at values close to a 100%. On the other hand, the presence of inflammation in the female reproductive tract and the presence of semen increase the risk of HIV-1 heterosexual transmission. This doctoral thesis also focused on a toxicological study to determine the limitation of G2-S16 dendrimer activity in the genital epithelium, showing no irritation and inflammation in the vaginal epithelium. G2-S16 demonstrated to be a safe dendrimer for vaginal application in the prevention of HIV-1 and HSV-2 transmission. Besides, no significant differences in mortality, sublethal or teratogenic effects were found in zebrafish embryos when they were treated with G2-S16 dendrimer. Finally, we have showed the development of dendronized gold nanoparticles with straightforward chemical synthesis, as possible

microbicidas against HIV-1, demonstrating their inhibition, and highlighting the importance of dendronization by reducing toxicity and increasing antiviral activity.

In conclusion, data presented in this doctoral thesis show that HSV-2 transmission can be blocked vaginally or rectally by applying G1-S4 or G2-S16 dendrimers, providing a step forward to prevent HSV-2 transmission in humans. The G2-S16 dendrimer stands out as an ideal candidate for the development of a topical microbicide against HIV-1 infection and could be a good candidate for phase 1a clinical trial due to the great biocompatibility presented *in vivo* as well as its ability to stop HIV-1 infection in presence of semen. Therefore, a new line of research is opened with dendronized gold nanoparticles for prevention of sexually transmitted infectious diseases.

RESUMEN

Durante la evolución de la hepatitis C crónica, la progresión de la fibrosis y la cirrosis hepática conlleva el desarrollo de complicaciones específicas de la enfermedad hepática avanzada. Se ha caracterizado el fenotipo celular por citometría de flujo multiparamétrica, junto al perfil inmunológico y el grado de activación/inflamación en plasma por ELISA multiplex, en pacientes coinfectados por VIH/VHC en distintos estadios clínicos de fibrosis y cirrosis en comparación con controles sanos y pacientes mono infectados VIH. Los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron mayores porcentajes de células T activadas y Treg, así como valores plasmáticos de biomarcadores de translocación bacteriana, inflamación, disfunción endotelial, coagulopatía, y citoquinas reguladoras del sistema inmune (Th1 y Th2) más altos. Por otra parte, la rigidez hepática (kPa) de estos pacientes coinfectados se asoció con disfunción del sistema inmune, encontrando una relación positiva entre el estadio de rigidez hepática y los marcadores de activación y senescencia del sistema inmune, translocación bacteriana, inflamación, disfunción endotelial y coagulopatía, observando una relación inversa con los valores plasmáticos de citoquinas relacionadas con la función inmune. Los pacientes coinfectados VIH/VHC con cirrosis avanzada (>40kPa) presentaron mayor nivel de disfunción del sistema inmune sobre el resto de pacientes, con porcentajes más altos de células T activadas, senescentes y Treg, junto a valores más elevados de marcadores de translocación bacteriana, inflamación, disfunción endotelial y coagulopatía. Estos pacientes también mostraron valores plasmáticos más bajos de citoquinas relacionadas con la función inmune y la proteína reguladora de inflamación IL-1RA con respecto a los individuos sanos y a los mono infectados VIH.

En conclusión, los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron una disfunción inmune directamente relacionada con el grado de rigidez hepática, siendo más acusada en los pacientes con cirrosis avanzada (>40kPa).

La urgente necesidad de microbicidas de uso tópico para frenar nuevas infecciones de transmisión sexual, como las causadas por el VIH-1 y el VHS-2, está siendo respondida por la nanotecnología. En esta Memoria se ha estudiado *in vitro* e *in vivo* el efecto antiviral y mecanismo de acción de dendrímeros carbosilanos polianiónicos con actividad anti-VIH-1 como

candidatos potenciales a microbicidas duales contra las ETS. Se ha demostrado que estos dendrímeros tienen actividad sinérgica con TFV frente al VHS-2, *in vitro*. Además, la administración vaginal o rectal del G1-S4 o G2-S16 previene la transmisión del VHS-2 en ratones BALB/c en valores cercanos al 100%. Por otra parte, la presencia de inflamación en el tracto reproductor femenino y la presencia de semen, aumentan el riesgo de transmisión heterosexual del VIH-1. Esta Memoria también se ha focalizado en el estudio toxicológico para conocer la limitación de la actividad del dendrímero G2-S16 en el epitelio genital, mostrando ausencia de irritación e inflamación en el epitelio vaginal, lo que demuestra que es un dendrímero seguro para su aplicación vaginal en el control de la transmisión del VIH-1 y VHS-2. Además no se han encontrado diferencias significativas en mortalidad, efectos subletales o teratogénicos en embriones del pez cebra cuando se trataron con el dendrímero G2-S16. Finalmente, se ha mostrado el desarrollo nanopartículas de oro dendronizadas con síntesis química más sencilla, como posibles microbicidas frente al VIH-1, demostrando su inhibición, y destacando la importancia de la dendronización al disminuir la toxicidad y aumentar la actividad antiviral.

En conclusión, los datos presentados en esta Memoria muestran que la transmisión del VHS-2 puede ser bloqueado por vía vaginal o rectal aplicando el dendrímero G1-S4 o el G2-S16, proporcionando un paso adelante para prevenir la transmisión por el VHS-2 en humanos. El dendrímero G2-S16 destaca como un candidato ideal para el desarrollo de un microbicida de uso tópico contra la infección por el VIH-1 y podría pasar a ensayo clínico fase 1a debido a la gran biocompatibilidad presentada *in vivo*, así como a su capacidad para detener la infección por el VIH-1 en presencia de semen. Se abre una nueva línea de investigación con nanopartículas de oro dendronizadas.

ABREVIATURAS

3O-S-HS	Heparán Sulfato 3-O-Sulfatado
3TC	Lamivudina
AAD	Antivirales de acción directa
aARM	Media aritmética ajustada (del inglés <i>adjusted arithmetic mean</i>)
AAS	Proteína amiloide sérica A (del inglés <i>serum amyloid A protein</i>)
AcM	Anticuerpos monoclonales
ACLF	Fracaso hepático agudo sobre crónico (del inglés <i>Acute-on-Chronic Liver Failure</i>)
AcN	Anticuerpos neutralizantes
AD	Agua de dilución
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADVP	Adicción a drogas por vía parenteral
AgNP	Nanopartículas de Plata
AIDS	del inglés <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ALT	Alanina-aminotransferasa
AMR	del inglés <i>Arithmetic Mean Ratio</i>
APC	Aloficocianina (del inglés <i>allophycocyanin</i>)
APCs	Células presentadoras de antígenos
APOB	Apolipoproteína B
APOC	Apolipoproteína C
APOE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico
ARNip	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
AuNP	Nanopartícula de Oro
AZT	Zidovudina
BBHGM	BioBanco (VIH) del Hospital Gregorio Marañón
BC	Conducto biliar (del inglés <i>Bile duct</i>)
BT	Bilirrubina total
CA	Cápside viral
CBMSO	Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
CCR5	del inglés chemokine (C-C motif) receptor 5
CD	Células dendríticas
CD[id]	del inglés <i>cluster of differentiation</i> [id]. Extensivo para las abreviaturas CD4, CD8, CD81,etc
CDps	Células dendríticas plasmocitoides
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CI	Consentimiento Informado
CAID	Disfunción inmune asociada a la cirrosis (del inglés <i>Cirrhosis-associated immune dysfunction</i>)

CKs	Células de Kupffer
CLDN1	Proteína claudin-1
cLDs	Gotitas lipídicas citoplasmáticas (del inglés cytoplasmic Lipid Droplets)
CLs	Células de Langerhans
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CMV	Citomegalovirus
CRD	Recogida de datos en papel
CRE	del inglés <i>Cis-acting Replication Elements</i>
CRF	Formas recombinantes circulantes (del inglés <i>circulating recombinant forms</i>)
CRM1	Receptor nuclear de exportación 1 (del inglés <i>Chromosome Region Maintenance 1</i>)
CT	Colesterol Total
CTL	Linfocitos T citotóxicos (del inglés <i>Citolytic T Lymphocyte</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (del inglés <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
CXCR4	del inglés chemokine (C-X-C motif) receptor 4
CV	Carga viral
CVD	Enfermedades cardiovasculares (del inglés <i>Cardiovascular disease</i>)
d4T	Estavudina
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños (del inglés <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>)
DC-SIGN	Receptor de lectina tipo C de manosa (del inglés <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>)
DDI	Didanosina
DGTA-1	Diacilglicerol aciltransferasa-1
DMEM	del Inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPV	Dapivirina
dsARN	Acido ribonucleico bicatenario
DSIF	del inglés <i>DRB Sensitivity Inducing Factor</i>
EALS	del inglés <i>European association for the study of the liver</i>
ECM	Matriz Extracelular (del inglés <i>Extracellular matrix</i>)
EE.UU.	Estados Unidos de América
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ELISA	del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMEM	del inglés <i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EphA2	Receptor de efrina tipo A2
ETS	Enfermedades de Transmisión Sexual
FA	Fosfatasa Alcalina
FITC	Isocianato de fluoresceína (del inglés <i>Fluorecein isothiocyanate</i>)
FMO	del inglés <i>Fluorescence minus one</i> Control
FTC	Emtricitabina
G	Genotipos
G1-S4	Dendrímero aniónico carboxilano con grupos sulfato de primera generación

G2-S16	Dendrímtero aniónico carbosilano con grupos sulfonato de segunda generación
G2-STE16	Dendrímtero aniónico carbosilano con grupos sulfonato de segunda generación
G2-STE15-FITC	Dendrímtero aniónico carbosilano con grupos sulfonato de segunda generación marcado con una molécula de fluorocromo FITC
G3-S16	Dendrímtero aniónico carbosilano con grupos sulfonato de tercera generación
GAG	Glicosaminoglicanos
GAG	Gen que codifica para la poliproteína estructural GAG del VIH-1 (del inglés Group-specific Antigen)
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (del inglés <i>Gut-associated lymphoid tissue</i>)
GARPR	del inglés <i>Global AIDS Response Progress Reporting</i>
GEHEP	Grupo de Estudio de Hepatitis Víricas
GESIDA	Grupo de Estudio del SIDA
GGT	Gammaglutamiltranspeptidasa
GLM	Modelos lineales generalizados (del inglés <i>Generalized Linear Models</i>)
GLUT4	Transportador de glucosa 4 (del inglés <i>Glucose transporter type 4</i>)
HDF	Factores del huésped esenciales (del inglés <i>Host Dependency Factor</i>)
HEC	Hidroxietilcelulosa
HGUGM	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
HLADR	del inglés <i>Human Leukocyte Antigens DR</i>
HPVG	Gradiente de presión venosa hepática (del inglés <i>Hepatic Venous Pressure Gradient</i>)
HSC	Células hepáticas estrelladas (del inglés Hematopoietic Stem Cells)
HSH	Hombres que mantiene Sexo con Hombres
HSPG	Proteoglicano de Heparán Sulfato
HULP	Hospital Universitario La Paz
HVEM	Receptor celular del mediador de la entrada del virus del herpes (del inglés <i>Herpesvirus entry mediator</i>)
IF	Inhibidores de fosfatasa
IFM	Intensidad de Fluorescencia Media
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-X	Interleuquina, extensivo para IL-2, IL-4, etc
IMC	Índice de masa corporal
IMPDH	Enzima inosina monofosfato deshidrogenasa
IN	Integrasa viral
INR	del inglés <i>International Normalized Ratio</i>
IP	Inhibidores de la proteasa
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (del inglés <i>Internal Ribosome Entry Site</i>)
ISCIH	Instituto de Salud Carlos III
ISDR	Región Determinante para la Sensibilidad al Interferón
ISG	Genes estimulados por interferón

ISO	del inglés <i>International Standardization Organization</i>
ITIN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleótidos
ITINN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleótidos
IVIS	del inglés <i>In Vivo Imaging System</i> (imágenes fluorescentes <i>in vivo</i>)
kPa	kilo Pascales
LATs	Transcritos asociados a la latencia (del inglés <i>Latency-Associated Transcripts</i>)
LBP	Proteína de unión al lipopolisacárido (del inglés <i>lipopolysaccharide-binding protein</i>)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LOEC	Concentración Mínima con Efecto Observado (del inglés <i>lowest-observed-effect concentration</i>)
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LTR	del inglés <i>Long Terminal Repeat</i>
LuLDs	Gotitas de lípidos luminal (del inglés <i>Luminal Lipid Droplets</i>)
LVP	Lipoviropartículas
MA	Matriz viral
mAb	Anticuerpos Monoclonales
MAVS	Proteína antiviral de señalización mitocondrial (del inglés <i>Mitochondrial AntiViral-Signaling protein</i>)
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monocitos (del inglés <i>Monocyte-derived Dendritic Cells</i>)
MDT	Máxima Dosis Tolerada
MELD	del inglés <i>Model for end-stage liver disease</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MLN	Ganglios linfáticos mesentéricos (del inglés <i>Mesenteric lymph nodes</i>)
MRV	Maraviroc
MS	Síndrome metabólico (del inglés <i>Metabolic Syndrome</i>)
MTa	Células T memoria temprana
MTDs	del inglés <i>Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns</i>
MTe	Células T memoria tardía
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
N-9	Nonoxynol-9
NC	Nucleocápside Viral
NEF	Gen que codifica para la proteína accesoria NEF del VIH-1 (del inglés <i>Negative regulatory Factor</i>)
NELF	del inglés <i>negative elongation factor</i>
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NK	del inglés <i>Natural Killer cells</i>
NKT	del inglés <i>Natural Killer T cells</i>
NLRs	Dominios de oligomerización <i>para la unión a</i> nucleótidos
NMRW	Estadio de la infección por el VIH según CDC
NOEC	Concentración máxima con efecto observado (del inglés <i>No-observed-effect</i>)

	<i>concentration</i>)
NP	Nanopartículas
NPC1L1	Transportador del colesterol Nieman-pick C1-like1
NS	No estructural (del inglés <i>Non Structural protein from HCV</i>)
NTR	del inglés <i>Non-Translated Region</i> (Regiones no codificantes)
OCLN	Proteína ocludina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	del inglés <i>Open Reading Frame</i>
PAI	inhibidor del activador del plasminógeno-1 (del inglés <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PAP	Fosfatasa Acida Prostática
PBS	del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	del inglés <i>Programmed cell Death protein 1</i>
PE	Ficoeritrina (del inglés <i>phycoerythrin</i>)
Peg-IFN-α	IFN- α pegilado
PET	<i>Estadios embrionarios del pez cebra (FET, por sus siglas en inglés)</i>
PFU	Unidades formadoras de placa
pH	Potencial de hidrogeno
PIC	Complejo de Preintegración
PKR	Proteína quinasa K
Pol II	Polimerasa II
PR	Proteasa viral
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
RBV	Ribavirina
RE	Retículo endoplásmico
rLDL	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
RLUs	Intensidad de luminiscencia
ROI	Áreas de interés (del inglés <i>Region Of Interest</i>)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT	Retrotranscriptasa
RVS	Respuesta Viral Sostenida
S	Región Corta
SAFE	del inglés <i>Sequential Algorithm for Fibrosis Evaluation</i>
SAPE	Solución de estreptavidina-ficoeritrina
sCD14	Forma soluble del receptor CD14
SD	del inglés <i>Standar Deviation</i> (Desviación Estándar)
SEM	del inglés <i>Standard Error of the Mean</i> (Error)
SEVI	derivado de semen potenciador de la infección del virus (del inglés <i>Semen-Derived enhancer of Virus Infection</i>)
sICAM-1	Molécula de adhesión intracelular soluble 1 (del inglés <i>soluble intercellular Adhesion Molecule 1</i>)
SIDA	Síndrome de la InmunoDeficiencia Adquirida

SIRS	Síndrome de respuesta Inflamatoria sistémica
SIV	Virus de la inmunodeficiencia del simio (del inglés <i>Simian immunodeficiency virus</i>)
SNP	del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismos de un solo nucleótido)
SPSS	Paquete Estadístico
SU	Superficie
sVCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1 soluble (del inglés <i>soluble vascular cell adhesion molecule 1</i>)
TARc	Terapia antirretroviral combinadas
TEMRA	Memoria efectora terminal (del inglés <i>Terminally Differentiated Effector Memory</i>)
TF	Virus fundadores
TFV	Tenofovir
TG	Triglicéridos
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
Th-	Linfocitos colaboradores o T Helper
TLR	Receptores tipo Toll (del inglés <i>Toll-Like Receptor</i>)
TM	Transmembrana
TNFα	Factor de necrosis tumoral alpha (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
TP	Tiempo de Protrombina
t-PA	Activador Tisular del Plasminógeno
Treg	Células T reguladoras
TRIF	del inglés <i>IR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
Ttf	Receptor de transferrina
UAH	Universidad de Alcalá
UL	Secuencia única larga
UNAIDS	<i>United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
Upa	Uroquinasa
US	Secuencia única corta
UTR	del inglés <i>untranslated region or untranslated trailer</i>
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHD	Virus de la Hepatitis D
VHS	Virus del Herpes Simple
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés <i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
VPH	Virus del papiloma humano

1

INTRODUCCIÓN



1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

1.1. Aspectos generales de la epidemia

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente etiológico causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se trata de un virus perteneciente al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae* que se aisló por primera vez en 1983^{1,2}. El VIH puede ser de tipo 1 o 2, siendo el VIH-1 más virulento que el VIH-2, y que a su vez se clasifican en grupos, subtipos y formas recombinantes. El 90% de las infecciones por VIH son debidas al VIH-1 del grupo M, que se divide hasta en nueve subtipos (A-D, F-H, J, K) y más de 50 formas recombinantes circulantes (CRF)³. Más de 30 años después de su descubrimiento, la elevada diversidad genética del VIH dificulta el conocimiento sobre las interacciones huésped-patógeno, que permiten al virus permanecer un paso por delante en el desarrollo de una vacuna preventiva o cura terapéutica^{4,5}(Figura 1).

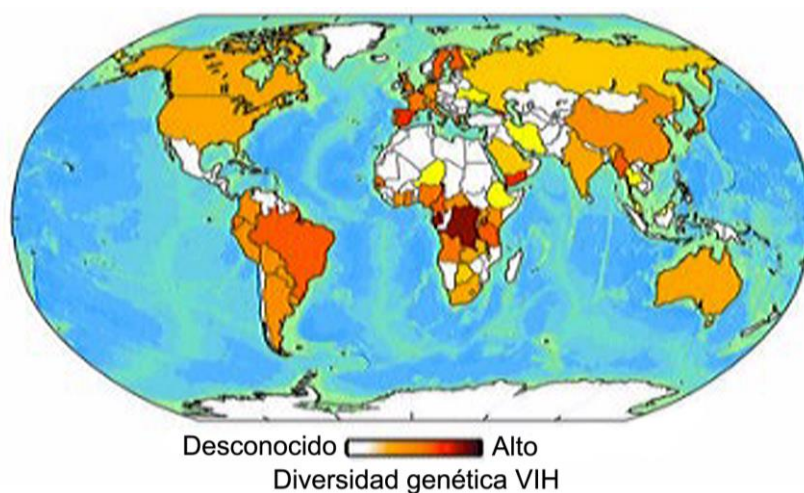


Figura 1. Distribución geográfica de la diversidad genómica del VIH-1. La diversidad genómica encontrada en las secuencias aminoacídicas del VIH-1 ha sido distribuida por países, mostrando la mayor diversidad en África Central. Países sin secuencias disponibles (NA) están coloreados en blanco. Adaptada de Li, G. *et al.*, 2015⁵.

Según el último informe "Global AIDS Response Progress Reporting" (GARPR) UNAIDS 2016, de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶, se demuestra el esfuerzo mundial por combatir la epidemia del SIDA con 17 millones de personas bajo tratamiento antiretroviral a finales del 2015, es decir, una cobertura antirretroviral del 46% [43-50%], lo que ha supuesto un descenso del 43% en el número de muertes relacionadas con SIDA desde el acceso global al tratamiento antiretroviral en 2003 (Figura 2).

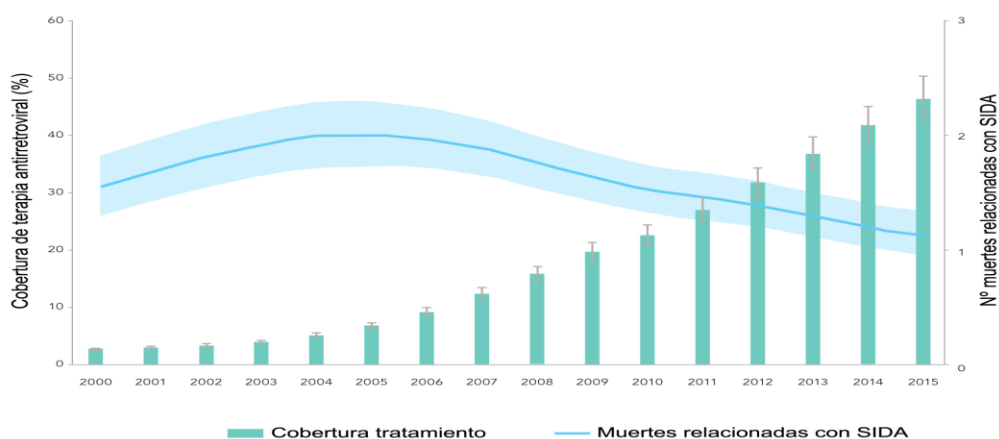


Figura 2. Cobertura de la terapia antirretroviral y número de muertes relacionadas con SIDA en el periodo 2000-2015. Datos actualizados en el año 2015. Fuente: UNAIDS 6

Sin embargo, siguen existiendo grandes desafíos, ya que el número total de nuevas infecciones se estimó en 2.1 millones [1.8 millones – 2.4 millones] manteniéndose estático desde el 2010, sumando un total de 36.7 millones [34.0 millones – 39.8 millones] de personas infectadas por VIH en el mundo. Aunque las tasas de nuevas infecciones presentan disparidad regional, puesto que en África Oriental y Meridional se produjo un descenso del 12%, en América del Sur y Caribe, Europa Occidental y Central, América del Norte, Oriente Medio y África del Norte se mantuvieron constantes, mientras que en Europa del Este y Asia Central se registró un aumento del 57%⁶ (Tabla 1). Debido a estos datos, no cesa la búsqueda de nuevas terapias, tratamientos y métodos de prevención más efectivos contra la infección.

	Personas infectadas por VIH (todas las edades)		Nuevas infecciones por VIH (todas las edades)	
	2010	2015	2010	2015
Global	33.3 millones [30.9 millones-36.1 millones]	36.7 millones [34.0 millones-39.8 millones]	2.2 millones [2.0 millones-2.5 millones]	2.1 millones [1.8 millones-2.4 millones]
Asia y Pacífico	4.7 millones [4.1 millones-5.5 millones]	5.1 millones [4.4 millones-5.9 millones]	310.000 [270.000-360.000]	300.000 [240.000-380.000]
África Oriental y Meridional	17.2 millones [16.1 millones-18.5 millones]	19.0 millones [17.7 millones-20.5 millones]	1.1 millones [1.0 millones-1.2 millones]	960.000 [830.000-1.1 millones]
Europa Oriental y Asia Central	1.0 millones [950.000-1.1 millones]	1.5 millones [1.4 millones-1.7 millones]	120.000 [110.000-130.000]	190.000 [170.000-200.000]
América del Sur y Caribe	1.8 millones [1.5 millones-2.1 millones]	2.0 millones [1.7 millones-2.3 millones]	100.000 [86.000-120.000]	100.000 [86.000-120.000]
Oriente Medio y África del Norte	190.000 [150.000-240.000]	230.000 [160.000-330.000]	20.000 [15.000-29.000]	21.000 [12.000-37.000]
África Occidental y Central	6.3 millones [5.2 millones-7.7 millones]	6.5 millones [5.3 millones-7.8 millones]	450.000 [350.00-560.000]	410.000 [310.000-530.000]
Europa Occidental y Central y América del Norte	2.1 millones [1.9. Millones-2.3 millones]	2.4 millones [2.2 millones-2.7 millones]	92.000 [89.000-97.000]	91.000 [89.000-97.000]

Tabla 1. Evolución del número de personas infectadas por el VIH y nuevas infecciones por el VIH a nivel mundial entre 2010-2015. Datos actualizados en el año 2015. Fuente: UNAIDS 6

1.2. Estructura y genoma del VIH

EL VIH es un retrovirus de ARN monocatenario que tiene forma esférica y presenta un diámetro en torno a 100nm. Está formado por una bicapa lipídica donde se encuentran ancladas 72 espículas formadas por las glicoproteínas virales gp41 (transmembrana, TM) y gp120 (Superficie, SU) y una cápside (CA) compuesta por 60 subunidades triangulares formadas por la proteína estructural p24, en cuyo interior se ubica la nucleocápside constituida por la proteína p7 que contiene el material genético y las enzimas necesarias para el ciclo viral (**Figura 3A**)⁷.

El genoma viral esta formado por dos copias idénticas de ARN de cadena sencilla de 9,8 kb cada una con polaridad positiva que contienen nueve genes que codifican para 15 proteínas virales. Los principales genes son *GAG*, *POL* y *ENV*, que codifican para proteínas estructurales (matriz, MA; cápside, CA; nucleocápside, NC), enzimas virales (integrasa, IN; retrotranscriptasa, RT; proteasa, PR) y proteínas de la envuelta (gp120, SU; gp41, TM), respectivamente. El resto de genes, *TAT* y *REV* codifican para proteínas reguladoras esenciales en la replicación viral y *VIF*, *VPR*, *VPU* y *NEF* son los llamados genes “accesorios” que modulan la respuesta inmune del hospedador durante el ciclo de la replicación viral. En ambos extremos posee las repeticiones terminales largas o LTR (Long Terminal Repeat), que actúan como promotores transcripcionales y están implicados en la integración del genoma viral en el ADN celular^{8,9} (**Figura 3B**).

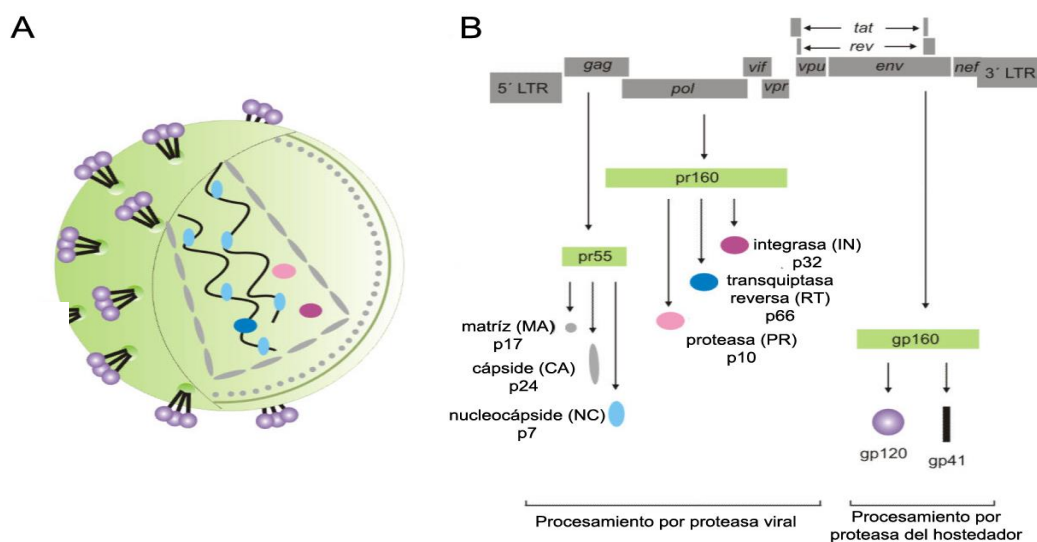


Figura 3. Estructura del VIH. (A) Morfología del virión. **(B)** Secuencia del genoma completo del VIH-1 y proteínas para las que codifican sus genes. Adaptada de Lazar, DC. *et al.*, 2016¹⁰.

1.3. Ciclo replicativo del VIH-1

El VIH-1 es capaz de infectar distintos tipos celulares que expresen el antígeno CD4 dentro de distintos tejidos humanos, como linfocitos T CD4+, monocitos, macrófagos, linfocitos B, células NK, células stem, y células dendríticas en el tejido linfoide; células de microglía y neuronas en el tejido nervioso; y células mucosas de intestino grueso y epitelio vaginal y células de Langerhans en el tejido epitelial¹¹, aunque la diana por excelencia donde el VIH se replica mejor son los linfocitos T CD4+¹². Sin embargo, los niveles de replicación viral van a depender del estado de activación o diferenciación según el tipo celular, puesto que las células en estado de

reposito o en fase no diferenciadas, no son permisivas a la replicación debido a los factores de restricción¹³ así como los niveles limitantes de los factores del huésped esenciales (HDF, de sus siglas en inglés)^{14,15}.

El ciclo de replicación del VIH-1 comienza cuando la proteína de la envuelta gp120 del virión se une al receptor celular CD4 y al co-receptor de quimioquinas, CCR5 o CXCR4 (1)¹⁶ y se produce la fusión de membranas entre el virus y la membrana plasmática celular liberándose la cápside viral al citoplasma (2), donde comienza el proceso de desensamblaje (3)¹⁷. Entonces comienza la transcripción inversa del ARN genómico viral a ADN complementario (ADNc) de doble cadena mediado por la transcriptasa inversa viral (4)¹⁸ y se constituye el complejo de preintegración (PIC), que contiene el ADNc viral y la enzima integrasa para transportarse al núcleo (5), donde el ADNc viral se integra en el genoma de la célula hospedadora a través de las secuencias TLR mediado por la integrasa viral (6)^{19,20}. El genoma viral integrado se denomina provirus.

Después de la integración, comienzan los procesos implicados en la replicación viral. La RNA polimerasa II (Pol II) reconoce y se une al promotor viral en la secuencia LTR 5' del provirus y comienza la transcripción del genoma viral mediada principalmente por el factor transcripcional NF- κ B, cuya elongación va a estar restringida por los factores negativo DSIF y NELF. Sin embargo, la proteína viral Tat es la encargada de reclutar al factor de elongación P-TEF β al complejo Pol II para estimular la elongación (7)²¹. La exportación nuclear de los transcritos virales primarios depende de la proteína viral Rev, que se une al factor de exportación CRM1 para reclutar los transcritos virales y exportarlos al citoplasma (8). A continuación, se produce la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) para dar lugar a las distintas proteínas virales en el citoplasma (9), donde se van a ensamblar (10) y se van a dirigir hacia la membrana plasmática para formar las nuevas partículas virales inmaduras (11) que van a salir de la célula infectada por gemación y gracias a la proteasa se conformara el núcleo dando un nuevo virus infectivo (12)²² (Figura 4).

En el estado de integración, el provirus VIH-1 puede adoptar diferentes comportamientos: permanecer latente, replicarse de forma controlada o replicarse masivamente sobre la célula infectada creándole un efecto citopático²³. La duración del ciclo vital del VIH-1 *in vivo* está estimada entre 24 y 48 horas²⁴.

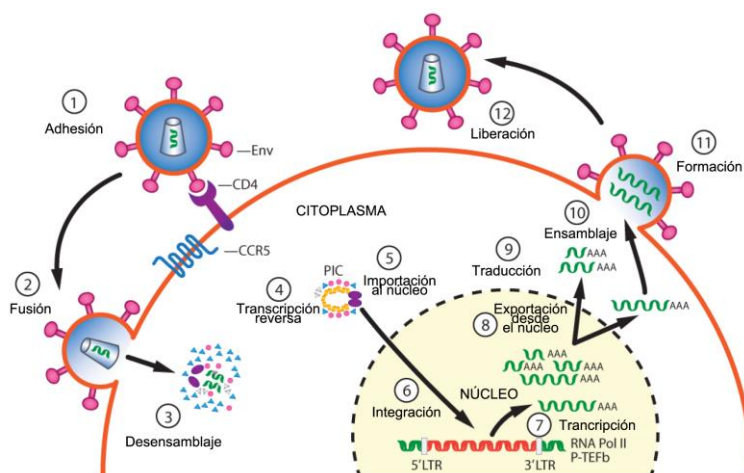


Figura 4. Ciclo replicativo del VIH-1. El primer paso es la unión de la partícula viral a los receptores celulares. El ARN genómico del VIH-1 entra en el citoplasma como un complejo de nucleoproteína y es transcrito inversamente en una doble cadena de ADN, con unas duplicaciones terminales conocidas como TLRs. Adaptada de Rice, A.P., 2015²⁵

1.4. Desarrollo de la infección por el VIH-1

1.4.1. Transmisión del VIH-1

La transmisión del VIH-1 se produce a través del intercambio de fluidos biológicos infectados por vía sexual, parenteral y/o vertical o perinatal, la efectividad de la transmisión dependerá del modo de exposición al virus. Actualmente, la mayoría de nuevas infecciones por el VIH-1 ocurren por transmisión entre mucosas, ya sea por contacto sexual a través del tracto genital, de la mucosa rectal o de la mucosa oral o bien entre madre e hijo a través de la mucosa oral o gastrointestinal²⁶⁻²⁸ (Tabla 2).

Lugar de Invasión	Sub-localización anatómica	Tipo de epitelio	Medio de transmisión	Probabilidad de transmisión por exposición	Número estimado de casos mundiales
Tracto genital femenino	Vagina	Estratificado	Semen	1 en 200 – 1 en 2,000	12.6 millones
	Ectocérnix	Estratificado			
	Endocérnix	Columnar			
	Otros	Varios epitelios			
Tracto genital masculino	Prepucio Interior	Estratificado ligeramente queratinizado	Secreciones y descamaciones cervicovaginal y rectal	mujer a hombre 1 en 700 – 1 en 3,000	10.2 millones
	Uretra peneana	Columnar/ estratificado	Semen	hombre a hombre 1 en 10 – 1 en 600	
	Otros	Varios epitelios			
Tracto gastrointestinal	Recto	Columnar	Semen	1 en 20 – 1 en 300	3.9 millones
	Tracto GI superior	Varios epitelios	Semen	1 en 2,500	1.5 millones
			Sangre materna, secreciones genitales	1 en 5 – 1 en 10	960.000
			Leche materna	1 in 5 – 1 in 10	960.000
Placenta	Vellosidades coriónicas	Dos capas de epitelio (cito-/sincitiotroblasto)	Sangre materna	1 en 10 – 1 en 20	480.000
Torrente sanguíneo	----	----	Hemoderivados, objetos punzantes	95 en 100 – 1 en 150	2.6 millones

Tabla 2. Estimación mundial de las vías de transmisión de nuevas infecciones por el VIH-1.
Adaptada de Hladik, F. *et al.*, 2008²⁸.

Las primeras etapas de la infección *in vivo* se han conocido debido a la inoculación del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) en macacos intrarrectal o intravaginalmente²⁹ y los explantes en tejidos genitales humanos. Mientras, el SIV puede transmitirse como virus libre o virus ligado a las células³⁰, en el VIH-1 aún es incierto así como el mecanismo por el cual atraviesa el epitelio. La fisiología de las mucosas es el primer obstáculo para la transmisión del VIH-1, generalmente se requieren de exposiciones sexuales múltiples para que se produzca la infección, ya que el cruce de la barrera epitelial por el virus es un evento raro, la incidencia de transmisión se ha estimado en 0.0001-0.004 por cada acto sexual^{31,32}.

Las múltiples capas del epitelio escamoso estratificado presentes en las regiones más expuestas de la mucosa genital femenina (vagina, ectocérnix) y masculina (prepucio interno, uretra peneana y fosa navicular) constituyen una barrera física significativa para la penetración de 30nm³³ y las células estratificadas no transmiten el virus³⁴. Sin embargo, este epitelio es la principal entrada del virus, por su elevada extensión y la frecuente pérdida de su integridad por las microabrasiones durante las relaciones sexuales^{35,36}, la presencia de úlceras genitales debido a infecciones sexuales coexistentes, el estado hormonal, la falta de micronutrientes o el uso de productos intravaginales que potencian la susceptibilidad a la infección por el VIH-1³⁷. Por el

contrario, el epitelio columnar consistente en una monocapa polarizada de células epiteliales cubriendo el endocérnix, perineo y/o mucosa anal es más susceptible a la entrada del VIH-1. Sin embargo, por su localización en el tracto genital superior y en la mujer la presencia del tapón de moco cervical en el endocérnix lo hacen menos accesible a la infección. Los diferentes tipos de epitelio conllevan diferentes mecanismos (**Figura 5**).

Los viriones libres pueden difundir a través de la mucosa al ser secuestrados por las células epiteliales esperando la oportunidad de infectar a una célula diana reclutándola mediante la liberación de quimioquinas o señales proinflamatorias³⁸ o por transcitosis en el epitelio columnar³⁹, mientras que, en el epitelio estratificado escamoso cuando está dañado, pueden penetrar por percolación a través de los espacios intersticiales internalizándose en compartimentos endocíticos en las CLs para infectar a las células diana o fusionarse directamente con los linfocitos T CD4+ intraepiteliales que expresan altos niveles de CCR5, produciendo grandes cantidades de progenie viral⁴⁰, o por transmigración a través de la microabrasión para entrar en contacto directo con las células dendríticas que mejoran la propagación viral a las células T CD4+²⁹.

Sin embargo, la determinación de varios factores (péptidos antimicrobianos, quimioquinas X4/R5, anticuerpos anti-VIH) presentes en el semen y las secreciones cervicovaginales, como los responsables de la inactivación de los viriones libres afectando a la transmisión del VIH-1, postulan como las verdaderas responsables de la infección, a las células infectadas presentes en estos fluidos, ya que con la neutralización del pH genital tras el coito por la leve alcalinidad del plasma seminal⁴¹, las células infectadas sobreviven por horas y tienen la oportunidad de alcanzar el epitelio, en este momento, con mayor número de células susceptibles al VIH-1 debido a los efectos proinflamatorios del semen en las células de la mucosa potenciando la transmisión de las partículas virales asociadas a células⁴². Estudios de microscopía electrónica de transmisión han demostrado que las células T y los monocitos infectados por el VIH-1 se unen fácilmente a las células epiteliales, dirigiendo al VIH-1 hacia la superficie epitelial donde los viriones pueden acumularse en hendiduras intersinápticas y ser secuestrados por las células epiteliales hasta tener la oportunidad de infectar una célula diana⁴³. En el epitelio columnar para ser reclutado a través de la liberación de quimioquinas o señales proinflamatorias por la célula infectante y/o la célula epitelial afectada⁴⁴, o ser trasncitado a través del epitelio hasta infectar las células en la lámina propia⁴⁵. Además, cuando el epitelio estratificado está dañado, se ha descrito que los macrófagos y las células T pueden transmigrar en las capas epiteliales e infectar directamente mediante sinapsis vírica a las células o a los propios linfocitos intraepiteliales CD4+ presentes en condiciones inflamatorias.

Las células dendríticas (CDs) desempeñan un papel fundamental en la exposición inicial del VIH-1, son el principal mediador en la transmisión asociada a célula del virus. El elevado nivel de expresión del receptor de lectina tipo C de manosa (DC-SIGN) altamente eficaz para la inserción de las partículas virales en las CDs, permite al VIH-1 la capacidad migratoria para acceder a los linfocitos T en los ganglios linfáticos. El VIH-1 es capaz de permanecer dentro de las CDs internalizado en vesículas endocíticas intracelulares hasta 5 días, que le permite tener tiempo suficiente para ser transportado hasta los compartimentos linfoides donde el virus puede ser diseminado⁴⁶

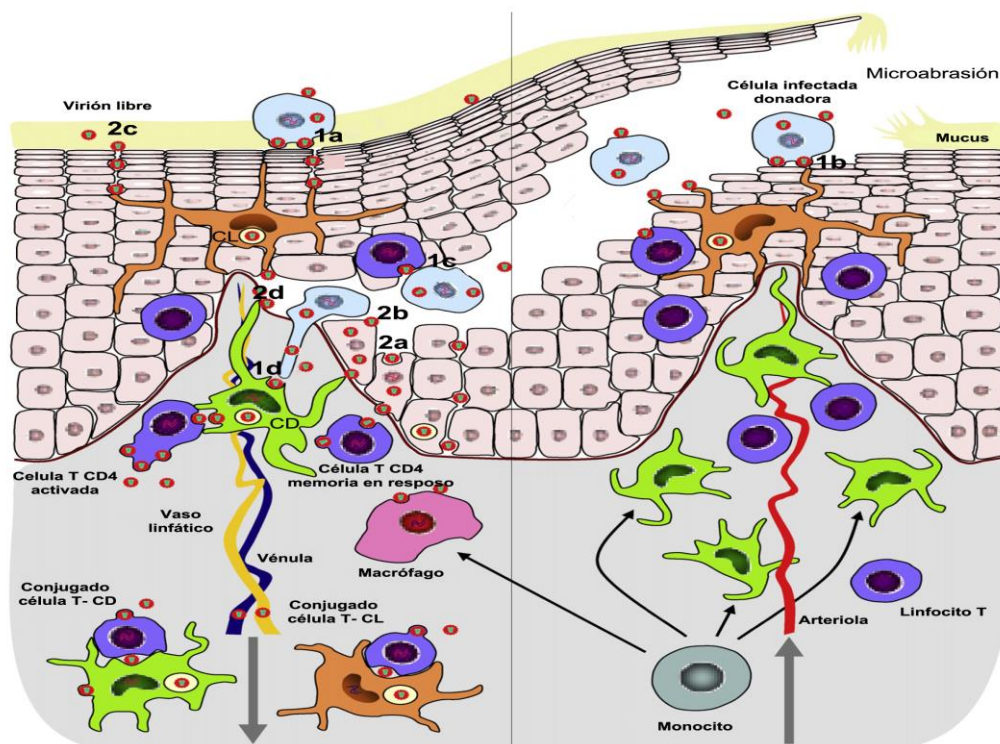


Figura 5. Mecanismos de invasión del VIH-1 en la mucosa. En la parte superior de la figura se muestran los receptores diana para el VIH en cada tipo celular. El epitelio estratificado escamoso presenta las papilas estromales, regiones microanatómicas enriquecidas con células dendríticas próximas a la superficie luminal de la mucosa, que representan focos susceptibles de infección. En la figura se representan dos papilas, la de la derecha es aferente, traslada las células sanguíneas a la mucosa donde se diferencian a macrófagos o células dendríticas y la de la izquierda eferente por donde emigran los conjugados de las células T CD4+ con células de Langerhans (CL) o CD4 activadas productivamente infecciosas. Una abrasión en el epitelio permite que tanto los viriones libres como las células infectadas del donante migren a través de los espacios intersticiales y entren en contacto directo con distintas células diana del epitelio y del estroma. 1. Mecanismos de transmisión del VIH asociado a célula: Transferencia del VIH desde la célula infectada a la CL a través de transcitosión o atracción por liberación de quimioquinas (1a). Transferencia directa célula a célula de la partícula viral mediante sinapsis vírica entre la célula infectada y la CL (1b). Transmigración de la célula infectada a través de los espacios intersticiales para infectar a linfocitos T CD4+ intraepiteliales (1c). Penetración de la célula infectada hasta el subepitelio para infectar productivamente a las CD4 estromales (1d). 2. Mecanismos de transmisión del virión libre: Infección directa de la célula epitelial (2a). Transcitosión del virión a través de la célula epitelial (2b). Migración entre las células epiteliales de la partícula viral para infectar a la CL (2c). Penetración a través de la microabrasión epitelial de los viriones para entrar en contacto directo con las células dendríticas estromales (2d). Adaptada de Hladik, F. and Doncel, GF., 2010⁴⁷.

1.4.2. Curso de la infección por el VIH-1

Con la entrada del virus en el hospedador se inicia el proceso de infección que **a).** **Infección aguda o primo-infección**, durante las primeras semanas cursa con los síntomas del síndrome de infección aguda como un cuadro pseudogripal o mononucleosis infecciosa que tras una o dos semanas deja al individuo asintomático. El periodo ventana hasta que se detectan los anticuerpos específicos frente al VIH-1 es de 2-6 semanas que marca la seroconversión del individuo. Se caracteriza por valores elevados de viremia plasmática, con valor máximo a las dos semanas y un descenso en el número de células T CD4+ por destrucción directa o indirecta al quedar atrapados en los órganos linfoides como principales centros de replicación. La aparición

de la respuesta mediada por los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC) específicos para el VIH-1 capaz de controlar parcialmente la replicación viral permite la disminución de la carga viral (CV) y una recuperación parcial del número de linfocitos T CD4+.

b). Infección crónica, es la latencia clínica o fase asintomática, caracterizada por una disminución de la replicación viral con un valor estable de la viremia plasmática, pero en la cual existe una destrucción persistente de los linfocitos T CD4+ por procesos de apoptosis inducidos por la hiperactivación del sistema inmunológico y un ambiente alterado de citoquinas y quimioquinas. La recuperación homeostática de linfocitos T CD4+ es insuficiente para compensar la pérdida, y la aparición de variantes virales de escape más virulentas con el progreso de la infección, acelera la destrucción del sistema inmune. La velocidad de progresión de la enfermedad dependerá del equilibrio dinámico entre los factores virales y los inmunológicos del hospedador. Esta segunda fase suele durar de 2 a 10 años en ausencia de terapia antirretroviral combinado (TARc). El 50% de infectados por VIH-1 desarrollan síntomas de infección, como un marcado descenso de linfocitos T CD4+, hiperplasia linfoide y/o deterioro de las funciones del sistema inmunológico⁴⁸.

c). SIDA, es el estadio más avanzado de la infección con un incremento persistente de la viremia con una deficiencia subyacente en la inmunidad reflejada en los valores de células T CD4 <200 células/ μ l en sangre, con la aparición de las enfermedades oportunistas y neoplasias definitorias de SIDA como el sarcoma de Kaposi o el linfoma de Burkitt, que culminará con la muerte en un tiempo variable si no se establece la TARc⁴⁹.

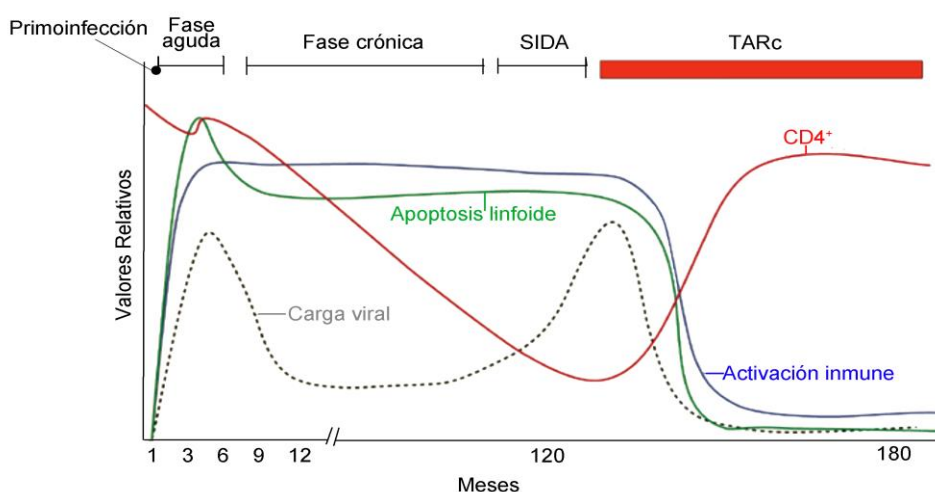


Figura 6. Curso de la infección por VIH-1. Adaptada de Deeks, SG. *et al.*, 2015

1.5. Terapia antirretroviral combinada (TARc)

La introducción de la TARc en 1996 y el desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales eficaces han supuesto un hito en la infección por el VIH-1, controlando la carga viral y mejorando la calidad y la esperanza de vida de los individuos infectados⁵⁰. Sin embargo, están apareciendo nuevos fenotipos clínicos de envejecimiento asociados a la inflamación crónica y activación del sistema inmune en individuos VIH+ típicos de la población envejecida⁵¹, como

rastornos neurocognitivos, enfermedades cardiovasculares (CVD), síndrome metabólico (MS), anomalías óseas y neoplasias no definitorias de SIDA⁵².

El tratamiento antirretroviral no cura el VIH, pero evitan que el virus se replique y destruya a las células T CD4+, permitiendo que el sistema inmunitario se recupere y pueda combatir las infecciones y las neoplasias asociadas a SIDA. Es muy importante que todas las personas seropositivas para el VIH inicien lo antes posible la TARc, ya que reduce la morbimortalidad y el riesgo de transmisión manteniendo la carga viral indetectable. Si la infección es asintomática, se recomienda empezar con la terapia cuando el recuento de CD4 está en torno a 350 células/mm³.

Los fármacos disponibles para la infección por el VIH se clasifican en 5 categorías dependiendo de su modo de acción en el ciclo viral:

- i. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleótidos (ITIN): actúan sobre la transcriptasa inversa viral, son la base de la TARc de primera línea, y en muchas ocasiones se toman combinados en un sólo comprimido (Zidovudina o AZT, Didanosina o ddI, Estavudina o d4T, Lamivudina o 3TC, Tenofovir, Abacavir, Emtricitabina o FTC).
- ii. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleótidos (ITINN): también actúan frente a la transcriptasa inversa pero por un mecanismo distinto (Nevirapina, Delavirdina, Efavirenz, Etravirina, Rilpivirina).
- iii. Inhibidores de la proteasa (IP): actúan frente a la proteasa viral (Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tripanavir, Darunavir).
- iv. Inhibidores de la entrada: evitan que el virus se una a las células, se dividen en inhibidores de la fusión (Enfuvirtida o T20) que sólo se prescriben en situación especiales e inhibidores del CCR5 (Maraviroc) que sólo es eficaz en individuos infectados por el VIH con tropismo CCR5.
- v. Inhibidores de la integrasa: evitan la integración del genoma viral en la célula hospedadora al inhibir la integrasa viral (Raltegravir).

El régimen de tratamiento frente al VIH por lo general incluye tres fármacos al menos de dos familias diferentes, que dependerá de varios factores como genotipo, coinfecciones y embarazo, entre otros, y de los posibles efectos secundarios e interacciones entre fármacos.

Actualmente, se está investigando sobre la “cura funcional” y la “cura esterilizante”⁵³. La cura funcional se centra en conseguir una carga viral indetectable sostenida en el tiempo sin necesidad de TARc, similar al fenómeno que ocurre en los individuos VIH controladores de élite, que son capaces de controlar por sí mismos la replicación del virus sin necesidad de tratamiento, y/o en individuos controladores post-tratamiento, que iniciaron la TARc durante la infección en fase aguda y al retirarles el tratamiento mantienen durante años la carga viral controlada. Mientras que, la cura esterilizante trata de alcanzar la completa eliminación del VIH-1 replicativo centrándose en la erradicación del reservorio viral latente. El caso reportado del “paciente de Berlín”, el cual tras un trasplante de médula ósea de un donante homocigoto para la mutación defectiva $\Delta 32$ del gen *CCR5*, consiguió una cura funcional del VIH-1^{54,55}, y cinco años después del

trasplante seguía presentando valores de carga viral indetectables sin TARc, ha supuesto la esperanza de lograr una cura funcional frente al VIH-1. Aún se mantiene el seguimiento de este paciente para observar si se produce reactivación de algún reservorio o continua indetectable su carga viral⁵⁶.

Un factor importante de la activación inmune y de la disfunción durante la infección por el VIH es el daño en las mucosas y las estructuras linfoides. En la última década, la progresión de la infección por el VIH se ha definido por la rápida depleción de las células T CD4+ de memoria efectoras activadas que expresan CCR5, densamente pobladas en el tracto gastrointestinal, diana preferida por el virus en la primoinfección⁵⁷, seguida por el deterioro de la integridad del epitelio intestinal y el aumento de la translocación de productos microbianos al romperse la simbiosis entre las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal y el control inmunológico del huésped⁵⁸. La liberación de los productos bacterianos a la circulación sistémica provoca una persistente activación sistémica del sistema inmune innato y adaptativo que desencadena y mantiene la inflamación⁵⁹. Durante la infección aguda por el VIH, los linfocitos T CD4+ de la mucosa intestinal se agotan rápidamente por efecto directo del virus y la apoptosis por la activación de la muerte celular inducida (AICD, de sus siglas en inglés), que permite la replicación viral descontrolada y el establecimiento de los reservorios. A pesar de la eficacia de la TARc, la restauración de las células T CD4+ en el intestino es mucho más lenta que en sangre periférica, debido a alteraciones en el reclutamiento de células T CD4+ en el intestino tras la infección⁶⁰ (**Figura 7**).

Esta activación local en el tracto gastrointestinal contribuye a un mayor número de células inflamatorias como las células dendríticas plasmocitóides (CDps), los neutrófilos y los monocitos y una pérdida de las células T CD4+ productoras de IL-17 y IL-22 junto a las células dendríticas CD103+, esenciales para la integridad de la mucosa⁶¹⁻⁶³, asociadas a mayores niveles de translocación bacteriana definida por el nivel de LPS y mayor concentración de DNA viral en el intestino⁶⁴. Además, la producción de sCD14 y citoquinas proinflamatorias representa un factor importante en la patogénesis de la enfermedad, siendo parcialmente responsable de la depleción de las células T CD4+ en el desarrollo de las comorbilidades como el daño hepático⁶⁵. Por lo tanto, la activación inmunológica persistente puede ser una de las principales causas para el fracaso inmune progresivo que conduce a la inmunodeficiencia. A pesar de la eficacia en el control virológico por el TARc, algunos pacientes definidos como "no respondedores inmunológicos" no son capaces de restaurar su inmunidad celular y los linfocitos T CD4+, sugiriéndose como responsable a la translocación microbiana persistente⁶⁶.

La pérdida masiva de células T CD4+ en el intestino está fomentada por los macrófagos residentes en la superficie de la mucosa infectados productivamente con el VIH-1, de modo que pueden transmitir el virus a las células T CD4+ por contacto directo célula a célula durante la presentación antigénica⁶⁷. Los macrófagos que se infiltran en la mucosa pueden promover la inflamación local y la lesión tisular debido a su baja actividad fagocítica que impide la eliminación eficiente de los antígenos virales que atraviesan la barrera intestinal dañada, además secretan citoquinas que atraen a los linfocitos T CD4+ aumentando el número de células diana primarias potenciando la infección⁶⁸.

a infección por el VIH se caracteriza por un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias desde la primoinfección y persistente a lo largo de su curso natural. Durante la infección viral aguda, el primer marcador detectable de la respuesta inmune innata es un aumento de los niveles de proteínas de fase aguda como la amiloide sérica A (AAS) que puede ser desencadenada por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y factores extrínsecos como LPS. Los niveles de citoquinas y quimioquinas en el plasma aumentan a medida que incrementa la carga viral. Los niveles de IL-15, interferones de tipo I y quimioquina ligando CXCL10 o IP10 aumentan rápidamente pero transitoriamente; mientras que IL-18, TNF α , IFN γ e IL-22 se mantienen en niveles altos, e IL-10 presenta un incremento ligeramente retrasado. Algunas de estas citoquinas tienen actividad antiviral como los IFNs de tipo I, que junto a IL-15 e IL-18 potencian las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Sin embargo, la intensa respuesta de citoquinas durante la infección aguda puede promover la replicación viral y la hiperactivación. Las fuentes celulares de las citoquinas y quimioquinas de fase aguda probablemente incluyen, células T CD4+CCR5+ infectadas, CD activadas, monocitos, macrófagos, células NK, células NKT y, posteriormente, células T VIH-antígeno específicas. Se desencadena una respuesta contra el propio virus, pero por su persistente replicación e hipervariabilidad consigue escapar de la respuesta celular y humoral⁶⁹.

La activación inmunológica inducida por el VIH durante la fase crónica de la infección se caracteriza por la producción masiva de citoquinas proinflamatorias responsables de la deleción clonal, el agotamiento gradual de las células T CD4+ periféricas a lo largo del tiempo, la alteración de la dinámica de las células T CD4+ y CD8+, y la involución del timo y de la infraestructura linfoide. La proliferación de las células T CD4+ está impulsada por la estimulación antigénica, por el contrario, en las células T CD8+ se produce por la expansión clonal de los linfocitos VIH-antígeno específicos en presencia del virus. Sin embargo, la activación persistente del sistema inmune por la replicación viral, las proteínas circulantes del virus como gp120 y NEF vía TLR9, las infecciones oportunistas y la reactivación de infecciones virales latentes como citomegalovirus (CMV), conduce a una apoptosis celular sostenida hacia la senescencia. Todo ello, da lugar a mecanismos homeostáticos con el fin de renovar la población celular, pero ello conlleva un desgaste excesivo, con el consiguiente deterioro progresivo que instaura un estado inmunosenescente y exhausto^{70,71}. Además, la pérdida progresiva de las células T reguladoras (Treg) que expresan Foxp3; la expresión de los reguladores negativos de la activación de las células T, como el de muerte programada 1 (PD-1) y el antígeno citotóxico de linfocito T -4 (CTLA-4); se correlacionan con la activación inmune y la viremia⁷².

La elevada producción de citoquinas proinflamatorias en paralelo conduce al deterioro de las funciones fisiológicas generando desórdenes relacionaos con la inflamación tales como osteoporosis y/o aterosclerosis, típicas de enfermedades comórbidas propias del agotada de las células específicas frente al VIH, conlleva la colapso del sistema inmunológico para controlar al virus instaurándose el estadio de SIDA. El ritmo de este proceso puede variar, dependiendo de la patogenicidad intrínseca del virus, de los factores genéticos del hospedador y de los factores ambientales⁷⁰.

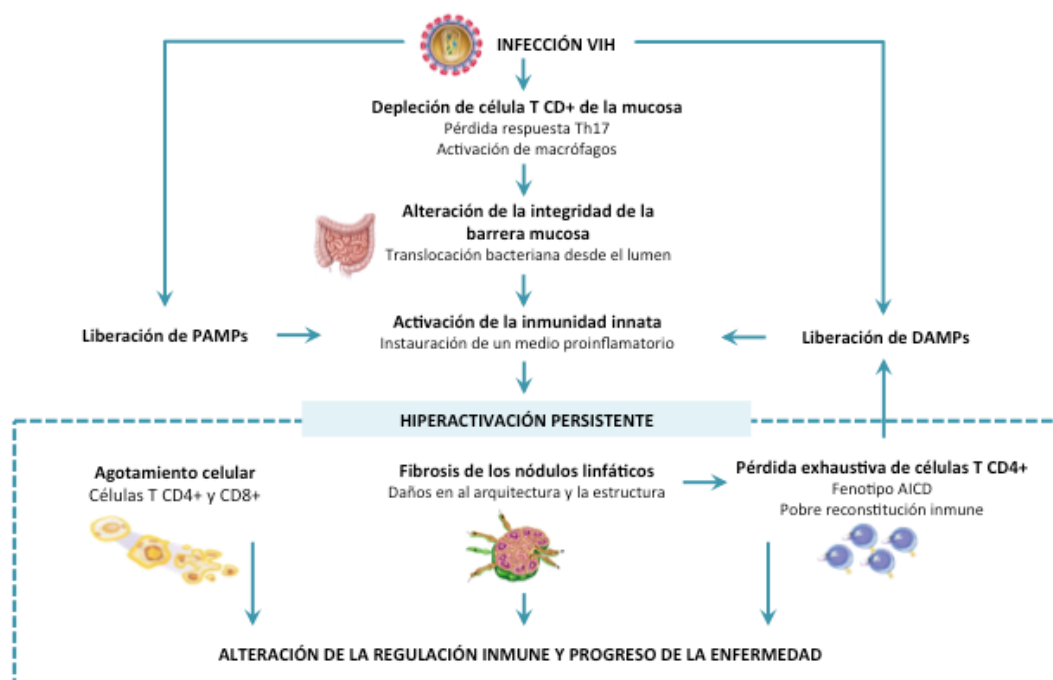


Figura 7. Patogénesis de la infección por el VIH-1: mecanismo de hiperactivación e inmunosenescencia. Adaptada de Nasi, M. *et al*, 2014⁷¹.

Por otro lado, a lo largo de su ciclo de vida el VIH se repliega generando diferentes moléculas que pueden actuar como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del VIH, que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) desencadenando una respuesta inmune innata con la inducción de un estado proinflamatorio⁷³. La liberación de moléculas llamadas "patrones moleculares asociados a daños" (DAMPs) de las células moribundas, a su vez pueden desencadenar otra respuesta inmune innata, causando inflamación a través del acoplamiento de los mismos TLRs que están unidos por PAMPs, como los DAMPs mitocondriales (MTDs) liberados por los tejidos dañados, que se han encontrado en altas cantidades en el plasma de pacientes infectados por el VIH⁷⁴. Podrían tener un papel patogénico en el sostenimiento de la inflamación estéril contribuyendo en parte a la activación crónica del sistema inmunológico⁷⁵.

2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

2.1. Aspectos generales de la infección

2.1.1. Prevalencia del Virus de la Hepatitis C

El valor estimado de individuos infectados por el VHC a nivel mundial, basados en la positividad de los anticuerpos anti-VHC, es del 1.9%, entre 130-150 millones de personas. Sin embargo, ya sea por eliminación espontánea o como resultado del tratamiento, solo el 71%, es decir, 62.5-79.4 millones de personas son virémicos, positivos para el ARN del VHC⁷⁶. En 2016, la OMS en la 69ª Asamblea Mundial de la Salud aprobó eliminar la infección por VHC para el 2030, con una reducción del 90% de nuevos casos de hepatitis C crónica, del 65% de muertes por hepatitis C, y alcanzar un 80% de cobertura en el tratamiento a las personas elegibles con

hepatitis C crónica⁷⁷. Sin embargo, la disponibilidad de datos globales robustos es una limitación, ya que, solo un 29% de los casos reportados proceden de los países más afectados con bajos recursos.



Figura 8: Representación esquemática de la prevalencia de la viremia del VHC y del número de personas infectadas en el mundo. Adaptada de Manns, MP. *et al.*, 2017⁷⁸

La infección por el VHC tiene una distribución universal, aunque su prevalencia es variable en función del área geográfica, siendo las regiones más afectadas el este y el sur de Asia y el norte y el oeste de África, relacionadas a infecciones debidas a causas iatrogénicas, mientras que el 67% de las infecciones por VHC en el mundo se deben a la adicción a drogas por vía parenteral (ADVP)⁷⁹ (**Figura 8**). La distribución por edades de la población infectada por el VHC se correlaciona con la fuente primaria de infección. Así, en países donde el factor de riesgo es la ADVP, la edad media de infección es de 30 años; mientras que en los países con mayoría de infecciones debidas a causas iatrogénicas, la edad está entre 50-60 años⁸⁰.

2.1.2. Genotipo viral

A través de árboles filogenéticos con las secuencias de los nucleótidos, el VHC se ha dividido en 7 genotipos (G) que comprenden a su vez 67 subtipos confirmados, 20 asignados provisionalmente y 21 aun sin asignación, identificados con letras minúsculas. Los genotipos presentan una homología aproximadamente del 66-69% entre sí, mientras que los subtipos de un 77-80%⁸¹. La distribución genotípica del VHC muestra una compleja distribución geográfica según la región (**Figura 9**). Esta distribución refleja la epidemiología, las diferentes vías de transmisión, las migraciones y la respuesta al tratamiento.

Los genotipos 1, 2 y 3 son los responsables del 90% de las infecciones por VHC en Asia, Caribe, Europa, América del Norte, Sudamérica y Australia; siendo el genotipo 1b el más Sudáfrica, el genotipo 6 en el sudeste asiático, y el genotipo 7 aislado de inmigrantes africanos en Canadá^{82,83}.

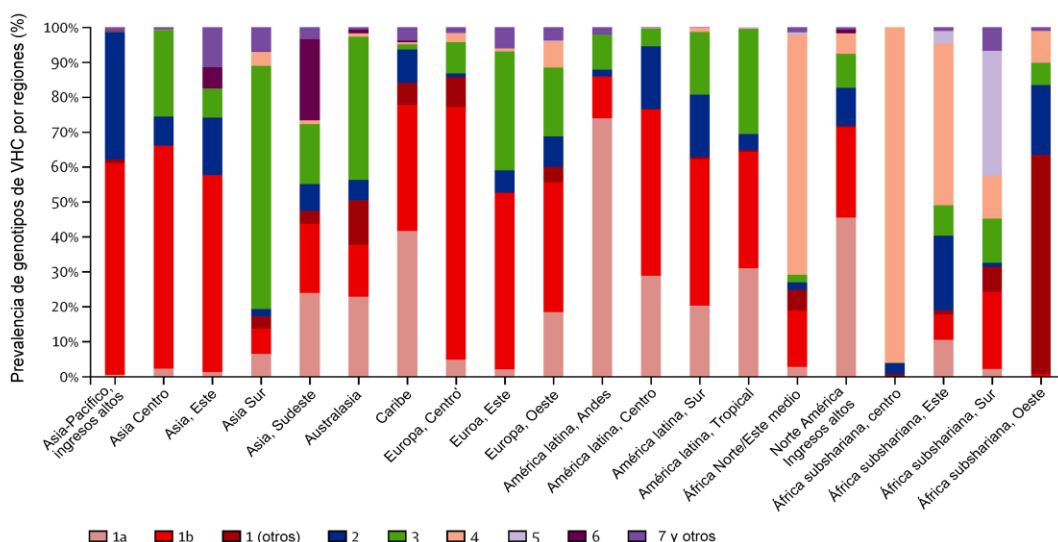


Figura 9: Distribución genotípica del VHC en el mundo. Los genotipos 1, 2 y 3 están distribuidos universalmente, siendo el genotipo 1b el más prevalente en Asia y Europa, el genotipo 4 en África, el genotipo 5 en Sudáfrica, el genotipo 6 en el sudeste asiático y el genotipo 7 en un inmigrante de Canadá. Adaptada de The Polaris Observatory HCV Collaborators, 2016⁸³.

Globalmente, el G1 es el predominante con un 49.1% del total de infecciones, seguido por el G3 con un 17.9%, el G4 con un 16.8%, el G2 con un 11%, el G5 con un 2%, el G6 con un 1.4% y el G7 junto a los no bien definidos con el 1.8% restante. Esta distribución tiene implicaciones en los requisitos para el tratamiento, ya que los fármacos pangentípicos son la clave para los países con menores ingresos, donde el G1 representa menos de la mitad de todas las infecciones^{82,84}.

En cuanto a la distribución genotípica en España, el último análisis del estudio GEHEP con datos del 2000-2015, sugiere que el genotipo 1 sigue siendo el predominante. Sin embargo, hay una tendencia decreciente del subtipo 1b; una disminución del genotipo 3 quizás debido a los efectos de los nuevos tratamientos; y la detención de la propagación del genotipo 4, probablemente por las medidas de control tomadas en la mayoría de los coinfectados VIH/VHC y la menor eficiencia en la transmisión por vía sexual. La mayor prevalencia del subtipo 1a y los genotipos 3 y 4 se observó en los jóvenes y ADVP⁸⁵.

2.2. Factores de riesgo y vía de transmisión del VHC

El VHC se transmite por vía percutánea, hemoderivados, causas iatrogénicas, ADVP, vía materno-fetal y transmisión sexual. Esta última es la menos frecuente, excepto en el caso de hombres que mantiene sexo con hombres (HSH) sin protección. En estos casos, conlleva prácticas de alto riesgo con el deterioro de la barrera de la mucosa, jugando un papel relevante en las nuevas transmisiones del VHC⁸⁶⁻⁸⁸. Los HSH infectados por VIH con un comportamiento sexual de alto riesgo se han asociado a un amplio “transmission bottleneck”, definido por el número de virus genéticamente distintos que pueden ser transmitidos durante el acto sexual, con un riesgo 3 veces mayor de adquirir el VHC⁸⁹.

En los últimos años, la incidencia de nuevas infecciones por el VHC ha disminuido en un 83%, entre 157.000 y 315.000 nuevos casos al año⁷⁹. Sin embargo, el número de

complicaciones derivadas de la hepatopatía crónica como la cirrosis, el carcinoma hepatocelular (CHC), fallo hepático y/o muerte relacionada con el hígado han aumentado entre 1990 y 2013 de 31.7 a 42.5 millones de afectados⁹⁰, y seguirán en dicha tendencia, ya que la población infectada con VHC progresa, hasta la enfermedad hepática en etapa tardía, en ausencia de tratamiento y programas de detección universales⁹¹⁻⁹³. Además, la infección por VHC se asocia con numerosas manifestaciones extrahepáticas que mejoran tras alcanzar una respuesta viral sostenida (RVS) con el tratamiento^{94,95}.

2.3. Estructura y genoma del VHC

El VHC es un virus de la familia Flaviviridae, del género Hepacivirus. Los viriones de VHC presentan un tamaño de 45-65nm con envuelta formada por una bicapa lipídica donde se anclan dos glicoproteínas (gp35 y gp76) envolviendo la nucleocápside no icosaédrica, cuyo genoma es una única cadena de ARN de polaridad positiva de 9.6kb, con un único marco de lectura abierto (ORF, del inglés Open Reading Frame) que codifica para una larga poliproteína de 3.010 aminoácidos flanqueada en ambos extremos 5' y 3' por dos regiones no codificantes (NTR), junto a los elementos reguladores en *cis* (CREs, del inglés *cis*-acting replication elements) en los NTR y en la secuencia del gen *NS5B* de la ARN polimerasa ARN-dependiente (**Figura 10A**)⁹⁶.

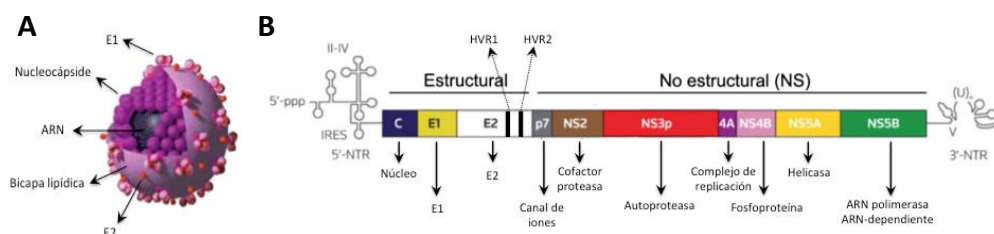


Figura 10: Organización del genoma del VHC. (A) Morfología del virión. (B) Secuencia del ARN de polaridad positiva del VHC que contiene un ORF para las regiones estructurales y las no estructurales. Adaptada de Cordek D.G. *et al*, 2011⁹⁷

La traducción del ORF es dependiente de un sitio interno de iniciación (IRES) en la región 5' UTR, que interactúa directamente con la subunidad 40S ribosomal⁹⁸. La poliproteína viral se fragmenta co- y post-traduccionamente, por proteasas del hospedador (signalasas y peptidasas) generando 3 proteínas estructurales (núcleo, E1 y E2) y por serin-proteasas virales para las 7 no estructurales o NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (**Figura 10B**). El primer corte lo realiza una proteasa del hospedador en los primeros 191 aminoácidos del extremo N-terminal de la región estructural dando lugar a las proteínas de la cápside, con capacidad de unirse al ARN viral con una secuencia de aminoácidos altamente conservada entre los diferentes aislados virales. A continuación, se procesan las glicoproteínas de la envuelta E1 y E2, las cuales sirven para la fijación del virus y su entrada a la célula diana. La proteína E2 tiene dos zonas hipervariables HVR1 y HVR2 que permiten al virus escapar del sistema inmune y son las responsables de la aparición de infecciones persistentes y de los fracasos en el desarrollo de una vacuna profiláctica basada en las proteínas virales. Se postula como posible diana de anticuerpos neutralizantes^{99,100}.

Las proteínas NS procesados por las serin-proteasas virales son una pequeña proteína de membrana (p7) y seis proteínas enzimáticas (NS2 a NS5). La viroporina p7, es un canal de iones capaz de formar poros en la membrana celular promoviendo la infectividad del virus¹⁰¹. NS2 es una autoproteasa que inhibe la apoptosis y modula la transcripción de genes, pierde su actividad tras la escisión de NS3 y es rápidamente es degradada por el proteasoma¹⁰². NS3 es una proteína multi-funcional con acción serin-proteasa en el dominio N-terminal y helicasa/NTPasa en el dominio C-terminal¹⁰³. NS4A, actúa como cofactor de la NS3 serin-proteasa¹⁰⁴, mientras que NS4B, sirve de anclaje al complejo de replicación, inhibe la síntesis celular y modula la actividad RpRd¹⁰⁵. NS5A tiene su papel como mediador en la interacción con proteínas celulares como con el dominio catalítico de la proteína-quinasa PKR a través de su región determinante para la sensibilidad al interferón (ISDR), implicada en la resistencia al tratamiento con interferón; regulando la replicación y el ensamblaje viral^{106,107}. NS5B tiene actividad ARN polimerasa ARN-dependiente y codifica la región esencial para la replicación genómica de los replicones^{108,109}.

2. 4. Heterogeneidad genética del VHC

La gran variabilidad genética del VHC entre sus secuencias genómicas da lugar a variantes intergenómica, dando lugar a los genotipos y subtipos; e intragenómica, dando lugar a las cuasiespecies¹¹⁰. El alto grado de heterogeneidad genética y la rápida dinámica de infección, son consecuencias de la baja fidelidad de la ARN-polimerasa dependiente de ARN responsable de la replicación viral y la alta cinética de replicación durante el ciclo viral. La tasa de producción viral es de 10^{12} viriones al día (de 10 a 100 viriones por célula al día), con una vida media del virus en sangre de 2.7h¹¹¹. La frecuencia media de alteraciones de nucleótidos en el ARN del VHC se estima entre $1.46-1.96 \times 10^3$ sustituciones por nucleótido por año¹¹². De este modo, es fácil comprender como la elevada tasa de variación genética del VHC dentro de un mismo individuo genera la presencia simultánea de diferentes variantes virales estrechamente relacionados con una homología superior al 98%, denominadas cuasiespecies. Estas variantes virales permiten a la población viral dominante, mediante la selección clonal, eludir la respuesta inmune ejercida por el huésped y progresar a la cronicidad de la infección¹¹³, y tiene consecuencias directas sobre la respuesta al tratamiento y la aparición de resistencias¹¹⁴.

2.5. Ciclo viral del VHC

Las partículas virales de VHC se asocian con lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés Low Density Lipoprotein), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés Very Low Density Lipoprotein), y apolipoproteínas B (APOB), C (APOC) y E (APOE) del huésped formando las lipoviripartículas (LVP). De modo que las LVP actúan a modo de ligando del receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) para evadir la respuesta humoral y permitir la unión y entrada del VHC al hepatocito¹¹⁵.

En la unión viral a la superficie celular, en el paso inicial de acoplamiento o attachment, las LVP interaccionan con baja afinidad con factores no específicos como los glicosaminoglicanos (GAG) y el rLDL^{116,117}. A continuación, en el proceso de unión las partículas

virales interactúan con receptores de entrada específicos. En primer lugar con el receptor Scavenger ('receptor escoba') tipo 1 clase B (SR-B1), que facilita la unión de las glicoproteínas de la envuelta viral con la tetraspanina CD81^{118,119}, estrechamente unida a la proteína claudin-1 (CLDN1) para formar el complejo multi-receptor esencial para el entrada del VHC¹²⁰, regulado probablemente por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor de efrina tipo A2 (EphA2) y la GTPasa HRas¹²¹. Después de la interacción con el complejo CD81/CLDN1, el VHC interactúa con la proteína ocludina (OCLN), también estrechamente unida al complejo receptor. La difusión de membrana de CD81, regula la entrada de la LVP¹²². Otras moléculas como el receptor de transferrina (Ttf), la tetraspanina CD63 y el transportador del colesterol Nieman-pick C1-like1 (NPC1L1), éste localizado en los conductos biliares (BC), se ha demostrado su participación en la unión VHC-hepatocito, pero sus mecanismo aún no están claros^{78,123}. Los complejos formados por los receptores estrechamente unidos parece que permiten la transmisión directa célula-célula, ofreciendo una ruta de evasión de los anticuerpos neutralizantes¹²⁴ (**Figura 11A**).

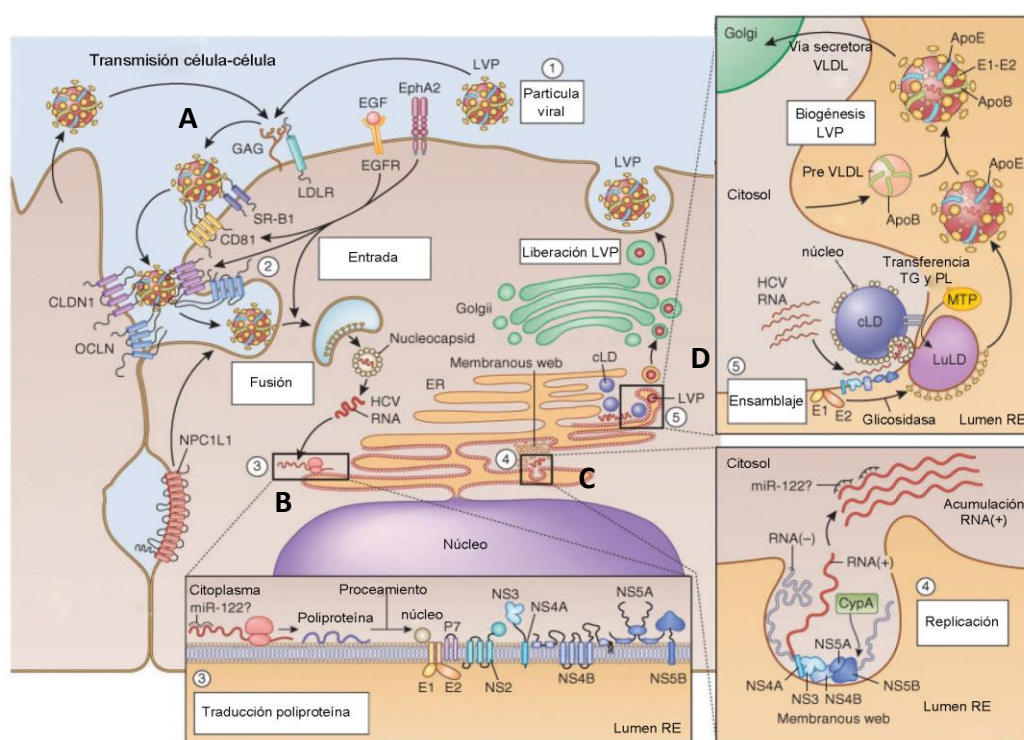


Figura 11: Esquema representativo del ciclo viral del VHC. Se muestran las etapas de (A) unión de la partícula viral por endocitosis mediada por clatrina; (B) traducción y procesamiento de la poliproteína; (C) replicación viral y ensamblaje en el retículo endoplásmico; y (D) liberación mediado por el aparato de Golgi. Adaptada de Scheel T.K.H. and Rice C.M., 2013¹²⁵.

A continuación, el virus se internaliza por endocitosis mediada, en un proceso pH-dependiente. Se produce la fusión de membranas, viral y endosomal, se cree que favorecida por la glicoproteína E1 de la envuelta que actúa como fusógeno, para liberar el genoma viral al citosol, donde el ARN genómico de cadena positiva sirve como ARNm para la síntesis de la poliproteína. La poliproteína precursora se traduce en esférulas membranosas del retículo endoplásmico, donde se generan las proteínas estructurales y las NS, a partir de la región no traducida 5' del VHC, la cual contiene el IRES que controla la traducción del ORF del VHC¹²⁶

(Figura 11B). La replicación es catalizada por NS5B, jugando también la NS5A un papel importante en la regulación de la replicación del virus. La NS5A está involucrada en la unión del ARN y en el balance entre la replicación y las últimas etapas del ciclo viral dependiendo de su estado de fosforilación. Además, la helicasa-NTPasa NS3 es la encargada de separar las nuevas secuencias de ARN de las hebras molde, desenrollar las estructuras secundarias del ARN y desplazar las proteínas de unión a ARN¹²⁵. La proteína de membrana NS4B cataliza los cambios conformacionales reordenando la membrana dando lugar a la formación de la "membranous web" o complejo de replicación del VHC. Las hebras de polaridad positiva sirven de molde para la síntesis de un intermedio de polaridad negativa, que son empleadas para producir las nuevas cadenas de polaridad positiva para la posterior traducción en poliproteína, intermedios de replicación o ensamblaje de nuevos viriones. Varios factores del huésped parecen estar implicados en la síntesis del VHC, tales como la ciclofilina A (peptidilprolyl isomerasa A) que se une a NS5A y NS5B, el micro ARN-122 (mir122) que se une a dos regiones conservadas de IRES necesarios para una la replicación y estabilización del ARN, así como la fosfatidilinositol 4-quinasa III α o las vías de biosíntesis de ácidos grasos y colesterol^{127,128} (Figura 11C).

El ensamblaje y la liberación de la partícula viral está regulado por las biogénesis de las VLDL generándose viriones como LVP¹²⁹. La proteína del núcleo madura (core) se relocaliza del RE a las gotitas lipídicas citoplasmáticas (cLDs, del inglés cytoplasmic lipid droplets) por la interacción de NS5A con la diacilglicerol aciltransferasa-1 (DGTA-1) para formar nucleocápsides cargadas con ARN¹³⁰. Las nucleocápsides se transfieren a gotitas de lípidos luminal (luLDs, del inglés luminal lipid droplets) precursores de las VLDL que contienen APOB para formar las LVP que también adquieren APOE y APOC y por gemación al salir del RE adquieren la envuelta lipídica¹³¹. Finalmente, el virión como LVP es liberado por la ruta de secreción mediada por el aparato de Golgi. En la coordinación del ensamblaje se encuentran implicadas las proteínas p7, NS2 y NS3-NS4A. La interacción de la proteína core con el ARN viral, parece que actúa como interruptor apagando el proceso de traducción/replicación y encendiendo el de ensamblaje¹³² (Figura 11D).

2.6. Historia Natural de la Infección por el VHC

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del huésped que inicialmente detecta la infección por el VHC. Este proceso se activa de forma intrínseca cuando los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) dentro de la célula infectada perciben el virus como no propio desencadenando la activación de cascadas de señalización para suprimir la replicación viral y la propagación a otras células. Sin embargo, esta primera línea de defensa no es suficiente y es necesario que orqueste la respuesta inmune adaptativa frente a la infección¹³³. Aproximadamente el 20-30% de las personas que están infectadas con el VHC aclaran espontáneamente el virus durante la fase aguda de la infección, mientras que el 70-80% desarrollan una infección crónica a lo largo de toda la vida¹³⁴. Los mecanismos implicados en estas diferencias aún no se conocen completamente, pero reflejan la compleja interacción entre el virus y el huésped, donde la importancia de la inmunidad innata en el control de la infección viral ante muchos virus, incluyendo el VHC, esta incrementada por los mecanismos de evasión que han desarrollado los virus¹³⁵.

2.6.1. Respuesta antiviral innata

El VHC puede ser detectado por las tres clases de PRRs, los receptores RIG-I (receptores del gen I inducible por el ácido retinoico), los receptores tipo toll (TLR) y el dominio de oligomerización de nucleótidos (NLRs) (**Figura 12**). Estos receptores detectan los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del VHC o procedentes de la translocación bacteriana, y los patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), que activan los factores de transcripción que dirigen la expresión de los genes antivirales y citoquinas, tales como los interferones de tipo I y III e IL-1 β . La secreción de estas citoquinas desde la célula infectada activa la señalización de forma paracrina y/o autocrina, activando el estado antiviral completo del huésped¹³⁶.

La activación de RIG-I en tiempos muy tempranos de la infección atenúa la replicación del VHC, al reconocer como PAMP la región poli U/UC localizada dentro del 3'NTR junto a la región 5'ppp del virus, altamente conservados entre los genotipos del VHC^{96,137,138}. Se promueve un cambio conformacional RIG-I que desencadena su activación y translocación a la membrana del RE asociada a la mitocondria para interactuar con la proteína antiviral de señalización mitocondrial (MAVS, de sus siglas en inglés) y formar el signalosoma que activa factores de transcripción IRF3 y NF κ B, para impulsar la señalización a IFN- β ¹³⁶ (**Figura 12A**). Otro sensor de virus ARN es MDA5, similar a RIG-I, que también desencadena la respuesta innata vía activación de MAVS, pero, aunque aún no se ha descrito su implicación definitiva en el VHC, su papel podría estar en la señalización a IFN- β a partir de los intermedios replicativos de dsARN que se acumulan en los tiempos posteriores durante la infección¹³⁹.

Los TLRs pueden reconocer tanto el ácido nucleico viral del VHC (TLR3, TLR7, TLR9) como las proteínas virales (TLR2 y TLR4). El TLR3 es expresado intracelularmente en los endosomas de los hepatocitos y las células de Kupffer (CKs), y detecta los dsARN del VHC durante la infección o el ARN extracelular de células infectadas moribundas mediante receptores Scavenger o autofagia. El TLR3 es activado y desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias e IFN- β a través del dominio TIR, para inducir los factores de transcripción IRF3 y NF κ B que inhiben la replicación del VHC¹⁴⁰⁻¹⁴² (**Figura 12A**). La detección del VHC por TLR7 en el endosoma ocurre tanto en las células dendríticas plasmocitóides (CDps) a partir del ARN adsorbido tras la transferencia exosomal de ARN vírico de hepatocitos infectados productivamente, como en las CKs, lo que conduce a la producción de IFN tipo I y III¹⁴³ (**Figura B y C**). Las proteínas del VHC pueden ser detectadas por TLR2 en la superficie de la célula, mientras que la infección por VHC puede inducir la expresión de TLR4^{144,145}.

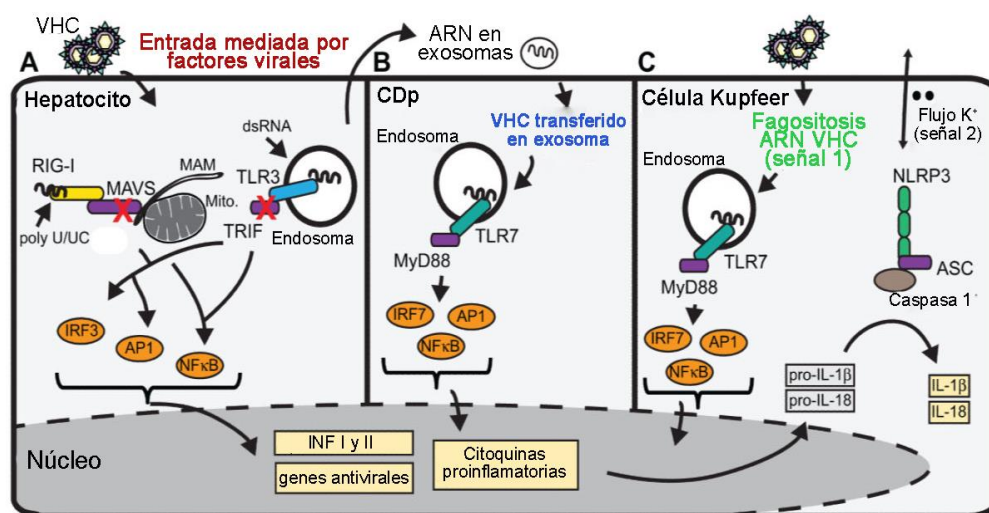


Figura 12: Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para la detección del VHC en la inmunidad innata. (A) En los hepatocitos, RIG-1 detecta la región poli U/UC del extremo 3' del ARN del VHC, y TLR3 detecta los intermediarios de replicación dsRNA, para activar la producción de IFN β , IFN λ , y citoquinas proinflamatorias. La X roja indica los puntos de regulación de las proteasas virales NS3/4A. **(B)** Las células dendríticas plasmocitoides (CDp) a partir del ARN adsorbido tras la transferencia exosomal de hepatocitos infectados productivamente vía TLR7 activa la producción de citoquinas proinflamatorias. **(C)** El VHC también puede detectarse en las células de Kupffer, los macrófagos residentes del hígado, para la señalización dependiente de TLR7 que activa la transcripción de IL-1 β e IL-18 (señal 1), mientras que el flujo de potasio (señal 2) detectado por NLRP3 conduce al procesamiento y maduración de IL-1 β e IL-18 y la activación completa del inflamasoma. Adaptada de Horner, SM., 2014¹³⁶.

Un mecanismo descrito recientemente es la activación de inflamasoma por el VHC, proceso que requiere dos señalizaciones. La primera es la señalización de TLR7 para la regulación transcripcional positiva de la pro-forma de IL-1 β e IL-18, y la segunda es la activación de la caspasa 1 por el eflujo de potasio mediado por NLRP3, para procesar y madurar IL-1 β e IL-18 y secretarlas fuera de la célula^{146,147} (**Figura C**). La combinación de IL-18 y IL-1 β podría reprogramar las células estrelladas hepáticas hacia la fibrogénesis¹³⁶.

Otro mecanismo antiviral frente al VHC es la secreción del IFN de tipo III o IFN λ , compuestos por las citoquinas antivirales IFNL1, IFNL2 e IFNL3 o IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente. Se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) cerca del gen que codifica para la citoquina IL-28B, que permite predecir el desarrollo de la infección, crónica o aguda, así como la respuesta al tratamiento¹⁴⁸. Recientemente se ha descubierto un cuarto IFN de tipo III, IFNL4, con SNPs asociados con el aclaramiento espontáneo y/o el inducido por el tratamiento. Similar al IFN tipo I, la señalización por IFN tipo III es la vía JAK/STAT con la formación del complejo de transcripción ISGF3 y la activación transcripcional de similares perfiles de ISG. Sin embargo, el receptor es diferente, y está compuesto por IL-10R2 e IFNLR1, con una distribución celular más limitada, pero a su vez una acción local más refinada¹⁴⁹.

A pesar de las muchas vías innatas para la detección inmune, el VHC tiene la capacidad para cronificar la infección mediante la evasión de la señalización inmune innata del huésped. El factor viral de evasión inmune más importante son las proteasas virales NS3/4A, que se oligomerizan formando un complejo proteico que utiliza su dominio proteasa para escindir las proteínas innatas claves para la señalización de la detección del ARN viral. Para RIG-I, escinde el MAVS de las membranas intracelulares, eliminando la señalización en el hepatocito por RIG-I, y

puesto que la proteína quinasa K (PKR), otro sensor de detección del VHC también señala a través de MAVS, es probable que NS3/4A también regule su señalización para prevenir la inducción de la respuesta antiviral frente al VHC por activación del IFN, contribuyendo a mecanismos de persistencia viral¹⁵⁰. NS3/4A también escinde a TRIF, el adaptador de la vía de señalización TLR3, bloqueando su acción antiviral¹⁵¹, y dado que TRIF también se ha implicado en un complejo con helicasas para detectar dsARN en las células dendríticas independiente de TLR, la escisión también pudiera regular la señalización no mediada por TLR3¹⁵².

2.6.2. Respuesta adaptativa antiviral

La barrera definitiva para controlar la infección por VHC es la inmunidad adaptativa (**Figura 13**), mediante la respuesta humoral por anticuerpos neutralizantes (AcN) y la respuesta celular por medio de linfocitos citotóxicos (CTL) específicos de virus y células auxiliares T CD4+, que desempeñan funciones efectoras y reguladoras respectivamente. Estas células aclaran el virus mediante la destrucción directa de las células infectadas o por la producción de factores solubles capaces de eliminar el virus de manera no citolítica, pero que pueden atraer a células inflamatorias no específicas perpetuando la inflamación del hígado¹⁵³.

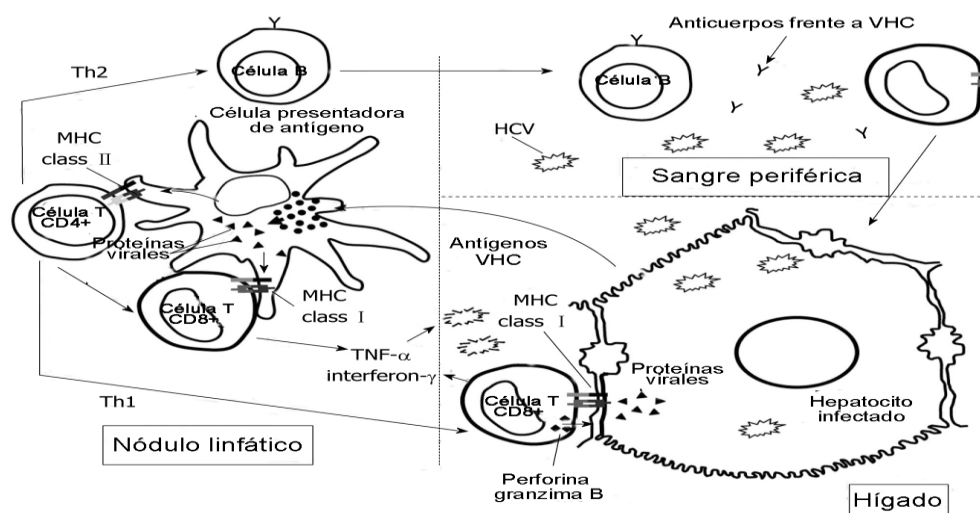


Figura 13: Activación de la respuesta inmune específica frente al VHC. Se muestra la presentación por células presentadoras de antígenos profesionales de los antígenos virales del hígado a las células T vírgenes en los ganglios linfáticos. Después de la activación, las células T específicas se convierten en células T efectoras (Th) y citotóxicas (CTL) y migran al hígado. La respuesta Th2 se encarga de regular la respuesta de las células B con anticuerpos neutralizantes mientras que la respuesta Th1 controla la función efectora de CTLs específicos capaces de destruir al VHC mediante mecanismos citolíticos y no citolíticos. Adaptada de Larrubia, J.R. *et al*, 2014¹⁵³.

2.6.2.1. Respuesta humoral

El papel de los AcN en el control de la viremia inicial por VHC es controvertido, generalmente son detectables a las 7-8 semanas de la infección (**Figura 13B**). Los anticuerpos generados durante la infección aguda pueden dirigirse contra epítomos de proteínas virales estructurales y no estructurales, sin embargo, la mayoría de los AcN son frente las glicoproteínas E1 y E2 de la envuelta¹⁵⁴. La evidencia de que los AcN podrían proteger contra la infección

natural surgió de una cohorte de mujeres accidentalmente expuestas a la misma cepa del VHC, que presentaron una rápida inducción de AcN durante la fase temprana de la infección, contribuyendo al control del VHC¹⁵⁵. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos neutralizantes suele estar retardada y ser ineficiente durante la infección aguda, detectándose altos títulos de AcN con reactividad cruzada en pacientes crónicamente infectados, pero que no eliminan el VHC debido a la aparición de mutaciones de escape del VHC en los sitios de reconocimiento de anticuerpos, causando la selección de mutantes víricos¹⁵⁶. Además, se ha propuesto que una estimulación exacerbada de las células B por el VHC provocaría la liberación de altos valores de anticuerpos no neutralizantes durante la infección crónica que puede favorecer el desarrollo de manifestaciones extrahepáticas tales como enfermedades linfoproliferativas, crioglobulinemia, glomerulonefritis, porfiria cutánea tarda y vasculitis cutánea necrótica^{157,158}.

2.6.2.2. Respuesta celular

La respuesta inmune celular es la más importante (**Figura 13. A y C**). Las células T CD4+ reconocen los antígenos del VHC presentados por las moléculas del MHC clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APCs). A continuación, las células T CD4+ ejercen su función efectora con la activación directa de macrófagos y células B antígeno específicas, así como la activación de las células efectoras T CD8+ (CTL) dependiente de citoquinas. Recientemente se ha demostrado que las CTLs VHC-específicas también pueden ser activadas mediante la presentación cruzada de antígenos por células dendríticas (CD)^{159,160}. La eficacia de la respuesta CTL depende del origen de las células, siendo eficiente cuando proviene de órganos linfoides ya que hay secreción de IFN γ y TNF α que inhiben la replicación viral sin matar a la célula o ejercen su acción citotóxica matando a las células diana infectada, mientras que si proceden del hígado tienden a inducir la inactivación de las células T, tolerancia o apoptosis¹⁵³. Las células T efectoras no llegan controlar el VHC, persistiendo debido a múltiples causas, tales como la mutación de escape del VHC para el sitio de reconocimiento del receptor de células T, efectos inmunosupresores del virus, agotamiento o delección de CTLs e inducción de células T reguladoras (Tregs)¹⁶¹. Es importante destacar que, incluso después del aclaramiento del VHC, las respuestas de células T CD4+ y CD8+ específicas del virus permanecen detectables durante muchos años, mientras que los AcN circulantes específicos de VHC se pierden más rápidamente¹⁶².

2.6.2.2.1. Respuesta celular adaptativa durante la infección aguda por el VHC

La respuesta de células T CD4+ y CD8+ específicas del VHC puede ser detectable en sangre periférica o en hígado varias semanas después de la infección aguda, dirigiéndose frente a múltiples regiones del virus; junto a un pico primario de las transaminasas. Posteriormente, ambos disminuyen junto al título viral, con la producción intrahepática de interferón IFN- γ de estas células¹⁶³. La función protectora de las células T CD4+, relacionada con el aclaramiento viral espontáneo, parece ser debido a la producción sostenida de citoquinas antivirales tales como IL-2 e IFN- γ , y a su naturaleza colaboradora, reclutando a las células B y T CD8+; mientras que en la infección crónica por VHC, la respuesta de células T CD4+ específicas del VHC no se observa tras varios meses de infección^{164,165}. Al contrario, en la infección aguda por VHC, la

magnitud de la respuesta de células T CD8+ no se correlaciona con el resultado clínico o viral. La expresión de un fenotipo disfuncional con una débil proliferación, producción de IFN- γ , citotoxicidad y aumento de los niveles de agotamiento (PD-1) es propio de la infección por VHC, independientemente del desenlace clínico (aclaramiento o cronificación)¹⁶⁶.

2.6.2.2.2. Respuesta celular adaptativa durante la infección crónica por VHC

La alta tasa de error y de replicación de la NS5B permite la aparición de rápidas mutaciones de escape del virus, con la evasión de la respuesta humoral y celular; dando lugar a una infección persistente. Parece ser que la selección de mutaciones de escape viral podría ocurrir al inicio de la infección aguda, ante la incapacidad de las CTLs para controlar la persistencia viral¹⁶⁷. La secreción de ciertas citoquinas inmunorreguladoras se encuentran aumentadas en la infección crónica por VHC. La producción de IL-10 se ha observado tanto por las CTL VHC específicas que suprimen la producción de IFN- α y promueven la apoptosis de CDp, como por los monocitos o células NK que disminuyen la respuesta de las células T efectoras, permitiendo la persistencia viral¹⁶⁸. Se promueve la activación de las CKs en el hígado con el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores profibróticos como el factor de crecimiento tumoral (TGF)- β involucrado en la supresión inmune antiviral y en la evolución crónica de la infección por VHC a través de la activación de las células hepáticas estrelladas (HSC, de sus siglas en inglés)¹⁶⁹. Además, las CKs expresan ligandos de receptores de cascadas de señalización de apoptosis como TNF α , TRAIL y FasL, con efecto en la sobreproducción de TGF- β ¹⁷⁰.

Las células T encargadas de regular el equilibrio entre el daño en el huésped y el control viral son las células Tregs con función supresora y fenotipo CD4+CD25+FoxP3+; las cuales se encargan de inducir tolerancia inmune, controlando la autoinmunidad al inhibir la presentación antigénica, la maduración celular y la activación de las células T. A nivel hepático, las células Tregs se han relacionado con la modulación de la respuesta inflamatoria y menor progresión a cirrosis. Se ha observado mayor frecuencia de células Tregs durante la infección crónica que en pacientes con aclaramientos del VHC¹⁷¹.

Por otra parte, el VHC es capaz de inducir la regulación positiva de diferentes moléculas coestimuladoras negativas con el fin de provocar un estado anérgico en las células T específicas del VHC, incapaces de matar a los hepatocitos infectados. En general, las células T producen IL-2, predominantemente por células T CD4+, que ayudan a las T CD8+, seguido por la pérdida secuencial de citotoxicidad y producción de TNF- α y IFN- γ . El estado de agotamiento en las células T CD8+ específicas se refleja por la expresión de los marcadores PD-1, CTLA4, KLRG1, CD162 y Tim-3 entre otras, que se correlacionan con bajos niveles de expresión de CD127, que alteran su capacidad proliferativa. Además, el VHC también es capaz de regular vías pro-apoptóticas vía Bcl-2 que inducen la supresión de la respuesta CTL^{153,172}.

2.7. Tratamiento antiviral contra el VHC

2.7.1. Monitorización antes y durante el tratamiento

La RVS se produce cuando no se puede detectar material genético del virus (ARN-VHC) en la sangre del paciente, pero con la distinción de que la RSV supone la curación de la infección, pero no la curación de la enfermedad hepática. Se debe conocer la carga viral al inicio, a las 12 y 24 semanas de la finalización del tratamiento para confirmar la RVS, y es recomendable en la semana 4 y al final del tratamiento para monitorizar posibles efectos adversos.

Los pacientes con fibrosis avanzada (F3-4) o cirrosis compensada (F4) tienen menores tasas de RVS, y aunque lo elimine, mantiene el riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma. Es por ello que tanto la Guía Americana como la Guía Europea recomiendan el seguimiento de pacientes con fibrosis avanzada. En cuanto a los pacientes con cirrosis descompensada los primeros resultados del uso de antivirales de acción directa (AAD) muestran una mejoría o estabilización de la función hepática en un 60%, y en algunos casos incluso la desaparición de la descompensación que podría llevar a no necesitar el trasplante hepático (10-30%)¹⁷³.

2.7.2. Fármacos utilizados para el tratamiento de la hepatitis C crónica

Durante muchos años, la terapia inmunomoduladora con el IFN- α pegilado (Peg-IFN- α) en combinación con ribavirina fue el único tratamiento con cierta eficacia frente al VHC. La tasa de RVS en los pacientes con genotipo 1 y 4 era de aproximadamente el 45%; y alrededor del 80% en los pacientes infectados con los genotipos 2 y 3¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. En la actualidad, los nuevos AADs, dirigidos contra las enzimas del VHC, son activos por vía oral, se toleran aceptablemente, tienen menor número de efectos adversos que las terapias previas, y tienen una eficacia superior al 95%. Los AADs se administran en terapia combinada libre de Peg-IFN- α , y en algunos casos junto con ribavirina^{125,177}.

La ribavirina, también conocida como Virazole, es un análogo de nucleótido de guanosina, que en el hepatocito infectado, es fosforilado mediante la acción secuencial de 3 quinasas celulares. Se han propuesto diferentes mecanismos de acción: i) potencia la respuesta Th1 aumentando las citoquinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2, que potencian la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones; ii) inhibe la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) esencial para la transcripción viral y la replicación de los virus ARN; iii) inhibe la NS5B, aunque este efecto es muy poco eficaz; y iv) como mutágeno, al incorporarse dentro de los nuevos genomas sintetizados dando lugar a mutaciones suicidas¹⁷⁸.

Los AADs se clasifican en tres tipos dependiendo de la fase del proceso replicativo del VHC donde actúan^{78,179} (**Figura 14**):

i. Inhibidores de la proteasa (NS3/4A): terminados en “previr”. Interfieren en la unión de la proteasa a su sustrato, impidiendo el correcto procesamiento de la poliproteína del virus. Los inhibidores de primera generación, Telaprevir y Boceprevir, mostraron una eficacia limitada al genotipo 1, escasa barrera para el desarrollo de resistencias y numerosos efectos adversos asociados. La segunda generación, Asunaprevir, Simeprevir, Parotaprevir y Grazoprevir tienen

una barrera genética elevada frente al desarrollo de resistencias, una mayor tolerabilidad y una actividad pangénica.

ii. Inhibidores de la polimerasa (NS5B): terminados en “buvir”. Se clasifican en dos categorías atendiendo a su estructura química:

- a) Inhibidores análogos de nucleótidos: se unen al sitio activo de la polimerasa actuando como terminadores de las cadenas de ARN nacientes. Son pangénicos y ofrecen una elevada barrera genética al desarrollo de resistencias. Destaca Sofosbuvir que ha demostrado una extraordinaria eficacia frente a todos los genotipos en combinación con Peg-IFN- α , y ahora con las nuevas terapias libres de IFN en combinación con Daclatasvir o Ledispavir.
- b) Inhibidores no análogos de nucleótidos: se unen a uno de los cuatro sitios alostéricos de la NS5B, alterando su conformación y bloqueando su función catalítica. Tienen poca cobertura genotípica y una barrera genética muy pequeña al desarrollo de resistencias. Sólo Dasabuvir ha sido aprobado para su uso en clínica y en terapia combinada con otros AADs.

iii. Inhibidores de la proteína NS5A: terminación en “asvir”. Se unen al dominio I de la NS5A y bloquean la formación de la red membranosa en la que se encuentran los complejos de replicación funcionales del VHC. Además, inhiben los procesos de ensamblaje y secreción de las partículas virales. Los de primera generación, Daclatasvir, Ledipasvir y Ombitasvir, se encuentran actualmente aprobados para su uso en terapia combinada, ya que muestran actividad pangénica y tienen una reducida toxicidad, aunque presentan una barrera genética pequeña al desarrollo de resistencias. Los de segunda generación Elbasvir y Velpatasvir acaban de salir al mercado.

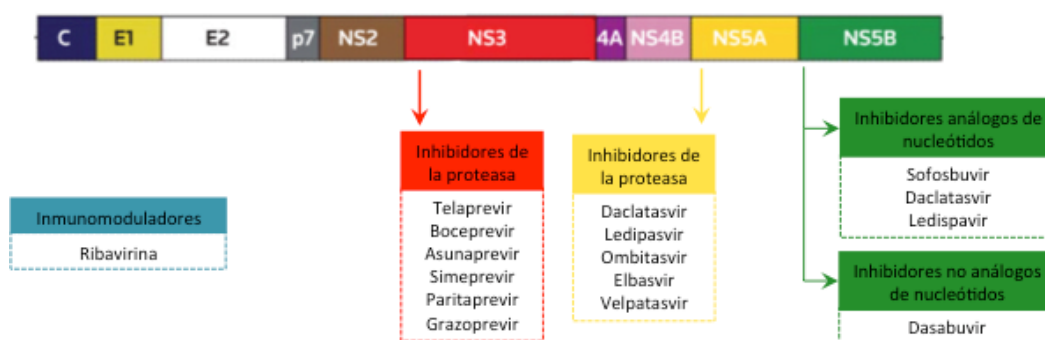


Figura 14. Fármacos en uso para el tratamiento de la hepatitis C. Se muestran la RBV como terapia inmunomoduladora y los antivirales de acción directa con su lugar de acción.

2.7.3. Pautas de tratamiento de la hepatitis C: Recomendaciones Europeas 2016

Desde el 2016, los regímenes de combinación de AADs libres de IFN, tanto para pacientes naïve como con tratamiento previo, y con enfermedad hepática compensada o descompensada, son el tratamiento de elección con eficacias de erradicación del VHC >90 % en la mayoría de las poblaciones y con menores tiempos de tratamiento (solo 12 semanas). Las

pautas de tratamiento varían en función de los genotipos del virus, los resultados de la terapia anterior y la gravedad de la enfermedad hepática (**Tabla 3**). Además, para pacientes coinfectados VIH/VHC las indicaciones son las mismas, con algún posible ajuste de la dosis¹⁷³.

Tratamiento	GT1	GT2	GT3	GT4	GT5-6
Sofosbuvir + RBV	X	so	so	X	X
Sofosbuvir/Ledipasvir ± RBV	✓	X	X	✓	✓
Sofosbuvir/Velpatasvir ± RBV	✓	✓	✓	✓	✓
Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir + Dasabuvir ± RBV	✓	X	X	X	X
Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir + RBV	X	X	X	✓	X
Grazoprevir/Elbasvir ± RBV	✓	X	X	✓	X
Sofosbuvir + Daclatasvir ± RBV	✓	✓	✓	✓	✓
Sofosbuvir + Simeprevir ± RBV	so	X	X	✓	X

Tabla 3. Recomendaciones de tratamiento de la Hepatitis C según genotipo. GT: genotipo; so: sub-óptimo. Adaptada de EALS Recommendations on Treatment of Hepatitis C, 2016¹⁷³.

2.8. Evolución natural de la infección por el VHC

2.8.1. Infección aguda

La fase aguda de la infección por VHC comienza inmediatamente posterior a la infección, suele cursar de forma asintomática hasta los 6 meses, pero las personas que sí presentan síntomas, manifiestan astenia, náuseas, ictericia y orina oscura (bilis en la orina) antes de la seroconversión. Clínicamente, solo se observa un incremento de hasta diez veces mayor de la normalidad de la alanina-aminotransferasa (ALT) en las primeras semanas. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes frente al VHC no aparecen hasta las 12 semanas, y aproximadamente solo en un tercio de las personas infectadas son detectables al inicio, lo cual dificulta el diagnóstico. El ARN del VHC se detecta, mediante PCR, desde los primeros días de infección, siendo la única prueba fiable¹⁸⁰.

La hepatitis C aguda puede presentar tres patrones evolutivos¹⁸¹:

- En el 10%–30% de las infecciones, se normalizan las transaminasas y el virus desaparece espontáneamente sin tratamiento. Deja de ser detectable el ARN-VHC en sangre y marca la erradicación del virus con una recuperación completa y, a veces, ni siquiera los individuos son conscientes de que han estado expuestos al virus C. Sin embargo, pueden seguir dando positivo en los análisis de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C.
- En un 10-20% de los casos, el paciente experimenta una normalización de las transaminasas pero con persistencia de ARN-VHC positivo, constituyendo una hepatitis C crónica generalmente con lesión hepática mínima, aunque en una cuarta parte de los casos pueden cursar con una lesión hepática más grave.
- El 40-60% restante mantienen elevadas las transaminasas y tienen positivo el ARN-VHC 6 meses después de la infección, con evolución a la forma crónica de la enfermedad.

2.8.2. Infección crónica

La hepatitis C crónica se define como la infección por VHC persistente por más de seis meses, sin posibilidad de una resolución espontánea de la viremia. Clínicamente, en muchos casos se mantiene asintomática durante 20-30 años sin ser diagnosticada o se descubre de manera casual, variando considerablemente de unas personas a otras¹⁸².

El riesgo de lesión hepática aumenta cuanto más tiempo se deja al paciente sin tratamiento para el VHC. El daño hepático se caracteriza por lesiones inflamatorias en el hígado, acompañadas de acumulación de lípidos (esteatosis) y fibrosis progresiva, que puede progresar a cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular (CHC). La tasa de progresión de fibrosis muestra gran variabilidad entre individuos, con cofactores como el genotipo viral, los factores genéticos del paciente, la edad de infección, el consumo de alcohol, las coinfecciones, la esteatosis hepática, etc^{183,184}.

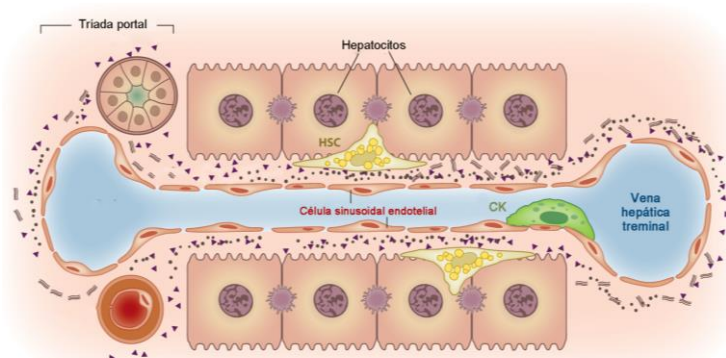
2.8.3. Enfermedad hepática

El parénquima hepático se compone de células epiteliales (hepatocitos), células endoteliales y células no parenquimatosas residentes, incluidas las HSC y CKs. El sinusoides es la unidad microvascular hepática, que presenta un revestimiento endotelial caracterizado por la fenestración de los poros, que se separa de los hepatocitos por el espacio subendotelial de Disse, donde residen las HSC. Este espacio contiene una matriz de baja densidad, esencial para mantener la función diferenciada de las células parenquimatosas, pero suficientemente porosa como para permitir el intercambio metabólico entre el torrente sanguíneo y los hepatocitos¹⁸⁵.

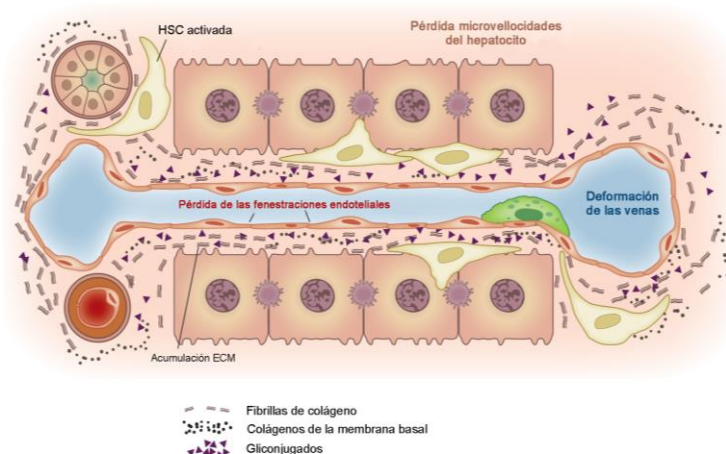
La fibrosis hepática es un proceso dinámico que resulta de un desequilibrio entre la acumulación progresiva y disminución de la remodelación de la matriz extracelular (ECM), alterando la estructura normal del hígado. Es una respuesta reversible de cicatrización de una lesión hepática. Si el daño es auto-limitado, como en caso de la hepatitis aguda, estos cambios son transitorios, y la arquitectura hepática se restaura a su composición normal gracias a la capacidad regenerativa de los hepatocitos que sustituyen el tejido necrótico. Durante este proceso reparativo, existe una reacción inflamatoria junto a un depósito de matriz extracelular constituido por colágeno no fibrilar, para reestructurar el lobulillo hepático dañado. Sin embargo, si la lesión se mantiene, la inflamación crónica y la acumulación de ECM persisten, lo que lleva a una sustitución progresiva del parénquima hepático por tejido cicatricial, denominados nódulos de regeneración. Este proceso resulta en cirrosis, la consecuencia final de la fibrosis progresiva. La progresión a esta etapa final es típicamente variable pero lenta, desarrollándose durante 20 a 40 años en pacientes con lesión hepática crónica, influenciado por factores genéticos y ambientales¹⁸⁶ (**Figura 15**).

Las principales consecuencias clínicas de la fibrogénesis sostenida, que conduce a cirrosis, son el deterioro de la función hepática y el desarrollo de la hipertensión portal, debidas a una disminución de la masa funcional de hepatocitos y un aumento de la resistencia del flujo sanguíneo intrahepático, respectivamente^{185,187}.

a. Hígado sano



b. Hígado fibroso

**Figura 15. Eventos celulares en la lesión hepática.**

Durante la lesión hepática se produce una activación de las células estrelladas HSC que conlleva la acumulación de cicatrices (depósitos de fibrillas) en la matriz extracelular subendotelial (ECM), que a su vez contribuye a la pérdida de las microvellosidades de los hepatocitos y las fenestraciones endoteliales, con el consiguiente deterioro de la función hepática. La activación de las células de Kupffer contribuyen a la lesión con la activación paracrina de las células estrelladas. Adaptada de Hernández-Gea V. y Friedman S.L, 2011¹⁸⁵.

2.8.3.1. Diagnóstico de la enfermedad hepática**2.8.3.1.1. Evaluación histológica: Escala Metavir**

La evaluación histológica de la fibrosis es una evaluación que combina información sobre la presencia de fibrosis y los niveles de inflamación cuantificado a través de un sistema de puntuación semi-cuantitativo denominado escala Metavir, diseñado para evaluar las biopsias hepáticas específicamente para pacientes con hepatitis C crónica¹⁸⁸. Esta clasificación comprende el grado de actividad (nivel de inflamación) que se le asigna un número basado en la intensidad de las lesiones inflamatorias en una escala de 0-3 ó 0-4 (según el histopatólogo), donde 0 indica ausencia de actividad y 3 ó 4 significa actividad intensa; y el estadio (nivel de fibrosis) con otra escala de 0-4, donde 0= no hay fibrosis, 1= fibrosis portal sin tabiques (fibrosis limitada al tracto portal), 2= pocos tabiques (escasos tractos fibrosos que salen de la triada portal), 3= fibrosis en puentes (tractos fibrosos porto-portales o porto-centrales) y 4= cirrosis (tractos fibrosos en nódulos de regeneración con alteración de la arquitectura hepática)¹⁸⁸ #335;Bataller, 2005 #266} (**Figura 16**).

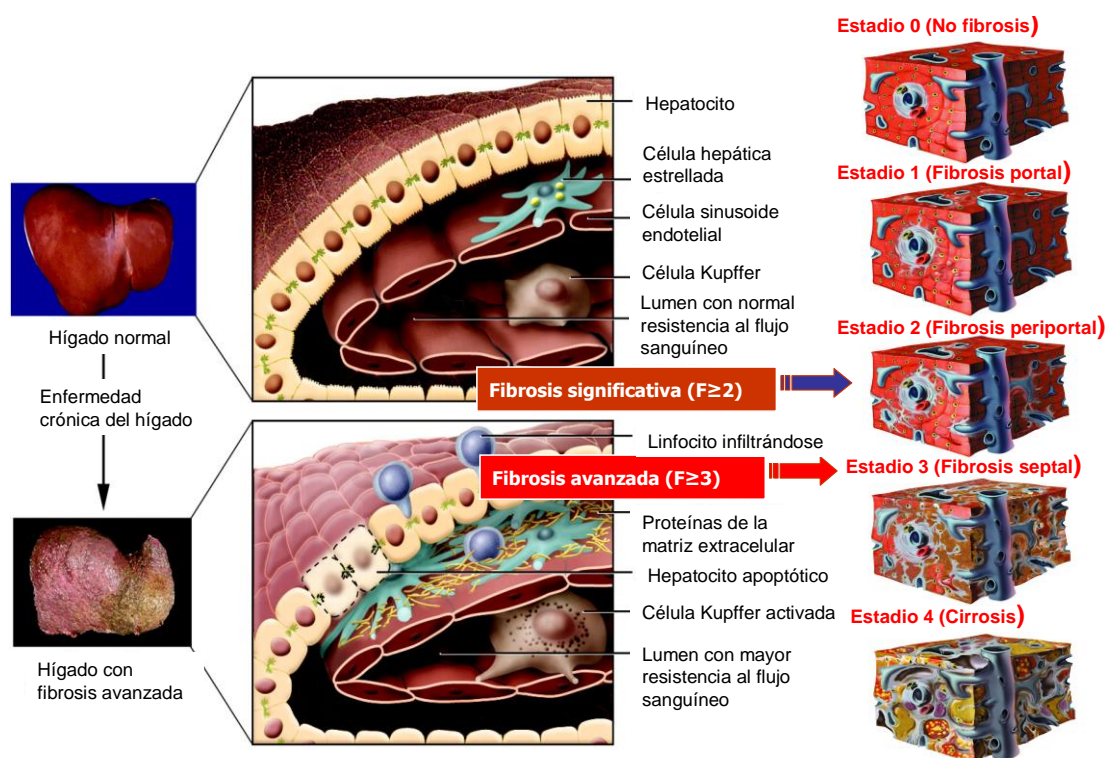


Figura 16. Progreso de la enfermedad hepática: Escala METAVIR para la evaluación del estado de fibrosis hepática. Adaptada de Bataller, R. y Brenner, DA., 2005¹⁸⁶.

2.8.3.1.2. Marcadores no invasivos de fibrosis

La infección por VHC puede conducir a complicaciones hepáticas, incluyendo fibrosis, cirrosis y CHC. Por ello, es necesaria la monitorización de los parámetros hepáticos en pacientes con hepatitis C crónica. Durante años, la herramienta para evaluar la fibrosis hepática fue la biopsia hepática, pero debido a su carácter invasivo, y el error de muestreo derivado de la propia heterogeneidad de la fibrosis, se han introducido nuevos métodos y marcadores no i. Marcadores séricos o plasmáticos de fibrosis, a su vez pueden ser:

- Directos, como los marcadores que reflejan la deposición de matriz extracelular (como el péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I, el péptido aminoterminal del procolágeno tipo II, el inhibidor tisular de las metaloproteinasas o el TGF- β), la degradación de la matriz extracelular (como el péptido C del procolágeno IV, el péptido N del procolágeno IV, el colágeno IV, las metaloproteinasas o ácido hialurónico); o una combinación de varios como en el European Liver Fibrosis Score (propéptido III del colágeno, TIMP-1 y ácido hialurónico), el Fibrospect ($\alpha 2$ -macroglobulina, TIMP-1 y ácido hialurónico) o el SHASTA (GOT, albúmina y ácido hialurónico).
- Indirectos, aquellos que no reflejan directamente el metabolismo de la matriz extracelular, pero si la alteración de la función hepática a partir de parámetros de pruebas de laboratorio convencionales (aminotransferasas, recuento plaquetario, colesterol), tales como el índice de Forns, FIB-4, APRI, y el Fibrotest, entre otros.
- Algoritmos, son la combinación de varios de estos índices no invasivos en algoritmos para aumentar la fiabilidad diagnóstica, pero también aumenta su complejidad y limita su aplicación. El algoritmo SAFE (por sus siglas en inglés Sequential Algorithm for

Fibrosis Evaluation) que combina de forma secuencial el test APRI y el Fibrotest®, identificando con una fiabilidad >90% al 50% de los pacientes con fibrosis significativa (F2-4) y al 70% de los pacientes con cirrosis.

ii) Métodos físicos de medición de la rigidez hepática por elastografía de transición (como Fibroscan), que a través de una sonda emisora-receptora recoge la onda mecánica que se propagan dentro del hígado, evaluando el volumen del parénquima, y expresando la rigidez en kilo Pascales (kPa). Se correlaciona con el estadio de fibrosis pacientes con hepatitis crónica C. A mayor rigidez del tejido, más rápido se propaga la onda. Esta técnica es la mejor validada entre las técnicas de imagen no invasivas, con una excelente precisión en la fibrosis avanzada y cirrosis.

2.8.3.1.3. Modelos predictores del pronóstico de la enfermedad hepática

El sistema de puntuación de Child-Pugh¹⁸⁹ evalúa el pronóstico de la enfermedad hepática crónica, principalmente la cirrosis, basándose en cinco medidas clínicas: nivel total de bilirrubina, nivel de albúmina sérica, tiempo de protrombina, gravedad de la ascitis y grado de encefalopatía hepática. La sumatoria de todos los parámetros clasifica el daño hepático en tres categorías:

- a) Puntuación de Child-Pugh A: (5-6) función hepática bien conservada con una supervivencia media de 2 años del 85%.
- b) Puntuación Child-Pugh B: (7-9) disfunción hepática moderada con una supervivencia media de 2 años del 57%.
- c) Puntuación de Child-Pugh C: (10-15) disfunción hepática severa y descompensada con una supervivencia media de 2 años del 35%.

Las tasas de RVS parecen disminuir cuando la enfermedad hepática se mueve a la puntuación B o C de Child-Pugh. En particular, la hipertensión portal parece ser un parámetro predictivo para la no respuesta al tratamiento con AAD.

El sistema de puntuación MELD¹⁹⁰ (de sus siglas en inglés Model for end-stage liver disease) evalúa la gravedad y el pronóstico de enfermedad hepática en etapa terminal basándose en el nivel sérico de bilirrubina, el nivel de creatinina sérica y el tiempo de protrombina, por la fórmula:

$$\text{MELD} = 3.78[\text{Ln}_{\text{bilirrubina (mg/dL)}}] + 11.2[\text{Ln}_{\text{INR}}] + 9.57 [\text{Ln}_{\text{creatinina (mg/dL)}}] + 6.43$$

Cuanto mayor sea el valor, mayor será el riesgo de mortalidad a los 3 meses, permitiendo priorizar los pacientes en espera de trasplante hepático.

2.8.4. Cirrosis

2.8.4.1. Evolución-progresión de la cirrosis

La cirrosis hepática es la fase final de las enfermedades hepáticas progresivas y crónicas, como resultado de alteraciones multifactoriales, incluyendo estrés oxidativo, inflamación sistémica y disfunción orgánica. La historia natural de la cirrosis se produce en dos etapas de velocidad variable: una fase inicial denominada cirrosis compensada y una fase avanzada que incluye tanto la cirrosis descompensada como el fracaso hepático agudo sobre crónico (ACLF), cada uno caracterizado por manifestaciones clínicas y pronósticos distintos^{191,192} (Figura 17).

Aparece el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)¹⁹³, un estado en el que se alteran los parámetros clínicos y bioquímicos, y se asocia con la disfunción de órganos, dando como resultado la ACLF^{194,195}. A menudo, en los pacientes con cirrosis hay activación persistente del sistema inmune a través de estímulos infecciosos y no infecciosos¹⁹⁶, desencadenando una inflamación sistémica junto con una deficiencia inmune, las cuales dan origen al síndrome de disfunción inmune asociada a cirrosis (CAID, de sus siglas en inglés).

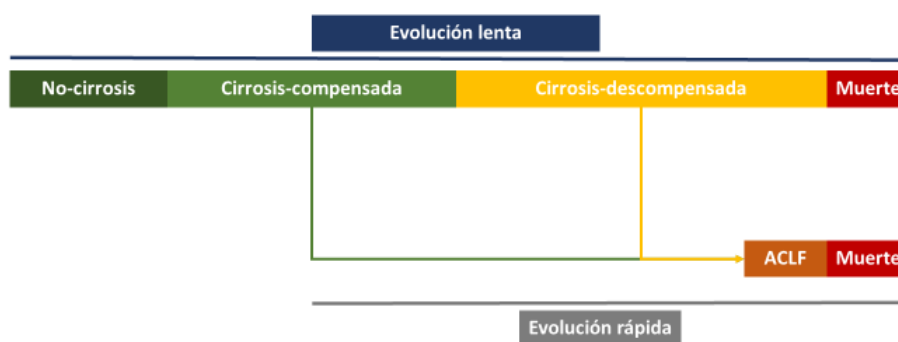


Figura 17. Historia natural de la cirrosis. Adaptada de Dirchwolf, M. y Ruf, A.E., 2015¹⁹⁵.

La cirrosis compensada se caracteriza por la ausencia de complicaciones relacionadas con la cirrosis (hemorragia varicosa, ascitis y encefalopatía hepática). Aunque, la hipertensión portal ya puede ser evidente por la presencia de varices, se encuentra por debajo del umbral clínicamente relevante. La etapa inicial tiene un bajo riesgo de descompensación (7% -10%) y de la etapa avanzada de la cirrosis de acuerdo a la velocidad de desarrollo y a la gravedad presenta dos vías:

- La **cirrosis descompensada o forma lenta**, se asocia a la presencia de complicaciones relacionadas con la cirrosis. D'Amico *et al.*¹⁹⁷ han sugerido subclasificar esta etapa, separando a los pacientes con ascitis con o sin varices esofágicas que nunca han sangrado (tasa de mortalidad asociada del 20% al año) de los que sí sufrieron hemorragia gastrointestinal con o sin ascitis (tasa de mortalidad asociada del 57% al año). Las variables determinantes de la mortalidad se han asociado con la hipertensión portal y el deterioro de la función hepática, pero otros factores deben tenerse en cuenta, como las infecciones bacterianas, que aumentan la tasa de mortalidad cuatro veces independientemente de la gravedad de la cirrosis^{198,199}.

ii. **ACLF o forma rápida**, es la etapa más avanzada que se define como un deterioro agudo de la función hepática en pacientes con cirrosis, que suele desencadenarse por un evento precipitante y que resulta en el fracaso de uno o más órganos y altas tasas de mortalidad a corto plazo, de hasta un 78% al mes^{194,195,200}. El ACLF no siempre aparece como un evento tardío o terminal en la cirrosis, ya que puede ocurrir en ausencia de antecedentes de cirrosis descompensada o unas semanas tras el primer episodio de descompensación. Además, el ACLF no es un síndrome temporalmente fijo, sino que los pacientes pueden progresar o mejorar de manera dinámica^{194,200}.

2.8.4.2. Síndrome de disfunción inmune asociado a cirrosis (CAID)

El CAID se ha propuesto como la principal vía fisiopatológica implicada en la historia natural de la cirrosis. El CAID aparece debido a la inflamación sistémica, consecuencia de la persistente e inadecuada estimulación de las células del sistema inmune, y a la inmunodeficiencia generada por la respuesta alterada a patógenos en diferentes niveles del sistema inmunológico. Es una complicación de la cirrosis de cualquier etiología, que marca la predisposición a infecciones bacterianas y/o mala respuesta a la vacunación, así como la activación endotelial y la alteración hemodinámica que contribuyen entre otras a la astenia¹⁹⁴.

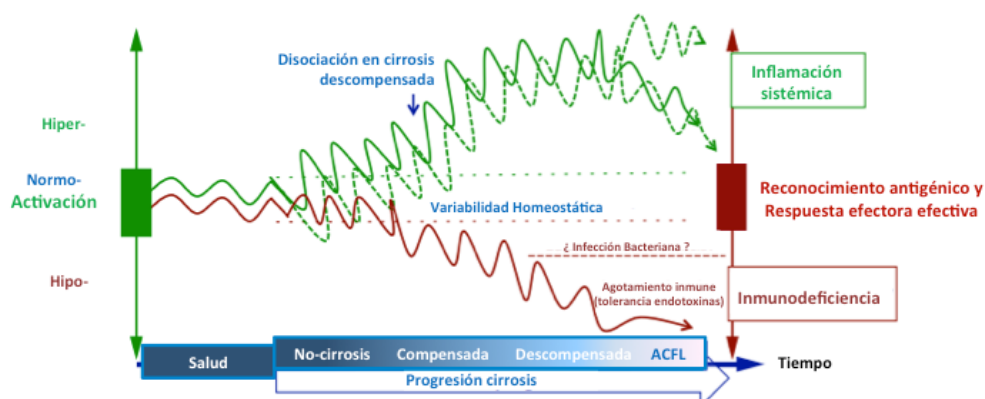


Figura 18. Disfunción inmune asociada a la cirrosis. Bajo el desafío bacteriano, en un individuo sano, el reconocimiento del antígeno (rojo) y la activación de la célula inmune (verde) se coordinan firmemente para montar una respuesta inmune eficaz contra el patógeno. La progresión de la cirrosis desde la enfermedad compensada a la descompensada, y luego el ACLF, se asocia principalmente con mecanismos de insuficiencia hepática y estimulación del sistema inmune impulsado por PAMPs y DAMPs. Estos mecanismos perjudican la regulación y la respuesta inmune efectora. Adaptada de Albillos A. *et al.* 2014¹⁹⁴.

Bajo el desafío bacteriano, en un individuo sin cirrosis, el reconocimiento del antígeno (**Figura 18**, línea roja) y la activación de la célula inmune (**Figura 18**, línea verde) se coordinan para tener una respuesta inmune eficaz contra el patógeno.

En la cirrosis compensada, aún en ausencia de translocación bacteriana del intestino, los DAMPs liberados por los hepatocitos necróticos pueden iniciar la activación del sistema inmune y la inflamación sistémica (**Figura 18**, línea verde). En este contexto, el sistema inmune exhibe un fenotipo predominantemente "proinflamatorio", con expresión aumentada de antígenos de activación en células inmunitarias, y niveles séricos aumentados de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Este fenotipo proinflamatorio no restringido está presente a pesar de la persistente estimulación de las células inmunes, lo que indica que la "tolerancia a

la endotoxina" no aparece en esta fase de la enfermedad, siendo un evento tardío en la historia natural de la cirrosis (**Tabla 4**). Las posibles explicaciones para este fenotipo CAID podría ser (i) la producción defectuosa de la citoquina anti-inflamatoria IL-10²⁰¹, (ii) la no inducción de bucles de retroalimentación negativa después de la estimulación de TLR4, como IRAK-M²⁰² o la glucógeno sintasa quinasa GSK3b²⁰³ constitutivamente activa en respuesta al LPS, y/o (iii) niveles reducidos de lipoproteínas plasmáticas de alta densidad en pacientes con cirrosis avanzada, ya que las lipoproteínas de alta densidad son capaces de unir y neutralizar la bioactividad del LPS²⁰⁴.

En la etapa descompensada, bajo el desafío persistente de los PAMPs, al patrón de respuesta inmune predominantemente "proinflamatorio" se une un fenotipo predominantemente "inmunodeficiente". Esta inmunodeficiencia secundaria y progresiva se produce como resultado de diferentes mecanismos, como la pérdida de la función de vigilancia inmunológica hepática y el deterioro de las funciones de las células inmunes, como la capacidad de fagocitosis (**Figura 18**, línea roja). En el marco experimental, las células dendríticas intestinales de ratas con cirrosis, ascitis e intensa translocación bacteriana del intestino, muestran menor fagocitosis y producción de TNF α en comparación con ratas que no están sometidas a alta presión bacteriana²⁰⁵. En este modelo, la descontaminación intestinal elimina el estímulo bacteriano y normaliza parcialmente las funciones de las células dendríticas intestinales, que podría explicar en parte el hecho de que la descontaminación intestinal en la cirrosis mejora la supervivencia más allá de la simple profilaxis infecciosa²⁰⁶. En el contexto clínico, la reprogramación severa de la respuesta inmune es máxima en la fase muy tardía de la cirrosis, es decir, en pacientes con ACLF, que desarrollan un estado de parálisis inmune similar a la encontrada en la sepsis, y se instaura un fenotipo CAID "inmunodeficiente" que afecta a la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa²⁰⁷. Este fenotipo se define por la expresión defectuosa de HLADR en monocitos, la incapacidad de los monocitos para producir TNF α en respuesta a LPS, la reducción de la producción de IFN γ de los linfocitos T y la liberación masiva de citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias (como IL-10). Es importante destacar que este fenotipo CAID, asociado con la expresión defectuosa de HLADR en monocitos, se correlaciona con el aumento de la mortalidad, en su mayor parte debido a la infección bacteriana²⁰⁸⁻²¹⁰.

El reconocimiento inmunitario de las bacterias y los PAMPs en la cirrosis ocurre localmente en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, de sus siglas en inglés), en los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y en la sangre periférica. Además, las células inmunitarias inflamatoria sistémica^{205,211}. Todo esto conduce a un aumento de la producción de una amplia gama de moléculas, incluyendo numerosas citoquinas pro- y antiinflamatorias, quimioquinas, moléculas de adhesión celular e inmunorreceptores que terminan induciendo la respuesta inmune adaptativa.

La activación persistente *in vivo* de las células inmunes circulantes, en la cirrosis, se apoya en la presencia de¹⁹⁴:

- a) Neutrófilos, mostrando un aumento de estallido respiratorio y expresión de CD11b.
- b) Monocitos, mostrando un aumento de la expresión en superficie de HLADR y moléculas de activación/coestimulación como CD80 y CD86, así como la regulación positiva de las vías y el aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (como TNF α e IL-6).

- c) Linfocitos T, mostrando una mayor expresión en membrana de antígenos de activación que están polarizados a la producción aumentada de IFN γ , TNF α e IL-17.
- d) Linfocitos B, mostrando una mayor expresión de marcadores de activación/coestimuladores, HLADR y CD86, y aumento de la respuesta a citoquinas e hiperglobulinemia.

Estas células inmunes activadas circulantes eventualmente se convierten en las responsables de que aumente la concentración en sangre de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF α , receptores solubles I y II de TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17, así como ICAM-1 y VCAM-1, presentes en los modelos experimentales de cirrosis y en la enfermedad hepática. La gravedad del estado de inflamación sistémica es paralela a la de la propia cirrosis, evaluada por la escala de Child-Pugh, particularmente intensa en la cirrosis con ascitis¹⁹⁴.

El papel de las citoquinas depende del equilibrio entre sus niveles séricos y los de sus inhibidores, como las formas solubles de sus receptores. La desregulación intensa del sistema inmune en la cirrosis implica un aumento concomitante de citoquinas en suero como TNF α e IL-6 y en sus receptores solubles como sTNF-R1, sTNF-R2 y sgp130. La cirrosis se ha asociado con el aumento de la expresión sérica de la forma soluble del receptor de IL-6, sgp130, que es un potente inhibidor de la señalización de IL-6²¹². Esto podría explicar la resistencia a la IL-6 mostrada por los pacientes con cirrosis, y la respuesta de fase aguda resultante a esta citoquina^{213,214}.

Por otro lado, el grado de expansión de monocitos activados, células T activadas y células B de memoria en la sangre periférica puede correlacionarse con la presencia de marcadores subrogados de translocación bacteriana, tales como el aumento de la proteína de unión a LPS (LBP) o sCD14 en el suero de pacientes con cirrosis y ascitis²¹⁵⁻²¹⁷. Del mismo modo, el papel crítico de la translocación bacteriana y la activación de las células inmunes y la respuesta inflamatoria en la cirrosis se apoya en la correlación entre el crecimiento bacteriano en el MLN y el fenotipo proinflamatorio de monocitos circulantes y linfocitos T en ratas cirróticas con ascitis²⁰⁵.

2.8.4.3. Inmunodeficiencia inducida por cirrosis

La cirrosis conduce a una alteración del sistema inmune con incapacidad para proteger al huésped contra las infecciones bacterianas y la desregulación de la activación de las células inmunes, generando un estado de inmunodeficiencia adquirida¹⁹⁴ (**Tabla 4**). La lesión local tiene lugar en el hígado, donde se interrumpe la arquitectura y la organización celular por la fibrosis sinusoidal, comprometiendo la función de vigilancia inmune del hígado a través del daño en el sistema retículo-endotelial, así como en la síntesis de proteínas de la inmunidad innata y los PRRs¹⁹⁵. Estos sucesos reducen la capacidad bactericida de las células del sistema inmune innato, alterando el aclaramiento bacteriano¹⁹⁶. A medida que la cirrosis progresa, el GALT, que es la primera barrera inmunológica de defensa contra los antígenos y patógenos que entran en el organismo desde el intestino, se ve afectado²¹⁸. En la cirrosis avanzada, el GALT está bajo la presión constante de la translocación bacteriana y la translocación de productos bacterianos debido un intestino permeable, ocasionando una elevada carga bacteriana entérica y cambios en las poblaciones de la microbiota intestinal hacia especies bacterianas patógenas (disbiosis)^{218,219}. Por último, a nivel sistémico, la función de las células inmunes se ve

comprometida debido a la citopenia secundaria por el secuestro en el bazo agrandado debido a la hipertensión portal, y también, a las alteraciones en cada línea celular¹⁹⁶. Estas alteraciones se hacen más importantes a medida que la cirrosis avanza. Finalmente, la activación crónica de las células inmunitarias provoca su agotamiento y reprogramación en un estado transitorio de falta de respuesta a nuevos estímulos por producto bacteriano, en un fenómeno de “tolerancia a la endotoxina”^{219,220}.

Hígado	Daño en el sistema retículo endotelial	Desvío del sistema portal Perdida/daño de CKs Capitalización sinusoidal	↓ Eliminación de patógenos en sangre
	Defecto en la síntesis de proteínas	↓ Complemento ↓ PRRs ↓ PFA	↓ Oponización bacteriana ↓ Inmunidad innata
Sistémico	Daño en la circulación de las células inmunes	Neutrófilos ↓ Frecuencia ↓ Fagocitosis ↓ Quimiotaxis ↑ Estallido respiratorio en reposo	↓ Fagocitosis de bacterias ↑ Propagación bacteriana
		Monocitos ↓ Frecuencia ↓ Fc-γ expresión ↑ Estado activado persistente	↓ Fagocitosis de bacterias
		Linfocitos B ↓ Frecuencia ↓ Células CD27+ memoria ↑ Estado activado persistente	↓ Oponización de bacterias ↓ Respuesta a vacunas
		Linfocitos T ↓ Frecuencia ↓ Cels T virgen ↓ Cels. T memoria ↓ Proliferación ↑ Estado activado persistente	↓ Respuesta antígenos T
		Células NK ↓ Frecuencia ↓ Actividad citotóxica	↓ Destrucción de bacterias
	Daño en el tejido inmune (GALT)	Monocitos/linfocitos T ↑ Frecuencia ↑ Estado activado persistente	↑ Inflamación intestinal ↑ Daño en la barrera intestinal

Tabla 4. Inmunodeficiencia inducida por cirrosis. Adaptada de Albillos, A. *et al.*, 2014¹⁹⁴.

2.8.4.4. Papel de la inflamación sistémica en la expresión clínica de la cirrosis

La inmunodeficiencia, unida a la inflamación sistémica en el CAID, es la base fisiopatológica de varias de las manifestaciones clínicas de la cirrosis, que se extiende desde una respuesta pobre al desafío bacteriano, con una susceptibilidad aumentada a la infección bacteriana acompañada de alta mortalidad, y daño inflamatorio multiorgánico^{221,222}. Se ha demostrado que cuanto mayor es la intensidad de la CAID celular y molecular, mayor es el riesgo de infección bacteriana grave^{215,223,224}. Concretamente, el riesgo de infección bacteriana es mayor en pacientes con cirrosis y ascitis que muestran niveles séricos elevados de moléculas sintetizadas tras la interacción de las bacterias con el sistema inmune del huésped, tales como LBP o anticuerpos IgA contra el citoplasma de neutrófilos^{217,224}. Además, los niveles de algunos mediadores inmunitarios solubles, como sTNFR1 y sICAM-1, están relacionados con menor

supervivencia de los pacientes con cirrosis²²⁵⁻²²⁷. Otra manifestación del CAID es también la falta de respuesta protectora en la vacunación^{207,228}.

La relevancia de la inflamación sistémica, distinta de la CAID, deriva del hecho de que las células inmunes activadas circulantes pueden ser reclutadas por los tejidos periféricos y/o pueden producir factores solubles, como las citoquinas pro-inflamatorias. A través de estos mecanismos, las células inmunes inflamatorias pueden dañar las células somáticas y contribuir a la expresión clínica de la cirrosis. Un ejemplo bien caracterizado es la modulación del tono vascular. Estas citoquinas pro-inflamatorias empeoran la vasodilatación esplácnica y sistémica a través de la sobreproducción de óxido nítrico²²⁹. De hecho, la severidad de la vasodilatación esplácnica y periférica es mayor en pacientes y en modelos experimentales de cirrosis severa, asociada con ascitis y translocación bacteriana, mostrando niveles de inflamación sistémica más severos^{215,230,231}. La contribución de la CAID inducida por bacterias entéricas sobre el trastorno hemodinámico de la cirrosis es apoyada por estudios que demuestran, que la descontaminación selectiva del intestino reduce la producción de óxido nítrico y la actividad de la renina plasmática, y mejora la vasodilatación periférica en pacientes con cirrosis, ascitis y niveles altos de LBP sérico; atenuando la activación endotelial y la expresión de citoquinas inflamatorias en la aorta de ratas con cirrosis biliar^{215,232,233}.

Además, la señalización directa en el cerebro mediante citoquinas proinflamatorias o el reclutamiento de células inmunes activadas en el tejido cerebral, induce la activación de los macrófagos residentes para producir TNF α , modifica la función cerebral y contribuye a la patogénesis de la encefalopatía y la fatiga distintiva de la cirrosis^{234,235}.

La inflamación sistémica también puede comprometer la función renal²³⁶. Todo parece indicar que la disfunción microvascular mediada por inflamación puede reducir la tasa de filtración glomerular, mientras que el estrés oxidativo que resulta de la interacción entre PAMPs/DAMPs y la célula epitelial tubular puede dañar la función tubular y causar lesión renal aguda en pacientes con infección bacteriana grave, e incluso sepsis en ausencia de signos manifiestos de hipoperfusión renal^{237,238}. Por tanto, sería posible que las citoquinas pro-inflamatorias, así como los PAMPs/DAMPs originados en el intestino o en el hígado, pudieran acceder a los túbulos renales por filtración glomerular o por la proximidad a los capilares peritubulares, provocando una respuesta inflamatoria de las células epiteliales tubulares a través de TLR4, y en última instancia contribuir a los episodios de lesión renal aguda en la cirrosis¹⁹⁴.

2.9. Coinfección VHC/VIH

Se estima que alrededor de 3 millones de personas viven coinfectadas con el VIH y el VHC, siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo⁷⁹. Ambos virus comparten la vía de transmisión, por lo que es frecuente la coinfección. No hay duda de que la historia natural del VIH y del VHC está significativamente alteradas por la coexistencia de ambos virus, con una progresión más rápida a SIDA²³⁹ y de la enfermedad hepática hacia la cirrosis y estadios avanzados de la enfermedad hepática^{240,241}. Durante muchos años, la hepatitis C crónica ha sido una de las principales causas de muerte en este grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC tras el control del VIH con la introducción de la TARc.

Durante muchos años, las personas coinfectadas VIH/VHC han sido un gran problema sanitario por el alto riesgo de morbilidad y mortalidad; sin embargo, con los recientes avances en el tratamiento de VHC ha cambiado radicalmente la esperanza de vida en esta población. El tratamiento eficaz con los AADs no sólo ha reducido la mortalidad general relacionada con el SIDA en esta población de pacientes, sino que también ha frenado la progresión de la enfermedad hepática²⁴². Las tasas de RVS con los nuevos tratamientos en los pacientes coinfectados VIH/VHC alcanzan valores similares a los mono infectados VHC. De este modo, pacientes infectados por VIH y por el genotipo 1 de VHC de un estudio de la universidad de NorthWestern (Chicago) tratados con sofosbuvir/ledipasvir durante 12 semanas mostraron una RVS del 100%²⁴³; en el estudio ASTRAL-5 en fase III los pacientes coinfectados tratados con sofosbuvir/velpatasvir durante 12 semanas alcanzaron tasas de RVS del 95% en todos los genotipos del VHC²⁴⁴. La seguridad y la tolerabilidad fueron excelentes con pocas interacciones con el tratamiento antirretroviral, por lo general con el efavirenz. Sin embargo, la incidencia creciente de complicaciones relacionadas con el hígado sólo será detenida con la erradicación definitiva del VHC en esta población de pacientes.

2.9.1. Evasión de la respuesta inmune del VHC durante la coinfección

El VHC encuentra la forma de persistir indefinidamente gracias a su alta tasa de replicación ($\sim 10^{12}$ viriones VHC/día). El VHC es reconocido por el sistema inmune, pero además de las estrategias de evasión del propio VHC, se añade el daño sobre el sistema inmune producido por la infección VIH. Esto se refleja en que las tasas de depuración espontánea del VHC son más bajas y las complicaciones del VHC son más frecuentes en las personas con infección por el VIH, por lo que la enfermedad hepática es la principal causa de muerte no relacionada con el SIDA en personas infectadas por el VIH²⁴⁵.

2.9.1.1. Coinfección VIH/HCV e inmunidad innata

El sistema inmune innato es desafiado aún más cuando un individuo está coinfectado con el VHC y el VIH. Los efectos protectores del sistema inmunológico presentes en la mono infección VHC se pierden o se alteran con la desregulación inmune producida por el VIH. La capacidad de infección del VIH sobre las células hepáticas también juega un papel crítico en la progresión de la enfermedad hepática de los pacientes coinfectados VIH/VHC. Al igual que otros macrófagos, las CKs residentes en el hígado pueden ser infectadas por el VIH²⁴⁶. En la coinfección VIH/VHC se ha postulado que las CKs desplazan la respuesta inmune de Th1 a Th2, presentan receptores CD4, que son dianas par la gp120 del VIH²⁴⁷. La presencia del VIH-1 produce un aumento de la activación de las células NK, con alteración de la expresión de los receptores NK y disminución de la secreción de citoquinas, lo cual provoca una disrupción de su función al disminuir su actividad citotóxica^{245,248}. El VIH infecta a los CD4 y reduce su número, lo que puede contribuir a una respuesta inmunitaria deficiente en pacientes coinfectados VIH/VHC.

2.9.1.2. Coinfección VIH/HCV e inmunidad adaptativa

Al igual que con la inmunidad innata, la coinfección del VIH altera la respuesta del sistema inmune adaptativo frente al VHC²⁴⁵. Una característica distintiva de la mono infección del VIH es el agotamiento de las células T CD4+ y la generación de inmunosupresión²⁴⁹, que acarrea un efecto perjudicial sobre la generación de anticuerpos neutralizantes VHC-específicos y la pérdida de la inmunidad generada previamente contra el VHC²⁵⁰. Este deterioro de la generación de anticuerpos puede deberse al hecho de que la infección por el VIH induce una mayor rotación "turnover" de las células B, lo que conduce a una mayor frecuencia de células plasmáticas de vida corta, células B activadas y agotadas, células B transicionales inmaduras y menos número de células B de memoria²⁴⁹.

A pesar de las similitudes en las respuestas inmunes específicas frente a VIH-1 y VHC, existen diferencias como la frecuencia de respuesta de las células T específicas mucho mayor frente al VIH-1 en comparación al VHC, especialmente en pacientes coinfectados por ambos virus. Los estudios sobre las células T CD8+ específicas para el VIH-1 y el VHC sugieren que tienen distintos fenotipos, estando sesgado hacia un fenotipo de "memoria central" en la respuesta frente al VHC²⁴⁹. El tropismo viral puede ser el responsable, probablemente, de dicha respuesta, ya que el VHC no infecta primariamente a las células T CD4+ y no se ha demostrado concluyentemente que el VIH-1 se replique en el hígado.

2.9.2. Patogénesis de la coinfección VIH/VHC

Muchos estudios han demostrado que la fibrosis progresa más rápidamente en los pacientes coinfectados VIH/VHC que en los mono infectados VHC, debido a la desregulación del sistema inmunitario y otras vías metabólicas que conducen a la toxicidad hepática y síndromes metabólicos como esteatosis y resistencia a la insulina, provocando un aumento de las tasas de cirrosis y complicaciones hepáticas²⁵¹ (Figura 19).

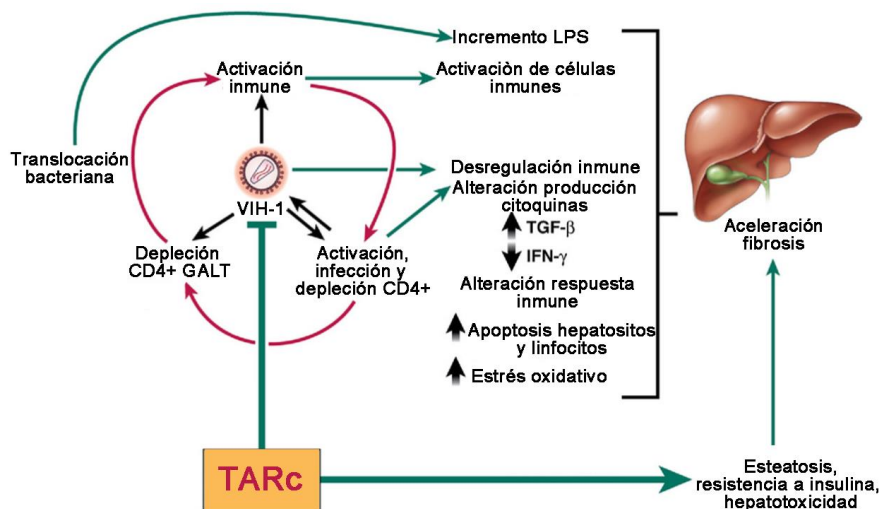


Figura 19: Patogénesis de la coinfección VIH/VHC: Efecto del directo e indirecto VIH sobre la fibrosis hepática. Adaptada de Kim, A.Y. y Chung, R.T., 2009²⁴⁹.

Se ha propuesto que el VIH-1 está presente en los linfocitos infiltrados en el hígado y puede promover fibrosis, aunque es más probable que actúe a través de efectos indirectos sobre los hepatocitos²⁵². Los co-receptores CCR5 y CXCR4 están expresados en los hepatocitos y otras células hepáticas residentes, y los polimorfismos en estos receptores pueden afectar a la patogénesis del VHC²⁵³; pero el receptor CD4 del VIH-1 no está altamente expresado en los hepatocitos. Modelos *in vitro* han sugerido que la gp120 del VIH-1 y la glicoproteína E2 del VHC puede promover directamente la apoptosis de hepatocitos²⁵⁴, dando lugar a cargas virales más altas del VHC por inducción de una respuesta Th2 mediada por citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que junto al TGF- β , amortiguan la respuesta inmune y promueve la fibrosis con el aumento de los depósitos de colágeno y la transformación hacia el carcinoma hepatocelular^{255,256}. Además, la pérdida de las células T CD4+ conlleva la desregulación del sistema inmune hacia un estado profibrótico a través de una estimulación inmunológica crónica que conduce al agotamiento de las células T y a la apoptosis de las células T CD4+ antígeno específicas^{257,258}. De manera similar, una disminución en la secreción de IFN- γ (citoquina antifibrótica) y un aumento de TGF- β (profibrótica) por células T CD8+ VHC específicas, junto a la susceptibilidad a la apoptosis de las células T CD8+ VIH específicas mediada por CD95/Fas, están relacionados con el incremento de la fibrosis en el hígado²⁵⁹.

La inmunopatogenia del VIH-1 produce el agotamiento masivo de las células T CD4+ del GALT, lo que conduce a un epitelio alterado y a un aumento de la translocación microbiana, en particular del LPS que entra en el torrente sanguíneo y se correlaciona con la progresión de la enfermedad⁵⁹. El LPS a su vez incrementa los niveles del marcador de activación de macrófagos sCD14, considerado como marcador de inflamación y asociado a un mayor riesgo de mortalidad en pacientes VIH⁶⁵. En la infección VIH/VHC, las etapas avanzadas de fibrosis desencadenan en la alteración del microbioma hacia una disbiosis intestinal, con un sobrecrecimiento bacteriano y aumento de la translocación, es decir una endotoxemia sistémica que incrementa aún más la hiperactivación inmune^{218,219,260}. En biopsias de individuos coinfectados VIH/VHC se ha encontrado una correlación entre el aumento de los niveles de LPS y otros marcadores asociados con la progresión de la enfermedad hepática²⁶¹.

Los efectos adversos de la TARc frente al VIH-1 durante la coinfección VIH/VHC juegan un papel importante en el desarrollo de desórdenes metabólicos, como la resistencia a la insulina, dislipidemia y/o esteatosis hepática no alcohólica²⁶². Además, la infección crónica por VIH-1 por sí misma induce anomalías metabólicas, como la deficiencia de glutatión que podría predisponer a las células T a la apoptosis por una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo potenciando el daño hepático, así como la disfunción mitocondrial en la esteatosis y la inhibición del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en la diabetes^{249,263}.

3. EL VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 2

3.1. Aspectos generales de la pandemia

El Virus del Herpes Simple es el agente etiológico causante del herpes oral y genital. Se trata de un virus perteneciente al género Simplexvirus de la familia *Herpesviridae*. El VHS puede ser de tipo 1 o 2, siendo el VHS-1 más prevalente responsable de las infecciones orales en el 70%

de la población adulta y el VHS-2 causante de la patología genital, aunque hoy en día la infección cruzada con el VHS-1 es bastante frecuente. Además, el herpes simple puede causar meningoencefalitis y ceguera corneal. Son virus de distribución mundial, que causan infecciones incurables de por vida, con reactivación viral intermitente y subclínica que solo se pueden modular o mitigar con el tratamiento²⁶⁴, por lo que se convierten en un problema de salud pública mundial.

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son infecciones que se propagan principalmente de persona a persona a través del contacto sexual (genital, oral o anal), pero también puede ser por transmisión vertical o hemoderivados. Existen más de 30 patógenos bacterianos, víricos y parasitarios sexualmente transmisibles, frecuentemente silenciosos en sus primeras fases, pero que pueden desencadenar graves secuelas a largo plazo incluyendo morbi-mortalidad. Las últimas estimaciones basadas en datos epidemiológicos del 2012 estimaron que al año se registran 357 millones de nuevos casos de una de las cuatro ETS curables (*Chlamydia trachomatis* (131 millones), *Neisseria gonorrhoeae* (78 millones), *Treponema pallidum* (6 millones) o *Trichomonas vaginalis* (142 millones) en personas entre 15-49 años, alrededor de 417 millones personas infectadas por VHS-2 (Figura 20A) y 291 millones de mujeres portadoras del virus del papiloma humano (VPH)^{265 266}.

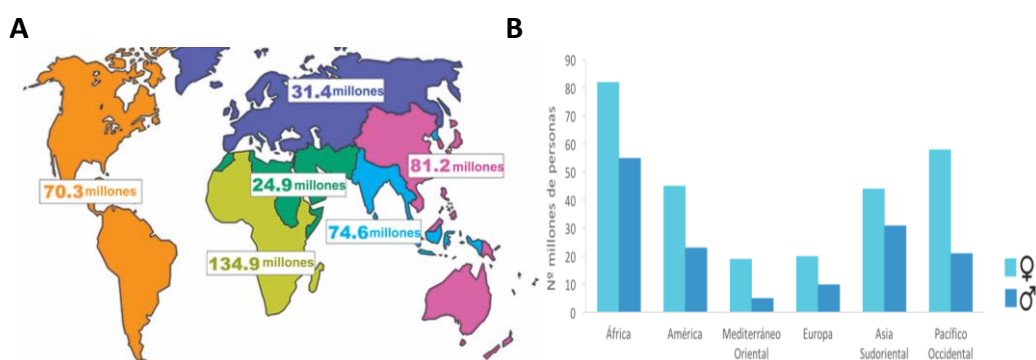


Figura: Distribución mundial de la infección por VHS-2. (A) Estimación del número de personas (en millones) portadoras del VHS-2 en 2012. Adaptada de Looker, K.J. *et al.*, 2015²⁶⁵. **(B)** Estimación de la prevalencia del VHS-2 por región y por sexo (en millones). Adaptada de WHO, 2016²⁶⁶.

La gran mayoría de las personas con herpes genital no saben que tienen la enfermedad, la infección y la reactivación son típicamente asintomáticos, lo que facilita su propagación en la población. Las lesiones genitales causadas por el herpes son a menudo muy dolorosas en el área genital con un grupo de ampollas blancas o erupción alrededor del pene, la vagina o el recto y dolor en la micción debido a las lesiones. Además, esta infección si no se trata, pueden conducir a la infertilidad, sobre todo en las mujeres. Se determina por pruebas serológicas que miden la presencia de anticuerpos IgG frente a VHS-2²⁶⁴. La infección neonatal tras la transmisión en el canal del parto puede ser muy grave, sin tratamiento el 80% de los niños con enfermedad diseminada mueren, y los que sobreviven presentan lesiones cerebrales²⁶⁷. Se estima que se producen 19.2 millones de nuevas infecciones al año por VHS-2²⁶⁵ y en el herpes neonatal se estiman 14.000 nuevos casos anuales (4000 por VHS-1 y 10.000 por VHS-2), el mayor número de casos por VHS-2 fue registrado en África debido a la alta tasa de infección materna²⁶⁸.

A diferencia del resto de ETS, la prevalencia de la infección por VHS-2 presenta una distribución desequilibrada en cuanto al sexo, se estimó en 267 millones de mujeres infectadas frente a 150 millones de hombres²⁶⁵ (**Figura 20B**). La razón principal probablemente reside en el efecto de las hormonas sexuales femeninas sobre el entorno del tracto genital incrementando susceptibilidad a la infección por VHS-2 en la mujer²⁶⁹. La estrategia mundial 2016-2021 en la prevención de las enfermedades de transmisión sexual se centra en lograr la igualdad de género y la equidad sanitaria para lograr la cobertura sanitaria universal en el 2030 especialmente en las poblaciones vulnerables como los adolescentes, las mujeres, los niños y jóvenes que viven en la calle y personas afectadas con conflictos²⁶⁶. Aunque, el riesgo de infección en hombres que mantiene sexo con hombres (HSH) está en crecimiento²⁷⁰.

3.2. Estructura y genoma viral del VHS-2

EL VHS-2 es un virus de ADN bicatenario esférico de aproximadamente 150nm de diámetro con envuelta lipídica con 9 glicoproteínas ancladas en al superficie (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ y gK) y 2 proteínas de membrana sin glicosilar gL y gM; el tegumento, una capa amorfa filamentosa que rodea a la cápside icosaédrica constituida por 162 capsómeros y la nucleocápside que contiene el material genético enrollado alrededor de una bobina proteica (**Figura 21A**). Su naturaleza lipídica le confiere una gran inestabilidad en el medio exterior y frente a disolventes y detergentes²⁷¹.

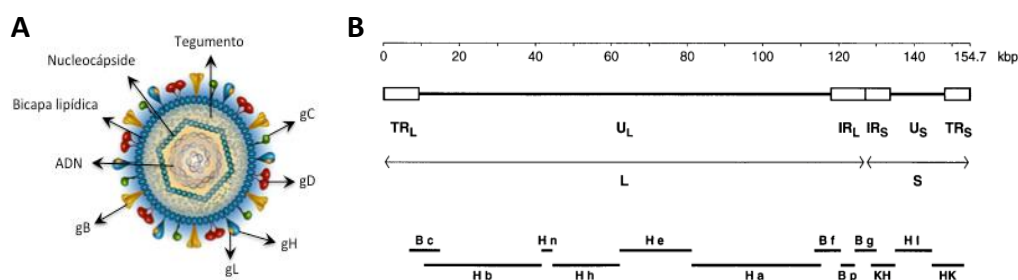


Figura 21. Estructura del VHS-2. (A) Morfología del virión. **(B)** Secuencia del genoma completo del VHS-2 y proteínas para las que codifican sus genes. Adaptada de Dolan, A. *et al.* 1998²⁷².

Es un virus con alto contenido en GC de 70.4%. El genoma viral es de 155 kbp, consta de dos regiones extendidas de secuencia única, larga (UL) y corta (US), limitadas cada una por un par de elementos repetitivos terminales invertidos TRL-IRL e IRS-TRS, respectivamente (**Figura 21B**). UL más sus repeticiones flanqueantes se denomina región larga (L) y US con sus repeticiones flanqueantes se denomina región corta (S). En moléculas de ADN, los componentes L y S pueden estar enlazados en cualquier orientación, de modo que el material genético codifica para distintas proteínas. Una delección en el gen *US4* que codifica para la gG pudiera ser el responsable de la diferencia de tropismo celular respecto al VHS-1, con el cual comparte un 83% de homología²⁷². El VHS-2 utiliza la ARN polimerasa II celular para transcribir sus genes gradualmente durante el ciclo viral clasificados en α de expresión inmediata en cuestión de horas, β de expresión precoz y γ de expresión tardía. Los genes inmediatos codifican para proteínas que regulan la expresión de los genes β , γ y proteínas del tegumento interno y promueven la evasión inmune y la neurovigilancia; los genes tempranos controlan la biosíntesis

de las enzimas implicadas en la replicación del ADN y la producción de varias glicoproteínas de la envuelta viral; y los tardíos codifican para las proteínas de la cápside y el tegumento y forman el virión^{273,274}.

3.3. Ciclo viral del VHS-2

La entrada de VHS-2 en células del hospedador requiere de una interacción secuencial entre siete glicoproteínas virales, gB, gC, gD, gH, gK, gL y gM. Y sus receptores afines de la superficie de las células epiteliales. Sin embargo, sólo cinco de ellas gB, gC, gD y el heterodímero gH/gL juegan un papel importante en la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped. El primer paso en la entrada de VHS-2 es la unión del virus a gB y gC a través del heparán sulfato (HSPG) de la superficie celular para anclarse a ésta. La gB podría realizar el anclaje en ausencia de la gC, pero reduciría la eficacia de infección del VHS-2 hasta 10 veces²⁷⁵. A continuación, la gD se une específicamente a los receptores celulares del mediador de la entrada del virus del herpes (HVEM) o nectina-1 y heparán sulfato 3-O-sulfatado (3O-S-HS), determinando el tropismo celular por las células inmunes o las células epiteliales y la sinapsis neuronal, respectivamente. Aunque, se desconoce el papel del receptor HVEM en la entrada viral, puesto que las células T no son la diana de la infección por el VHS-2, posiblemente esta interacción es importante para modular la respuesta de las células T asegurando la supervivencia del virus evitando la replicación descontrolada²⁷⁶. La interacción de gD con su receptor causa cambios conformacionales dependientes de pH atrayendo la bicapa lipídica viral hacia la membrana celular dentro del endosoma para promover la fusión de membranas, y transmite una señal de activación al heterodímero gH/gL, que actúa como regulador del proceso de fusión permitiendo la fusión de membranas a través de la activación de la capacidad fusógena de gB (Proteína de fusión de clase III), crea un poro de entrada liberando el tegumento con la cápside al citoplasma celular²⁷⁷ (**Figura 22**).

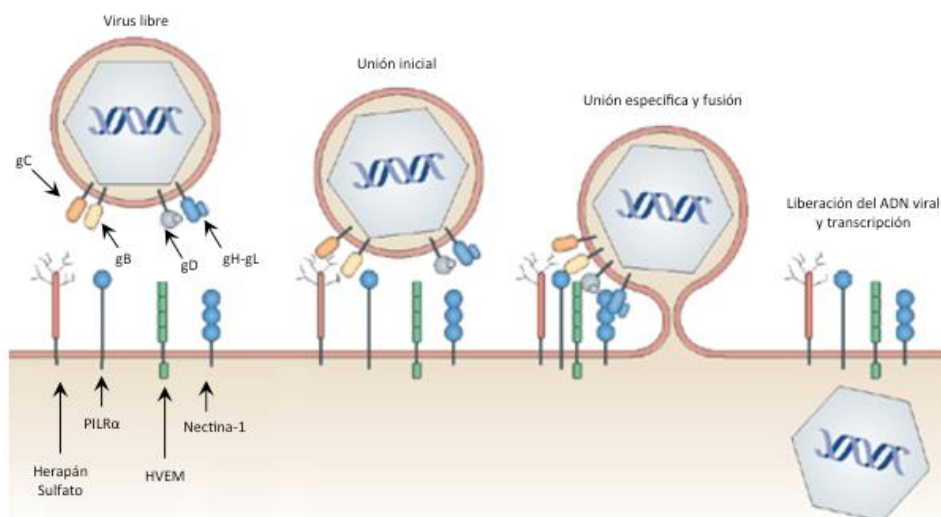


Figura 22: Mecanismo y receptores implicados en la entrada viral del VHS-2 en la célula hospedadora. Adaptada de Spear, PG., 2004

La cápside viral es transportada al núcleo a lo largo de la red del citoesqueleto de la célula infectada impulsado por las proteínas motrices, dineína y kinesin-1, que se activan en presencia de las proteínas UL36 y UL37 del tegumento interno o VP16 de la cápside en ausencia

de tegumento²⁷⁸. Por acción de la UL36 y las nucleoporinas Nup358 y Nup214, la cápside se asocia por su vértice portal a la membrana nuclear por el complejo de poros nucleares para transportar el ADN viral por la vía de importación nuclear mediada por la importina β ²⁷⁹.

La transcripción y la replicación viral, así como el ensamblaje de las cápsides de la progenie tienen lugar dentro del núcleo. Al inicio se requiere la supresión de la síntesis de proteínas celulares del huésped o “early shutoff” mediada por la proteína del gen *VP16*, así como la degradación de los ARNm del huésped. Mientras la nucleocápside viaja al núcleo el resto de componentes se mantienen en el citoplasma para ejercer su función. Una vez en el núcleo el ADN viral se recombina en forma circular para su replicación dependiente de origen de replicación, que puede ser oriL en los genes *UL29* y *UL30* o dos copias de oriS en los dos extremos US, aunque se sabe que no todos son necesarios para la replicación, por lo que se cree que unos están activos durante la fase lítica y otros en la fase latente^{280,281}.

El ARNm viral es sintetizado por la ARN-polimerasa II de la célula huésped con la participación de proteínas virales que regulan cascadas transcripcionales secuenciales (genes α , β y γ). Una vez replicado el ADN debe escindirse y reensamblarse en una nueva nucleocápside, se desplaza hacia la membrana interna del núcleo por acción de los microfilamentos de actina y por acción de las proteínas virales UL31 y UL34, se ablanda la lamina nuclear interna para que la nucleocápside la atraviese y el paso a través de la membrana nuclear externa es por fusión con el retículo endoplásmico. La formación de la cápside es a través del aparato de Golgi, donde la gM es clave para la maduración del virión reclutando todos los elementos necesarios para ello, seguido de la formación de la envoltura primaria, aunque en este paso aún no está claro el papel de las glicoproteínas. La envuelta lipídica viral es adquirida por exocitosis al salir de la célula medida por el complejo heterodímero gE/gI^{281,282}

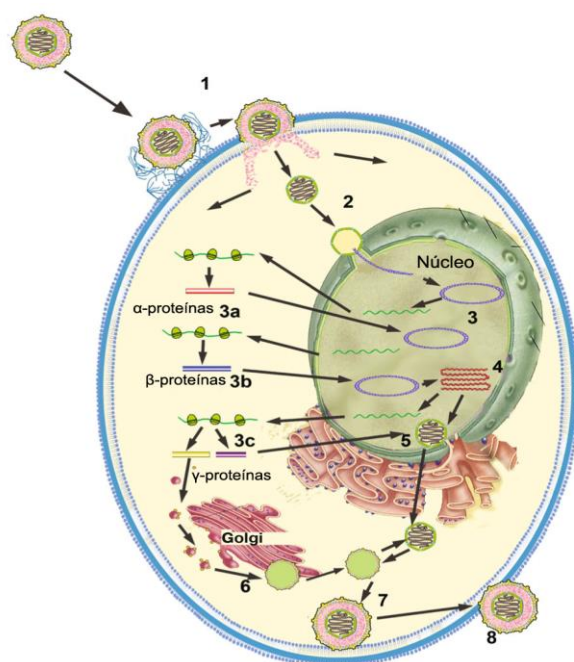


Figura 23: Ciclo viral del VHS-2. 1) Unión y entrada en la célula hospedadora; 2) transporte al núcleo; 3) transcripción de las proteínas virales: α de liberación inmediata (3a), β de liberación precoz (3b) y γ de liberación tardía (3c); 4) replicación viral; 5) ensamblaje de la nucleocápside; 6) maduración de la cápside; 7) formación de la envoltura primaria; 8) exocitosis de la partícula viral. Adaptada de Kukhanova, MH. *et al*, 2014²⁸¹.

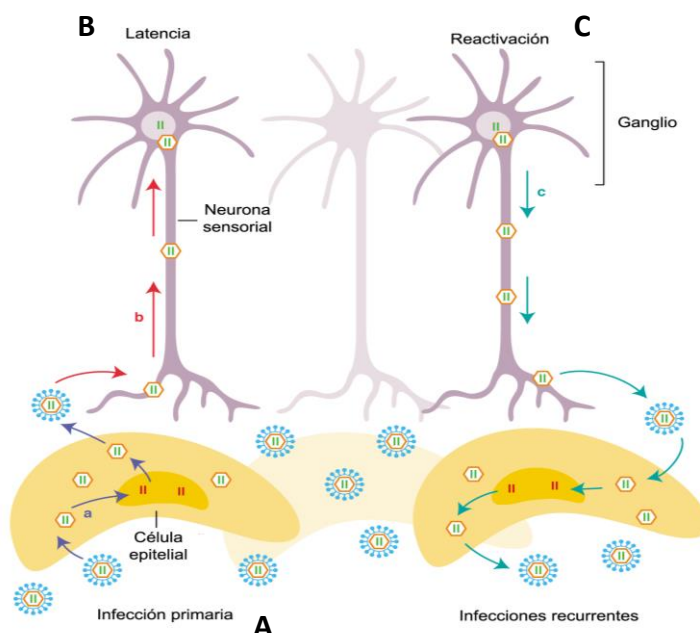
El ciclo replicativo desde la entrada viral hasta la lisis celular es de aproximadamente 24 horas, con una producción viral de 10^6 viriones/día durante 3 días en la infección primaria²⁸³ (Figura 23).

3.4. Curso de la enfermedad por el VHS-2

Una característica de los herpesvirus es su capacidad de establecer latencia en el huésped de por vida y reactivarse periódicamente para facilitar su diseminación²⁸⁴. La infección es incurable, el tratamiento con antivirales como Aciclovir, Famciclovir y Valaciclovir, solamente modula el curso de la enfermedad y mitiga los síntomas, pero la infección latente no puede eliminarse. El curso de la patología por VHS-2 puede dividirse en tres fase o etapas²⁸⁵ (**Figura24**):

- i. **Ciclo lítico:** es la infección primaria del VHS-2 en las células epiteliales, cursando con la aparición de los primeros síntomas como llagas y úlceras dolorosas alrededor del área genital o recto e incluso en inmunocompetentes puede ser asintomático.
- ii. **Latencia viral:** el genoma viral se mantiene en las neuronas de los ganglios sacros sensoriales estableciendo reservorios virales.
- iii. **Reactivación viral:** bajo ciertas condiciones, tales como en estados inmunodeficientes o de estrés, el VHS-2 inactivo puede reactivarse periódicamente replicándose productivamente seguido del transporte anterógrado hasta sitio periférico de infección primaria, diseminándose de forma asintomática incrementando la prevalencia del VHS-2 o generando lesiones recurrentes.

Figura 24: Desarrollo de la infección por VHS-2. (A) Ciclo lítico (entrada, transcripción de las proteínas virales, replicación viral, ensamblaje de los nuevos viriones y exocitosis) en las células epiteliales de la piel que causa la infección primaria. (B) Latencia viral: el virus entra por la terminación de la neurona sensorial y viaja retrógradamente al núcleo donde establece el reservorio viral. (C) Reactivación viral: transporte anterógrado de las partículas virales desde las neuronas hasta las células epiteliales de nuevo, conduciendo a lesiones recurrentes. Adaptada de Lachmann R, 2013²⁸⁵.



A través de modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, aunque es difícil llegar a un consenso con los datos hasta la fecha, se han definido diferentes mecanismos moleculares claves para la latencia del VHS²⁸⁶:

- i) La latencia como consecuencia del fracaso en la transcripción de las proteínas α de liberación inmediata, debido a defectos en VP16 del virus esencial para el inicio del ciclo lítico junto a los activadores ICP0 e ICP4, pero que pueden establecer partículas virales

quiescentes no citotóxicas en los fibroblastos y las neuronas sensoriales dando lugar a la latencia.

ii) Durante la latencia, el genoma del virus existe como una molécula "interminable" no replicante que carece de los terminales genómicos como un episoma extracromosómico compatible con la supervivencia neuronal.

iii) La transcripción durante la latencia está restringida a una única región diploide que codifica los transcritos asociados a la latencia (LATs) con la función de proteger frente a la apoptosis neuronal inducida por virus y modular la expresión de los genes α de liberación inmediata.

La reactivación de la latencia es consecuencia de una respuesta a las señales celulares que reactivan la expresión de los genes α del virus y la entrada de nuevo en estado de replicación productiva reprimiendo a las histonas no acetiladas que mantenían la configuración circular del genoma durante la latencia.

Por todo ello, la infección por el VHS-2 es una preocupación de salud pública mundial, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de una vacuna que suprima la diseminación del VHS-2, pero no hay ningún candidato efectivo hasta la fecha en los ensayos clínicos, tanto con fines profilácticos como terapéuticos²⁸⁷⁻²⁸⁹. Por lo tanto, las estrategias de prevención son esenciales en la lucha contra las ETS, junto al desarrollo de microbicidas tópicos seguros que permitan a las mujeres sexualmente activas evitar la adquisición de ETS.

3.5. Patogénesis de la enfermedad

La infección primaria puede inducir respuestas humorales y celulares fuertes que residen que en la unión dermo-epidérmica contigua a las terminaciones nerviosas y contribuyen al control de las infecciones posteriores²⁹⁰. Se cree que la producción de anticuerpos neutralizantes juega un papel importante en la limitación de la propagación del virus^{44,291}. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa celular ejercida en la mucosa (genital, ocular) es crucial para el control de la infección, así como la reactivación del virus en las neuronas ganglionares infectadas latentemente^{292,293}. La infección previa por VHS parece proteger parcialmente contra reinfecciones evitando el agotamiento celular y puede disminuir los síntomas clínicos de la enfermedad incluyendo la frecuencia de la reactivación viral²⁹⁴ (**Figura 25**).

Tras una transmisión eficaz estimándose el riesgo de contagio aproximadamente en un 3,5% por acto sexual, el VHS-2 entra en las células epiteliales de la epidermis a través de las microabrasiones que se generan durante el coito²⁹⁵. La replicación viral conduce inevitablemente a la muerte celular de los queratinocitos. Tras la entrada de la cápside en el citoplasma celular, se desencadena la producción de proteínas virales en forma de cascada. En ausencia de terapia antiviral, el VHS-2 se propaga rápidamente entre las células epiteliales y la lisis celular conduce a la formación de las vesículas o úlceras. El virus entra en los axones de las neuronas sensoriales a través del plexo de las terminaciones nerviosas libres en la epidermis y es transportado hasta los cuerpos de las células neuronales en los ganglios de la raíz dorsal, donde se mantiene en forma quiescente para reactivarse y extenderse a otras neuronas²⁸³.

Los ganglios han sido considerados sitios inmunoprivilegiados donde el VHS permanecía bajo escasa presencia antigénica y sin apenas transcripción génica viral, pero existen evidencias de que los mecanismos inmunes del huésped pueden favorecer la latencia, al quedar permanentemente retenidas las células T CD4+ y CD8+ VHS-2 antígeno específicas en los ganglios trigeminales infectados durante meses tras la resolución de la lesión. Sin embargo, por celulares se encuentran en ellos durante la infección por VHS-2^{296,297}Verjans, 2007 #226}.

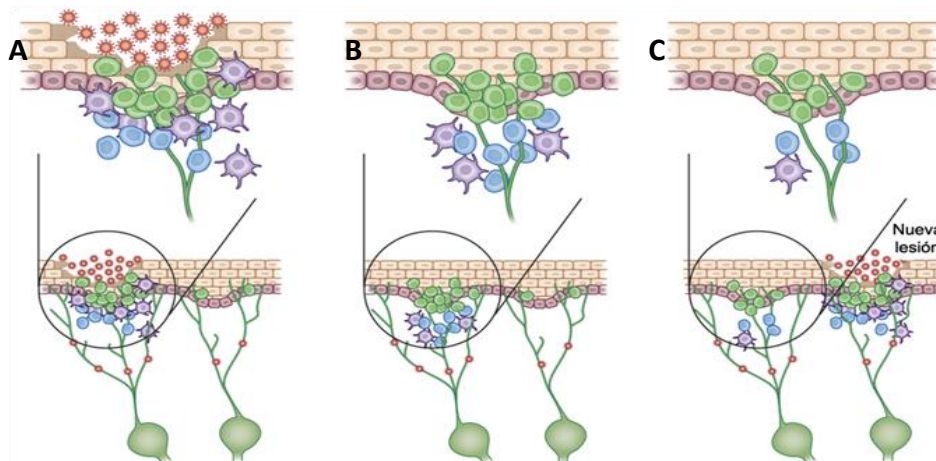


Figura 25: Representación esquemática de la dinámica de reactivación del VHS-2. El virus se reactiva continuamente dentro de los ganglios neuronales. Esto conduce a la liberación de partículas virales en múltiples sitios espacialmente separados en la mucosa. **(A)** Periódicamente, las células epiteliales se infectan, lo que lleva a una rápida propagación viral con la formación de úlceras donde tiene lugar un aumento del infiltrado de células T. **(B)** Después de la recurrencia de la infección, las células T persisten en el lugar durante varios meses como inmunovigilancia. **(C)** Entonces, el virus se reactiva en otros lugares del epitelio donde la densidad de linfocitos es menor y permite la diseminación a través del tracto genital en una región diferente. Se muestran los linfocitos CD4+ (en azul), linfocitos CD8+ (en verde), viriones (en rojo) y células dendríticas (en morado). Adaptada de Schiffer, JY. y Corey, L., 2013²⁸³

Las partículas virales son detectadas inicialmente por los PRR que reconocen los PAMP del VHS-2 que incluyen a los antígenos virales y al ADN viral. Las células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) desempeñan un papel importante de reconocimiento inmune innato inespecífico independiente de TLR, que reconoce las glicoproteínas virales del complejo de entrada gB, gD, gH y gL, induciendo una maduración parcial con la producción de IFN α e IL-10 pero no IL-12 clave para la activación de la respuesta Th1 adaptativa ni CCR7²⁹⁸. Además, los TLR-2, TLR3, TLR5 y TLR9 parecen estar implicados también en la respuesta inmune innata contra el VHS-2²⁹⁹.

La respuesta adaptativa celular comienza con la presentación antigénica a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II de las CD y las células B a las células T CD4+³⁰⁰, desencadenando una respuesta Th1 de memoria con la producción de IFN- γ que inducen la producción de quimioquinas que desencadenan la respuesta de los linfocitos T CD8+³⁰¹. La infiltración de los linfocitos T CD4+ se produce durante la formación de la lesión ligeramente antes que la de los linfocitos T CD8+, ocupando una localización más profunda junto a las CD. Las células T CD4+ residentes junto a las células NK continúan expresando en el tejido durante semanas después de la curación de la lesión. Las células T CD8+ efectoras de memoria controlan los niveles de viremia en las neuronas a través de mecanismos no citotóxicos con un

efecto amortiguador parcial en la replicación viral temprana, producen IFN- γ y granzima B, que en las neuronas a diferencia de en los fibroblastos, no inducen vías apoptóticas, sino que escinden ICP4 una proteína necesaria para la transcripción de los genes virales favoreciendo la síntesis de LATs durante la quiescencia clínica, por el contrario la disrupción de estas células promueve la reactivación viral. El principal determinante de la gravedad del episodio es si el escape de la respuesta inmune innata y adquirida ocurre precozmente durante la propagación viral²⁸³.

3.6. Confección del VIH-1 y el VHS-2

La infección por VHS-2 aumenta el riesgo de adquisición del VIH aproximadamente tres veces^{302,303} (**Figura 26**). La presencia de la úlcera genital por VHS-2 aumenta la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 a través de la disrupción de la integridad del epitelio y los cambios inflamatorios, que aumentan el reclutamiento de las células diana del VIH-1 hacia la úlcera³⁰⁴. Además, los infiltrados de linfocitos CD4+ residentes en el epitelio genital enriquecidos para el receptor CCR5, tras la lesión por VHS-2 durante meses tras la cicatrización de la lesión, proporcionan un mecanismo biológico mejorado para la adquisición del VIH-1 por la coinfección por el VHS-2³⁰⁵. Entre las personas infectadas por el VIH-1, la coinfección con VHS-2 aumenta el desprendimiento genital del VIH-1³⁰⁶, aumentando la transmisibilidad del VIH-1 hasta cinco veces a través de úlceras genitales pudiendo acelerar la enfermedad³¹. A su vez, la infección por bajos de células T CD4+³⁰⁷. La alta prevalencia de la infección por el VHS-2 limita significativamente la prevención de la infección por el VIH en determinadas regiones, sobre todo en África subsahariana³⁰⁸. La terapia antiviral frente al VHS-2 reduce las recurrencias y la diseminación asintomática del virus, pero no el incremento del riesgo de coinfección por el VIH-1³⁰⁹.

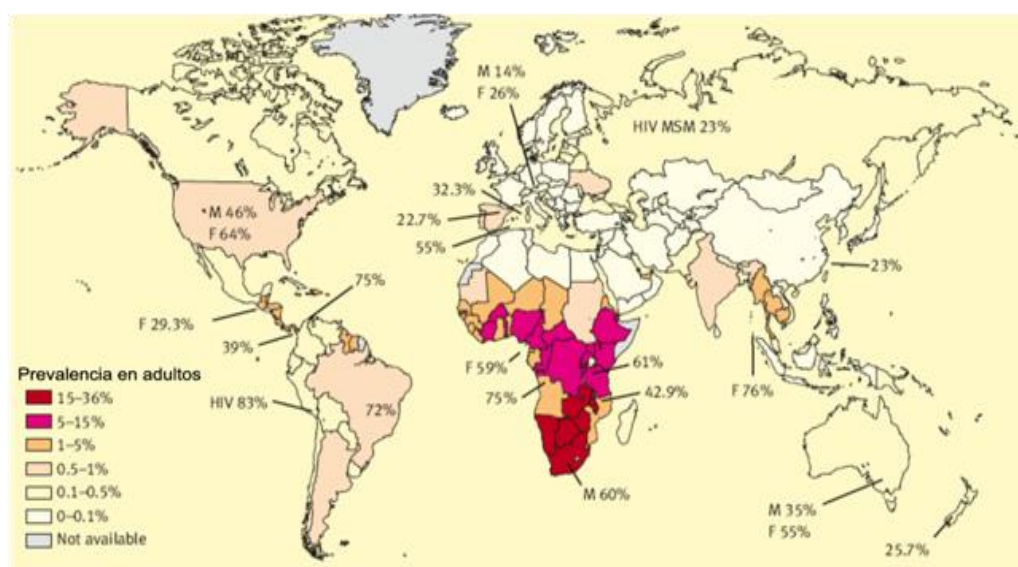


Figura 26: Distribución mundial del incremento del riesgo de la infección por el VIH-1 en prevalencia con el VHS-2. Adaptada de Looker, KJ. *et al.*, 2012

4. NUEVAS ESTRATÉGIAS DE PREVENCIÓN: NANOMEDICINA

4.1. Microbicidas

Más del 80% de los 2,1 millones de nuevas infecciones por VIH que se producen al año se adquieren por transmisión sexual⁶. La infectividad del VIH en el líquido seminal masculino, la susceptibilidad del huésped, el tipo de practica sexual y la carga viral son decisivos para establecer la infección crónica, pero esta relación sigue siendo poco clara^{310,311}. El VHS-2 es la ETS de mayor transmisión en el mundo, siendo la principal causa de úlceras genitales²⁶⁵. Diversos estudios, han demostrado un riesgo tres veces mayor de infección por el VIH en presencia del VHS-2, al aumentar la susceptibilidad del VIH por la alteración epitelial^{302,303}. La falta de una vacuna eficaz frente al VIH^{312,313}, y el VHS-2³¹⁴, junto a los problemas asociados a las terapias antirretrovirales de combinación actuales, como la generación de resistencias, procesos clínicos relacionados con inflamación, aparición de efectos secundarios y alto coste económico ya que estos tratamientos son de por vida, porque no se consigue eliminar la presencia del virus, centra los esfuerzos en el desarrollo de nuevos microbicidas en formato de gel o anillo vaginal como estrategia profiláctica dual para evitar la coinfección VIH y VHS-2^{315,316}.

Un agente microbicida es un compuesto en forma de gel, espuma o crema que, aplicado vía vaginal o vía rectal, puede reducir el riesgo de la infección por el VIH, el VHS-2 u otras enfermedades de transmisión sexual. Los microbicidas presentan grandes ventajas sobre otros métodos de profilaxis, pues resultan más sencillos de utilizar y muy importante las mujeres tienen el poder de decisión sobre su uso y aplicación^{316,317}. A la hora de comercializar un agente microbicida es vital que el vehículo que lo contiene cuente con las condiciones idóneas de osmolaridad, concentración y pH que garanticen que su actividad no sea modificada. Los geles son una de las formas más comunes de administración de un producto microbicida, y presentan beneficios sobre otros sistemas de administración como mayor biodisponibilidad, seguridad y versatilidad³¹⁸.

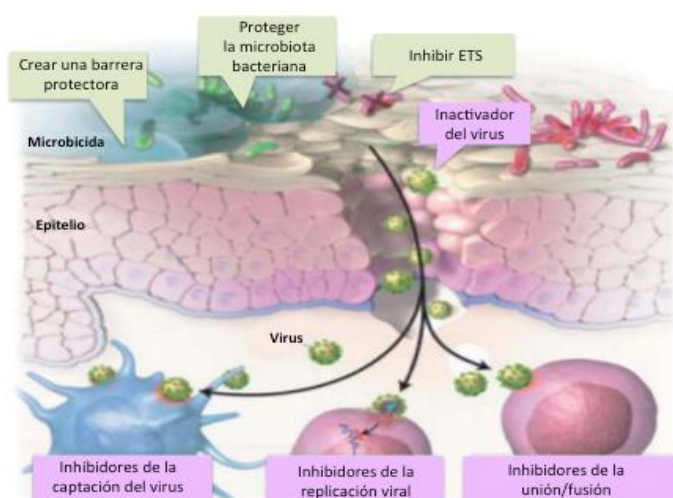


Figura 27: Propiedades y mecanismos de acción de los microbicidas. Se muestran en verde las propiedades que deben cumplir los microbicidas y en violeta los posibles tipos de microbicidas según su mecanismo de acción. Adaptada de Lederman, MM. *et al.*, 2006³¹⁹

Basándose en sus propiedades activas, los microbicidas se pueden clasificar en cuatro categorías: i) inactivador del virus; ii) inhibidor de la unión, fusión o entrada del virus en la célula huésped; iii) inhibidor de la replicación viral en la célula huésped; y iv) potenciadores de la defensa vaginal^{315,316} (**Figura 27**).

En los últimos años, han surgido numerosos fármacos como potenciales microbicidas. El primero de ellos es el nonoxynol-9 (N-9), un surfactante aniónico que actúa como detergente por su capacidad de trastocar la integridad de la membrana lipídica, alterando la envuelta de diversos virus como el VIH-1. Sin embargo, los ensayos clínicos de fase 1 demostraron que el N-9 no era eficaz como microbicida vaginal puesto que no sólo incrementaba el riesgo de la infección por el VIH-1 debido a su alta toxicidad sobre el epitelio vaginal^{318,320}, sino que tampoco inhibía la infección generada por otros microorganismos que causan ETS como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans* y *Trichomonas vaginalis*, frente a los cuales sí actuaba *in vitro*^{321,322}. Entre los efectos de toxicidad vaginal inducidos por el N-9 se incluye irritación, presencia de pequeñas úlceras e inflamación. Esto genera un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias que promueven el reclutamiento de células del sistema inmune, células diana del virus³²²⁻³²⁴, con lo que se favorece la infección por el VIH. Por todo ello se descartó el N-9 como microbicida.

Junto a los surfactantes, se han probado compuestos polianiónicos con actividad antiviral por interacciones electrostáticas entre las proteínas de la envuelta viral y los grupos funcionales, actuando a nivel de la entrada, como la celulosa sulfato el carragenano (Carraguard) y el PRO2000, muy eficaces en los experimentos realizados *in vitro*, pero fracasando cuando llegaron a ensayos clínicos³²⁵⁻³²⁷.

Los candidatos actuales a microbicidas son los antirretrovirales empleados en las TARc que inhiben la replicación viral dentro de las células del huésped, aunque hasta la fecha el único que ha mostrado eficacia ha sido el TFV, primero en el ensayo CAPRISA 004 aplicado el TFV al 1% en gel inhibió en un 39% la infección por vía vaginal en 889 mujeres de Sudáfrica³²⁸. Sin embargo, el ensayo VOICE con 5000 mujeres prematuramente debido a la pérdida de eficacia, particularmente por la baja adherencia de las mujeres participantes en el ensayo^{329,330}. Actualmente se están desarrollando nuevas formulaciones, que además abarcan el desarrollo de microbicidas que puedan pasar a ensayos clínicos y cubran la infección por vía rectal, debido a que el riesgo de transmisión anal es de 1,7% por acto sexual mientras que a nivel vaginal es del 0.08%³³¹. Además, es de destacar, que el TFV al 1% ha mostrado eficacia frente a la infección vaginal por el VHS-2 en ensayos clínicos^{332,333}, así como su combinación con Aciclovir en un anillo vaginal³³⁴, abriendo la puerta a microbicidas con acción dual. Otro posible candidato es la Dapivirina (DPV) formulado en anillo vaginal, que en el ensayo IMP027 presentó un 31% de protección frente al VIH-1 en 1959 mujeres de Sudáfrica y Uganda³³⁵. Por último, están los microbicidas potenciadores de la defensa vaginal, que funcionan aumentando los *Lactobacillus* o acidificando rápidamente el eyaculado, inactivando tanto el esperma como las ETS, como es el BufferGel³³⁶ y/o ACIDFORM³³⁷, pero no han mostrado los resultados deseados de protección frente a las ETS.

Debido a estos efectos adversos, en la búsqueda de un microbicida eficaz se deben considerar numerosos aspectos: i) que no genere toxicidad en el epitelio, no produzca ninguna respuesta pro-inflamatoria, preservando la integridad estructural del epitelio y; ii) que sea eficaz contra el VIH y otras ETS como el VHS-2, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Treponema pallidum*; iii) que no modifique la microbiota natural del ambiente donde se administre porque esta microbiota como *Lactobacillus*, protege de patógenos externos; iv) que su actividad no se modifique en presencia de plasma seminal o

alteraciones del pH como ocurre en el entorno genital tras un encuentro sexual; v) que tenga una capacidad de acción de varias horas después de su aplicación; vi) que sea sencillo de aplicar, incoloro e inodoro y vii) que su coste al comercializarlo no sea demasiado elevado^{338,339} (Figura 27).

4.2. Nanomedicina en el desarrollo de microbicidas

En este contexto del desarrollo de microbicidas, durante la búsqueda de estrategias y soluciones frente a la infección por el VIH y el VHS-2, la nanotecnología ha surgido como una herramienta potencial para frenar la epidemia. La nanotecnología se centra en el estudio, desarrollo y producción de materiales a nivel nanoscópico ($1-10^2\text{nm}$) como liposomas, polímeros, dendrímeros, nanocristales, nanofibras y nanopartículas formadas por metales inorgánicos³⁴⁰ (Figura 28). Estos nanosistemas pueden funcionar como vehículos debido a su capacidad para transportar fármacos hasta dianas celulares específicas o hasta compartimentos intracelulares^{316,341}, también son capaces de transportar y liberar ácidos nucleicos o ARNs pequeños de interferencia (ARNip)³⁴² y/o pueden actuar como agentes antivirales y microbicidas debido a las propiedades antivirales intrínsecas que presentan³⁴²⁻³⁴⁶.

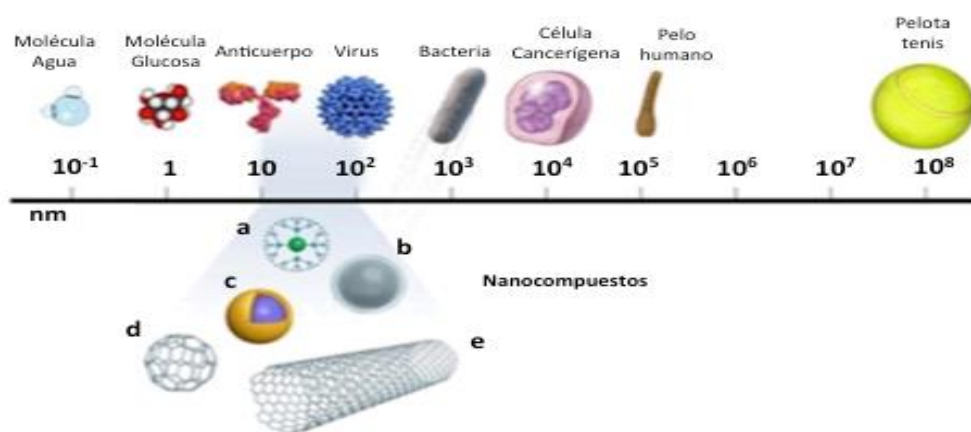


Figura 28: Nanomateriales usados en biomedicina. Materiales de tamaño nanoscópico ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$), entre ellos se encuentran a) dendrímeros, nanopartículas hiperramificadas funcionalizadas e su superficie; b) liposomas, compuestos por moléculas con grupo hidrofílicos e hidrofóbicos con capacidad de autoensamblaje en medio acuoso; c) nanopartículas de oro, usadas para el transporte de fármacos, proteínas u oligonucleótidos; d) fullereno y e) nanotubos, ambos estructuras derivadas del carbono. Adaptada de Kim, BY. *et al.*, 2010³⁴⁰.

Dentro del contexto de la nanotecnología, los dendrímeros son el grupo de nanocompuestos que se han evaluado más ampliamente como microbicidas. Los dendrímeros son nanoestructuras tridimensionales con forma arborescente e hiperramificadas, monodispersos, con un núcleo central que puede ser fácilmente funcionalizado, y con un número concreto de grupos terminales^{345,347} (Figura 29A). Estas partículas siguen una síntesis controlada que nace desde el núcleo central o unidad de ramificación, a partir de donde surgen los puntos de ramificación de la estructura que condicionan el número de capas, y con ello la generación del dendrímero. La estructura de los dendrímeros, son sistemas polivalentes flexibles, que incluyendo el número de ramificaciones, la composición y el número de grupos funcionales terminales en la periferia puede ser diseñado con el objetivo de obtener compuestos que cumplan con las propiedades biológicas y aplicaciones biomédicas deseadas³⁴⁵.

Se pueden formular de forma que interactúen de forma directa con una célula diana, un patógeno, conjugarse con un determinado fármaco o formar complejos con otro tipo de moléculas como péptidos o ARNips³⁴⁸.

El primer compuesto basado en dendrímeros que llegó a fase I en ensayos clínicos fue el VivaGel®, un gel cuyo principio activo es un dendrímero polianiónico de polilisina denominado SPL7013 que demostró tener gran potencial microbicida frente al VIH-1 y el virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2). Sin embargo, los ensayos de la fase I fracasaron debido a que el VivaGel® producía cierto grado de inflamación e irritación vaginal tras su uso repetido³⁴⁹.

Otros dendrímeros desarrollados como microbicidas vaginales son los dendrímeros carbosilano polianiónicos, que han demostrado una gran actividad antiviral frente al VIH-1 y VHS-2 en experimentos *in vitro* e *in vivo*³⁵⁰⁻³⁴⁶. Estos dendrímeros polianiónico carbosilanos presentan un esqueleto interno formado por enlaces de C-Si, y muestran alta bioseguridad y baja toxicidad tanto en líneas celulares epiteliales humanas derivadas del tracto genital femenino como en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se ha demostrado que estos dendrímeros actúan a nivel de la entrada de los aislados virales del VIH-1 impidiendo la infección, no generando rotura ni desorganización en la monocapa celular del epitelio genital, reduciendo la infección en CMSP y no generando irritación ni lesiones vaginales en ratón y conejo^{342,350}. La actividad anti-VIH-1 de estos dendrímeros carbosilano polianiónicos se basa en del VIH-1 y los grupos aniónicos funcionales de la periferia del dendrímero, lo que impide la unión de la partícula viral con la célula diana, bloqueando la fusión de membranas y la entrada viral³¹⁶. Uno de los dendrímeros más desarrollados como potencial microbicida frente a la infección por el VIH es el dendrímero denominado G2-S16, un dendrímero carbosilano polianiónico con 16 grupos aniónicos sulfonato en su superficie, que ha demostrado, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, su capacidad para interferir en el proceso de entrada viral al interactuar con los residuos catiónicos del complejo V3 de la glicoproteína gp120, así como con los receptores CD4 y correceptores CXCR4 y CCR5, y otras moléculas de la superficie de la célula diana^{316,343}. Por otra parte, G1-S4 es un dendrímero carbosilano polianiónico de primera generación con 4 grupos aniónicos sulfato que se ha estudiado recientemente como potencial microbicida frente a VHS-2 por su capacidad de unión a la proteína viral de superficie gB y actuar como un posible análogo de heparán sulfato³⁴⁶.

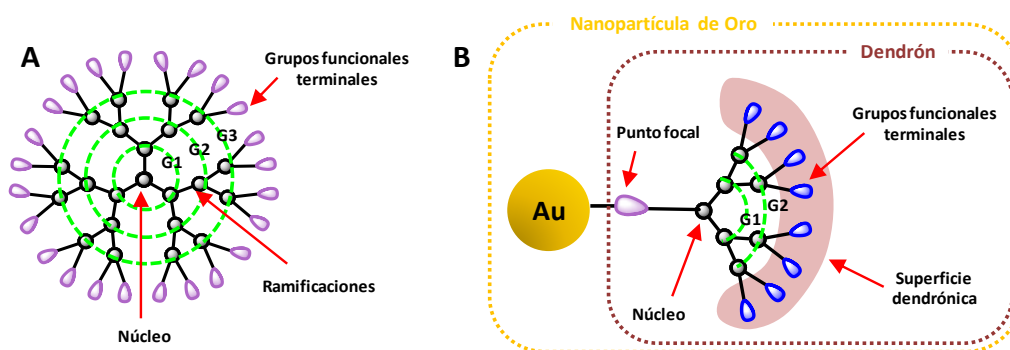


Figura 29: Esquema representativo de los dendrímeros y dendrones. (A) Estructura típica de un dendrímero. Las distintas generaciones vienen determinadas por si progresivo mayor nivel de ramificación desde el núcleo, con un crecimiento exponencial en el número de sus grupos funcionales periféricos. **(B)** Nanopartícula de oro dendronizada. Se muestra la estructura típica de un dendrón, con las distintas generaciones determinadas por el número de ramificaciones, que le

aportan la superficie dendrónica con los grupos terminales periféricos y el punto focal por el que es funcionalizado con la nanopartícula.

Por otra parte, las nanopartículas (NP) de metales exhiben propiedades físico-químicas y biológicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. Pueden ser producidas con distintos tamaños y formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de sistemas para su aplicación en el campo de la biomedicina³⁵¹. Entre ellas destacan de manera especial las NP de oro (AuNP)³⁵² y en menor medida las de plata (AgNP). El oro es básicamente inerte y menos citotóxico que otros metales, y sus NP se han utilizado en diferentes aplicaciones como transporte de fármacos y material genético³⁵³. Para ello, es importante recubrir la NP adecuadamente para dar lugar a una interacción idónea con el material a transportar así como facilitar su circulación *in vivo* o dirigirlas a su zona de acción³⁵⁴. Respecto a las AgNP, éstas presentan un amplio espectro como agentes antibacterianos^{355,356} y se emplean en la actualidad en diversos productos médicos, estando presentes incluso en tejidos con propiedades bactericidas³⁵⁷.

Las NP metálicas de oro y plata son estabilizadas de manera habitual con ligandos que contienen una función tioéter que se une directamente a la superficie metálica, mientras que la función adicional se encontraría en el otro extremo de la molécula. Otras funciones empleadas en la estabilización pueden ser aminas y fosfinas. La síntesis de NPs (Au y Ag) con funciones activas se lleva a cabo la reducción de los precursores metálicos siguiendo dos protocolos. En el primero de ellos, la reducción con un agente reductor se realiza en presencia de ligandos estabilizadores como citrato o tiolalcanos (estas NPs son comerciales), y a continuación se produce la sustitución de estos ligandos estabilizadores por los de interés. En el segundo, la reducción del precursor se lleva a cabo en presencia del ligando de interés, simplificando el proceso.

Un tipo de moléculas que se ha utilizado recientemente para estabilizar NP, con un atractivo específico para aplicaciones biomédicas, son las moléculas dendríticas como dendrímeros y dendrones. Los dendrones, al igual que los dendrímeros, son moléculas hiperramificadas de construcción arborescente, de tamaño y estructura tridimensional bien definidos y que poseen unas propiedades químicas uniformes debidas en parte a su baja polidispersidad como consecuencia de su síntesis controlada, pero cuya topología molecular es de cono o cuña. Presentan la superficie dendrónica que contiene los grupos activos (sulfonatos, sulfatos, entre otros) y una posición adicional denominada punto focal, que puede servir para introducir una nueva función activa o como anclaje a otros sistemas, como por ejemplo las NPs. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de un grupo tiol en dicho punto focal sería de interés para la funcionalización de estas NPs (**Figura 29B**).

Tanto dendrímeros³⁵⁸ como dendrones³⁵⁹ se han empleado para estabilizar NPs metálicas, utilizando para ello los grupos de la periferia o el punto focal respectivamente. Las principales funciones para conseguir la estabilización son grupos tioles, amino o fosfinas. Los dendrímeros y dendrones *per se* tienen actividad biológica actuando como agentes antibacterianos o antivirales. También pueden actuar como agentes de transporte de ácidos nucleicos o fármacos. Esta actividad depende principalmente de las funciones periféricas, y parece estar relacionada con la multivalencia que presentan, ya que permite la presencia de un número elevado de funcionalidades sobre una misma molécula, en un tamaño nanoscópico. Las moléculas dendríticas descritas en la bibliografía y potencialmente útiles como agentes

antivirales presentan en su periferia carbohidratos, péptidos y/o aniones. En los sistemas carbozilano aniónicos, la presencia de grupos, sulfonato y/o sulfato, como los presentados en esta Memoria, les confieren una actividad muy importante frente al VIH y otros virus de transmisión sexual como el VHS-2. La importancia de su capacidad antiviral se debe a que evita la infección de células epiteliales y también reducen la infección en células ya infectadas.

4.3. Capacidad de los dendrímeros de detener la infección por VIH en presencia de semen

Hasta la fecha, el fracaso de los ensayos clínicos realizados con los microbicidas se había atribuido a la falta de adherencia, inducción de inflamación y/o efectos citotóxicos^{323,360-362}. Sin embargo, recientes estudios han mostrado que la ineficacia de estos compuestos podría deberse a que las pruebas preclínicas no reflejan fielmente las condiciones de la transmisión sexual del VIH, encontrándose la reducción de la eficacia antiviral en la propia composición del semen, principal vector de la transmisión^{363,364}. Munch y colaboradores, realizaron un cribado sobre una biblioteca completa de todos los péptidos y proteínas pequeñas presentes en el líquido seminal masculino humano para identificar posibles moduladores de la infección por el VIH. Dicha biblioteca abarcó 294 fragmentos, encontrándose que la fracción 29 mejoraba significativamente la infección por VIH. Tras su secuenciación, se identificó que se correspondía a la confirmación de que estos péptidos aumentaban drásticamente la infección se realizó por microscopía de fluorescencia en células CEM (que contienen el gen reportero de GFP bajo el promotor de VIH) así como por citometría de flujo, observándose un aumento del número de células infectadas³⁶⁵. Previamente había sido descrito que las fibrillas amiloides asociadas al Alzheimer mejoran la infección por VIH, por ello el siguiente paso fue evaluar si este efecto mostrado por PAP era también debido a que formaba dichas fibrillas amiloides, lo cual se corroboró por microscopía, y se denominaron SEVI (derivado de semen potenciador de la infección del virus), demostrando que capturan los viriones de VIH promoviendo su adhesión a las células diana, incrementando la capacidad del virus para infectar en varios órdenes de magnitud a las células humanas, independientemente del tipo celular^{366,367}.

La infectividad del VIH en el fluido genital masculino junto a la susceptibilidad del huésped, el tipo de práctica sexual y la carga viral son determinantes en la transmisión sexual para que se desencadene una infección productiva que establezca una infección crónica, sin embargo esta relación sigue sin estar clara^{310,311}. En más del 80% de los pacientes la transmisión del VIH-1 se produce por un clon viral³⁶⁸. Numeros estudios apoyan la hipótesis de que estos virus denominados “fundadores” (TF), presentan una serie de propiedades biológicas que les confieren una ventaja funcional en la transmisión por vía sexual con mayor capacidad infectiva en las primeras etapas de transmisión de un individuo VIH-positivo a otro no infectado^{310,311,369,370}. En concreto, parece que existe un acoplamiento más eficiente del receptor y/o correceptor^{310,311}, las envueltas presentan bucles de la región variable más cortos, existe un menor sitio de glicosilación en la región N terminal^{369,371} y/o una interacción de las glicoproteínas Env con la integrina 47³⁷². Además, se ha observado que en algunos casos, existe un aumento de la sensibilidad a la neutralización del sitio de unión de CD4 (CD4bs) por anticuerpos monoclonales (AcM)^{369,373}. Sin olvidar el mecanismo de evasión a la respuesta del

huésped por parte de los virus, ya que en la infección temprana por el VIH-1, el IFN ejerce una presión selectiva en la replicación viral *in vivo* ya que entre otros, se induce la expresión de factores de restricción, como la proteína transmembrana, tetherina, que actúa secuestrando los viriones en la membrana celular ³⁷⁴.

Por todo ello, estos resultados claramente sugieren que la eficacia *in vitro* de los microbicidas candidatos para la prevención de la transmisión sexual del VIH debe ser determinada en presencia de semen y de virus TF para asemejar lo más posible el entorno fisiológico de la transmisión del VIH y comparar el comportamiento de los distintos dendrímeros obtenidos frente a virus de laboratorio.

2

OBJETIVOS



Sección I: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS VIH/VHC

Hipótesis

La replicación activa del VHC en pacientes con hepatitis C crónica puede ser causa de una estimulación antigénica e inflamación persistente, con efectos nocivos sobre el sistema inmune, que se puede ver agravada con la progresión de la cirrosis. Sin embargo, hoy día, hay poca información sobre la influencia de la infección por el VIH sobre la hepatitis C crónica, y viceversa, a nivel del sistema inmune en pacientes coinfectados VIH/VHC con distintos grados de fibrosis, y especialmente entre los que tienen cirrosis.

El objetivo general fue analizar el perfil inmunológico y el grado de activación/inflamación, a nivel de sangre periférica, en pacientes coinfectados por VIH/VHC en distintos estadios de fibrosis y cirrosis.

Objetivos

1. Estudiar marcadores celulares de subpoblaciones linfocitarias T relacionados con la diferenciación celular, activación del sistema inmune, senescencia y células T reguladores, mediante citometría de flujo multiparamétrica en sangre periférica.
2. Analizar marcadores plasmáticos relacionados con translocación bacteriana, coagulación, inflamación, riesgo cardiovascular y activación del sistema inmune, mediante técnicas de ELISA múltiplex.

Sección II: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 y VHS-2

Hipótesis

Desde hace más de 30 años, se está trabajando en el desarrollo de estrategias profilácticas para frenar nuevas infecciones de transmisión sexual como las causadas por el VIH-1 y el VHS-2. Previamente, se ha demostrado la potente actividad del dendrímero carboxilano polianiónico G2-S16 frente al VIH-1 *in vitro*³⁴³ e *in vivo* en modelos de ratón humanizado³⁵⁰. Pero debido al fallo que han tenido las anteriores estrategias preventivas, principalmente relacionadas con procesos inflamatorios, se necesitan realizar estudios de toxicología exhaustivos antes de que el dendrímero o cualquier otro nanosistema o fármaco pueda pasar a fase clínica.

El objetivo general fue desarrollar dendrímeros y nanopartículas con actividad microbicida frente al VIH-1 y/o VHS-2 sin que produjesen alteraciones en la vagina o el recto por procesos inflamatorios, debido a que esta es la principal causa de que los microbicidas de uso tópico fallen y por lo tanto de no frenar nuevas infecciones.

Objetivos

1. Estudiar la actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* y hacer un análisis toxicológico completo de dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano para mostrar su potencial aplicación en el desarrollo de geles microbicidas de uso tópico para la prevención de la transmisión sexual por el VIH-1 y/o VHS-2.
2. Diseñar y desarrollar dendrones y nanopartículas dendronizadas que pudieran ser mas efectivas frente a las infección de transmisión sexual por el VIH con una síntesis química mas sencilla para el desarrollo de microbicidas de uso tópico más potentes y novedosos.

3

MATERIALES Y MÉTODOS



Sección I: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS VIH/VHC

1. SUJETOS DE ESTUDIO

1.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal, con recogida de datos y muestras biológicas de forma prospectiva sobre una población de pacientes coinfectados por VIH/VHC.

1.2. Ámbito del estudio

El estudio se ha llevado a cabo en 18 centros del territorio español asociados a la Cohorte de GESIDA de Coinfectados, cuyos investigadores fueron adscritos a los grupos de investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM, Madrid) y del Hospital Universitario La Paz (HULP, Madrid); y con la participación de la Unidad de Infección Viral e Inmunidad del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII, Majadahonda) y el BioBanco VIH del HGUGM (BBHGM, Madrid).

1.3. Aspectos éticos

Los datos clínicos y epidemiológicos fueron tratados con confidencialidad, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas, y lo establecido por la legislación aplicable (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y Sanitaria y Ley 14/1986, General de Sanidad). Se han cumplido los principios éticos de investigación recogidos en la Declaración de Helsinki y en el informe Belmont así como los contenidos en la Declaración Universal de la UNESCO referentes al genoma humano. De igual manera, se ha dado cumplimiento a la Ley Orgánica para la Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos Personales.

El proyecto de investigación ha sido revisado y evaluado por el Comité de Bioética del Institucional del Instituto de Salud Carlos (IMajadahonda), así como por el Comité Ético Científico del HGUGM del BioBanco VIH. Los pacientes dieron su consentimiento informado (CI) a la Cohorte de Gesida de coinfectados por VIH/VHC, firmando el formulario BB-F3I/Rev00/Febrero 2011 del BBHGM (Anexo 2).

1.4. Población de estudio

La población de estudio está formada por 3 grupos:

- a) **Grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC:** 238 pacientes coinfectados VIH/VHC de la cohorte GESIDA de Coinfectados que comenzaron (consecutivamente) tratamiento frente a la hepatitis C entre el 9 febrero de 2012 y el 11 de junio de 2014 y firmaron su consentimiento informado para la inclusión en el estudio.
- b) **Grupo “control VIH”:** 48 pacientes mono infectados por VIH ajustados por edad y sexo. Estos controles se reclutaron en el HGUGM y el HULP y firmaron su consentimiento informado para la inclusión.

c) **Grupo “control sano”**: 32 sujetos sanos ajustados por edad y sexo a los pacientes coinfectados que se incluyeron en el estudio. Estos controles se reclutaron en el HGUGM y el HULP y firmaron su consentimiento informado para la inclusión.

1.5. Recogida de datos

La cohorte de GESIDA de coinfectados (Estudio GeSIDA 3603b) cuenta con un cuaderno de recogida de datos (CRD) electrónico online que satisface todos los requerimientos de confidencialidad de datos y que recoge toda la información clínica y epidemiológica de los pacientes según se ha descrito previamente³⁷⁵. Para este proyecto, se modificó el CRD para incluir la nueva información de eventos no relacionados con la hepatopatía ni el VIH. Los estudios especiales de laboratorio, obtenidos de forma centralizada, no se incluyeron en el CRD electrónico sino que se añadieron posteriormente a la base de datos de trabajo (que se crea tras el volcado de la información incluida en el CRD) para su análisis.

1.6. Variables del estudio y su definición

En cada paciente se consideraron las siguientes variables, que fueron consignadas en el CRD:

i. Variables sociodemográficas

- a) Hospital.
- b) Comunidad autónoma.
- c) Sexo.
- d) Fecha de nacimiento.
- e) Situación laboral.
- f) Estado civil.
- g) Nivel escolar.
- h) Pareja sexual estable.
- i) Número de hijos.

ii. Consumo de alcohol de forma habitual

Se consideró que un individuo bebía alcohol de forma habitual si refería consumir o haber consumido alcohol al menos una vez por semana de forma continua. En los pacientes que referían consumir alcohol de forma habitual se estimó si el consumo era mayor o menor de 50 gr/día promediando el consumo semanal.

iii. Consumo de otras drogas

Se recogieron como variables dicotómicas (SI/NO) el consumo actual (referido a los últimos seis meses) de tabaco y el consumo de cualquier sustancia recreativa aparte del alcohol: heroína, cocaína, drogas de síntesis, cannabis, metadona y otras.

iv. Determinaciones de laboratorio

Estos parámetros fueron determinados mediante la técnica de laboratorio estándar en cada centro.

- A) Variables relativas a la bioquímica/hematología
 - a) Hematología: hemoglobina, leucocitos, neutrófilos y plaquetas.

- b) Bioquímica: gammaglutamiltranspeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total (BT), colesterol total (CT), triglicéridos (TG), creatinina, albúmina, tiempo de protrombina (TP), INR y transaminasas en los últimos doce meses.

B) Variables relativas a la infección por el VIH

- a) Factor principal de riesgo para su transmisión. Variable dividida en las siguientes seis categorías: ADVP, transfusión de sangre o hemoderivados, relaciones homosexuales entre varones, relaciones heterosexuales, transmisión vertical madre-hijo y desconocida.
- b) Fecha del diagnóstico.
- c) Número de linfocitos CD4+ (células/ μ L).
- d) Carga viral del VIH (copias/mL).
- e) Estadio de la infección por el VIH según los CDC (NMRW): Estadio A (síntomas leves), Estadio B (síntomas moderados), Estadio C (Síntomas severos).

v. Variables relativas al tratamiento antirretroviral (TAR)

- a) Fecha de inicio del TAR.
- b) Número y clase de fármacos utilizados.
- c) TAR actual y cambios del TAR.
- d) Hepatotoxicidad.

vi. Variables relacionadas con la infección por los virus de las hepatitis.

- a) Fecha estimada de la infección por el VHC.
- b) Estudio serológico de anticuerpos antiVHC, antiHBc, antiHBs, antiHBe, antiVHD y antiVHA (IgG) y de antígenos HBs y HBe.
- c) Estudio virológico: detección del ARN del VHC por PCR cualitativa; cuantificación del mismo por PCR (Amplificador HCV Monitor, Roche) o branched DNA (Bayer Diagnostics, Emeryville, CA); y determinación del genotipo viral.
- d) Infección crónica activa por VHC. Se considera que un individuo expuesto a infección por VHC presenta una infección crónica por el VHC, si la PCR específica en suero es positiva. En caso contrario se considera una infección por el VHC resuelta.
- e) Hepatitis crónica por el VHC. Se considera que un individuo presenta una hepatitis crónica por el VHC, si además de presentar una PCR específica positiva en suero presenta elevación de las concentraciones de GPT en suero.
- f) Infección crónica por el VHB. Se considera que un individuo tiene una infección crónica por el VHB si la determinación de HBsAg en suero es positiva (HBsAg+).
- g) Infección crónica por VHB expuestos a infección por el VHD. Se considera que un paciente tiene una infección crónica por el VHB y exposición al VHD si además de tener HBsAg+ en suero tiene anticuerpos IgG frente al VHD (HBsAg+, IgG VHD+).
- h) Infección crónica por el VHB e infección crónica por el VHD. Se considera que un paciente tiene una infección crónica por el VHB y el VHD si además de tener HBsAg+ en suero tiene anticuerpos IgM frente al VHD (HBsAg+, IgM VHD+).

vii. Variables relacionadas con la hepatopatía.

- A) Existencia de cirrosis:

- a) Criterios clínicos: alteración severa de la síntesis hepática en ausencia de otra posible causa y presencia de hipertensión portal valorada por hallazgos exploratorios, ecográficos o endoscópicos.
- b) FibroScan®: Se consideró diagnóstico de cirrosis por encima de 12,5 kPa.
- c) Histológicos: Se consideró diagnóstico de cirrosis la presencia de nódulos de regeneración en la biopsia hepática (Escala Metavir)¹⁸⁸.

B) Gravedad de la cirrosis: Se estableció según la clasificación por estadios de Child-Pugh¹⁸⁹: Estadio A (puntuación total de 5 a 6), Estadio B (puntuación total de 7 a 9), y Estadio C (puntuación total de 10 a 15).

C) Complicaciones asociadas a cirrosis (presentes o pasadas): encefalopatía hepática, hemorragia digestiva por varices esofágicas o gastropatía por hipertensión portal, descompensación hidrópica, ictericia o peritonitis espontánea, cada una de ellas se incluyó como una variable dicotómica (SI/NO).

1.7. Elastografía de transición (FibroScan®)

El Fibroscan® consiste en la medida de la elasticidad hepática con una sonda (que incluye un transductor de ultrasonidos) que emite una vibración de baja frecuencia y amplitud al hígado, generando una onda elástica cuya velocidad es directamente proporcional a la dureza del tejido hepático. A mayor dureza, mayor es el grado de fibrosis. El resultado se expresa en kilopascales (kPa)³⁷⁶. El FibroScan® mide la elasticidad hepática en un cilindro de 1 cm de diámetro y 5 cm de longitud, en el que se realizan 10 medidas en 2 ó 3 puntos diferentes de superficie (en total, 20-30 medidas), por dicho motivo este método no invasivo puede ser más representativo de la situación de todo el parénquima hepático que los cambios observados en un cilindro de tejido obtenido por biopsia percutánea.

2. TÉCNICAS DE LABORATORIO

2.1. Registro de muestras y datos en el BBHGM

Las muestras de sangre fueron cedidas por los grupos clínicos participantes en el Estudio GeSIDA 3603b al BBHGM. Todo el circuito de recogida de muestras y los procedimientos de archivo y criopreservación en dicho BioBanco están financiados por un proyecto FIPSE (Ref. 361020/10) y se firmó un acuerdo de depósito de muestras por parte de la Cohorte de GeSIDA de Coinfectados VIH/VHC y el BBHGM. Cuando el material biológico llega al BBHGM se recibe y se realiza la comprobación y validación de los datos y las muestras recibidas. A continuación, se lleva a cabo su procesamiento, registro y almacenamiento en condiciones que garanticen su viabilidad y calidad.

2.1.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre utilizadas en el estudio se obtuvieron por venopunción de los pacientes en tubos con anticoagulante EDTA (VACUTAINER®), se mantuvieron a temperatura ambiente y se enviaron desde los diferentes hospitales incluidos en el estudio, dentro de las primeras 24h desde la extracción, al BioBanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (BBHGM) donde se procesaron por gradiente de Ficoll (Rafer, España) para la obtención de plasma y CMSP siguiendo los estándares del BBHGM³⁷⁷ y se almacenaron hasta su uso (Figura 30).

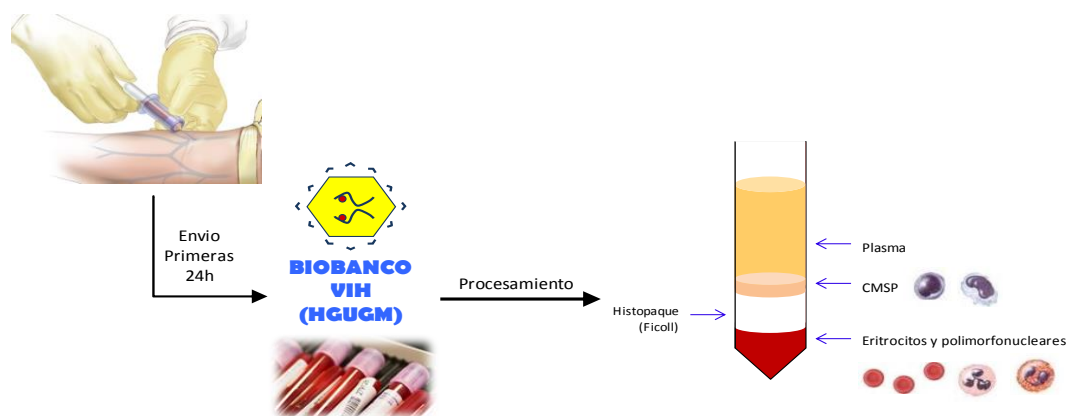


Figura 30. Protocolo de envío y procesamiento de las muestras de sangre de los pacientes.

Se traspasa la sangre de todos los tubos EDTA (40-60mL) a un falcon estéril, se extrajeron dos alícuotas de sangre total, una de 500µL para el marcaje de citometría en sangre fresca y otra de 1,5mL que se almacenó a -80°C. La sangre restante se diluyó en proporción 1:1 con PBS y se centrifugó en gradiente de densidad a 1500r.p.m. durante 30min. Tras dicha centrifugación se recuperaron en primer lugar cuatro viales de 1,5mL de plasma que se almacenaron a -80°C y a continuación el halo que contenía las CMSP, se realizaron varios ciclos de lavado-centrifugado con PBS a 1500r.p.m. durante 10min, para su limpieza y purificación. Las CMSP resultantes fueron contadas en una cámara de conteo Neubauer y se distribuyeron en dos viales con 10^6 células cada uno, los cuales se centrifugaron a 1500r.p.m. durante 10min para retirar el PBS y almacenarlo como pellet seco a -80°C y el resto de CMSP en tantos viales como fuese posible a una densidad celular entre 8×10^6 – 16×10^6 células/vial, las cuales se centrifugaron a 1500r.p.m. durante 10min para retirar el PBS y se resuspendieron a viabilidad en medio de congelación (SFB al 7,5% de DMSO) manteniéndose en una gradilla de congelación a -80°C con disminución gradual de la temperatura grado a grado durante las primeras 24h, y posteriormente se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido a -180°C.

2.2. Análisis fenotípico de las distintas subpoblaciones celulares T

Mediante citometría de flujo se caracterizó por la expresión diferencial de diez moléculas de superficie, que permiten distinguir las diferentes subpoblaciones celulares T y su papel en la respuesta inmune: el perfil fenotípico de las células T CD4+ y CD8+, los niveles de activación y senescencia y la frecuencia de células T reguladoras. Para ello se emplearon los

anticuerpos marcadores de linaje anti-CD3-PO, anti-CD4-APC-Cy7 y anti-CD8-PB; marcador de la homeostasis celular que diferencia a las células según su contacto con antígenos anti-CD45RA-ECD; marcador del coestimulador que discrimina parcialmente la función de las subpoblaciones de células T anti-CD28-PE; marcador de senescencia celular anti-CD57-FITC; marcador de activación celular anti-CD38-APC-Cy5.5; marcador de diferenciación celular anti-HLADR-APC; receptor IL-2R α , marcador de las células T reguladoras anti-CD25-PC5; y el receptor IL-7R α , marcador de diferenciación de las células T reguladoras anti-CD127-PC7 (**Tabla 5**). Se partió de 100 μ L de sangre fresca anti-coagulada y se incubó con la mezcla de anticuerpos durante 20min a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, con el lisador Coulter MULTI-Q-PREP Lysing Workstation (Beckman Coulter, Miami, FL, EE.UU.), se añadió el reactivo IMMUNOPREP System (Beckman Coulter, Galway, Irlanda) a las muestras para lisarlas y fijarlas. Para el diseño del panel de adquisición se emplearon los controles de compensación para cada color (FMO, de sus siglas en inglés Fluorescence minus one) estableciéndose los voltajes adecuados para cada fluorocromo. Las muestras se adquirieron por un citómetro de flujo de 10 colores Gallios™ (Beckman Coulter, Miami, FL, EE.UU.). Se recogieron 200.000 eventos por muestra y los datos de citometría se analizaron usando el software Kaluza™ versión 1.5 (Beckman Coulter, Miami, FL, EE.UU.).

Con dichos marcadores se clasificaron a las células T CD4+ y CD8+ en las siguientes subpoblaciones: CD45RA+CD28+ virgen, CD45RA-CD28+ memoria temprana (TME), CD45RA-CD28- memoria tardía (TMA) y CD45RA+CD28- memoria efectora en fase terminal (TEMRA), así como los niveles de activación CD38+HLADR-, CD38-HLADR+ HLADR+ y CD38+HLADR+; y de senescencia CD28-CD57+ dentro de cada subpoblación. Las células T reguladoras se caracterizaron dentro de las células CD4+ y CD4+CD45RA+/- por la expresión de CD25+CD127-/bajo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Función	Casa comercial	Procedencia
CD3	Pacific Orange	VCHT1	Linaje	Invitrogen	Frederick, MD, EEUU
CD4	APC-Cy7	OKT4	Linaje	BioLegend	San Diego, CA, EEUU
CD8	Pacific Blue	SK1	Linaje	BioLegend	San Diego, CA, EEUU
CD45RA	ECD	2H4LDH11LDB9	Homeostasis	Beckman Coulter	Marsella, Francia
CD28	PE	CD28.2	Coestimulador	Beckman Coulter	Marsella, Francia
CD57	FITC	NC1	Senescencia	Beckman Coulter	Marsella, Francia
CD38	APC-Cy5.5	HIT2	Activación	Invitrogen	Frederick, MD, EEUU
HLADR	APC	GRB+1	Diferenciación	ImmunoStep	Salamanca, España
CD25	PC5	B1-49.9	Receptor IL-2R α	Beckman Coulter	Marsella, Francia
CD127	PC7	R34.34	Receptor IL-7R α	Beckman Coulter	Marsella, Francia

Tabla 5: Anticuerpos empleados en el marcaje de las CMSP para citometría de flujo. APC: Alociocianina, APC-Cy7: Alociocianina-Cianina7, APC-Cy5.5: Alociocianina-Cianina5.5, ECD: Ficoeritrina-Texas Red, PE: Ficoeritrina, FITC: isocianato de fluoresceína, PC5: Ficoeritrina-Cianina5.1, PC7: Ficoeritrina-Cianina7.

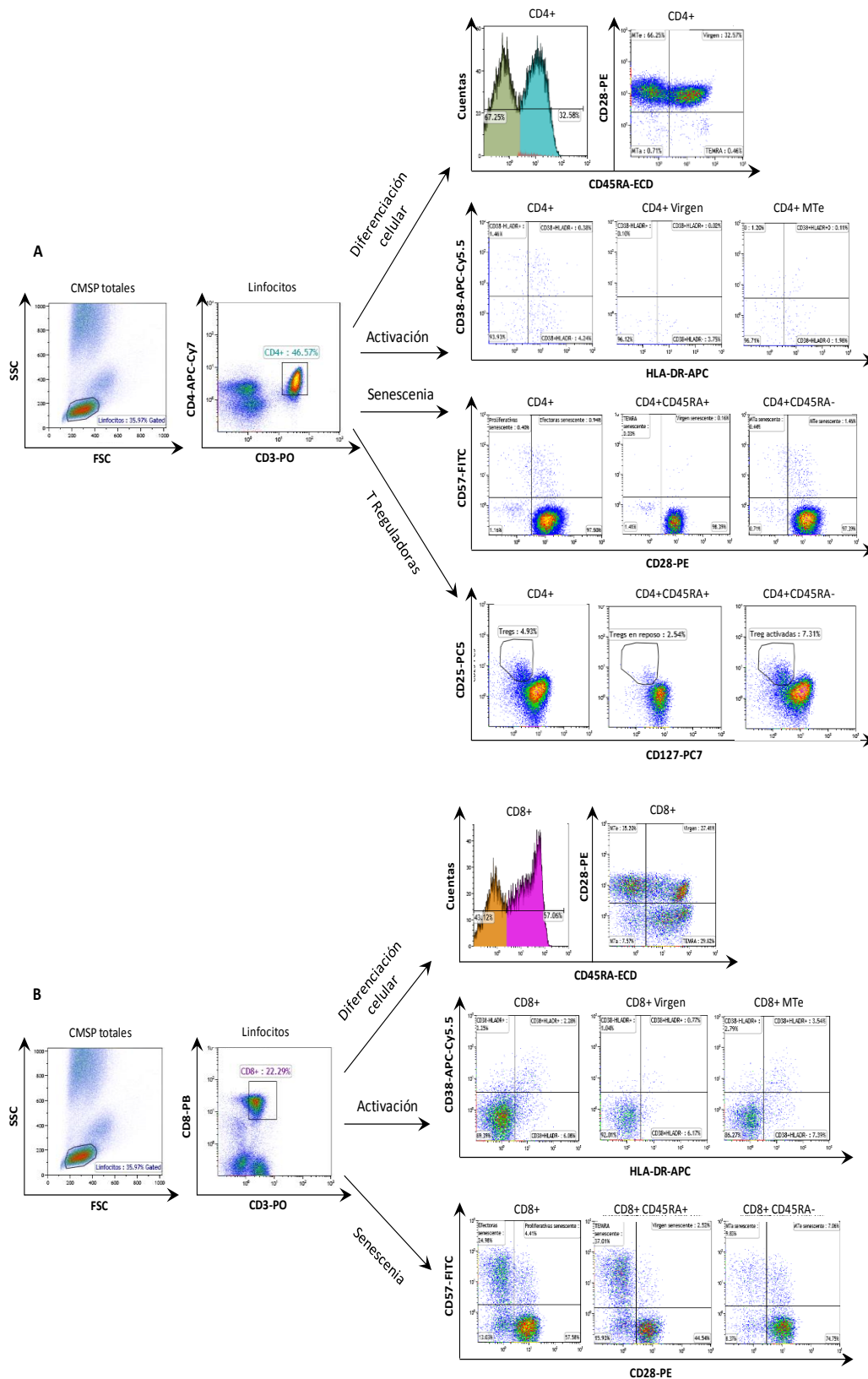


Figura 31: Análisis representativo de la citometría de flujo en sangre periférica en uno de los pacientes coinfectados del estudio. (A) Subpoblaciones de células T CD4+ por marcadores de diferenciación celular, activación, senescencia y T reguladoras. (B) Subpoblaciones de células T CD8+ por marcadores de diferenciación celular, activación y senescencia.

2.3. Inmunoensayo de los biomarcadores plasmáticos

2.3.1. Ensayo Elisa multiplex

Los biomarcadores se midieron en las muestras de plasmas por ELISA multiplex con Procarta® Immunoassays (Panomics Afymetrix, Inc., Fremont, CA, EE.UU.) mediante el analizador Bioplex 200™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se seleccionaron marcadores relacionados con inflamación, coagulación y daño endotelial, los cuales fueron analizados en 3 paneles diferentes en función del tipo de dilución necesaria de la muestra y la compatibilidad en las regiones de los analitos seleccionados, del siguiente modo:

- i) Panel 1: TNF-RI, Dímero-D, IL-18, IL-8, IP-10, MCP-1, PAI-1 e IL1-RA, sin dilución previa.
- ii) Panel 2: sVCAM1 y sICAM1, con dilución previa 1/200.
- iii) Panel 3: IFN γ , TNF α , IL-6, IL1- β , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-2 e IL-4, sin dilución previa y mediante el kit ProcartaPlex® Human High Sensitivity Panel (EPXS090-12199-901)

Se adquirió un mínimo de 50 eventos (microesferas) para cada muestra de analito, obteniéndose valores de intensidad media de fluorescencia. Las concentraciones analíticas de proteína se calcularon a partir de una curva estándar empleando el software Bio-Plex Manager™ versión 6.1 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) mediante una fórmula de regresión con cinco parámetros. El principio de este análisis es similar a un inmunoensayo de tipo sándwich, donde los anticuerpos dirigidos contra las citoquinas, quimioquinas o factores de crecimiento diana están unidos covalentemente a microesferas marcadas con diferentes rangos de fluorescencia, de modo que las microesferas reaccionan con las biomoléculas diana presentes en la muestra (**Figura 32**).

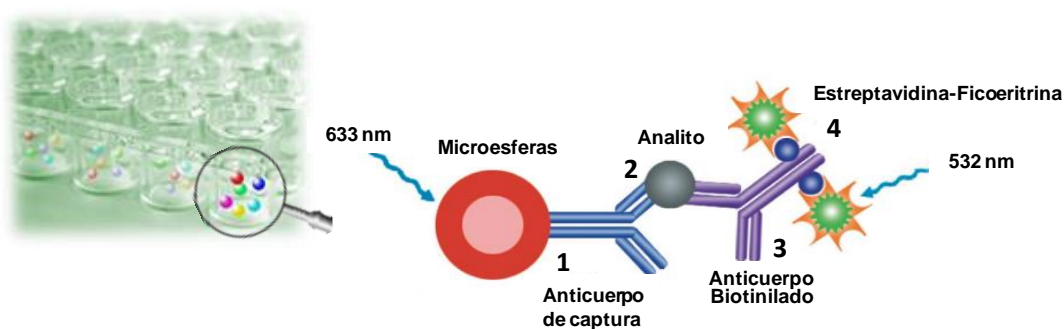


Figura 32: Esquema representativo del inmunoensayo Elisa multiplex tipo sándwich para la detección de biomarcadores plasmáticos. 1) Incubación de las microesferas con el anticuerpo de captura diana de los analitos en estudio. 2) Incorporación de la muestra. 3) Incubación del anticuerpo biotinilado. 4) Incorporación de la solución de Estreptavidina-Ficoeritrina para la detección por fluorescencia del biomarcador plasmático en estudio.

Brevemente, se prepararon los estándares suministrados con el kit realizando diluciones seriadas 1/4, resultando 8 muestras estándares que se analizaron por duplicado y como control negativo se utilizó el diluyente del estándar. Las muestras del panel 2 se diluyeron 1/200, mientras que en los otros dos paneles las muestra de plasma se utilizaron directamente. Las muestras se clarificaron por centrifugación a 10.000g durante 10min a 4°C. A continuación, se añadió en placas de 96 pocillos, previo vortex, el mix de microesferas con los anticuerpos dirigidos frente a los diferentes analitos de estudio incorporados (50 μ l por pocillo de cada

marcador), y se realizaron dos lavados con 150µL por pocillo de tampón de lavado (wash buffer) empleando un lavador magnético automático de placa Bio-plex Pro™ wash station (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Tras ello, se añadieron 25µL de los estándares, controles y/o muestras en los pocillos correspondientes y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación a 500r.p.m. durante 30min, dejándose a 4°C durante toda la noche en una superficie plana. Al día siguiente, se agitó a 500r.p.m. a temperatura ambiente durante 30min y se realizaron 2 lavados con 150µL/pocillo de tampón de lavado en lavador magnético automático. Mientras tanto, se preparó una mezcla 1x de los anticuerpos de detección biotinilados a analizar con el diluyente correspondiente del kit, en un volumen final de 3mL, y se añadió 25µL del mix a cada pocillo, incubándose la placa a temperatura ambiente en agitación a 500r.p.m. durante 30min, dando lugar a la formación de un sándwich de anticuerpos alrededor del analito diana. Se realizaron 2 lavados con 150µL/pocillo de tampón de lavado en el lavador magnético automático, y se adicionó 50µL de la solución de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) por pocillo incubándose la placa a temperatura ambiente en agitación a 500r.p.m. durante 30min, de modo que el SAPE se une al anticuerpo biotinilado. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 150µL/pocillo de tampón de lavado en el lavador magnético automático y se añadieron 120µL/pocillo de tampón de lectura o “Reading buffer” y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación a 500r.p.m. durante 5min antes de la lectura en el Bioplex 200™.

Las muestras se adquirieron usando el sistema Bioplex 200™, basado en la citometría de flujo que permite cuantificar la intensidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la superficie de las microesferas. Tiene incorporados dos láseres, uno que emite a 633nm capaz de excitar las moléculas de fluorocromo contenidas en las microesferas, y otro a 532nm que excita las moléculas de ficoeritrina (PE), de modo que la intensidad de la fluorescencia interna emitida por las microesferas permite diferenciar los analitos presentes, y por otro lado, la intensidad de la fluorescencia en la superficie de las microesferas mediante el software Bio-plex Manager™ v6.1 con la curva estándar permite calcular la concentración de cada citoquina en la muestra problema (Figura 33).

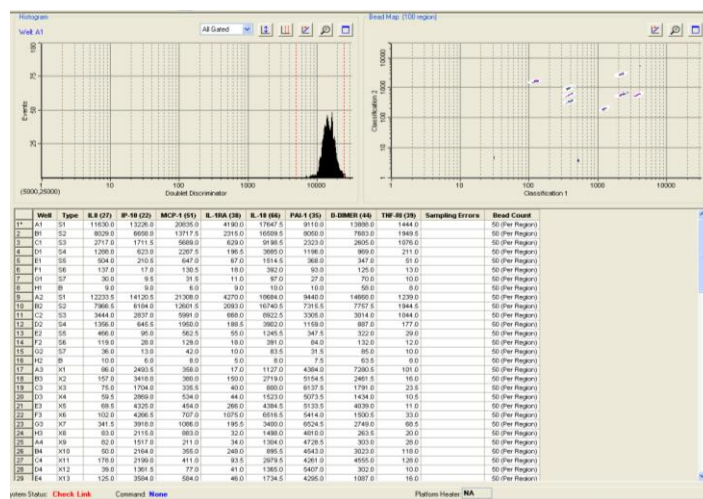


Figura 33: Análisis de los marcadores plasmáticos por el software Bio-plex Manager™ v6.1®. Se muestra un ejemplo de uno de los paneles empleados, donde se recogen en una tabla los valores de cada citoquina en estudio presente en la muestra, y en los gráficos las regiones en las que se distribuyen las microesferas así como la intensidad de fluorescencia que emiten.

Para una adecuada adquisición de los datos, las microesferas están teñidas con una combinación de dos colorantes fluorescentes en proporciones conocidas de manera que cada

microesfera tiene asignado un número (región de la microesfera) del 1 al 200 según el ratio de los dos colorantes fluorescentes. Los valores del último estándar fueron considerados como límites de detección para cada mediador, tal y como recomienda el fabricante. En aquellos valores por debajo del nivel de detección, se determinó como el punto más bajo de la curva dividido entre dos.

2.3.2. Elisa simple

En el caso de los biomarcadores plasmáticos para las que no se disponía de ensayo multiplex, se realizó su cuantificación por inmunoensayo sencillos mediante el kit ELISA cuantitativos comerciales, tales como:

- i) Detección de endotoxina bacteriana mediante el kit Limulus amebocyte lysate chromogenic endpoint assay, Hycult biotech, HIT302, Uden, Países Bajos). La medición se basa en un ensayo colorimétrico, en el que se utilizó una dilución 1/10 de la muestra de plasma.
- ii) Proteína II de unión a ácidos grasos (FABP2) con el kit Human FABP2 ELISA (RayBio®, Norcross GA, EE.UU.). La medición se basa en un ensayo de ELISA tipo sándwich, sin dilución previa de la muestra de plasma.
- iii) CD14 soluble con el kit Human CD14 ELISA (RayBio®, Norcross GA, EE.UU.). La medición se basa en un ensayo de ELISA tipo sándwich, en el que se utilizó una dilución 1/5000 de la muestra de plasma.

Sección II: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 y VHS-2

3. MATERIALES

3.1. Dendrímeros

Los dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano fueron sintetizados por el grupo de Biodendrímeros de Aplicaciones Biomédicas (BioInDen) del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá (UAH, Alcalá de Henares, Madrid, España) siguiendo los procedimientos previamente publicados por el grupo^{342,378,379}. En esta Memoria se han utilizado: el dendrímero de primera generación con grupo terminal de tipo sulfato **G1-S4** ($C_{52}H_{101}N_{12}Na_4O_{16}S_4Si_5$; Pm: 1.509g/mol) (**Figura 34A**); el dendrímero de segunda generación con grupo terminal sulfonato sintetizado por adición de Michael **GS-S16** ($C_{112}H_{244}N_8Na_{16}O_{48}S_{16}Si_{13}$; Pm: 3.717,15g/mol) (**Figura 34B**); el dendrímero de segunda generación con grupo terminal sulfonato sintetizado vía tienol **G2-STE16** ($C_{144}H_{300}Na_{16}O_{48}S_{32}Si_{13}$; Pm: 4.558,92g/mol) (**Figura 34C**); el dendrímero de segunda generación con grupo terminal sulfonato marcado con una molécula de fluorocromo de isocianato de fluoresceína (FITC) **G2-STE15-FITC** ($C_{164}H_{311}N_2Na_{15}O_{50}S_{32}Si_{13}$; Pm: 4.847,25g/mol) (**Figura 34D**); y el dendrímero de tercera generación con grupos sulfatos en su periferia **G3-S16** ($C_{256}H_{508}N_8Na_{16}O_{64}S_{16}Si_{29}$, Pm: 6.978,41 g/mol) (**Figura 34E**). Los lotes de estos dendrímeros se disolvieron en agua destilada libre de nucleasas (Promega, Madrid, España) y se generaron stocks a una concentración final de 1mM.

Las diluciones de trabajo de rango μM se generaron a partir del stock diluyéndolos con agua destilada.

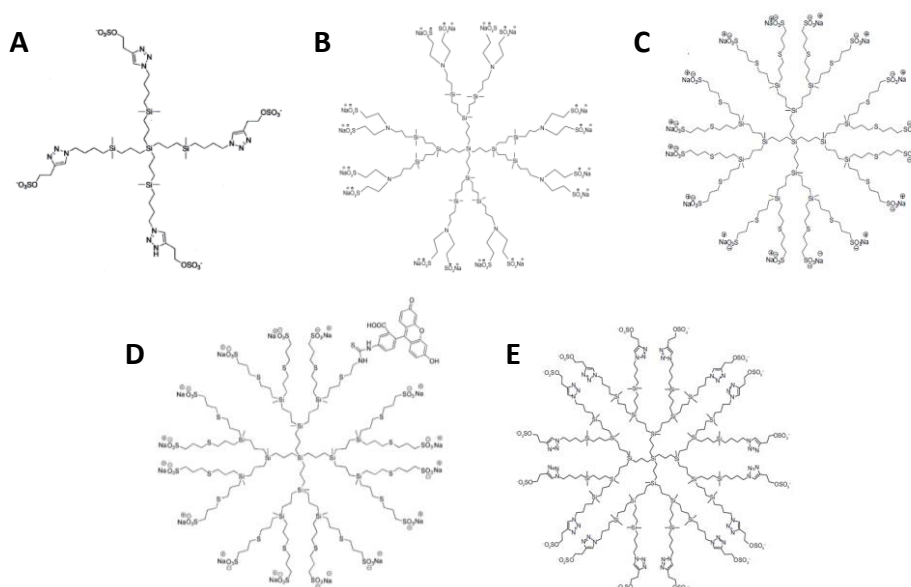


Figura 34: Esquema representativo de los dendrímeros de tipo carboxilano aniónicos. **(A)** Estructura esquemática del dendrímeros polianiónico carboxilano G1-S4 de primera generación con grupos sulfatos en su periferia sintetizado por la química de adición de Michael. **(B)** Estructura esquemática del dendrímeros polianiónico carboxilano G2-S16 de segunda generación con grupos sulfonatos en su periferia sintetizado por la química de adición de Michael. **(C)** Esquema representativo del dendrímero polianiónico carboxilano G2-STE16 de segunda generación con grupos sulfonatos en su periferia sintetizado vía tioenol. **(D)** Esquema representativo del dendrímero polianiónico carboxilano G2-STE15-FITC de segunda generación con grupos sulfonatos en su periferia sintetizado marcado con una molécula de fluorocromo de FITC. **(E)** Esquema representativo del dendrímero polianiónico carboxilano G3-S16 de tercera generación con grupos sulfatos en su periferia sintetizado por la química de adición de Michael.

3.2. Nanopartículas de Oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con dendrones de diferente generación se sintetizaron por el grupo de Biodendrímeros de Aplicaciones Biomédicas (BioInDen) del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá (UAH, Alcalá de Henares, Madrid, España) siguiendo el método directo de dendronización Brust-Schiffin $\text{Au@SG}_n(\text{SO}_3\text{Na})_m$ (**Figura 35A**) para las AuNPs de primera $\text{Au@}(\text{SG1}(\text{SO}_3\text{Na})_2)$ $[\text{Au}_{1441}(\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_5\text{Si})_{255}; \text{Pm}: 421986\text{g/mol}]$, segunda $\text{Au@}(\text{SG2}(\text{SO}_3\text{Na})_4)$ $[\text{Au}_{1214}(\text{C}_{33}\text{H}_{69}\text{Na}_4\text{O}_{12}\text{S}_9\text{Si}_3)_{121}; \text{Pm}: 374963\text{g/mol}]$ y tercera $\text{Au@}(\text{SG3}(\text{SO}_3\text{Na})_8)$ $[\text{Au}_{834}(\text{C}_{69}\text{H}_{145}\text{Na}_8\text{O}_{24}\text{S}_{17}\text{Si}_7)_{41}; \text{Pm}: 257935\text{g/mol}]$ generación, funcionalizadas con oro a partir de dendrones aniónicos de tipo sulfonato $\text{HSG}_n(\text{SO}_3^-)_m$ (**Figura 35B**) de primera $\text{HSG1}(\text{SO}_3\text{Na})_2$ $[\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_5\text{Si}; \text{Pm}: 542,78\text{g/ml}]$, segunda $\text{HSG2}(\text{SO}_3\text{Na})_4$ $[\text{C}_{33}\text{H}_{70}\text{Na}_4\text{O}_{12}\text{S}_9\text{Si}_3, \text{Pm}: 1123,66\text{g/mol}]$ y tercera $\text{HSG3}(\text{SO}_3\text{Na})_8$ $[\text{C}_{69}\text{H}_{145}\text{Na}_8\text{O}_{24}\text{S}_{17}\text{Si}_7; \text{Pm}: 2284,43\text{g/mol}]$ generación con 2, 4 y 8 grupos funcionales en su periferia, respectivamente.

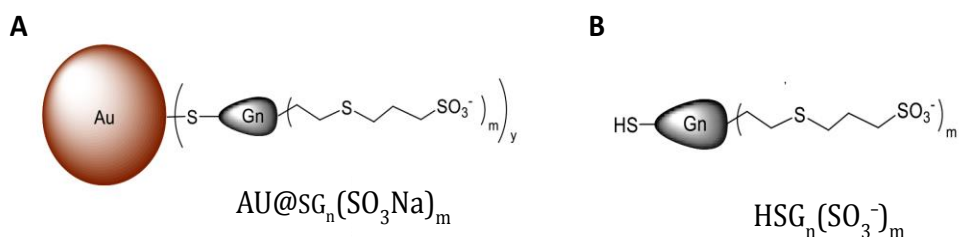


Figura 35: Esquema representativo de los dendrones aniónicos tipo sulfonato y las nanopartículas de oro funcionalizadas por dendronización Brust-Schiffin. (A) Estructura esquemática de los dendrones sulfonatos de primera, segunda y tercera generación (HSG_n(SO₃⁻)_m). **(B)** Estructura esquemática de las nanopartículas de oro funcionalizadas a partir de los dendrones sulfonatos por método directo (Au@SG_n(SO₃⁻)_m) [n = número de generación, m = número de grupos funcionales].

3.3. Cultivos celulares

3.3.1. Células primarias

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de buffy coats de donantes sanos anónimos procedentes del centro de transfusión de la Comunidad de Madrid, siguiendo las normas y especificaciones de la normativa vigente (Real Decreto 1343/2007).

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron mediante gradiente de Ficoll (Rafer, Madrid, España) siguiendo los estándares del BBHGM de la RED Nacional de Sida y del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM)³⁷⁷. La sangre se diluyó en proporción 1:1 con PBS y se centrifugó en gradiente de densidad a 1500 r.p.m. durante 30min. Tras dicha centrifugación se recuperó el halo que contenía las CMSP y se realizaron varios ciclos de lavado-centrifugado con PBS a 1500 r.p.m. durante 10min, para la limpieza y purificación de las mismas. Las CMSP resultantes se contaron en una cámara de contaje Neubauer y se resuspendieron a la densidad celular deseada en medio de cultivo RPMI 1640 (Life Technology, Madrid, España) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 1% de L-glutamina y un coctel de antibióticos (125mg/ml de ampicilina, 125 mg/ml de cloxaciclina y 40 mg/ml de gentamicina; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EE.UU.) y se cultivaron con 60UI/ml de interleuquina 2 (IL-2; Bachem, Suiza). Las CMSP se estimularon con 2μg/ml de fitohemaglutinina (PHA; Remel, Santa Fe, EEUU) durante 72h en condiciones de cultivo (37°C en atmosfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa).

3.3.2. Líneas celulares

TZM.bl, (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, EE.UU.), es una línea celular HeLa generada a partir de la línea JC53-bl (clon 13), que expresa los marcadores CD4 y CCR5 en grandes cantidades y constitutivamente CXCR4, y tiene integrado copias de los genes de la luciferasa y β-galactosidasa bajo el control del promotor LTR ("long terminal repeat") del VIH-1. Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Life Technology, Madrid, España) suplementado con 5% SFB inactivado, 1% de L-glutamina y coctel de antibióticos.

HEK293T, (ATCC®CRL-3216™, Manassas, VA, EE.UU.), es una línea celular epitelial humana procedente de riñón. Es un derivado altamente transfectable de la línea celular 293 en el que se insertó el gen sensible a la temperatura del antígeno T de SV40. Se utilizó para la obtención de los stocks virales del VIH-1 empleados en los experimentos de infección. Se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technology, Madrid, España) suplementado con 10% SFB inactivado, 1% de L-glutamina y coctel de antibióticos.

Vero (ATCC®CCL81™, Manassas, VA, EE.UU.), células epiteliales de riñón derivadas de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, con linaje continuo y aneuploídico, se cultivó en medio de cultivo Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Gibco, Life Technologies, Madrid, España) suplementado al 2% con SFB inactivado.

3.4. Producción Viral

Los aislados virales R5 trópico R5-VIH-1_{NL(AD8)} y X4 trópico VIH-1_{NL4.3}, así como los virus fundadores (TF) VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 son aislados de laboratorio producidos por transfección transitoria de los plásmidos provirales pNL(AD8), pNL4.3, pTHRO y pCH058, respectivamente (se obtuvieron del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, EE.UU.), en la línea celular HEK293T. Para ello, los plásmidos se crecieron en bacterias competentes *Escherichia coli* y se purificaron los plásmidos conteniendo el genoma viral utilizando el kit Plasmid MaxiPrep Qiagen® (Madrid, España), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se transfectaron placas de cultivo de células HEK293T con 15µg de plásmido por placa utilizando un método de transfección por cloruro cálcico. A las 24h se eliminó el medio y se lavaron los cultivos dos veces para retirar el plásmido no integrado en el genoma celular, reponiéndose medio fresco al cultivo. La producción viral presente en el sobrenadante del cultivo se recogió a las 24h posteriores. Los stocks virales se clarificaron por centrifugación a 1200 r.p.m. durante 7min y posteriormente se filtraron utilizando filtros de 0,45µm de poro y se llevó a cabo la titulación viral en la línea celular TZM.bl. Se cultivaron 1,5x10⁵ células con medio de cultivo DMEM completo en placas de 24 pocillos y se añadieron 40µl de la producción viral a distintas concentraciones, realizándose previamente las diluciones correspondientes. Dichas diluciones se pusieron por triplicado y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 72h, transcurrido este tiempo, se lisaron las células con el tampón de lisis comercial Glo Lysis buffer (Promega, Madrid, España) y se trataron las células con β-Gal (Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Madrid, España)) para determinar el número de células infectadas por cuantificación de la actividad luciferasa. Además, la producción viral se tituló cuantificando el antígeno VIH-p24^{gag} por ELISA (HIVp24^{gag} ELISA kit INNOTEST™ HIV antigen mAB, Innogenetics®, Gent, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se estableció la relación de µg de virus por mL. Se preparó el stock de cada aislado viral y se almacenaron a -80°C.

El aislado viral VHS-2 333 lo proporcionó el Dr. Alcamí (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España). Se preparó un stock viral y se tituló por ensayo de placa como se describe en³⁸⁰ y se almacenó a -80°C. Brevemente, se sembraron las células Vero a una densidad de 2 x 10⁵ células/pocillo en placas de 12 pocillos, cuando las células estaban en una

monocapa confluyente, se retiró el medio de cultivo y se infectaron con diferentes diluciones del stock viral en un volumen de 0,3mL de medio y se incubaron en condiciones de cultivo a 37°C y 5% CO₂ durante 1h, moviéndose la placa constantemente para evitar que la monocapa se secase. Después de ese tiempo, se retiró el excedente de virus y se repuso 2mL de medio fresco de cultivo DMEM completo con 5% de IgG (Berigloniba P, CSL Behring, Marbug, Alemania) para que la infección se produjera solo por contacto célula-célula creciendo progresivamente las placas de lisis. Tras 48 horas de incubación, se retiró el medio y se tiñeron con azul de metileno. Se contaron las placas virales y se tituló el stock viral en unidades formadoras de placa (PFU, de sus siglas en inglés).

3.5. Reactivos y Antirretrovirales

En la Sección 2 de esta Memoria se han empleado los siguientes reactivos y antirretrovirales como controles de la inhibición de la replicación viral: **Maraviroc** (MRV, C₂₉H₄₁N₅F₂O; Pm: 513,66g/mol, Selleckchem, DELTACLON S.L., Madrid, España) como inhibidor de la entrada de los virus con tropismo R5 al bloquear el correceptor CCR5 en la superficie celular; **T-20** (C₂₀₂H₂₉₈N₅₀O₆₄; Pm: 267,24g/mol, Fuzeon, Genentech, San Francisco, CA, EEUU) como inhibidor de la fusión; **Tenofovir disoproxil fumarato** (TFV, C₉H₁₄N₅O₄P; Pm: 287,21g/mol, Selleckchem, DELTACLON S.L., Madrid, España) como inhibidor nucleótido de la retrotranscriptasa.

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes productos químicos: Dextrano [(C₆H₁₀O₅)_n, Pm: 4,84x10⁵g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), molécula inerte utilizada como control negativo en los ensayos de toxicidad celular; Dimetilsulfoxido (DMSO, (CH₃)₂SO; Pm: 78,13g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) utilizado como control positivo de muerte en los ensayos de toxicidad; Fitohemaglutinina (PHA, Remel, Santa Fe, EE.UU.) como estímulo para activar las CMSP; 3,4-Dicloroanilina (Merck, Darmstadt, Alemania) (3,4-DCA, C₆H₅Cl₂N; Pm: 162g/mol) utilizado como sustancia de referencia de toxicidad en el ensayo del pez cebra; Acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera®, Nueva York, NY, EE.UU.) hormona para sincronizar el ciclo estral de los ratones hembra; Hidroxiethylcelulosa (HEC) en gel (Sulky, Lab. Bohm, Fuenlabrada, España) como vehículo de los dendrímeros en los ensayos *in vivo*; nonoxinol-9 (N9, C₃₃H₆₀O₁₀; Pm: 616,83g/mol) como control positivo de irritación vaginal en los experimentos *in vivo*; PBS (Tampón fosfato salino, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.); Isoflurano (C₃H₂ClF₅O; Pm: 184,5g/mol, Forane®, Abbott, Perú) como anestésico inhalatorio; Ketamina C₁₃H₁₆NClO; Pm: 237,72g/mol) y Xilacina (C₁₂H₁₆N₂S; Pm: 220,33g/mol) en combinación como anestésico potente.

4. MÉTODOS

4.1. Estudios *in vivo* de inhibición de la infección por el virus Herpes Simple tipo 2 en ratones BALB/c

Este estudio se realizó en las instalaciones del animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO) de acorde con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento

Europea y el Real Decreto 1201/2005, y en conformidad con las normas de manejo y cuidado animal del Comité de Ética en experimentación animal del mismo.

4.1.1. Infección vaginal

Se emplearon hembras de ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratoties, Wilmington, MA, EE.UU.) que se mantuvieron en condiciones especiales libres de patógenos en el animalario P-2 del CBMSO. Se emplearon 10 especímenes dentro de cada condición de estudio, las cuales se pusieron en la fase estro del ciclo estral por la administración subcutánea de 2mg de Depo-Provera (Pfizer) para incrementar la susceptibilidad a la infección por el VHS-2. Las ratonas se anestesiaron por inhalación con isoflurano (Forane, Abbott, Perú), y se pre-trataron intravaginalmente con 30µL de los diferentes tratamientos i) grupo control blanco tratado con PBS; ii) grupo vehículo tratado gel HEC; iii) grupo estudio tratado con G2-S16 al 3% en gel HEC; y iv) grupo estudio tratado con G1-S4 al 3% en gel HEC. Una hora después, se anestesiaron de nuevo y se les administró intravaginalmente 10^5 PFU/20µL del aislado viral VHS-2 333 manteniéndose en posición supina con ligera elevación de la pelvis aproximadamente 10min hasta que se despertaron. Diariamente durante 16-18 días consecutivos se valoró el peso corporal de los ratones y la patología genital, empleando un sistema de puntuación de la enfermedad con el fin de analizar la presencia de sintomatología por la infección intravaginal del VHS-2, utilizando la siguiente puntuación: 0=ausencia de lesiones, 1=eritema genital, 2= moderada infección genital, 3=ulceración genital purulenta y pérdida de peso, 4= severa ulceración genital con tejido exudativo y parálisis de las extremidades posteriores (requiere de eutanasia) (Figura 36).

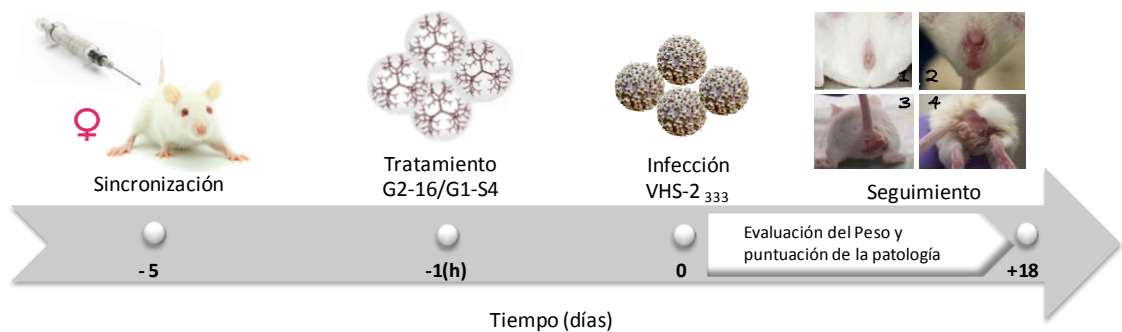


Figura 36: Esquema representativo del procedimiento seguido en el ensayo *in vivo* con ratones hembras BALB/c. 1) Sincronización del ciclo estral con la administración subcutánea de Depo-Provera 5 días antes de la infección; 2) pre-tratamiento con gel HEC, G2-S16 y/o G1-S4 una hora previa a la infección; 3) inoculación intravaginal de la cepa viral VHS-2 333; 4) evaluación diaria del peso y la puntuación de las patologías asociadas a la infección durante 18 días post-infección.

4.1.2. Infección rectal

En este caso, los dendrímeros se disolvieron en PBS. Se emplearon ratones hembra y macho de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratoties, Wilmington, MA, EEUU), que se mantuvieron en condiciones especiales libres de patógenos en el animalario P-2 del CBMSO. Se emplearon 5 hembras y 10 machos dentro de cada condición de estudio i) grupo vehículo tratado con PBS; ii) grupo estudio tratado con G2-S16; y iii) grupo estudio tratado con

G1-S4. Los ratones permanecieron en ayunas de 24h previa a la infección rectal, pero con glucosa al 1% disponible a demanda, y tras la infección la comida y el agua se repusieron a demanda. Los ratones se anestesiaron e inmovilizaron, previniendo la defecación por la administración intraperitoneal de Ketamina (100mg/kg) y xilacina (10mg/kg). Los ratones se pre-trataron con 25 μ L de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 al 3% en PBS o PBS mediante una sonda vía rectal para evitar la alteración del epitelio, y se mantuvieron en posición supina con ligera elevación de la pelvis. A los 30 minutos, se les inoculó rectalmente 10⁵PFU/10 μ L del aislado viral VHS-2 333 manteniéndose en posición supina de nuevo hasta que se despertaron. Siguiendo este mismo protocolo, se realizaron otros dos experimentos rectales. Uno con 18 ratones machos distribuidos en tres grupos i) control vehículo tratado con PBS; ii) grupo estudio tratado con G2-S16 al 3% en PBS; iii) grupo estudio tratado con G1-S4 al 3% en PBS pero con un incremento del inóculo viral en un logaritmo 10⁶ PFU/10 μ L del aislado viral VHS-2 333; y el segundo con 18 ratones machos distribuidos en tres grupos i) vehículo tratado con PBS; ii) tratado con TFV al 1%, iii) estudio tratado con G2-S16 al 3% + TFV al 1% en PBS frente a un inóculo viral de 10⁵ PFU de VHS-2 333. Diariamente durante 14-18 días consecutivos se valoró el peso corporal de los ratones y la patología genital, empleando el sistema de puntuación de la enfermedad con el fin de analizar la presencia de sintomatología al igual que en la infección intravaginal del VHS-2 (Figura 37).

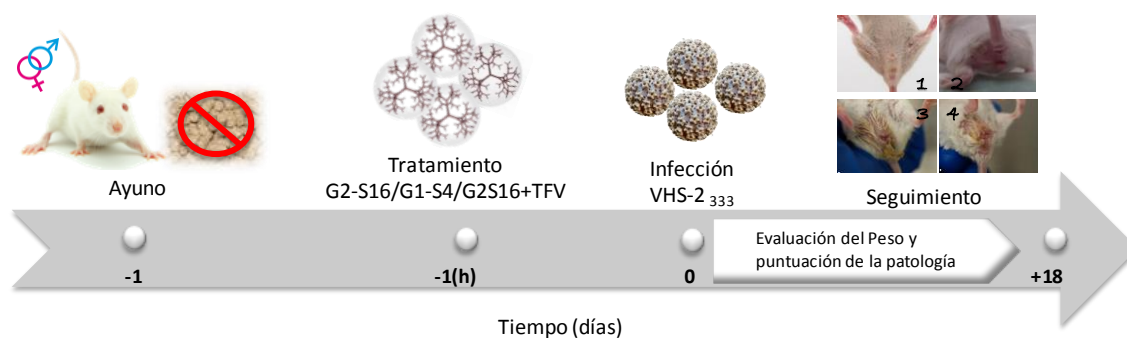


Figura 37: Esquema representativo del procedimiento seguido en el ensayo *in vivo* con ratones machos/hembras BALB/c. 1) Ayuno de 24h antes del tratamiento; 2) pre-tratamiento con PBS, G2-S16, G1-S4 y/o GS-16+TFV una hora previa a la infección; 3) inoculación rectal de la cepa viral VHS-2 333; 4) evaluación diaria del peso y la puntuación de las patología asociada a la infección durante 18 días post-infección.

4.2. Biodistribución del dendrímero G2-STE15-FITC *in vivo*

Este estudio se realizó en las instalaciones del animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO) de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Real Decreto 1201/2005, y en conformidad con las normas de manejo y cuidado animal del Comité de Ética en experimentación animal del mismo. Para evaluar el posible tiempo de acción del G2-S16 tras su aplicación intravaginal, se estudió la capacidad de retención del dendrímero G2-S16 en el tejido vaginal. Para ello se empleó un dendrímero análogo en estructura pero marcado por una molécula de fluorocromo de isocianato de fluoresceína (FITC), G2-STE15-FITC, que permitiera su seguimiento mediante el sistema de formación de imágenes fluorescentes *in vivo* (IVIS, de sus siglas en inglés In Vivo Imaging System, PerkinElmer, EE.UU.),

visualizando en tiempo real la presencia del dendrímero en el organismo. Se emplearon 4 ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas, a los que se les anestesió en cámara de isoflurano (Forane, Abbott, Perú) y se les administró intravaginalmente 30 μ L del dendrímero marcado al 3% en gel-HEC (Sulky, Lab. Bohm, España). A los 30min dos de los ratones se sacrificaron, se les retiró la piel para evitar autofluorescencia en la toma de imágenes y se evaluó la presencia del dendrímero en el animal completo. A continuación, se extrajo la vagina del animal y se procedió de nuevo a la toma de imágenes, se siguió con la apertura de la vagina por su eje longitudinal dejando expuesta la cara interna hacia el exterior para la nueva toma de imágenes y por último el tejido se lavó dos veces con PBS sin contacto para no alterar el tejido retirando todo el excedente de dendrímero no unido que pudiese quedar y se volvió a evaluar la fluorescencia por toma de imágenes. A las 20h se repitió el mismo procedimiento con los otros dos ratones.

En todas las secciones realizadas se tomaron previamente imágenes con luz blanca para la correcta visualización del tejido, seguido de imágenes con el epi-iluminador (desde la parte superior) excitando el fluorocromo FITC con el láser 488nm. Los archivos obtenidos se analizaron con el software Living Image® v4.0 para determinar la intensidad de fluorescencia de las áreas de interés (ROI, de sus siglas en inglés "Region of Interest").

4.3. Estudio de irritación sobre el epitelio vaginal en ratonas BALB/c tras tratamiento durante 7 días consecutivos

Este estudio se realizó en las instalaciones del animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CBMSO) de acorde con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europea y el Real Decreto 1201/2005, y en conformidad con las normas de manejo y cuidado animal del Comité de Ética en Experimentación Animal del mismo. Se emplearon 9 hembras de ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratorities, Wilmington, MA, EE.UU.) que se mantuvieron en condiciones especiales libres de patógenos en el animalario del CBMSO. Los animales se distribuyeron en grupos de 2 especímenes por condición excepto para el grupo blanco con un único ejemplar, en los siguientes grupos de estudio: i) grupo control blanco tratado únicamente con PBS; ii) grupo control negativo tratado únicamente con gel HEC; iii) grupo irritación vaginal tratado con N9 al 3% en gel HEC; iv) grupo de estudio tratado con G2-S16 al 3% en gel HEC; y v) grupo de estudio tratado con G2-S16 al 3% y TFV al 1% en gel HEC. El gel vehículo se formuló diluyendo el gel-HEC al 2% (Sulky, Lab. Bohm, Fuenlabrada, España) con PBS a una concentración final de 1% p/v. Previamente, los ratones se pusieron en fase estro con la administración subcutánea de 2mg de Depo-Provera (Pfizer, Nueva York, YN, EE.UU.). Después de 5 días, y durante 7 días consecutivos se les anestesió en cámara de isoflurano (Forane, Abbott, Perú) por inhalación y se les administró intravaginalmente 30 μ L de los diferentes tratamientos, respectivamente. Al octavo día, se sacrificaron los ratones, se extrajeron las vaginas y se fijaron con formaldehído al 10%. El estudio anatómo-histopatológico se realizó por la empresa AnaPath S.L. (Laboratorio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario, Granada, España) acreditada por la ISO 9001:2008. Brevemente, las muestras se embebieron en parafina mediante el paso por alcoholes de grado creciente, dos baños de xilol y uno de parafina y se colocaron en un molde de parafina. Posteriormente se cortaron en secciones por un micrótopo y se desparafinaron mediante baños de xileno y alcoholes en grado decreciente para teñirse con

hematoxilina-eosina para la determinación de la presencia de lesiones histológicas en los tejidos.

A continuación, empleando el sistema de graduación certificado por la Norma ISO 10993-10 para el *Examen microscópico de la biocompatibilidad de compuestos en tejido vaginal* se valoró la aparición de lesiones epiteliales con el fin de analizar el efecto del dendrímero en el tejido. Este sistema emplea una escala de puntuación de 0 (normal o ausencia de efectos adversos) a 4 (efectos adversos graves) para evaluar la integridad del epitelio considerando la existencia de hiperplasia o hiperqueratosis, ulceración y/o presencia de infiltrado de células inflamatorias, congestión vascular epitelial y edema presentes en la submucosa y tejido muscular bajo el epitelio. El ratio de irritación vaginal se define por la combinación de la puntuación de los distintos parámetros, considerándose valores entre 1-4 un ratio de irritación vaginal “mínimo”, valores entre 5-8 un ratio de irritación “medio”, valores de 9-11 definen una irritación “moderada” y valores de 12-16 un grado de irritación vaginal “severo”³⁴³.

4.4. Ensayos de infección celular en presencia o ausencia de semen

4.4.1. Procesamiento de las muestras de semen

Las muestras de semen se obtuvieron de más de 10 donantes sanos anónimos, previa firma del consentimiento informado en el BBHGM³⁷⁷ (Madrid, España). Estos experimentos fueron aprobados por el Comité Ético Científico del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (SemDem-15-02). Los eyaculados se mantuvieron a temperatura ambiente entre 30 y 120 min para su licuefacción, ya que tras la eyaculación el semen presenta un estado condensado, y se continuó con su almacenamiento en pools de diferentes pacientes en alícuotas de 500µl a -20°C. Las muestras fueron empleadas rápidamente tras su descongelación y los excedentes fueron desechados.

4.4.2. Ensayo de inhibición celular

Para evaluar la actividad antiviral de los dendrímeros, solos o en combinación con los antirretrovirales, en presencia de semen, se empleó la línea celular TZM.bl, la cual se cultivó 24h antes en placas de 96 pocillos a una densidad de 15×10^3 células/200µl para su adhesión, y las células primarias CMSP previamente activadas con PHA 2µg/ml durante 48h a una densidad de 2×10^5 células/200µL en placas de 96 pocillos. Los cultivos celulares se trataron durante 1h en condiciones de cultivo 37°C, 5% CO₂ con un gradiente de concentraciones desde 0,01µM a 20µM de los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16, solos y en combinación con TFV y MRV a un ratio 1:2 y 1:1, respectivamente, así como con los antirretrovirales, TFV y MRV, en un rango de 0,005µM a 1µM. La cepa viral VIH-1-R5_{NL(AD8)} y los virus fundadores VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 se preincubaron con semen durante 5min a una concentración final de semen del 10%. Tras la incubación del virus con el semen, las células se infectaron con 20ng virus/10⁶células en 14µl de semen-virus o PBS-virus, siendo la concentración final del semen en las placas de 0,67% o 0%, respectivamente. Las células TZM.bl y CMSP fueron incubadas durante 2h y 3h, respectivamente, en condiciones de cultivo, transcurrido el tiempo, se eliminó el medio y se lavaron los cultivos dos veces para retirar el excedente de virus, reponiéndose medio fresco al

cultivo. Tras 48h de cultivo, las células TzM.bl se lisaron con el tampón de lisis comercial Glo Lysis buffer (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.) y se trataron con β -Gal (Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Fitchburg, WI, EE.UU.)) siguiendo las indicaciones del comerciante para cuantificar la actividad luciferasa. Se midió la producción viral por luminiscencia en un lector de placas Synergy™4. En el caso de las CMSP, tras 72h de cultivo, se recolectó 100 μ L de sobrenadante y se presentó sobre células TzM.bl sembradas el día anterior a una densidad de $15 \times 10^3 / 100 \mu\text{L}$ pocillo en placas p96, se dejaron en condiciones de cultivo 48h, y se procedió a la cuantificación de la infección viral del mismo modo que para las células TzM.bl. Cada experimento se realizó por triplicado.

4.5. Estudio de toxicidad aguda en estadios embrionarios del pez cebra (PET)

La determinación de toxicidad aguda de sustancias sobre huevos de pez cebra *Danio rerio* se realizó mediante método estático, siguiendo las directrices del "Test Guideline de la OECD 236 (TG236, 26 de Julio, 2013)" para determinar la toxicidad aguda de compuestos químicos en estadios embrionarios del pez cebra (FET, por sus siglas en inglés)^{381,382}, cuyos resultados muestran una fuerte correlación con los obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda en peces adultos³⁸³. El ensayo FET emplea el pez cebra *Danio rerio* por la transparencia de los embriones, el rápido desarrollo embrionario, la abundancia y frecuencia de puestas así como la homología del 70% de su genoma con el humano^{382,384}. La conservación de los peces reproductores se realiza según las especificaciones definidas en la instrucción técnica IT-DD-17 "mantenimiento y cuidados de pez cebra adultos", y la producción de huevos siguiendo las especificaciones definidas en el protocolo PT-DD-12 "obtención y cultivo de huevos fecundados de pez cebra".

Se evaluó un gradiente de concentraciones del dendrímero G2-S16 a 4,6mg/L, 10mg/L, 22mg/L, 46mg/L y 100mg/L disuelto en agua de dilución (AD) con DMSO al 0,1%, partiendo de una solución madre a 100 mg/mL en DMSO al 100% del compuesto, la cual se vortexeó y sonicó durante 45min hasta su completa disolución. A partir de ésta dilución, se hicieron las concentraciones de estudio con AD dejando la concentración del DMSO al 0,1%. Como controles se emplearon, un grupo negativo tratado con AD, un grupo control vehículo tratado con AD con DMSO al 0,1% (vehículo de dilución) para garantizar la bioseguridad de los embriones, y un grupo control positivo de toxicidad tratado con 3,4 dicloroanilina (3,4-DCA) a 3,7 mg/L. Para el ensayo, se utilizaron únicamente aquellos huevos fecundados que no presentaron ningún tipo de anomalía externa, rechazando aquellos con anomalías de división celular (asimetrías, vesículas) o cuya membrana estuviera dañada. Posteriormente, con una pipeta Pasteur de plástico se transfirieron los huevos fecundados sin entrar en contacto con el aire, un huevo por pocillo en un volumen de 2mL a las concentraciones de los controles y del ensayo correspondientes. Se realizaron 20 réplicas de cada condición, y en cada placa se añadieron 4 replicas del grupo blanco con AD como control interno de la placa. Las placas se incubaron a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24h, 48h, 72h y 96h. Tras cada período de incubación, se examinaron los huevos/embriones y se anotaron los resultados obtenidos según los siguientes criterios:

a). Parámetros letales:

- i). Número de huevos coagulados: los huevos coagulados son opacos y se muestran oscuros al estereomicroscopio.

ii). Desprendimiento de la cola: se verifica si la cola del embrión se ha desprendido del saco vitelino (yolk) debido a su aumento en longitud.

iii). Ritmo cardíaco: se registra si se detecta o no ritmo cardíaco.

iv). Formación de somitas y ojos: se analiza la formación de somitas (series longitudinales del mesodermo que por delaminación, fusión y migración se convierten en el esqueleto axial, la dermis y los músculos dorsales y la pared del cuerpo y las extremidades) y los ojos.

b). Parámetros subletales:

i). Movimientos espontáneos: se registra si se detectan o no movimientos espontáneos rotativos o dentro del corión.

ii). Pigmentación: se registra si se detectan cambios en la pigmentación.

iii). Formación de edemas: se registra si se detectan edemas en órganos o estructuras.

iv). Formación de coágulos: se registra la formación de coágulos en órganos o estructuras.

c). Parámetros teratogénicos:

i). Malformaciones en órganos y estructuras.

ii). Escoliosis.

iii). Raquitismo.

iv). Retardo generalizado del desarrollo.

Después del tratamiento, se determina si un embrión está muerto cuando se detecta cualquiera de los parámetros letales descritos anteriormente.

4.6. Ensayo de viabilidad celular: MTT

Para evaluar la toxicidad de los dendrones y las nanopartículas de oro (AuNPs) en los diferentes tipos celulares, se empleó el ensayo MTT, que mide la citotoxicidad en relación a la actividad mitocondrial celular. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células vivas para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Permite determinar el efecto letal de los nanocompuestos sobre el metabolismo celular. Esta técnica se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante (MTT, Sigma-Aldrich, St-Louis, EEUU).

Brevemente, tras los periodos de incubación correspondiente a 24h o 48h en las distintas líneas celulares con un gradiente de concentraciones de los dendrones desde 0,01 μ M a 20 μ M y de las nanopartículas de oro desde 0,01 μ g/mL a 100 μ g/mL en placas de 96 pocillos, se retiró el sobrenadante que contenía los compuestos y se sustituyó por 200 μ l de Opti-MEM® (medio de cultivo sin suero ni rojo fenol) y se añadió 20 μ l de MTT (Azul de tiazolil, 5mg/ml, a una concentración final por pocillo de 0,5mg MTT/ml) por pocillo. Tras una incubación de 4h en

condiciones de cultivo, se centrifugó la placa a 2000 r.p.m. 10min y se retiró el sobrenadante con el excedente de MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán formados se disolvieron en 200µl de DMSO (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EEUU). La placa se agito a 700 r.p.m. para la correcta disolución de los cristales y se determinó la concentración de formazán por espectrofotometría a una longitud de onda de 570nm (referencia de 690nm) utilizando un lector de placas (Multilector de placas Synergy 4, Biotek Instrument, EEUU). La calibración del lector se realizó con medio Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) se calculó respecto al control de células sin tratar en base a la fórmula: $[A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}} \times 100$. Como controles se emplearon Dextrano como control negativo de muerte celular, ya que es un polímero de efecto inocuo, y DMSO al 10% como control positivo. Se consideró un tratamiento como no tóxico cuando la viabilidad de las células tratadas fue igual o superior al 80%. Cada experimento se realizó por triplicado.

4.7. Ensayo de inhibición de la replicación del VIH

Para evaluar la actividad antiviral de los dendrones HSG1(SO₃Na)₂, HSG2(SO₃Na)₄ y HSG3(SO₃Na)₈, y las nanopartículas de oro (AuNPs) Au@(SG1(SO₃Na)₂), Au@(SG2(SO₃Na)₄) y Au@(SG3(SO₃Na)₈), se cultivaron las células TZM.bl en placas de 96 pocillos overnight a una densidad de 15x10³células/200µl para su adhesión. Se pre-trataron con un gradiente de concentraciones desde 0,1µM a 20µM de los dendrones y desde 0,01 µg/mL a 10µg/mL, 0,01 µg/mL a 1µg/mL y 0,005 µg/mL a 0,5µg/mL de las respectivas AuNPs. Después de 1h de tratamiento, los cultivos se incubaron durante 3h con 20ng/10⁶células de las cepas virales R5-VIH-1_{NL(AD8)} y X4-VIH-1_{NL4.3} en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo, se eliminó el medio y se lavaron los cultivos dos veces con PBS para retirar el excedente de virus, reponiéndose medio fresco al cultivo. Tras 48h, las células TZM.bl se lisaron con el tampón de lisis comercial Glo Lysis buffer (Promega) y se trataron con β-Gal (Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)) siguiendo las indicaciones del comerciante para cuantificar la replicación viral mediante la actividad luciferasa.

En las células primarias CMSP previamente activadas con PHA 2µg/ml durante 48h, y sembradas a una densidad de 2x10⁵ células/200µl, para el ensayo de infectividad se empleó un pre-tratamiento de las AuNPs a una concentración de 100µg/ml 1h antes de la infección con el aislado viral R5-VIH-1_{NL(AD8)} (50ng/10⁶ células). Después de 3h de incubación, se eliminó el medio y se lavaron los cultivos dos veces con PBS para retirar el excedente de virus, reponiéndose medio fresco al cultivo. A las 72h, se centrifugaron los cultivos a 1200 r.p.m. 5min y se recolectaron los sobrenadantes para cuantificar la producción viral por el antígeno VIH-p24^{gag} por ELISA (HIVp24^{gag} ELISA kit INNOTEST™ HIV antigen mAB, Innogenetics®, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control positivo de la inhibición de la infección del VIH-1 se empleó el T20 (inhibidor de la fusión) a una concentración de 20µM. Cada experimento se realizó por triplicado.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.1. Sección I: Estudio del sistema inmune en pacientes coinfectados VIH/VHC

El análisis estadístico se realizó con el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS) 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Todos los p-valores en los test estadísticos utilizados fueron de dos colas. La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

5.1.1. Variable predictora (x) desenlace (y) analizadas en el estudio

La variable predictora analizada fue el valor de rigidez hepática medido por Fibroscan®, tanto como valor continuo como categorizado en 4 estratos: $<12,5\text{kPa}$ (F0-F3), $12,5\text{-}25\text{kPa}$ (F4.1 - cirrosis), $25\text{-}40\text{kPa}$ (F4.2 - cirrosis) y $\geq 40\text{kPa}$ (F4.3 - cirrosis).

Las variables desenlace analizadas fueron las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+, y los biomarcadores plasmáticos de inflamación, riesgo cardiovascular, y de función inmune.

5.1.2. Análisis univariante

El Test Chi-cuadrado (X^2) de Pearson se utilizó para comparar variables cualitativas indicando si existen diferencias entre las distintas categorías. El test exacto de Fisher es una variante de la prueba Chi-cuadrado (X^2) de Pearson para tablas 2x2, cuando el tamaño muestral es pequeño. Recomendable para comparar proporciones. Se ha de aplicar siempre que haya una celda con valor esperado menor de 5.

Las variables continuas fueron comparadas con test paramétricos y no paramétricos. Las pruebas paramétricas (T-student y ANOVA) exigen el cumplimiento de una serie de condiciones para poder ser aplicadas: la variable debe seguir una distribución normal en los grupos estudiados y las varianzas han de ser homogéneas entre los grupos. La normalidad de cada una de las variables se comprobó previamente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante la prueba de Levene.

Las pruebas estadísticas no paramétricas (Test de U-Mann Withney) se usaron cuando la muestra fue pequeña o la distribución de los datos en la población fue libre (los datos no procedían de poblaciones normales y con igualdad de varianzas).

La relación entre variables se analizó calculando el coeficiente de correlación, que permite estudiar la fuerza de asociación entre dos variables. Dicha fuerza será nula (asociación inexistente) si $r=0$, aumentando a medida que el valor de r se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente r indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo, e inversa cuando es negativo. Para el análisis de dos variables cuantitativas normales se calcula el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r). Cuando las dos variables cuantitativas no se ajustan a la distribución normal se calcula en coeficiente de correlación Spearman que es una variante no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson.

5.1.3. Análisis multivariante

Cuando se desea estudiar la relación entre dos variables y además una de ellas puede considerarse como variable dependiente o “respuesta” se utilizaron modelos de regresión. En este caso, se han utilizado modelos lineales generalizados (GLM) con una distribución gamma (log-link). El GLM da las diferencias entre los grupos y la ratio de la media aritmética (AMR) o la razón por la cual se multiplica la media aritmética del resultado original.

Cada modelo GLM se ajustó por las principales variables clínicas y epidemiológicas: edad, sexo, CD4+nadir, CD4+/mm³ en el momento del estudio, carga viral detectable del VIH, ingesta alta de alcohol, diabetes, genotipo del VHC, y carga viral del VHC.

5.2. Sección II: Estudio de microbicidas frente a infecciones de transmisión sexual: VIH-1 y VHS-2

Se empleó el software bioinformático CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK) para calcular la CI50 de cada compuesto o combinación de dendrímero con antirretroviral y se calculó el incremento (Fold) entre las CI50 de los compuestos en presencia de VIH o VIH-semen basado en el principio del efecto de la mediana³⁸⁵. El programa GraphPad Prism v.7 (graphPad Software, San Diego, EE.UU.) se empleó para representar los resultados, incluyendo cálculo de la media, desviación estándar (SD) y error (SEM), junto al análisis estadístico utilizando los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, dependiendo de los experimentos, con una $p=0,05$ como nivel de significación. Para las curvas de supervivencia Kaplan Meier se empleó el test no paramétrico de Mantel-Cox, con una $p=0,05$ de nivel de significación.

4

RESULTADOS



SECCIÓN I: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS POR VIH/VHC

1. Características clínicas y epidemiológicas de los grupos de estudio

Las principales características de los grupos de estudio a nivel clínico y epidemiológico quedan reflejadas en la **Tabla 6**. Los tres grupos de estudio fueron, a) 32 individuos sanos (Trabajadores del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) y el Hospital Universitario La Paz (HULP); grupo b) 48 pacientes mono infectados VIH procedentes del HGUGM y el HULP; y grupo c) 238 pacientes coinfectados VIH/VHC procedentes de la cohorte de GESIDA, estudio GeSIDA 3603b en el que participaron 18 hospitales del territorio español.

El género, la edad y las características del índice de masa corporal (IMC) fueron similares en los tres grupos. Además, el grupo de pacientes mono infectados VIH presentaron un valor de mediana de células T CD4+ >500 células/mm³, al igual que el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC. Además, en ambos grupos la carga viral fue indetectable en la mayoría de los pacientes, solo un 6,25% en el grupo b y un 12,6% en el grupo c tuvieron carga viral >400 copias VIH/mL. Todos los pacientes mono infectados VIH recibieron TARc y 233 de los 238 pacientes coinfectados VIH/VHC también recibieron TARc. En el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC, el 72,3% estaban coinfectados por el genotipo 1 del VHC, y la mediana de Log₁₀ ARN VHC fue de 6,3.

En la **Tabla 7** se reflejan las principales características clínicas y epidemiológicas de los pacientes coinfectados VIH/VHC, estratificados por los valores de rigidez hepática obtenidos por el Fibroscan, del siguiente modo: i) F0-F3 ($<12,5$ kPa): 119 pacientes; ii) F4.1 (12,5-25kPa): 73 pacientes; iii) F4.2 (25-40kPa): 28 pacientes y iv) F4.3 (>40 kPa): 18 pacientes. La diferencia más relevante entre los cuatro grupos de pacientes fue el número de células T CD4+, que fueron mayores en los pacientes con $<12,5$ kPa y menores en los pacientes con >40 kPa.

	Control sano	VIH+	VIH/VHC+
No. *	32	48	238
Género (varón)	17 (53,1%)	32 (66,7%)	187 (78,6%)
Edad (años) #	49,5 (47; 53)	51 (47; 53)	49 (46; 52)
IMC (kg/m²) #	24,9 (23,1; 27,1)	24,9 (23,2; 26,5)	24,4 (21,8; 26,9)
IMC ≥25 (kg/m²) *	14 (43,7%)	23 (47,9%)	98 (41,2%)
Diabetes *	-	6 (12,5%)	20 (8,4%)
Alto consumo de alcohol *	-	2 (4,1%)	117 (89,1%)
ADVP *	-	-	186 (78,1%)
SIDA *	-	18 (37,5%)	64 (26,9%)
Infección VIH (años) #	-	-	23 (18; 26)
Infección VHC (años) #	-	-	21 (16; 24)
TARc *			
No tratado	-	-	5 (2,1%)
IP #	-	11 (22,9%)	35 (14,7%)
2ITIN+II *	-	8 (16,6%)	59 (24,8%)
2ITIN+IP *	-	-	47 (19,7%)
2ITIN+ITINN *	-	26 (54,2%)	70 (29,5%)
Otros	-	3 (5,3%)	22 (9,2%)
VIH marcadores			
CD4+ Nadir(cels/mm³) #	-	203 (63; 230)	172 (84; 254)
Nadir CD4+<200 *	-	20 (41,6%)	131 (55,1%)
CD4+ (cels/mm³) #	-	771 (540; 977)	547 (394; 803)
CD4+ <500 cels/mm³ *	-	9 (19,1%)	100 (42%)
VIH-ARN >50 cp/mL*	-	3 (6,3%)	30 (12,6%)
VHC marcadores			
VHC genotipo (n=235)*			
1	-	-	170 (72,3%)
2	-	-	5 (2,1%)
3	-	-	39 (16,6%)
4	-	-	21 (8,9%)
Log₁₀ VHC-ARN (IU/mL)#	-	-	6,3 (5,87; 6,74)
VHC-ARN > 850,000 IU/mL *	-	-	170 (71,4%)

Tabla 6. Características clínicas y epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio. IMC: índice de masa corporal; VHC: virus de la hepatitis C; VHC-ARN: carga viral plasmática del VHC; VIH-1: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1; VIH-ARN: carga viral plasmática del VIH; ADVP: adición a drogas por vía parenteral; TARc: terapia antirretroviral combinada; ITINN: inhibidor de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos; ITIN: inhibidor de la transcriptasa inversa análogos de; IP: inhibidor de proteasa; II: inhibidor de la integrasa (*), Número absoluto (porcentaje); (#), media y media de error estándar.

	<12,5 kPa	12,5-25 kPa	25-40 kPa	>40 kPa
No. *	119	73	28	18
Género (varón)	96 (80,7%)	54 (74%)	23 (82,5%)	14 (77,8%)
Edad (años) #	48 (45; 52)	49 (46; 51)	49,5 (46; 53)	50 (47; 52)
IMC (kg/m²) #	23,8 (21,4; 26,3)	24,6 (22,7; 28,1)	24,7 (21,9; 26,5)	24,6 (21,6; 25,9)
IMC ≥25 (kg/m²) *	46 (38,6%)	33 (45,2%)	12 (42,8%)	7 (38,9%)
Diabetes *	8 (6,7%)	6 (8,2%)	4 (14,3%)	2 (11,1%)
Alto consumo de alcohol *	56 (47,1%)	36 (49,3%)	16 (57,1%)	9 (50%)
ADVP *	92 (77,3%)	56 (76,7%)	24(85,7%)	14 (77,7%)
SIDA *	27 (22,7%)	23 (31,5%)	8 (28,6%)	6 (33,3%)
Infección VIH (años) #	22 (17; 26)	24 (20; 27)	21 (18; 26)	23 (19; 27)
Infección VHC (años)#	21 (13; 24)	21 (18; 25)	19 (17; 21)	22 (15; 26)
TARc *				
No tratado	2 (1,7%)	1 (1,4%)	2 (7,1%)	0 (0%)
IP #	19 (15,9%)	12 (16,4%)	2 (7,1%)	2 (11,8%)
2ITIN+II *	31 (26,1%)	18 (24,7%)	6 (21,4%)	4 (23,5%)
2ITIN+IP *	25 (21%)	10 (13,7%)	6 (21,4%)	6 (35,3%)
2ITIN+ITINN *	31 (26,1%)	26 (35,6%)	10 (35,7%)	3 (17,6%)
Otros	11 (9,2%)	6 (8,2%)	2 (7,2%)	2 (11,8%)
VIH marcadores				
CD4+ Nadir (cels/mm³)#	196 (78; 277)	167 (87; 234)	160 (85; 251)	116 (95; 198)
CD4+ Nadir<200 *	58 (48,7%)	42 (57,5%)	17 (60,7%)	14 (77,7%)
CD4+ (cels/mm³) #	603 (436; 832)	511 (339; 736)	570 (395; 828)	364 (243; 520)
CD4+ <500 cels/mm³ *	41 (34,4%)	35 (47,9%)	13 (46,4%)	11 (61,1%)
VIH-ARN >50 cp/mL*	16 (13,4%)	7 (9,6%)	4 (14,3%)	3 (16,7%)
VHC marcadores				
VHC genotipo (n=235) *				
1	78 (66,7%)	58 (80,6%)	20 (71,4%)	14 (77,8%)
2	3 (2,6%)	1 (1,4%)	1 (3,6%)	0 (0%)
3	18 (15,4%)	12 (16,7%)	7 (25%)	2 (11,1%)
4	18 (15,4%)	1 (1,4%)	0 (0%)	2 (11,1%)
Log₁₀ VHC-ARN (IU/mL)#	6,32 (5,83; 6,83)	6,36 (6,04; 6,69)	6,36 (5,79; 6,52)	6,16 (5,78; 6,59)
VHC-ARN > 850,000 IU/mL *	80 (97,2%)	58 (79,4%)	19 (67,9%)	13 (72,4%)

Tabla 7. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes coinfectados VIH/VHC. IMC: índice de masa corporal; VHC: virus de la hepatitis C; VHC-ARN: carga viral plasmática del VHC; VIH-1: virus de inmunodeficiencia humana tipo 1; VIH-ARN: carga viral plasmática del VIH; ADVP: adición a drogas por vía parenteral; TARc: terapia antirretroviral combinada; ITINN: inhibidor de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos; ITIN: inhibidor de la transcriptasa inversa análogos de; IP: inhibidor de proteasa; II: inhibidor de la integrasa. (*), Número absoluto (porcentaje); (#), media y media de error estándar.

2. Valores estimados de las subpoblaciones de células T CD4+

2.1. Caracterización fenotípica de las células T CD4+ en los diferentes grupos de estudio

En el anexo I se encuentran los datos crudos, de todas las subpoblaciones de células T CD4+ en cada uno de los 3 grupos de estudio.

En primer lugar, se clasificaron las subpoblaciones celulares definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD28, distribuidas en subpoblaciones virgen (CD45RA+CD28+), memoria temprana (MTe, CD45RA-CD28+), memoria tardía (MTa, CD45RA-CD28-) y memoria efectora terminal (TEMRA, de sus siglas en inglés *Terminally Differentiated Effector Memory*, CD45RA+CD28-)³⁸⁶ en las células T CD4+ totales, en los 3 grupos de estudio a) controles sanos, b) pacientes mono infectados VIH y c) pacientes coinfectados VIH/VHC.

Las frecuencias más elevadas se observaron en las células T CD4+ MTe (CD45RA-CD28+), siendo éstas mayores en los pacientes coinfectados VIH/VHC (59,3%) que en el grupo control sano (48,81%) y en los pacientes mono infectados VIH (56,25%), aunque estas diferencias solo fueron significativas respecto a los controles sanos ($p<0,001$ y $p=0,202$, respectivamente). A su vez, los pacientes mono infectados VIH (b), respecto a los controles sanos (a), tuvieron valores significativamente más altos de células T CD4+ MTe (CD45RA-CD28+) ($p=0,030$). Las subpoblaciones T CD4+ virgen, MTa (CD45RA-CD28-) y TEMRA (CD45RA+CD28-) presentaron el patrón de distribución inversa; con valores más elevados en los a) controles sanos, seguido de b) los pacientes mono infectados VIH y por último c) los pacientes coinfectados VIH/VHC. Para las células T CD4+ virgen, los valores fueron muy similares 38,6%, 34,06% y 33,82% entre los tres grupos, respectivamente; mientras que la disminución de los valores de células T CD4+ MTa (CD45RA-CD28-) en los pacientes coinfectados VIH/VHC (3,51%) respecto a los controles sanos (7,29%) fue significativa ($p=0,021$), al igual que las células TEMRA (CD45RA+CD28-) (2,4% vs. 522%, $p=0,001$), que además fueron la subpoblación menos frecuente (**Figura 38**). Los datos obtenidos indican que la coinfección VIH/VHC conduce a un enriquecimiento de células T CD4+ con fenotipo de memoria temprana.

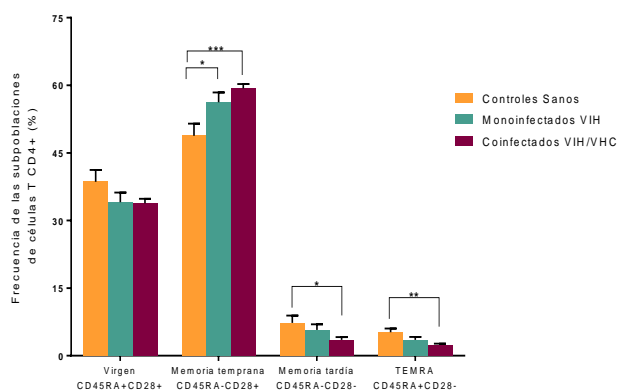


Figura 38: Identificación de las subpoblaciones de las células T CD4+ en los tres grupos de estudio. Distribución de las células T CD4+ en subpoblaciones definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD28 respecto al total de células T CD4+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

Posteriormente, se analizaron los niveles de activación mediante la expresión de los marcadores CD38 y HLADR, observándose un notable aumento en las subpoblaciones T CD4+ activadas CD38+HLADR- y CD38+HLADR+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC, respecto a los controles sanos [10,44% vs. 4,07% ($p=0,001$) y 1,76% vs. 0,23% ($p=0,002$), respectivamente]; y respecto a los pacientes mono infectados VIH [10,44% vs. 3,67% ($p<0,001$) y 1,76% vs. 0,45% ($p=0,001$), respectivamente]. Además, en la subpoblación CD4+CD38-HLADR+ también se observó un incremento, pero menos marcado y sin diferencias significativas respecto a los controles sanos [3,32% vs. 2,16% ($p=0,068$)] y a los pacientes mono infectados VIH [3,32% vs. 2,75% ($p=0,278$)] (**Figura 39A**).

Ante dichos resultados, el planteamiento fue analizar la distribución de las células activadas en las subpoblaciones de las células T CD4+ con capacidad proliferativa. Para ello, se estudiaron los marcadores de activación previamente analizados en las células T CD4+ virgen y memoria temprana. En las células que no han tenido contacto con el antígeno, células CD45RA+CD28+, se observó una distribución de las células activadas similar a la de las células T CD4+ activadas totales, pero en este caso los mayores incrementos se hallaron en los pacientes coinfectados VIH/VHC respecto a los controles sanos y a los pacientes mono infectados VIH en los valores CD38+HLADR- [15,08% vs. 5,84%, $p=0,002$ y 15,08% vs. 4,64%, $p=0,003$, respectivamente] y CD38-HLADR+ [1,85% vs. 0,69%, $p=0,043$ y 1,85% vs. 0,55%, $p=0,008$, respectivamente]. En la coexpresión CD38+HLADR+ se observó la misma tendencia, aunque con valores de frecuencia muy bajos y por ello sin diferencias significativas respecto a los controles sanos ($p=0,104$) y pacientes mono infectados VIH ($p=0,178$) (**Figura 39B**).

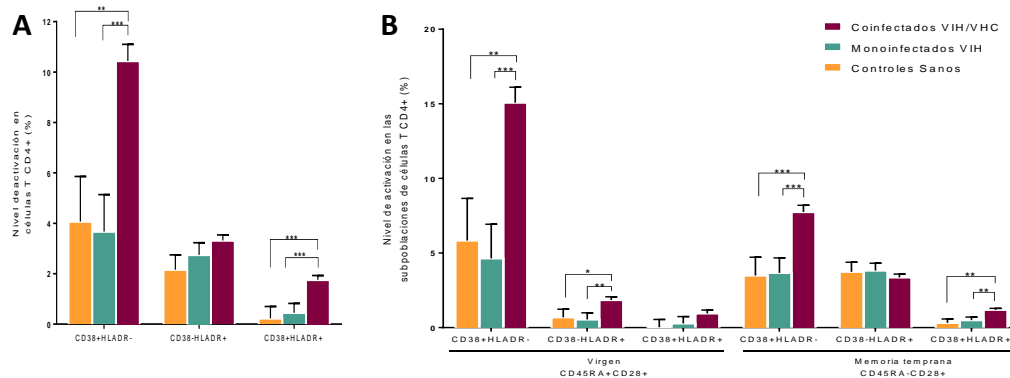


Figura 39: Niveles de activación de las células T CD4+ en los tres grupos de estudio. (A) Frecuencia de células activadas T CD4+ definidas por la expresión o coexpresión de los marcadores HLADR y CD38. **(B)** Niveles de activación en las subpoblaciones virgen y memoria temprana de las células T CD4+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) p 0,05; (**) p <0,01; (***) p <0,001.

Por el contrario, en las células T CD4+ diferenciadas (CD45RA-CD28+) se observó una pérdida en la expresión de HLADR considerable, alcanzando incluso valores levemente menores, pero no significativos, en los pacientes coinfectados VIH/VHC (3,36%) respecto a los controles sanos (3,74%) y a pacientes mono infectados VIH (3,82%). En las células dobles positivas CD38+HLADR+ se mantuvo la mayor frecuencia en los coinfectados VIH/VHC respecto a los controles sanos (1,19% vs. 0,32%, $p=0,002$) y los mono infectados VIH (1,19% vs. 0,5%, $p=0,003$), al igual que en las células CD38+HLADR- (7,75% vs. 3,49%, $p=0,001$; y 7,75% vs. 3,67%, $p<0,001$,

respectivamente) (**Figura 39B**) (**Figura 1**). Los resultados indican una mayor activación crónica del sistema inmune en los individuos coinfectados VIH/VHC.

La pérdida de expresión de CD28 está acompañada de la aparición de la expresión de CD57, indicando una menor respuesta proliferativa con progresión hacia un fenotipo senescente replicativo propio del envejecimiento. En los pacientes mono infectados VIH se hallaron valores mayores de expresión de CD57 en las diferentes subpoblaciones respecto a los controles sanos, como está descrito en la literatura científica³⁸⁷, debido a la instauración del fenotipo senescente debido a la hiperactivación inmune persistente propia de la infección VIH. Sin embargo, en los pacientes coinfectados VIH/VHC se obtuvieron porcentajes notablemente más bajos de células T CD4+ con expresión de CD57+ (**Figura 40A**). Dicha falta de expresión de CD57+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC fue significativa con respecto a los pacientes mono infectados VIH en las células virgen CD45RA+CD28+ (0,48% vs. 1,67%, $p<0,001$), en la MTe CD45RA-CD28+ (1,14% vs. 1,97%, $p=0,001$) (**Figura 40B**), en la MTa CD45RA-CD28- (2,72% vs. 5,82%, $p=0,002$) y en la TEMRA CD45RA+CD28- (2,47% vs. 6,22%, $p=0,003$; y con respecto a los controles sanos, excepto en las células TEMRA (CD45RA+CD28-) donde fue aún mayor (2,47% vs. 7,2%, $p=0,005$) (**Figura 40C**). Los datos claramente indican que en la coinfección VIH/VHC hay menor porcentaje de células T CD4+ con fenotipo senescente CD57+ que en los pacientes VIH y en los controles sanos.

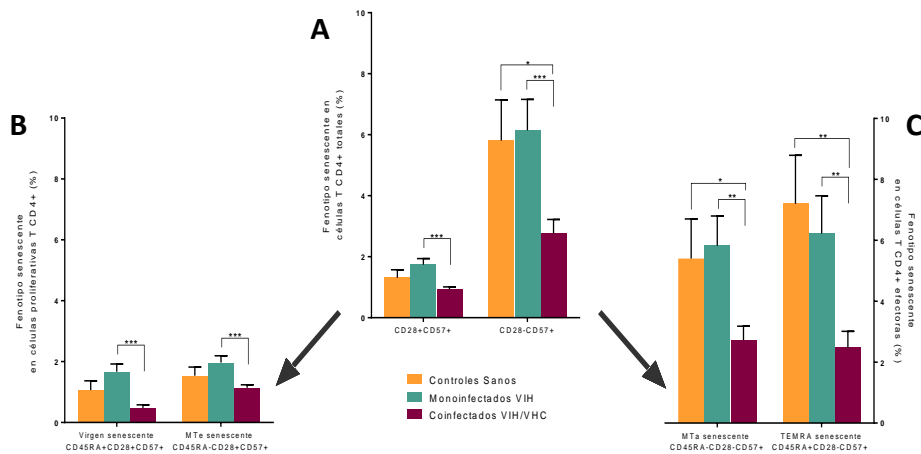


Figura: Frecuencia de marcadores de senescencia en las células T CD4+ totales y en sus subpoblaciones. (A) Fenotipo senescente en las células T CD4+ totales definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD28 y CD57. **(B)** Fenotipo senescente en las células virgen y memoria temprana (CD28+) T CD4+. **(C)** Fenotipo senescente en las células memoria temprana y memoria efectora terminal (CD28-) T CD4+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

Además, se analizó la frecuencia de las células T CD4+ reguladoras (Treg) definidas por la expresión de CD25 y la pérdida del correceptor CD127, con potente capacidad inmunosupresora que modulan la respuesta inflamatoria³⁸⁸. Los pacientes coinfectados VIH/VHC mostraron porcentajes significativamente mayores de células Treg CD4+CD25+CD127- que los controles sanos (8,44% vs. 4,54, $p<0,001$) y que los pacientes mono infectados VIH (8,44% vs. 6,14%, $p<0,001$) (**Figura 41A**). Cuando se analizó el nivel de activación de las células Treg definido por la co-expresión del marcador CD45RA, se encontró un incremento

significativamente mayor en el número de células Treg activadas (CD4+CD25+CD127-CD45RA-) en los pacientes coinfectados VIH/VHC (11,26%) respecto a los controles sanos (6,02%, $p<0,001$) y los mono infectados VIH (8,08%, $p<0,001$); mientras que en las células Treg en reposo (CD4+CD25+CD127-CD45RA+) no se observó variación significativa entre grupos (**Figura 41B**).

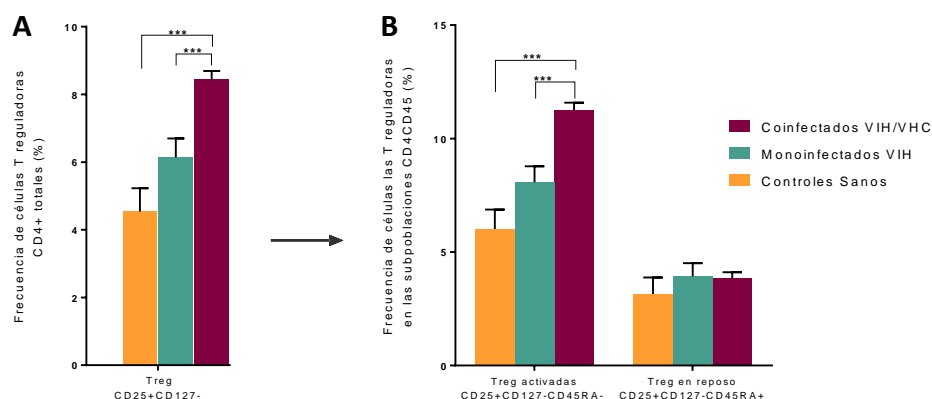


Figura 41: Porcentaje de células T reguladoras CD4+. (A) Frecuencia de células Treg en las células CD4+ totales definidas como CD25+CD127-. (B) Porcentaje de células Treg en las subpoblaciones CD4+CD45RA+ (Treg en reposo) y CD4+CD45RA- (Treg activadas). Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (***) $p<0,001$.

2.2. Asociación de los valores de rigidez hepática y subpoblaciones de células T CD4+

Se analizó la asociación entre los valores de rigidez hepática (como variable continua) y las subpoblaciones de células T CD4+ en pacientes coinfectados VIH/VHC (**Figura 42**). Se halló una asociación inversa y significativa entre los valores de rigidez hepática y los valores de activación en células T CD4+ definidos por la expresión de HLADR, en la poblaciones CD4+CD38-HLADR+ (aAMR=0,55; $p<0,001$), CD4+CD45RA+CD28+CD38-HLADR+ (aAMR=0,36; $p<0,001$) y CD4+CD45RA-CD28+CD38-HLADR+ (aAMR=0,72; $p=0,009$). Además, se encontró una asociación positiva y significativa entre los valores de rigidez hepática y las células T CD4+ con fenotipo CD57+, dentro de la población con capacidad proliferativa CD28+CD57+ (aARM=1,25; $p=0,032$), en las células T CD4+ de memoria temprana CD45RA-CD28+CD57+ (aAMR=1,19; $p=0,015$), y en las células T CD4+ efectoras senescentes CD28-CD57+ (aARM=1,71; $p=0,012$), siendo aún mayor dentro de dicha subpoblación, en las células CD4+ TEMRA senescentes CD45RA+CD28-CD57+ (aARM=2,41; $p=0,004$) (**Figura 42**). Por tanto, a pesar de que los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron menor frecuencia de células T CD4+ con fenotipo senescente CD57+ que los dos grupos control, en este caso se encontró una correlación positiva y significativa con valores de rigidez hepática, indicando que a mayor fibrosis hepática mayor porcentaje de células T CD4+ con fenotipo senescente CD57+.

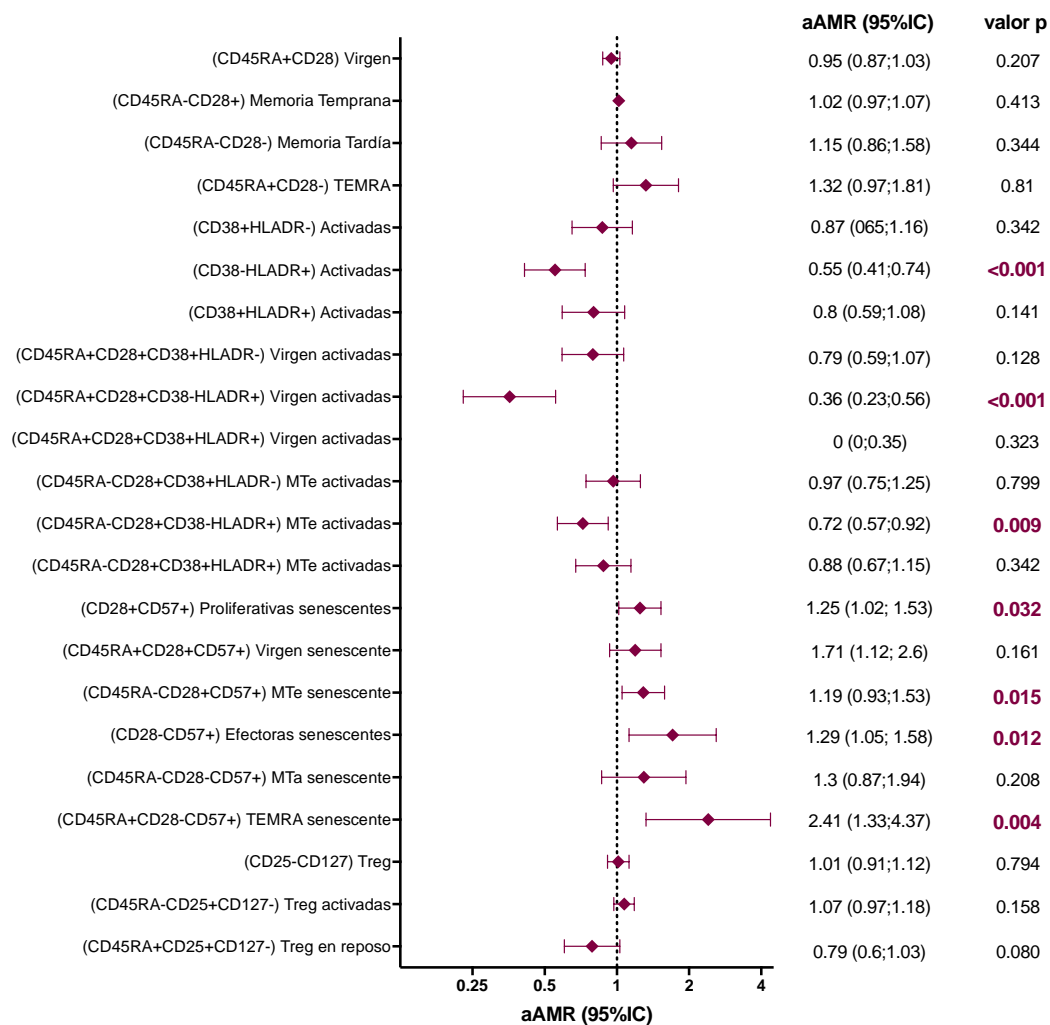


Figura 42. Asociación del grado de rigidez hepática con las subpoblaciones de células T CD4+. Se muestran los valores de las medias aritméticas ajustadas (aAMR), junto al límite inferior y superior con el 95% de intervalo de confianza (IC) obtenidos mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p: (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

2.3. Caracterización fenotípica de las células T CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática

Cuando se estratificaron los pacientes coinfectados VIH/VHC por el estadio de rigidez hepática, se observó una inversión o ‘switching’ en la distribución de las subpoblaciones en los pacientes con F4.3 (>40kPa). En las células T CD4+ TEMRA (CD45RA+CD28-), se observó un descenso a medida que aumentaba el estadio de fibrosis, hasta que se superó los 40kPa, produciéndose un aumento significativo respecto a los otros 3 estadios de fibrosis/cirrosis previos [(vs. F0-F3 (p=0,017); F4.1 (p=0,011); F4.2 (p=0,02)]. Sin embargo, las células T CD4+ memoria temprana (CD45RA-CD28+) presentaron una relación positiva con el aumento de la rigidez hepática (F0-F3 vs. F4.2, p=0,033), hasta que se superaron los 40kPa, produciéndose una caída del porcentaje de células CD45RA-CD28+ (F4.2 vs. F4.3, p=0,014). En las células T CD4+ memoria tardía (CD45RA-CD28-), se observó un incremento de la frecuencia de esta

subpoblación a medida que aumentaba la rigidez hepática en los pacientes cirróticos (F4.1 vs. F4.3, $p=0,026$). Al analizar estos resultados es importante tener en cuenta los porcentajes bajos de esta subpoblación y de las células TEMRA (CD45RA+CD28-) (**Figura 43**).

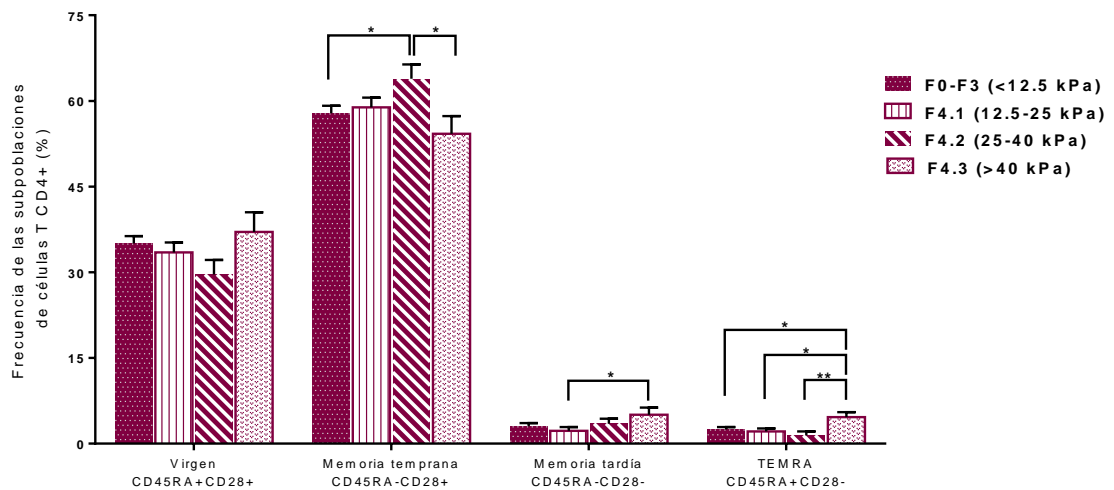


Figura 43: Diferenciación fenotípica de las subpoblaciones de las células T CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. Distribución de las células T CD4+ en subpoblaciones definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD28 respecto al total de células T CD4+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$.

En relación al nivel de activación de las células T CD4+ expresado por los niveles de células CD38+HLADR-, se observó una disminución en los primeros estadios de la cirrosis, para después aumentar significativamente en los pacientes con $>40\text{kPa}$ (F4.1 vs. F4.3, $p=0,010$). Sin embargo, se encontraron valores más bajos de células T CD4+ activadas CD38+HLADR+ en los pacientes con cirrosis [F0-F3 (3,68%) vs. F4.1 (1,46%), $p<0,001$; vs. F4.2 (1,01%), $p<0,001$; vs. F4.3 (1,5%), $p<0,001$]. Aunque las células T CD4+ activadas dobles positivas (CD38+HLADR+) presentaron el mismo patrón, los valores que se obtuvieron en los sujetos F4.3 (1,72%) fueron superiores a los obtenidos en los otros estadios, siendo significativos frente a los grupos cirróticos F4.1 (0,76%; $p=0,002$) y F4.2 (0,60%; $p=0,001$). A su vez, el descenso observado con el progreso de la fibrosis entre los pacientes no cirróticos F0-F3 respecto a los primeros estadios de cirrosis F4.1 y F4.2, fueron significativos ($p=0,002$ y $p=0,003$, respectivamente (**Figura 44A**)).

El análisis sobre la activación de las subpoblaciones de células T CD4+ virgen (CD45RA+CD28+) y memoria temprana (CD45RA-CD28+), mostró el mismo patrón de expresión que el observado en las células T CD4+ totales activadas. En las células T CD4+CD45RA+CD28+, se observó una pérdida significativa de la expresión de HLADR, incluso en ausencia de células dobles positivas (F4.1, F4.2 y F4.3). Sin embargo, en las células CD4+CD45RA-CD28+, la re-expresión de HLADR en el último estadio de fibrosis F4.3 ($>40\text{kPa}$) fue más alta en las células CD38+HLADR+ y CD38+HLADR+ que en las células CD38+HLADR- (**Figura 44B**).

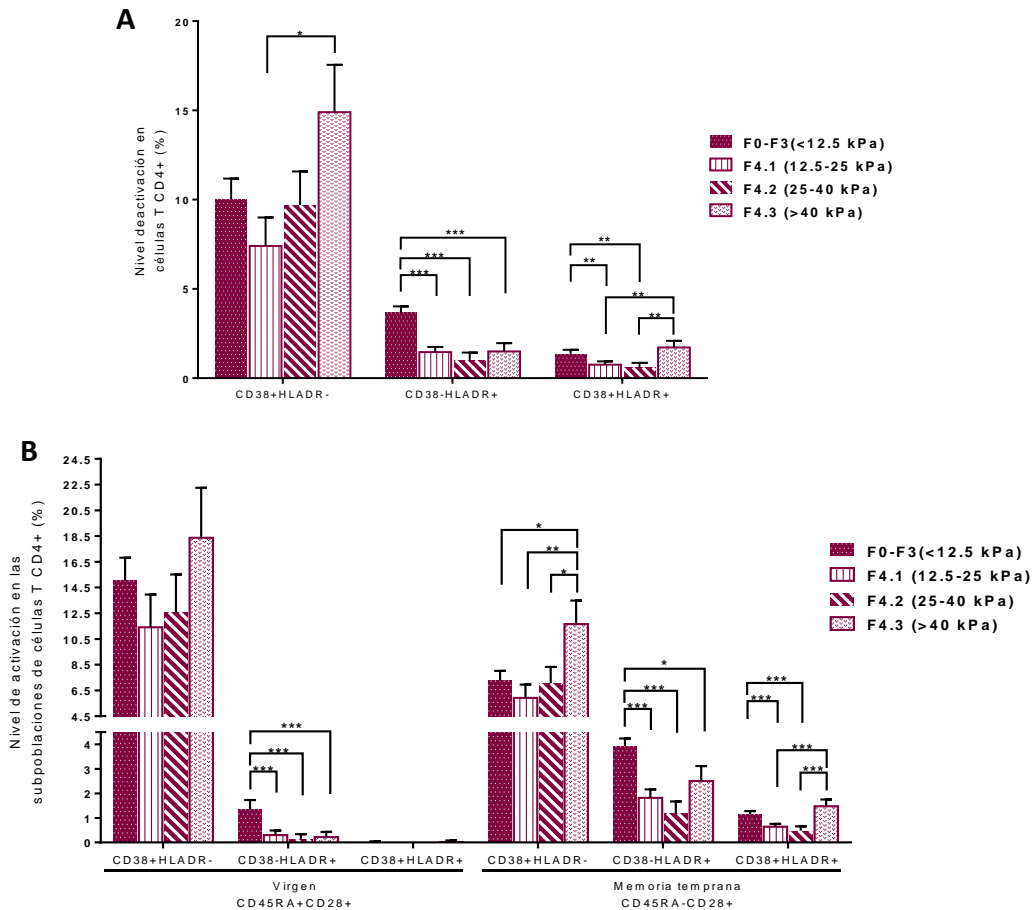


Figura 44: Niveles de activación de las células T CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. (A) Porcentajes de células T CD4+ activadas por la expresión o coexpresión de los marcadores HLADR y CD38. **(B)** Porcentaje de células T activadas en las subpoblaciones virgen y memoria temprana de las células T CD4+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

El fenotipo senescente CD57+ en todas las subpoblaciones estudiadas estuvo asociado directamente con el progreso de la enfermedad hepática en los diferentes estadios, excepto en las células T CD4+ de memoria tardía (CD45RA-CD28-), donde se observó una disminución en los pacientes >40kPa. Este incremento fue más marcado a partir de valores de cirrosis F4.2, con diferencias significativas con respecto a los pacientes F0-F3 y F4.1 en las células T CD4+ MTE ($p=0,038$ y $p=0,023$, respectivamente), y en las células TCD8+ diferenciadas CD28-CD57+ ($p=0,014$ y $p=0,011$, respectivamente), específicamente dentro de las células T CD8+ MTa ($p=0,012$ y $p=0,008$, respectivamente). Además, debe tenerse en cuenta que la variabilidad observada en las subpoblaciones efectoras senescentes entre los pacientes de cada grupo (Figura 45).

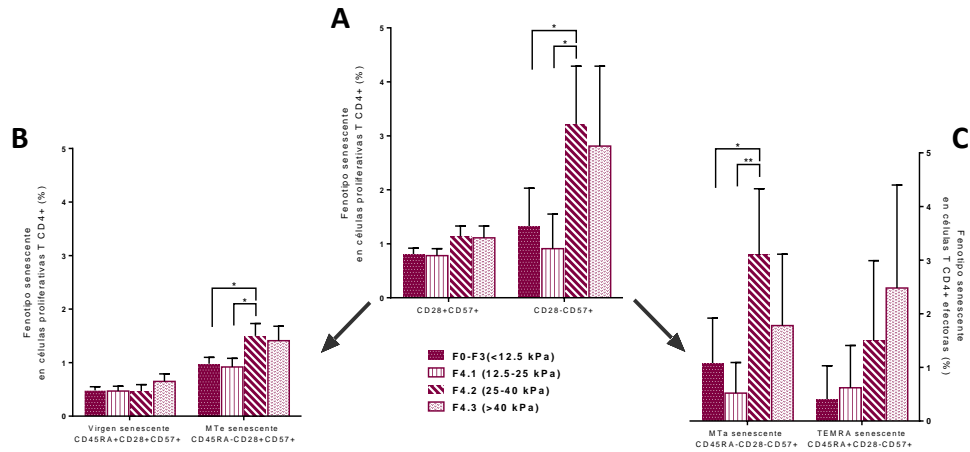


Figura 45: Fenotipo senescente de las células T CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. (A) Porcentajes de células T CD4+ que expresan CD57+ asociado a senescencia junto a CD28. **(B)** Fenotipo senescente en las células virgen y memoria temprana (CD28+) T CD4+. **(C)** Fenotipo senescente en las células memoria temprana y memoria efectora terminal (CD28-) T CD4+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$.

Las células inmunosupresoras CD4+Treg (CD25+CD127-) presentaron valores similares entre los pacientes con fibrosis <25kPa; mientras que los pacientes en el estadio F4.2 mostraron valores significativamente más bajos que los pacientes con F0-F3 ($p=0,040$) y F4.3 ($p=0,017$) (Figura 46A). Sin embargo, la frecuencia de células CD4+ Treg activadas (CD25+CD127-CD45RA-) fue mayor en los pacientes F4.3 (<40kPa) que en los pacientes con F0-F3 ($p=0,016$), F4.1 ($p=0,027$) y F4.2 ($p<0,001$). Además, los pacientes en el estadio F4.2 mostraron valores significativamente más bajos que los pacientes con F0-F3 ($p=0,040$) y F4.1 ($p=0,041$). En las células CD4+ Treg en reposo (CD25+CD127-CD45RA+) se observó un descenso a medida que aumentaba el estadio de rigidez hepática, con resultados significativos entre los pacientes con estadio F0-F3 y F4.2 ($p=0,042$) (Figura 46B).

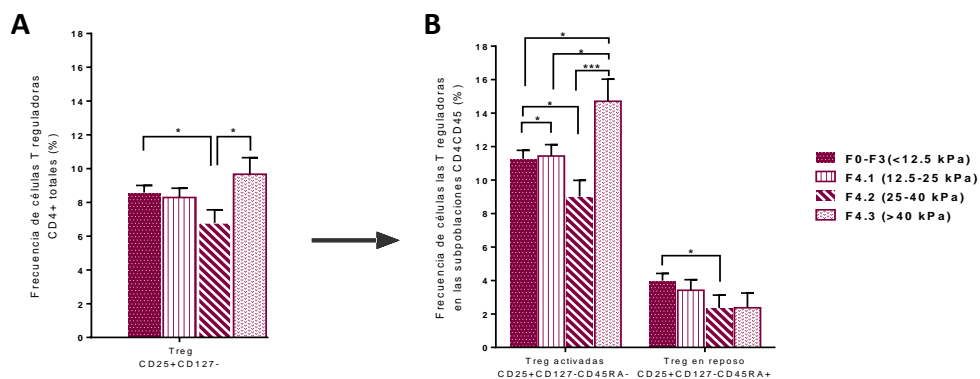


Figura 46: Niveles de células T reguladoras CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. (A) Frecuencia de células T reguladoras en las células CD4+ totales definidas como CD25+CD127-. **(B)** Porcentaje de células T reguladoras en las subpoblaciones CD4+CD45RA+ (Treg en reposo) y CD4+CD45RA- (Treg activadas). Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

Por lo tanto, a medida que aumenta el estadio de rigidez hepática, especialmente en los sujetos con más de 40kPa, los pacientes coinfectados VIH/VHC tienden a acumular en sangre periférica células T CD4+ activadas, efectoras con fenotipo senescente, sobre todo las de células de memoria en fase terminal que re-expresan CD45RA, y células Treg activadas.

2.4. Variación de las subpoblaciones de células T CD4+, en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificadas por estadio de fibrosis, respecto a los controles sanos y pacientes mono infectados VIH

La **Figura 47** muestra, de forma resumida y global, la variación de las subpoblaciones celulares T CD4+ estimadas de los pacientes coinfectados VIH/VHC, estratificados según el estadio e fibrosis, con respecto a cada grupo control, sanos y pacientes mono infectados VIH.

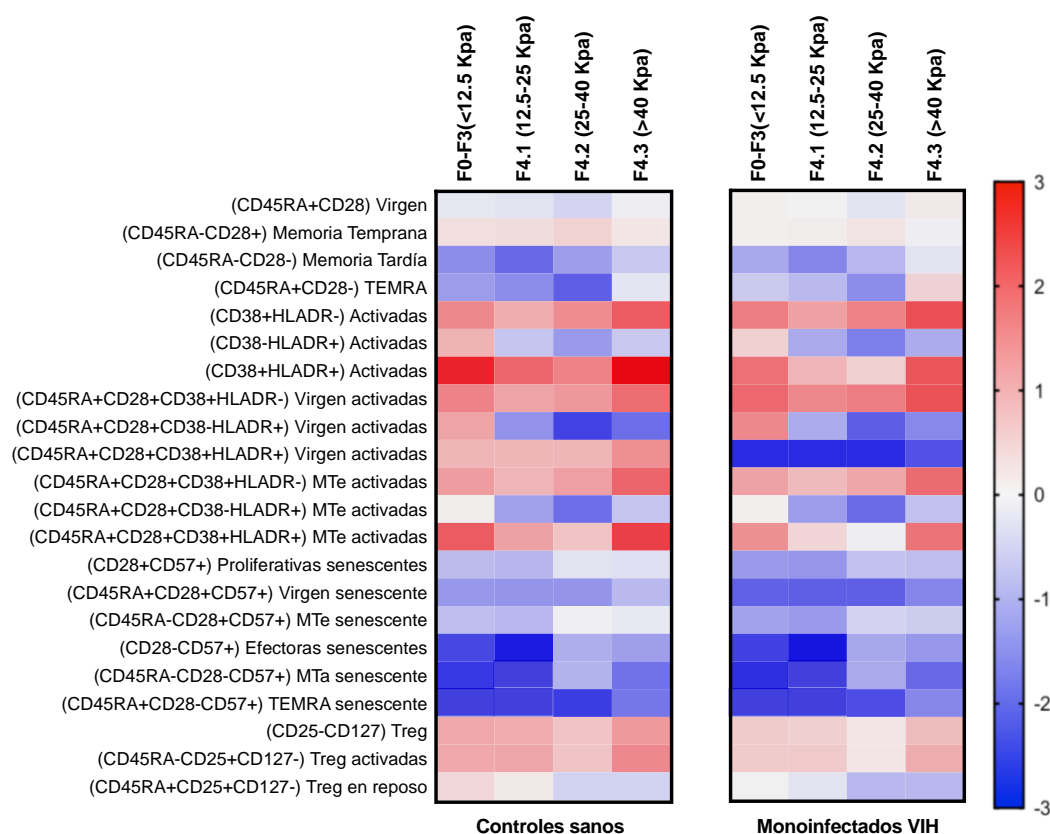


Figura 47. Mapa de color de los niveles estimados de subpoblaciones de células T CD4+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC, estratificados según el estadio de fibrosis, con respecto al grupo control sano y al grupo mono infectados VIH. ($M = \log_2(B/A) = x \log_2\text{-fold-change} = 2^x \text{fold-change}$). Un incremento (fold-change) positivo indica que el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC tiene valores mayores que el grupo control correspondiente, grupo control o mono infectados VIH; y viceversa.

Por un lado, los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más bajos (azul) que el grupo control sano y el grupo mono infectados VIH en relación a las células T CD4+ efectoras en estadios avanzados de maduración (MTa y TEMRA), y a todas las subpoblaciones con fenotipo senescente CD57+, pero esta diferencia se diluyó a medida que aumentaba el estadio de cirrosis en los pacientes coinfectados VIH/VHC. Sin embargo, estos valores nunca llegaron a

ser superiores a los valores encontrados en los dos grupos de control, sano y mono infectados VIH (**Figura 47**). Por otro lado, los valores de células T CD4+ activadas y células CD4+ Tregs en los pacientes coinfectados VIH/VHC estuvieron siempre por encima (rojo) de los valores encontrados en el grupo control sano y en el grupo mono infectados VIH; además, los valores de células T CD4+ activadas definidas por la expresión de CD38+ y células T CD4+ Tregs incrementaron a media que aumentaba el estadio de cirrosis. Sin embargo, la frecuencia de las células T CD4+ activadas definidas por la expresión de HLADR fue menor que en los controles, sanos y pacientes mono infectados VIH (**Figura 47**).

3. Valores estimados de subpoblaciones de células T CD8+

3.1. Caracterización fenotípica de las células T CD8+ en los diferentes grupos de estudio

En el **Anexo I** se encuentran los datos crudos de todas las subpoblaciones de células T CD8+, en cada uno de los tres grupos de estudio.

Al igual que en las células T CD4+, se analizaron las subpoblaciones de las células T CD8+ definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD28³⁸⁶ en los tres grupos de estudio. En este caso, las células T CD8+ MTe (CD45RA-CD28+) fueron más frecuentes en los pacientes coinfectados VIH/VHC (30,47%) que en los grupos control sano (23,25%) y en los pacientes mono infectados VIH (25,48%), con diferencias significativas ($p=0,00$ y $p=0,017$, respectivamente). En la subpoblación T CD8+ MTa (CD45RA-CD28-), los valores mayores se observaron en los pacientes mono infectados VIH (18,69%) con respecto a los pacientes coinfectados VIH/VHC (14,9%, $p=0,024$) y a los controles sanos (10,59%, $p=0,001$); y a su vez, los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores de esta subpoblación T CD8+ MTa (CD45RA-CD28-) significativamente más altos que los controles sanos ($p=0,036$). Los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más bajos de células TEMRA (CD45RA+CD28-) (23,44%) que en los controles sanos (32,17%) y pacientes mono infectados VIH (29,26%) ($p=0,002$ y $p=0,010$, respectivamente) (**Figura 48**). Estos resultados claramente indican que la infección VIH/VHC conduce a una mayor presencia de células T CD8+ MTe y a una pérdida de células T CD8+ MTa.

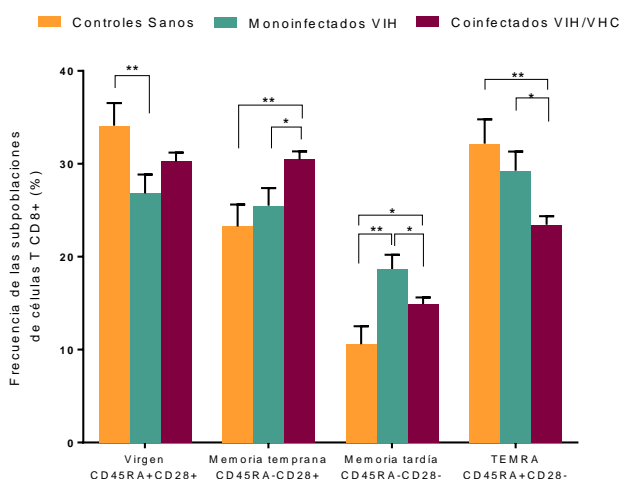


Figura 48: Identificación de las subpoblaciones de las células T CD8+ en los distintos grupos de estudio.

Distribución de las células T CD8+ en subpoblaciones definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD28 respecto al total de células T CD8. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$.

En cuanto a los niveles de activación en las células T CD8+ evaluado por la expresión de los co-receptores CD38 y HLADR, los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron un marcado incremento de células CD8+CD38+HLADR-, respecto a los controles sanos (13,4% vs. 6,42%; $p=0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH (13,4% vs. 8,4%; $p=0,004$); mientras que la expresión de HLADR en las células T CD8+ se vio afectada por la coinfección VIH/VHC, presentando dichos pacientes menor frecuencia de células T CD8+CD38-HLADR+ respecto a los pacientes mono infectados VIH (2,1% vs. 4,52%; $p<0,001$) y a los controles sanos (2,1% vs. 4,41%; $p=0,008$). Sin embargo, se observó un incremento en la coexpresión, CD38+HLADR+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC, pero solamente fue significativo respecto a los controles sanos (2,15% vs. 1,11%; $p=0,030$) (**Figura 49A**).

Al analizar la distribución de los niveles de activación en las subpoblaciones T CD8+ que expresan CD28 con una función citotóxica íntegra, se observaron valores similares de activación en células virgen (CD8+CD45RA+CD28+) de los tres grupos de estudio. En cuanto a las células CD8+ MTe (CD45RA-CD28+), se observó un aumento significativo en la frecuencia de las células CD38+HLADR- en los pacientes coinfectados VIH/VHC (10,62%) respecto a los controles sanos (3,85%, $p<0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH (6,47%, $p=0,007$). Sin embargo, en las células CD38-HLADR+ la tendencia fue inversa, con un fuerte descenso en los pacientes coinfectados VIH/VHC (2,19%) frente a los controles sanos (6,34%, $p<0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH (5,78%, $p<0,001$). En las células dobles positivas CD8+CD38+HLADR+ no hubo apenas variaciones entre los tres grupos de estudio (**Figura 49B**). En conclusión, los pacientes coinfectados VIH/VHC tienen valores más elevados de CD38 asociado a la maduración de las células CTL.

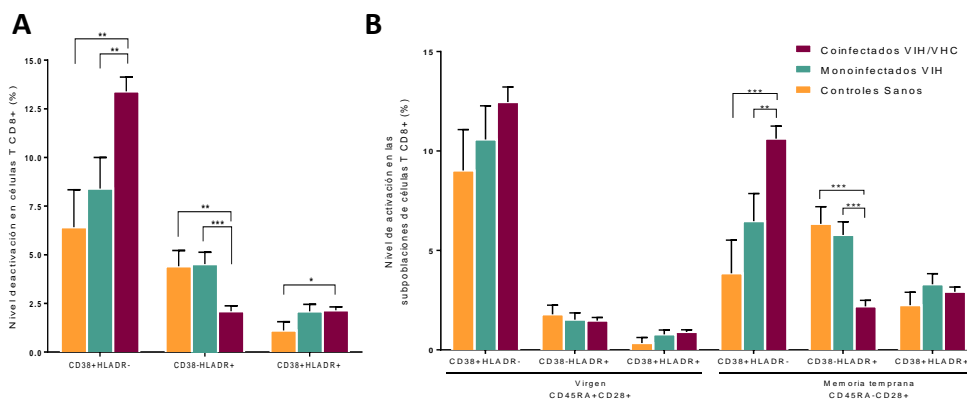


Figura 49: Niveles de activación de las células T CD8+ en los tres grupos de estudio. (A) Frecuencia de células activadas T CD8+ definidas por la expresión o coexpresión de los marcadores HLADR y CD38. **(B)** Niveles de activación en las subpoblaciones virgen y memoria temprana de las células T CD8+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***), $p<0,001$.

La diferenciación de las células T CD8+ con la pérdida de los marcadores de superficie CD45RA y CD28 corresponde al deterioro y/o la pérdida de las funciones citotóxicas, que va acompañado de la expresión de nuevos marcadores como CD57 o PD-1, que indican senescencia y/o agotamiento celular o la re-expresión de CD45RA como estado de fase terminal³⁸⁹. En líneas

generales, los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron una disminución de la expresión de CD57 en todas las células T CD8+ respecto a ambos grupos control. Dicha variación fue significativa para las células CD8+CD28+CD57+ ($p=0,027$) y CD8+CD28-CD57+ ($p=0,019$) de los pacientes coinfectados VIH/VHC frente a los pacientes mono infectados VIH (**Figura 50A**). Como era de esperar, se observaron valores bajos de frecuencias dentro de las células T CD8+ proliferativas CD28+, y solo se hallaron valores significativamente elevados de células T CD8+ virgen (CD45RA+CD28+) con fenotipo CD57+ en pacientes coinfectados VIH/VHC respecto a los controles sanos (1,27% vs. 2,92%, $p<0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH (1,27% vs. 2,44%, $p=0,001$) (**Figura 50B**). En cuanto a las células T CD8+ diferenciadas, sólo se obtuvieron diferencias significativas entre los pacientes coinfectados VIH/VHC y los mono infectados VIH (23,63% vs. 28,375%, $p=0,008$) (**Figura 50C**). De esta forma, los datos mostrados claramente indican que la coinfección VIH/VHC está asociada a una disminución del fenotipo CD57+ en las células CTL.

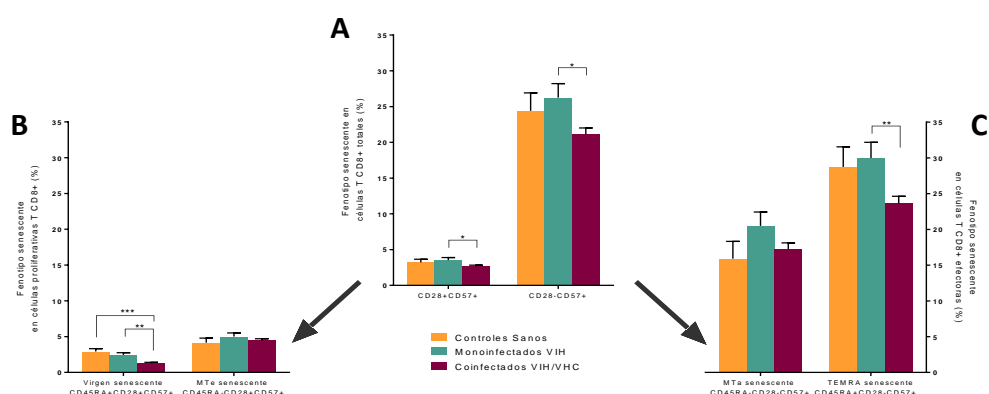


Figura 50: Frecuencia de marcadores de senescencia en las células T CD8+ totales y en sus subpoblaciones. (A) Fenotipo senescente en las células T CD8+ totales definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD28 y CD57. **(B)** Fenotipo senescente en las células virgen y memoria temprana (CD28+) T CD8+. **(C)** Fenotipo senescente en las células memoria temprana y memoria efectora terminal (CD28-) T CD8+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

3.2. Asociación de los valores de rigidez hepática y las subpoblaciones de células T CD8+

En este caso, se muestra el análisis de asociación de las subpoblaciones celulares T CD8+ y los valores de rigidez hepática (como variable continua) en los pacientes coinfectados VIH/VHC (**Figura 51**). Se encontró una asociación inversa y significativa de los valores de rigidez hepática con las células T CD8+ MTe (CD45RA-CD28+) ($aAMR=0,9$; $p=0,019$). Así, a pesar de que los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron mayor frecuencia de células T CD8+ MTe (CD45RA-CD28+) que los dos grupos control, en este análisis se observó una asociación inversa con la fibrosis, de modo que a mayor fibrosis hepática menor porcentaje de células T CD8+ MTe. Por otro lado, las células T CD8+ TEMRA (CD45RA+CD28-) presentaron una asociación directa y significativa con el progreso de la rigidez hepática ($aARM=1,16$; $p=0,012$), al igual que las subpoblaciones T CD8+ activadas definidas por el marcador CD38+ [CD8+CD38+HLADR-

(aARM=1,24; $p=0,017$) y CD8+CD45RA-CD28+CD38+HLADR- (aAMR=1,33; $p=0,009$)] (Figura 51). Los resultados indican que, a mayor fibrosis hepática, mayor porcentaje de células en estadios de memoria avanzados y mayores niveles de activación por expresión de CD38+.

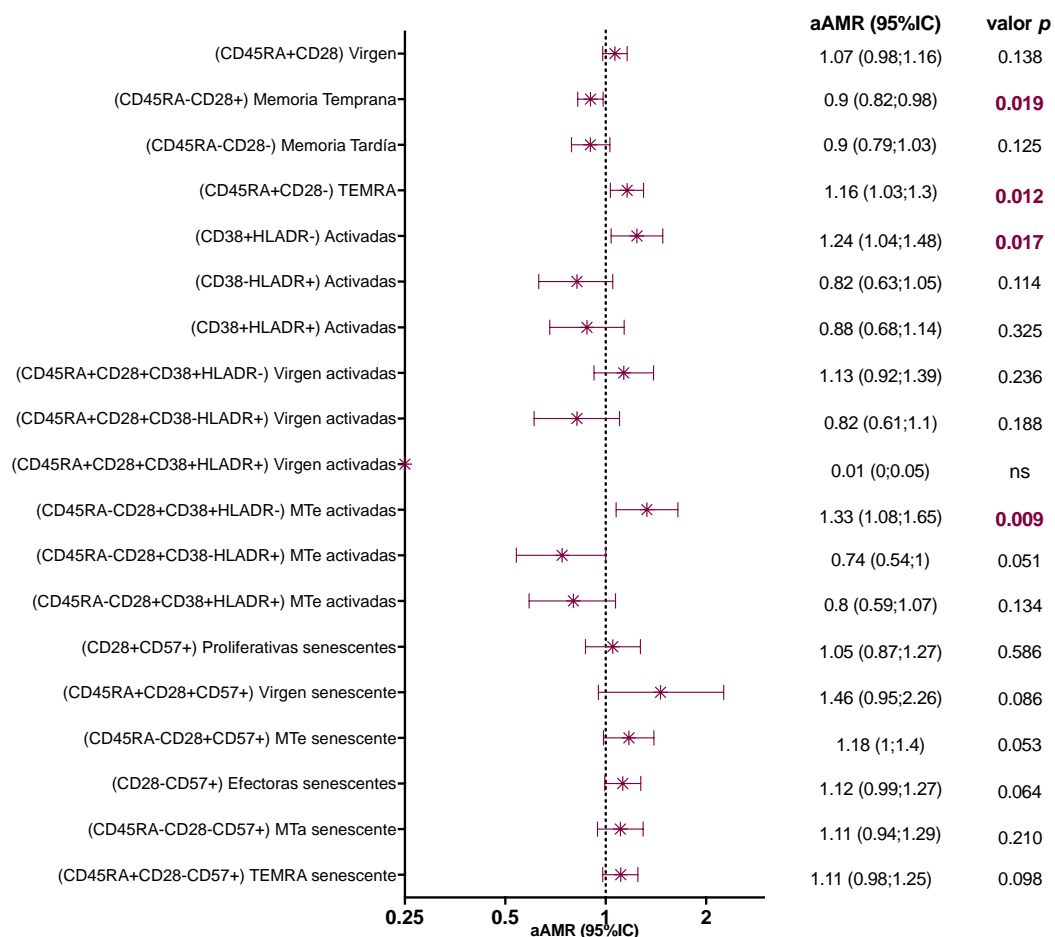


Figura 51. Asociación del grado de rigidez hepática con las subpoblaciones de células T CD8+. Se muestran los valores de las medias aritméticas ajustadas (aAMR), junto al límite inferior y superior con el 95% de intervalo de confianza (IC) obtenidos mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

3.3. Caracterización fenotípica de las células T CD8+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática

En esta ocasión, se observaron valores más bajos de las células T CD8+ MTe (CD45RA-CD28+) en los pacientes coinfectados VIH/VHC con valores >40 kPa con respecto a los pacientes con estadio F0-F3 ($p=0,029$). Sin embargo, en el caso de las células TCD8+ TEMRA (CD45RA+CD28-), su porcentaje en sangre periférica aumento e forma progresiva con el progreso de la fibrosis hepática [F0-F3 vs. F4.3 ($p=0,012$) y F4.1 vs. F4.3 ($p=0,012$)] (Figura 52).

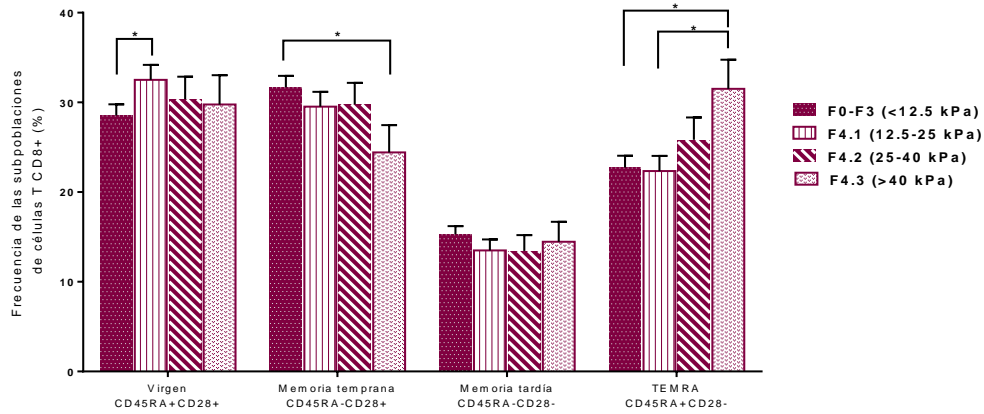


Figura 52: Diferenciación fenotípica de las subpoblaciones de las células T CD8+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. Distribución de las células T CD8+ en subpoblaciones definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD45RA y CD28 respecto a las células T CD8+ totales. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$.

En el análisis de los niveles de activación de las células T CD8+, expresado como la frecuencia de células CD38+HLADR-, se observaron valores similares de esta subpoblación en los pacientes con <40kPa, con un incremento significativo en los pacientes coinfectados F4.3 (21,52%) vs. [F0-F3 (11,93%), $p=0,001$; vs. F4.1 (12,57%), $p=0,002$; vs. F4.2 (11,96%), $p=0,004$]. La expresión del marcador HLADR fue muy baja en todos los estadios de fibrosis, con un descenso ligero a medida que aumentaba el estadio de fibrosis, desde 2,17%, 1,79%, 1,15% y 1,12%, respectivamente; siendo significativo entre los pacientes F0-F3 y F4.2 ($p=0,036$). Las células T CD8+ dobles positivas (CD38+HLADR+) también presentaron reducidos porcentajes, pero se observó una bajada significativa entre los pacientes F0-F3 (2,09%) y los pacientes con el primer estadio de cirrosis F4.1 (1,19%, $p=0,002$); que se revirtió con el incremento de la rigidez hepática, alcanzado los máximos valores en los pacientes con >40kPa (2,4%), significativamente respecto a los pacientes F4.1 ($p=0,013$) (Figura 53A).

El relación a la activación de las células T CD8+ virgen (CD45RA+CD28+), se observaron valores más bajos de CD38+HLADR+ con el aumento de la fibrosis hepática, respecto a los pacientes no cirróticos F0-F3 [vs. F4.1, $p < 0,001$; vs. F4.2, $p=0,042$; vs. F4.3, $p=0,008$]. Por el contrario, se observó un aumento de células T CD8+ virgen con fenotipo CD38+HLADR- con el aumento de la rigidez hepática [F0-F3 vs. F4.3 ($p=0,033$) y F4.1 vs. F4.3 ($p=0,012$)]. Por otro lado, las células T CD8+ MTe (CD45RA-CD28+) con fenotipo CD38+HLADR- presentan la misma frecuencia en los pacientes con <40kPa, pero fue más elevado en aquellos con valores >40kPa (19,59%) vs. [F0-F3 (9,13%), $p < 0,001$; vs. F4.1 (10,38%), $p=0,001$; vs. F4.2 (8,77%), $p=0,001$]. En las células T CD8+ MTe con fenotipo CD38+HLADR+ se observó una ligera disminución con el aumento de la rigidez hepática, al igual que en las células con fenotipo CD38+HLADR+, pero en éstas últimas, se observó un marcado incremento en los pacientes con F4.3 (3,91%) respecto a los pacientes F0-F3 (2,32%, $p=0,035$), F4.1 (1,56%, $p=0,001$) y F4.2 (1,18%, $p < 0,001$) (Figura 53B).

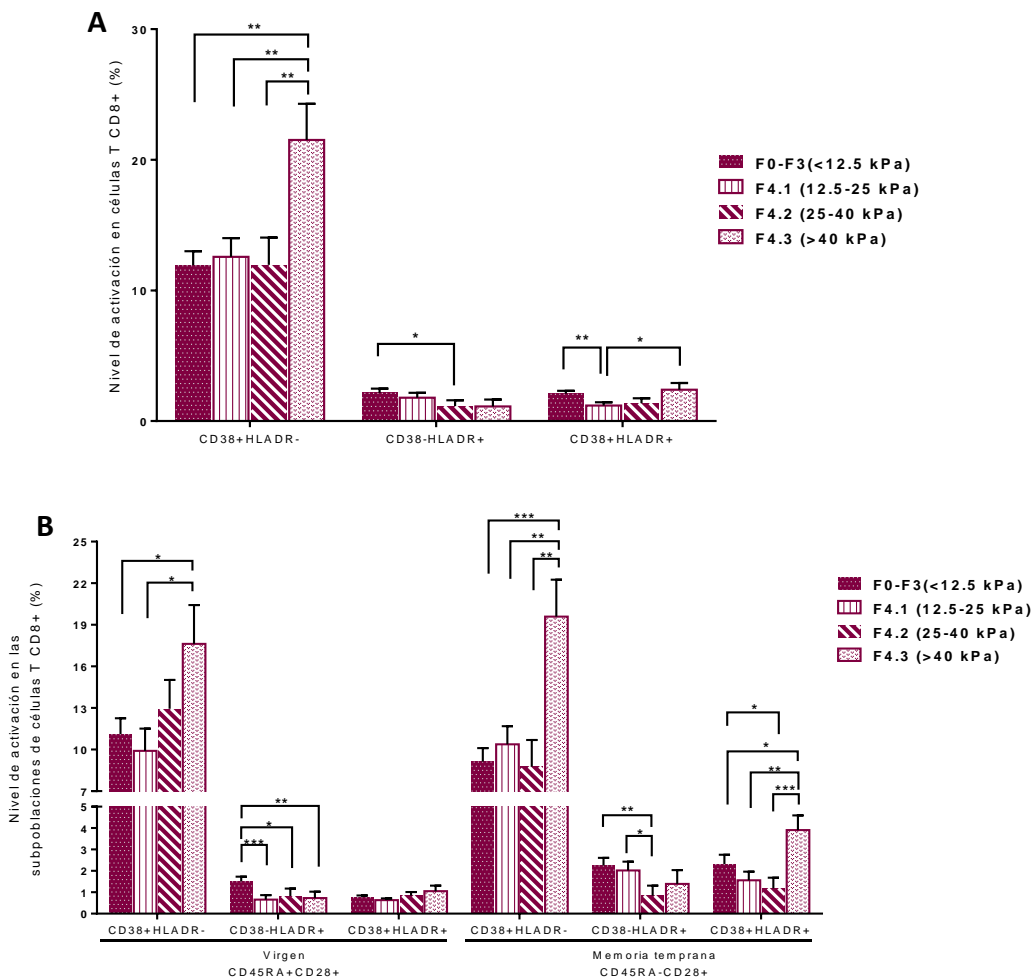


Figura 53: Niveles de activación de las células T CD8+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. (A) Porcentajes de células T CD8+ activadas por la expresión y/o coexpresión de los marcadores HLADR y CD38. **(B)** Porcentaje de células T activadas en las subpoblaciones virgen y memoria temprana de las células T CD8+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

El fenotipo senescente en todas las subpoblaciones estudiadas estuvo asociado directamente con el incremento de la rigidez hepática, con significativos incrementos en las células T CD8+ diferenciadas que han perdido la expresión de CD28, especialmente en los pacientes con $>40\text{kPa}$, respecto a los estadios F0-F3 y F4.1 ($p=0,008$ y $p=0,004$, respectivamente). Este mismo patrón de distribución se observó tanto en las células T CD8+ MTa (CD45RA-CD28-) ($p=0,014$ y $p=0,006$) como en las TEMRA (CD45RA+CD28-) ($p=0,024$ y $p=0,007$), presentando éstas últimas los mayores valores de porcentajes. También se observó un aumento significativo de células T CD8+ virgen (CD45RA+CD28+) con fenotipo CD57+ en los pacientes F4.2 con respecto a los pacientes F0-F3 ($p < 0,001$) y F4.1 ($p < 0,01$) (Figura 54).

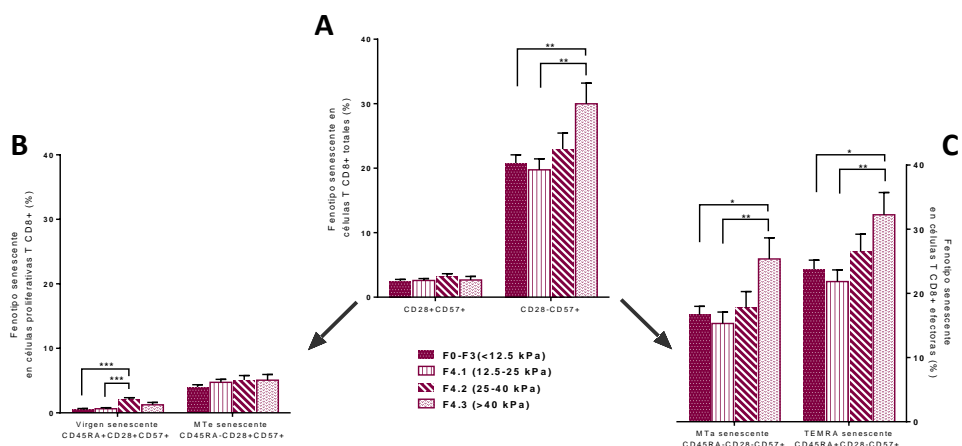


Figura 54: Fenotipo senescente de las células T CD8+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. (A) Porcentajes de células T CD8+ que expresan CD57+ asociado a senescencia junto a CD28. **(B)** Fenotipo senescente en las células vírgen y memoria temprana (CD28+) T CD8+. **(C)** Fenotipo senescente en las células memoria temprana y memoria efectora terminal (CD28-) T CD8+. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

3.4. Variación de las subpoblaciones de células T CD8+, estratificadas por estadios de fibrosis en los pacientes coinfectados VIH/VHC, respecto a los controles sanos y pacientes mono infectados VIH

La **Figura 55** muestra, de forma resumida y global, la variación de las subpoblaciones celulares T CD8+ de los pacientes coinfectados VIH/VHC, estratificados según el estadio de fibrosis, con respecto a cada grupo control, sanos y pacientes mono infectados VIH.

Los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores de células T CD8+ efectoras en estadios avanzados de maduración (TEMRA) inferiores y/o similares (azul-blanco) a los valores encontrados en el grupo control sano y en los pacientes mono infectados VIH; así como menor frecuencia de células T CD8+ vírgen respecto a los controles sanos y de células memoria tardía respecto a los pacientes mono infectados VIH. El fenotipo senescente CD57+ en todas las subpoblaciones estudiadas fue menor en los pacientes coinfectados VIH/VHC que en los controles, sanos y pacientes mono infectados VIH. Destacar que se observó un incremento de estas subpoblaciones T CD8+ a medida que aumentaba el estadio de cirrosis, pero nunca llegaron a ser superiores a los valores encontrados en los dos grupos control, excepto en las células T CD8+ senescentes de memoria temprana y memoria tardía, que fue similar y/o ligeramente mayor (**Figura 55**).

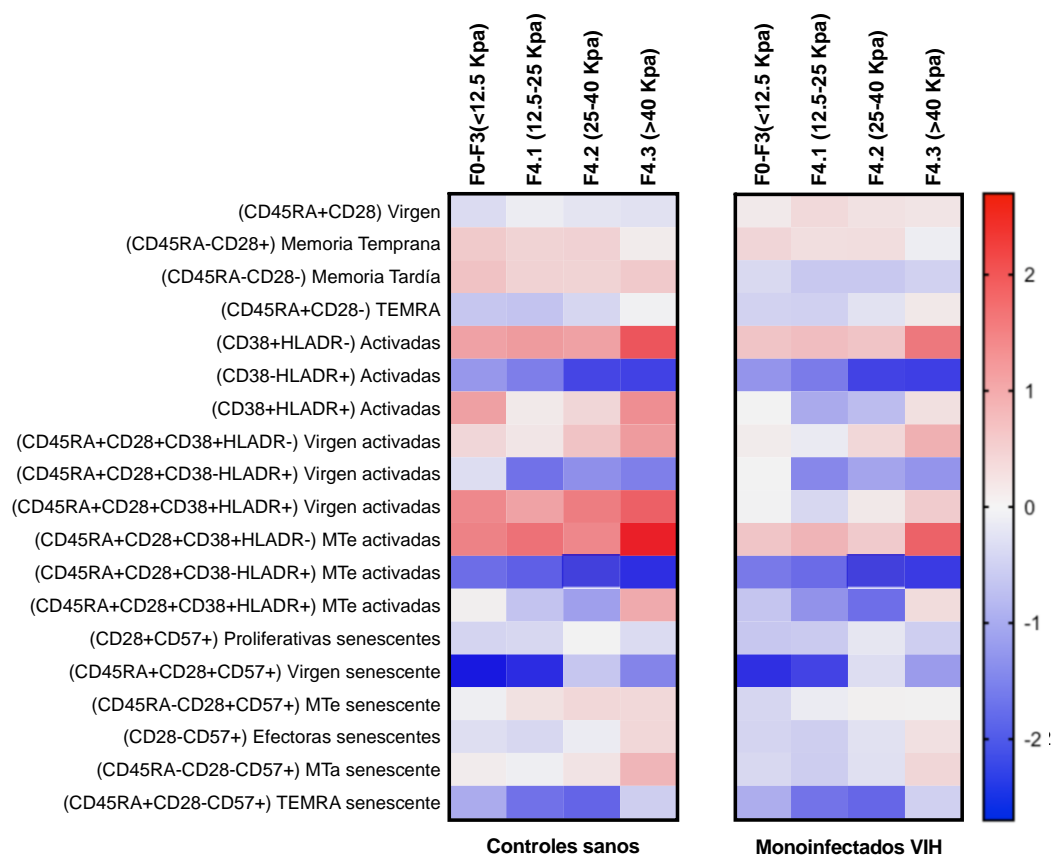


Figura 55. Mapa de color de los niveles estimados de subpoblaciones de células T CD8+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC, estratificados según el estadio de fibrosis, con respecto al grupo control sano y al grupo monoinfectados VIH. ($M = \log_2 (B/A) = x \log_2\text{-fold-change} = 2^x \text{ fold-change}$). Un incremento (fold-change) positivo indica que el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC tiene valores mayores que el grupo control correspondiente, grupo control o monoinfectados VIH; y viceversa.

Además, los valores de células T CD8+ activadas definidas por la expresión de CD38+ estuvieron siempre por encima (rojo) de los valores encontrados en el grupo control sano y en los pacientes monoinfectados VIH. Estos valores aumentaron a medida que aumentaba el estadio de cirrosis. Sin embargo, las células T CD8+ que expresan CD38-HLADR+ disminuyeron a medida que aumentaba la rigidez hepática, excepto en las células T CD8+ dobles positivas (CD38+HLADR+), cuyos valores aumentaban a medida que aumentaba el estadio de cirrosis (Figura 55).

4. Valores estimados de los biomarcadores plasmáticos

4.1. Evaluación de los niveles plasmáticos de translocación bacteriana, riesgo cardiovascular, inflamación y citoquinas relacionadas con respuesta Th1/Th2/Th17 en los diferentes grupos de estudio

En el **Anexo I** se encuentran los datos crudos, de todos los marcadores plasmáticos, en cada uno de los tres grupos de estudio.

En el análisis de los biomarcadores de translocación bacteriana, se observó que los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron valores plasmáticos más elevados de sCD14 que en

los grupos control, siendo significativo respecto a los controles sanos (6,62ng/mL vs. 3,82ng/mL, $p<0,001$). El marcador FABP2 presentó valores significativamente mayores en los pacientes coinfectados VIH/VHC (1,16pg/mL) que en los controles sanos (0,56pg/mL, $p<0,001$) y los pacientes mono infectados VIH (0,88pg/mL, $p=0,047$); y a su vez la diferencia entre los valores en los dos grupos control ($p=0,042$). Sin embargo, los valores plasmáticos de LPS fueron estadísticamente más bajos en los pacientes coinfectados VIH/VHC (1,75UE/mL) que en ambos grupos control, controles sanos (9,68UE/mL, $p<0,001$) y pacientes mono infectados VIH (7,16UE/mL, $p<0,001$) (Figura 56).

En cuanto a los niveles de los marcadores de coagulación, Dímero-D e inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI, de sus siglas en inglés), los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron valores plasmáticos más elevados que en los controles sanos (72,68ng/mL vs. 42,74ng/mL, $p=0,005$ y 10,4ng/mL vs. 7,56ng/mL, $p=0,002$, respectivamente) y los pacientes mono infectados VIH (72,68ng/mL vs. 40,07ng/mL, $p<0,001$ y 10, ng/mL vs. 7,6 ng/mL, $p=0,001$, respectivamente) (Figura 56).

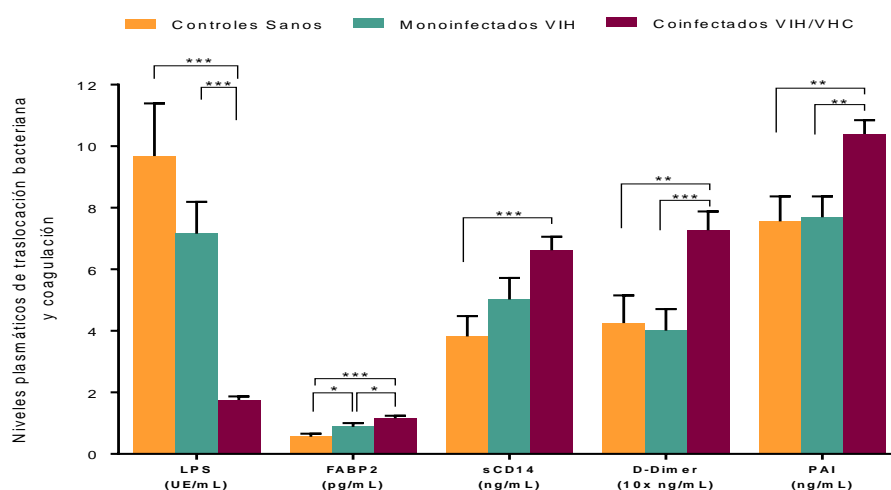


Figura 56. Valores plasmáticos estimados de los biomarcadores de translocación bacteriana y coagulación en cada uno de los tres grupos de estudio. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

En relación a los marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular, se observó que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 β , y TNF- α , así como de los marcadores de inflamación IP-10, MCP-1, sTNF-R1, sVCAM1 e sICAM1, que en los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH (Figura 57). Excepto del antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL-1RA), que presento valores similares en los tres grupos de estudio.

Los mayores incrementos en los pacientes coinfectados VIH/VHC se observaron en las citoquinas IL-8, con un valor de 9,19pg/mL respecto a 1,97pg/mL en los controles sanos ($p<0,001$) y 2,7pg/mL en los pacientes mono infectados VIH ($p<0,001$); IL-6, con un valor de 8,18pg/mL vs. 3,81pg/mL ($p<0,001$) y 8,18pg/mL vs. 3,38pg/mL ($p<0,001$), respectivamente; e IL-18, con un valor de 401,81pg/mL vs. 220,08pg/mL ($p<0,001$) y 401,82pg/mL vs. 188,89pg/ml

($p < 0,001$), respectivamente. Para IL-1 β el valor en los pacientes coinfectados VIH/VHC fue de 1,88pg/mL respecto a los controles sanos 1,08pg/mL ($p = 0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH 0,78pg/mL ($p < 0,001$); para TNF α el valor fue 3,42pg/mL vs. 2,2pg/mL ($p = 0,011$) y 3,42pg/mL vs. 2,22pg/mL ($p = 0,004$), respectivamente (**Figura 57**).

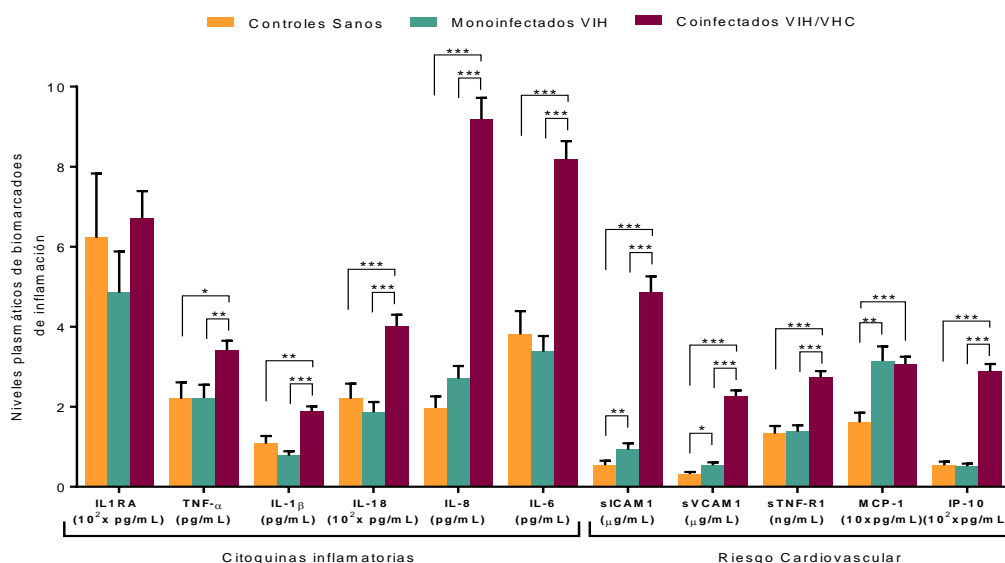


Figura 57. Valores plasmáticos estimados de los biomarcadores de inflamación y riesgo cardiovascular en cada uno de los tres grupos de estudio. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

En los marcadores inflamatorios relacionados con el riesgo cardiovascular, los mayores valores en los pacientes coinfectados VIH/VHC se observaron en la molécula de adhesión intracelular-1 soluble (sICAM-1, de sus siglas en inglés) 4863,2 μ g/mL respecto a los controles sanos 537,1 μ g/mL ($p < 0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH 925,5 μ g/mL ($p < 0,001$); seguido de la molécula de adhesión vascular-1 soluble (sVCAM-1, de sus siglas en inglés) [2269,1 μ g/mL vs. 319,4 μ g/mL ($p < 0,001$) y 2269,1 μ g/mL vs. 544,9 μ g/mL ($p < 0,001$), respectivamente]; la proteína 10 inductora de interferón- γ (IP-10, de sus siglas en inglés) [287,7pg/mL vs. 54,18pg/mL ($p < 0,001$) y 287,7pg/mL vs. 50,86pg/mL ($p < 0,001$), respectivamente]; el receptor soluble del factor de necrosis tumoral-1 (sTNF-R1, de sus siglas en inglés) 2,73ng/mL vs. 1,33ng/mL ($p < 0,001$) y 2,73ng/mL vs. 1,38ng/mL ($p < 0,001$), respectivamente. En el marcador de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1 de sus siglas en inglés) el incremento se observó en los pacientes coinfectados VIH/VHC respecto a los controles sanos (30,72pg/mL vs. 16,09pg/mL, $p < 0,001$) y en los pacientes mono infectados VIH respecto a los controles sanos (31,38pg/mL vs. 16,09pg/mL, $p = 0,001$) (**Figura 58**).

Respecto a los valores de citoquinas plasmáticas relacionadas con respuesta Th1/Th2/Th17, también se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IFN- γ (citoquina Th1) respecto a los controles sanos (30,18pg/mL vs. 10,22pg/mL, $p < 0,001$) y a los pacientes mono infectados VIH (30,18pg/mL vs. 6,64pg/mL, $p < 0,001$); y de las citoquinas Th2, IL-10 [1,83pg/mL vs. 1,06pg/mL, $p < 0,001$ y 1,83pg/mL vs. 1,22pg/mL, $p < 0,001$], e IL-4 [5,84pg/mL vs. 3,51pg/mL, $p = 0,002$ y 5,84pg/mL vs. 3,6pg/mL, $p = 0,001$], respectivamente. El heterodímero p70 de la interleucina 12 (IL-12p70, de sus siglas en

inglés) inductor de la respuesta Th1 también presento valores más elevados en los pacientes coinfectados VIH/VHC (3,22pg/mL) respecto a los controles sanos (2,34pg/mL, $p=0,039$) y a los pacientes mono infectados VIH (2,14pg/mL, $p=0,002$) (**Figura 59**).

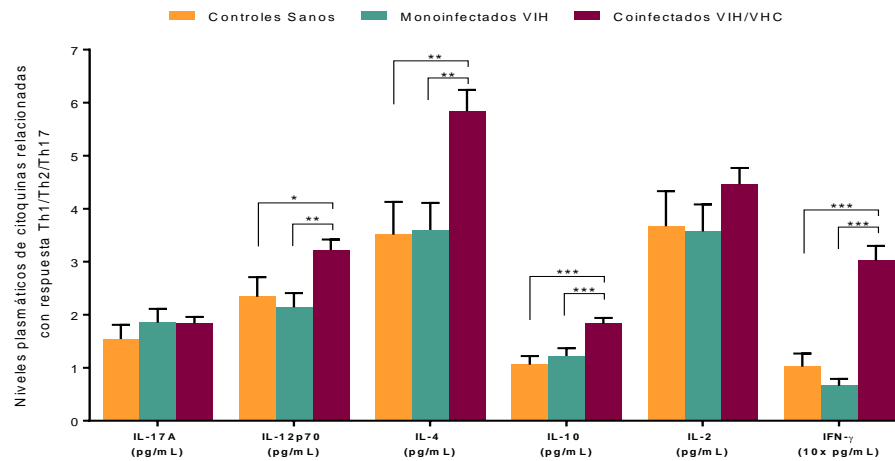


Figura 59. Valores plasmáticos estimados de las citoquinas relacionadas con la respuesta Th1/Th2/Th17 en cada uno de los tres grupos de estudio. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

En resumen, en el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC se encuentran elevados los marcadores plasmáticos de translocación bacteriana, inflamación, riesgo cardiovascular, y activación del sistema inmune. La excepción, fueron los valores de LPS, que sorprendentemente fueron más bajos en el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC.

4.2. Asociación de los valores de rigidez hepática y los niveles de los biomarcadores plasmáticos

Se analizó la asociación de los valores de rigidez hepática (como variable continua) y los valores de los biomarcadores plasmáticos en los pacientes coinfectados VIH/VHC (**Figura**). Se encontró una asociación directa y significativa de los valores de rigidez hepática con los valores plasmáticos de LPS (aAMR=1,18; $p=0,011$), Dímero-D (aAMR=1,68; $p<0,001$), IL-8 (aAMR=2; $p<0,001$), IL-6 (aAMR=1,2; $p=0,021$), sICAM-1 (aAMR=1,41; $p<0,001$), sVCAM-1 (aAMR=1,39; $p=0,016$), sTNF-R1 (aAMR=1,43; $p<0,001$), e IP-10 (aAMR=1,24; $p=0,021$) (**Figura 60**). Es decir, a mayor grado de fibrosis hepática se observó mayor translocación bacteriana, coagulación, inflamación y riesgo cardiovascular.

Por el contrario, se encontró una asociación inversa y significativa entre los valores de rigidez hepática y los valores de plasmáticos de TNF α (aAMR=0,67; $p<0,001$), IL-17A (aAMR=0,72; $p=0,002$), IL-10 (aARM=0,82; $p=0,011$), e IL-2 (aAMR=0,73; $p=0,003$) (**Figura 60**). Los resultados indican que, a mayor grado de fibrosis hepática, mayor disfunción inmune, debido a que estas citoquinas regulan la respuesta inmune Th1, Th2 y Th17.

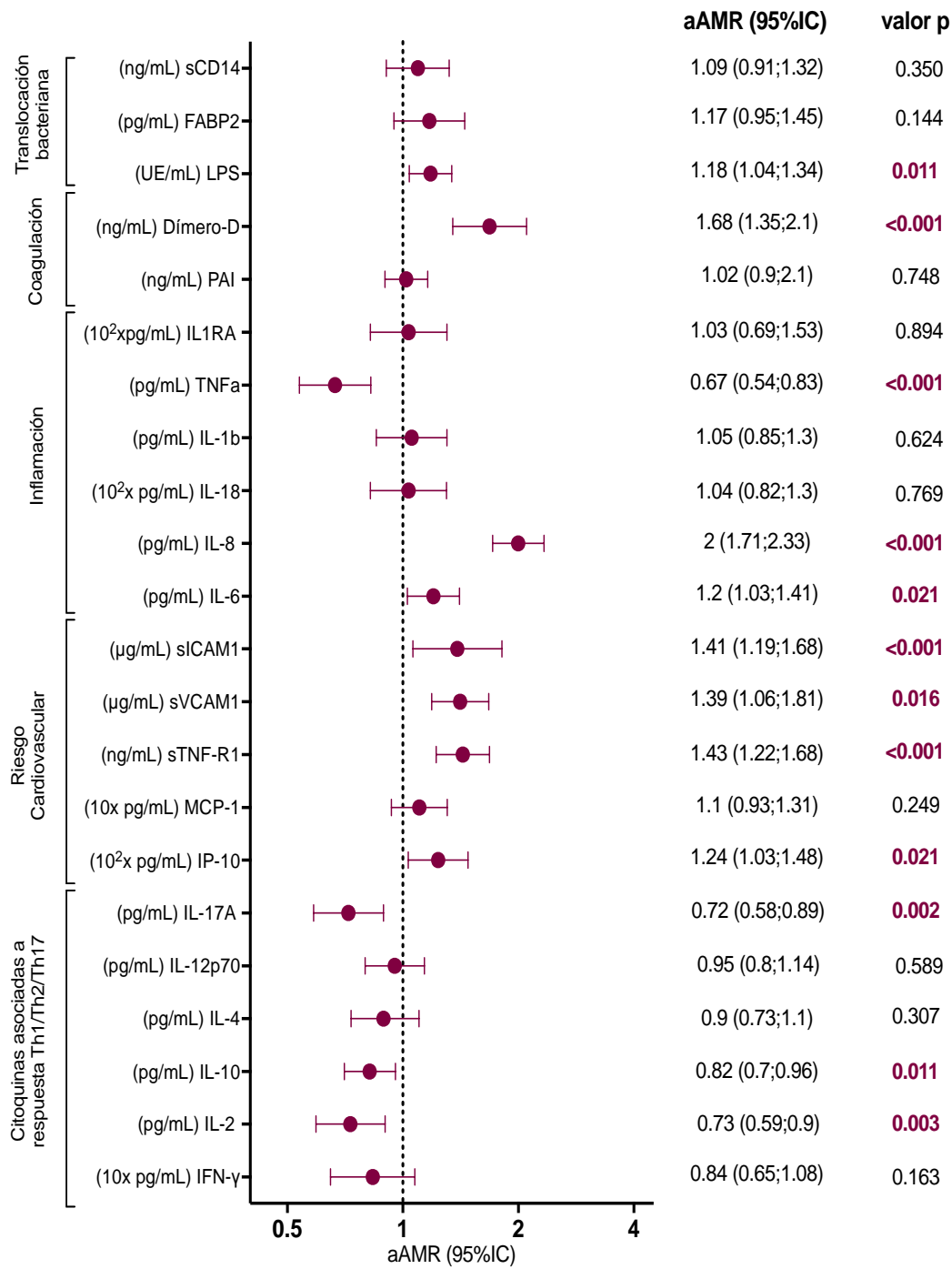


Figura 60. Asociación del grado de rigidez hepática con los biomarcadores plasmáticos. Se muestran los valores de las medias aritméticas ajustadas (aAMR), junto al límite inferior y superior con el 95% de intervalo de confianza (IC) obtenidos mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p: (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

4.3. Análisis de los niveles de los biomarcadores plasmáticos en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática

Por otro lado, se analizaron las diferencias en los niveles de biomarcadores plasmáticos de acuerdo al estadio de fibrosis hepática en los pacientes coinfectados VIH/VHC (**Figura 61**). Se observó un incremento significativo en los valores plasmáticos de LPS con el progreso de la enfermedad hepática en los pacientes con F0-F3 (1,52UE/mL) respecto a los estadios de cirrosis F4.2 (2,34UE/mL, $p=0,007$) y F4.3 (2,42UE/mL, $p=0,026$); así como entre los pacientes F4.1 y F4.2 (1,62UE/mL vs. 2,34UE/mL, $p=0,028$). En el marcador Dímero-D, se observó un incremento con el avance de la fibrosis, con un valor máximo en los sujetos con F4.3 (>40kPa) (196,98ng/mL) significativamente diferente respecto a los estadios previos F0-F3 (49,49ng/mL, $p=0,014$), F4.1 (48,25ng/mL, $p=0,012$) y F4.2 (66,48ng/mL, $p=0,032$) (**Figura 61**).

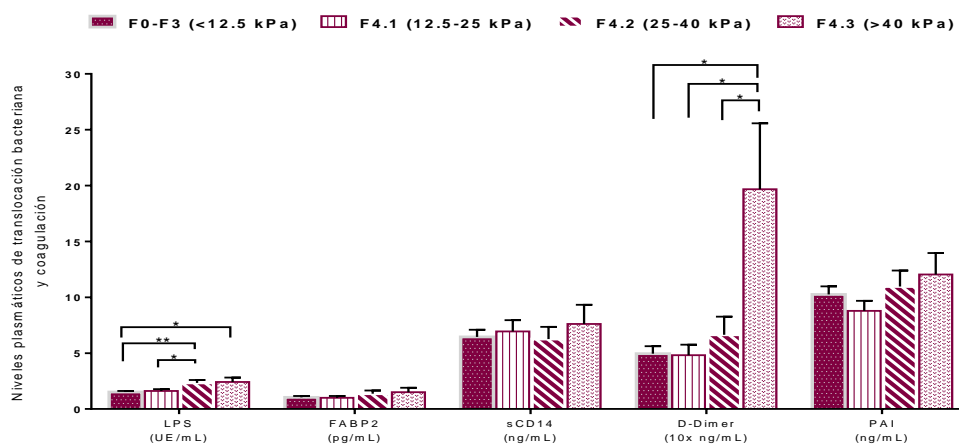


Figura 61. Valores plasmáticos de los biomarcadores de translocación bacteriana y coagulación en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p<0,05$; (**) $p<0,01$.

En cuanto a las citoquinas inflamatorias plasmáticas, se observó una asociación inversa respecto a la evolución de la rigidez hepática, en el caso de $TNF\alpha$, con valores significativamente mayores en los pacientes coinfectados F0-F3 (4,17pg/mL) respecto a los pacientes F4.2 (2,55pg/mL, $p=0,027$) y F4.3 (1,73pg/mL, $p=0,001$). Mientras que, IL-8 e IL-6, presentaron el patrón inverso, con un aumento en sus niveles a medida que progresa la fibrosis. En los valores de IL-8 las diferencias fueron significativas entre los pacientes coinfectados con valores >40kPa (20,33pg/mL) respecto a los pacientes F0-F3 (6pg/ml, $p<0,001$) y F4.1 (8,76pg/mL, $p=0,005$), entre los pacientes F4.2 (14,45pg/mL) vs. F0-F3 (6pg/mL, $p<0,001$) y vs. F4.1 (8,76pg/mL, $p=0,032$), y entre los pacientes F4.1 y F0-F3 ($p=0,039$). Para IL-6, el incremento fue significativo entre los pacientes F4.3 (13,27pg/mL) y F0-F1 (7,76pg/mL, $p=0,043$) y F4.1 (6,02pg/ml, $p=0,007$). Sin embargo, para el marcador IL-1RA se observó un incremento en los pacientes con los primeros estadios de la cirrosis, que disminuyó significativamente en el último estadio de cirrosis F4.3 (253,44pg/mL) respecto a F0-F3 (554,63pg/mL, $p=0,043$), a F4.1 (820,60pg/mL, $p=0,030$) y a F4.2 (843,07pg/mL, $p=0,049$) (**Figura 62**).

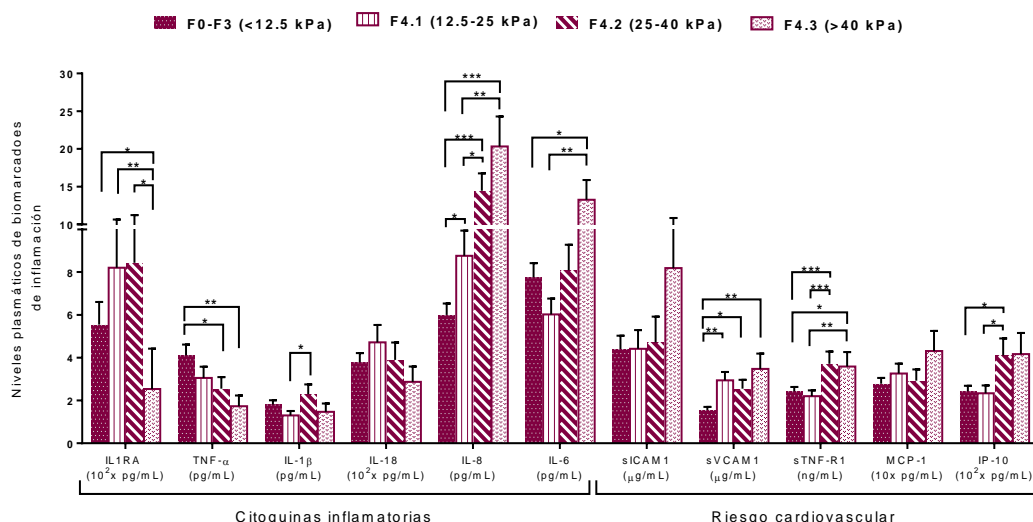


Figura. Valores plasmáticos de los biomarcadores de inflamación y riesgo cardiovascular en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

En los marcadores de riesgo cardiovascular, se observó un incremento en sus valores en los pacientes coinfectados VIH/VHC con el progreso de la enfermedad hepática hacia los estadios más avanzados de fibrosis, con diferencias significativas en sVCAM-1 entre los pacientes F0-F3 (1560,9μg/mL) y los pacientes cirróticos F4.1 (2941,4μg/mL, $p=0,001$), F4.2 (2549,1μg/mL, $p=0,026$) y F4.3 (3473,9μg/mL, $p=0,009$) con valores >40kPa; en sTNF-R1 entre $p=0,002$) y a su vez entre los pacientes F4.2 (3,71ng/mL) y F0-F3 ($p < 0,001$) y F4.1 ($p < 0,001$); en IP-10 las diferencias se encontraron entre los pacientes F4.2 (410,88pg/mL) y los pacientes F0-F3 (2,43,2pg/mL, $p=0,0044$) y F4.1 (233,38pg/mL, $p=0,046$) (**Figura 62**).

Además, también se encontró un descenso significativo de los valores plasmáticos de las citoquinas relacionadas con la respuesta Th17, Th1 y Th2 a medida que aumentaba el estadio de rigidez hepática en los pacientes coinfectados VIH/VHC (**Figura 63**). La interleucina IL-17A disminuyó significativamente entre los pacientes F0-F3 (2,33pg/mL) y los pacientes cirróticos F4.1 (1,55pg/mL, $p=0,49$), F4.2 (1,29pg/mL, $p=0,006$) y F4.3 (1,26pg/mL, $p=0,022$), así como los niveles de IL-4 entre los estadios F0-F3 y F4.1 (5,94pg/mL vs. 3,79pg/mL, $p=0,015$) e IL-2 entre F0-F3 y F4.3 (5,35pg/mL vs. 2,49pg/mL, $p=0,002$). En el caso de las citoquinas IL-12p70 e IFN γ , se observó una significativa disminución entre los pacientes coinfectados VIH/VHC de los estadios F0-F3 y F4.1 (3,35pg/mL vs. 2,26pg/mL, $p=0,021$, y 26,61pg/mL vs. 10,46pg/mL, $p=0,001$, respectivamente), que incrementó de nuevo en los valores >25kPa de fibrosis.

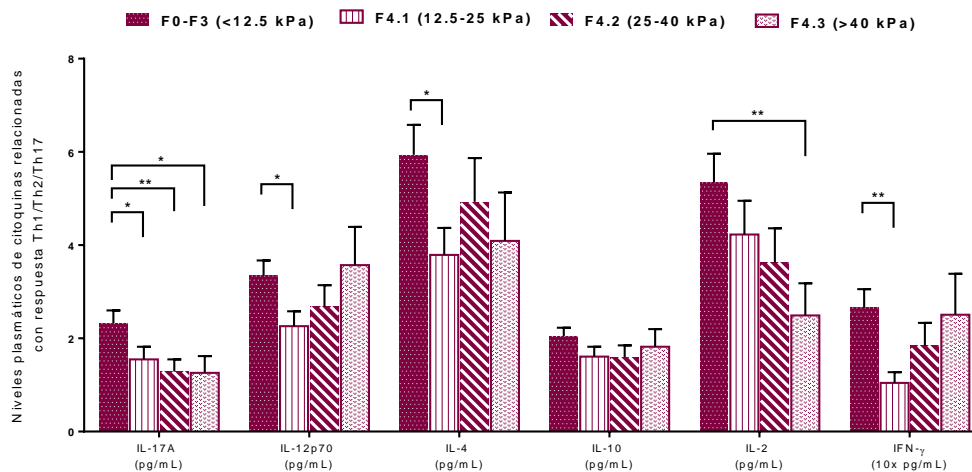


Figura 63. Valores plasmáticos de las citoquinas relacionadas con respuesta Th1/Th2/Th17 en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados por el estadio de rigidez hepática. Se muestran los porcentajes y la desviación estándar de los valores estimados en cada uno de los grupos de estudio mediante análisis GLM ajustado por las principales covariables clínicas y epidemiológicas. Valores significativos p : (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

4.4. Variación de los niveles de los biomarcadores plasmáticos, estratificados por estadios de fibrosis en los pacientes coinfectados VIH/VHC, respecto a los controles sanos y pacientes mono infectados VIH

La **Figura 64** muestra, de forma resumida y global, la variación de los valores de los biomarcadores plasmáticos en los pacientes coinfectados VIH/VHC estratificados según el estadio de fibrosis, con respecto a los dos grupos control, a) sanos y b) pacientes mono infectados VIH.

Los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores siempre inferiores (azul) de LPS a los encontrados en el grupo control sano y en el grupo de pacientes mono infectados VIH, aunque aumentó a medida que aumentaba el estadio de cirrosis hepática. Además, los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores de IL-1RA, TNF α , IL-17A e IL-2, similares a los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH, excepto en los pacientes con cirrosis avanzada (>40kPa), que mostraron valores más bajos que en los dos grupos control (**Figura 64**). Mención aparte son los valores de IL-10, que fueron más altos en los pacientes coinfectados VIH/VHC respecto al grupo controles sanos y al grupo pacientes mono infectados VIH, pero tuvieron una tendencia descendente a medida que aumentaba el estadio de cirrosis (**Figura 64**).

Los valores de los biomarcadores plasmáticos IP-10, sVCAM1 e sICAM1, estuvieron siempre muy por encima (rojo) de los valores encontrados en los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH; aumentando, además, a medida que aumentaba el estadio de cirrosis. Los valores de Dímero-D, sTNF-R1, IL-8, IL-6 e IFN γ también estuvieron por encima de los valores encontrados en el grupo control sanos y el grupo de pacientes mono infectados VIH, pero en menor intensidad, y aumentaron a medida que aumentaba el estadio de cirrosis (**Figura 64**).

El resto de biomarcadores plasmáticos, sCD14, FABP2, PAI-1, IL-18, IL-1 β , MCP-1, IL-12p70 e IL-4, y tuvieron valores levemente mayores en los pacientes coinfectados VIH/VHC que

en los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH, con una tendencia ascendente a medida que aumentaba el estadio de cirrosis, pero como se ha demostrado anteriormente, sin llegar a alcanzar la significación estadística (Figura 64).

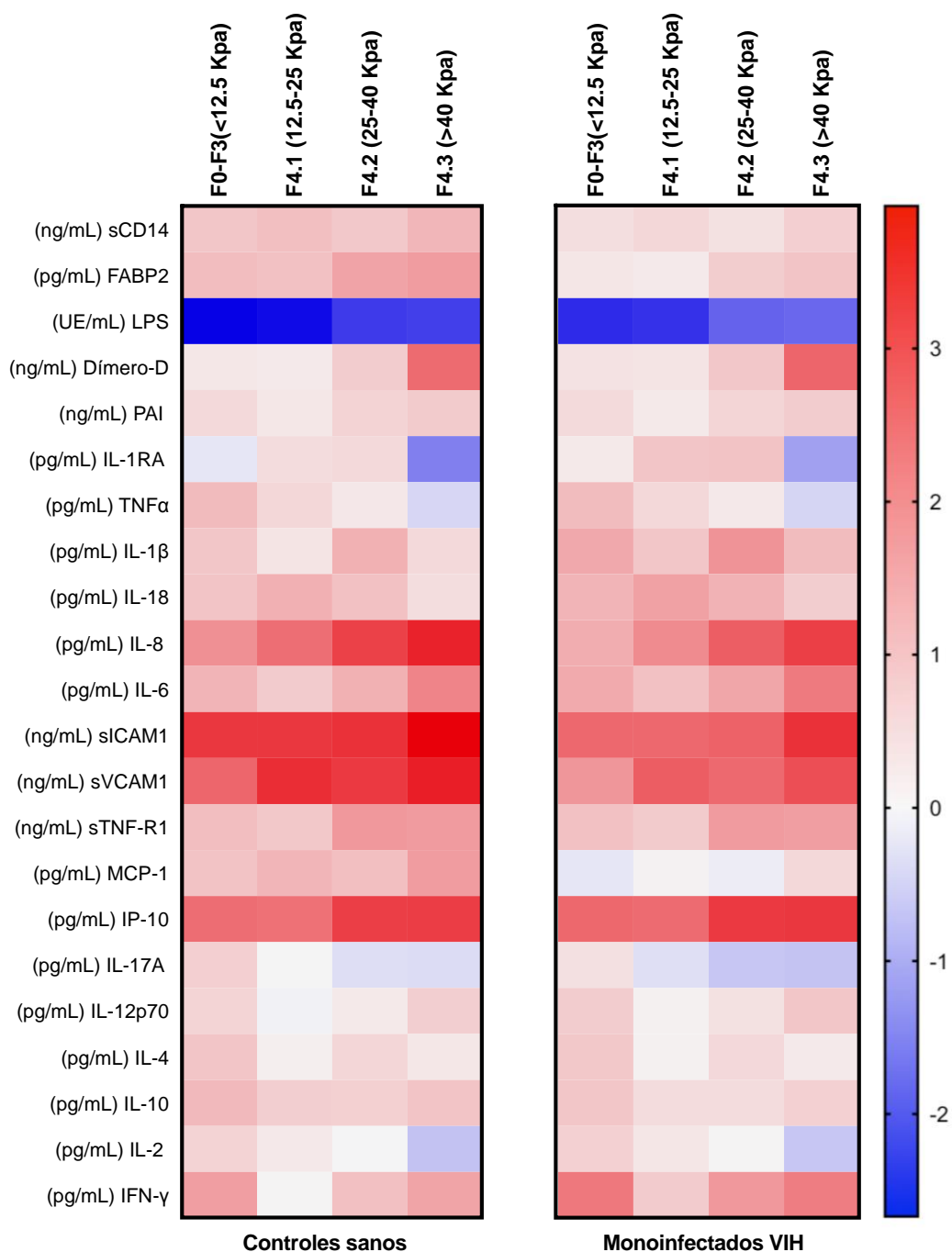


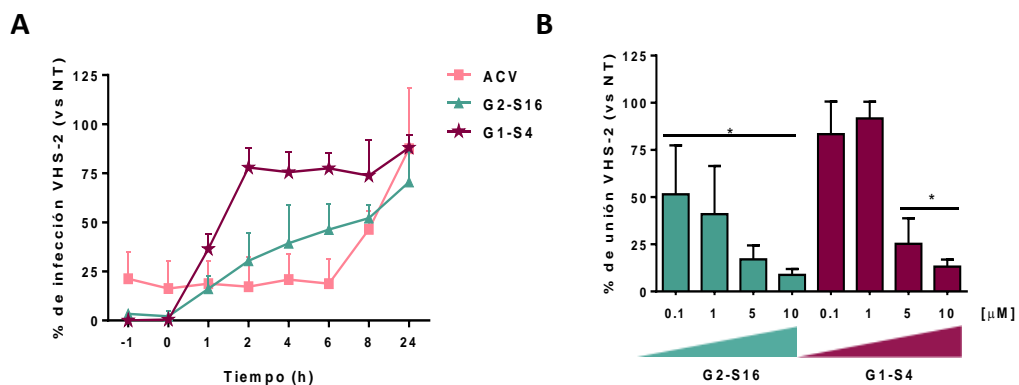
Figura 64. Mapa de color de los niveles estimados de los biomarcadores plasmáticos en los pacientes coinfectados VIH/VHC, estratificados según el estadio de fibrosis, con respecto al grupo control sano y al grupo mono infectados VIH. ($M = \log_2 (B/A) = x \log_2 \text{fold-change} = 2^x \text{fold-change}$). Un incremento (fold-change) positivo indica que el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC tiene valores mayores que el grupo control correspondiente, grupo control o mono infectados VIH; y viceversa.

SECCIÓN II: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 Y VHS-2

5. Estudio *in vivo* de la actividad antiviral de los dendrímeros polianiónicos carbosilano frente al VHS-2 en ratones BALB/c

G2-S16 es un dendrímero aniónico carbosilano de segunda generación formado por un núcleo de sílice y grupos sulfonatos en su periferia con 16 cargas negativas, que se encuentran en forma de sales de sodio. G2-S16 ha demostrado ser viable tanto *in vitro*^{343,344} en varias líneas celulares epiteliales y células primarias humanas, como *in vivo* en ratones BALB/c y en ratones humanizados BLT en una dosis del 3% en gel HEC por aplicación intravaginal³⁵⁰.

La infección por el VHS-2 aumenta el riesgo de adquisición del VIH-1 aproximadamente tres veces^{302,303}. Por ello, se analizó el posible papel dual que podría tener el dendrímero G2-S16 como microbicida en otras enfermedades de transmisión sexual como la infección por el VHS-2. Previamente, se había analizado *in vitro* la actividad antiviral de varios dendrímeros polianiónicos carbosilano frente al VHS-2 para determinar su potencial desarrollo como microbicidas. Se seleccionó el dendrímero carbosilano G2-S16 de segunda generación con 16 grupos sulfonato en la periferia, debido no sólo a los resultados obtenidos *in vitro* frente al VHS-2³⁴⁶, sino también a los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* frente al VIH-1 como posible microbicida^{343,344,350,390}, y el dendrímero carbosilano de primera generación G1-S4 con 4 grupos sulfato en la periferia, debido al alto efecto inhibitorio frente a la infección por el VHS-2³⁴⁶, bloqueando la infección en los primeros pasos del ciclo viral, a nivel de la entrada por inhibición de la interacción virus-célula (**Figura 65 A-B**). El dendrímero G1-S4 se une directamente a las proteínas de la superficie del VHS-2, inactivándolo (**Figura 65C**), mientras que el dendrímero G2-S16 se une a las proteínas de la superficie de la célula huésped inhibiendo la infección (**Figura 65D**). Estos resultados se confirmaron por estudios de modelaje molecular con la glicoproteína B (gB) del VHS-2, mostrando que el dendrímero G1-S4 se une mejor a los sitios de unión seleccionados sobre la superficie de la gB que el dendrímero G2-S16³⁴⁶. Se seleccionaron los dos dendrímeros con el objetivo de evaluar su capacidad de inhibir la infección por el VHS-2 *in vivo*, a nivel vaginal y/o rectal, en ratones BALB/c.



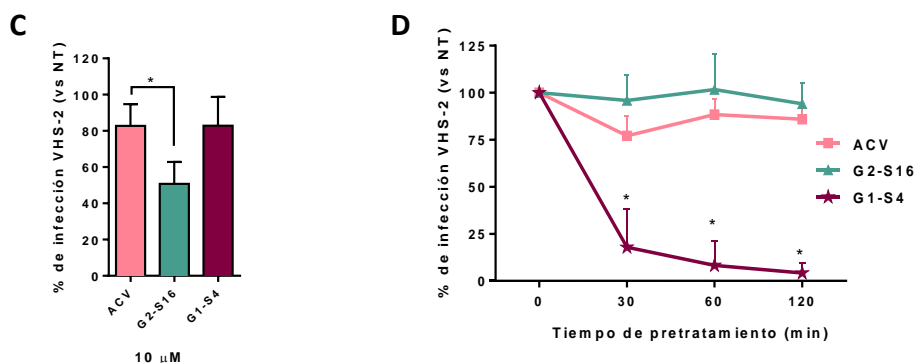


Figura 65: Mecanismo de acción de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 frente al VHS-2 *in vitro*. (A) Ensayo de tiempo de adición para evaluar la etapa del ciclo viral donde actúan los dendrímeros. Se infectaron células Vero con VHS-2 y se trataron con los dendrímeros a -1, 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24h. pre- y post-infección respectivamente. El porcentaje de infección se determinó a las 48h. (B) Ensayo de unión del VHS-2 para evaluar el efecto de los dendrímeros: las células Vero se pre-incubaron a 4°C durante 20min, se trataron con los dendrímeros durante 1h a diferentes concentraciones y se infectaron con VHS-2 durante 2h a 4°C. (C) Ensayo de unión dendrímero-célula para evaluar la capacidad del dendrímero de unirse a las proteínas de la superficie celular: las células Vero se pretrataron con los dendrímeros 1h, se lavaron para eliminar el exceso de dendrímero y se infectaron con VHS-2 durante 2h. después de 48h se contaron las placas virales por tinción. (D) Ensayo de unión dendrímero-virus para evaluar la capacidad del dendrímero de unirse a las proteínas de la superficie viral e inactivarlo: 10⁴ PFU de VHS-2 se incubaron durante 1h con los dendrímeros, se retiró el excedente de dendrímero, y se infectaron las células Vero con el virus tratado. A las 48h se cuantificó la infectividad por la formación de placas. El Aciclovir (ACV) se utilizó como fármaco control de inhibición viral (**p*<0,05 vs. control).

5.1. Actividad antiherpética de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 por administración vaginal en ratones BALB/c

Se utilizaron 40 ratones hembras BALB/c, que se distribuyeron en 4 grupos de estudio con 10 ratones cada uno: i) grupo control tratado con PBS; ii) grupo placebo tratado con el vehículo (gel HEC); iii) grupo de estudio tratado con G2-S16 al 3% en gel HEC y iv) grupo de estudio tratado con G1-S4 al 3% en gel HEC. A los ratones hembras se les administró por vía subcutánea 2 mg de medroxiprogesterona (Depo-Progevera) para aumentar la susceptibilidad a la infección por el VHS-2. A día 5 se les anestesió en cámara de isoflurano y se les administró los tratamientos descritos anteriormente por vía tópica intravaginalmente. Una hora más tarde se expusieron a una dosis letal de VHS-2. Se examinaron diariamente los ratones BALB/c para controlar el peso corporal y evaluar la ausencia o presencia de patología genital producida por los cuatro tratamientos a nivel vaginal durante 17 días.

Los dos grupos de estudio G2-S16 y G1-S4 demostraron ser capaces de inhibir la infección frente al VHS-2 en el 100% y 90% de las ratonas, respectivamente, tras la exposición a una dosis letal de VHS-2, mostrando diferencias significativas en comparación con el grupo control y el grupo placebo como se muestra en la **Tabla 8 (Figura 66A)**. El peso de las ratonas en los grupos control y placebo disminuyó de manera constante a partir del día 6 post-infección, mientras que en los grupos tratados con los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 el peso corporal mantuvo su relación de crecimiento normal (**Figura 66A**). En el caso del dendrímero G2-S16 ningún ratón mostró signos de infección por el VHS-2 con una puntuación de la enfermedad igual a 0, mientras que en el pre-tratamiento con el dendrímero G1-S4 un ratón mostró

sintomatología de infección por el VHS-2 con una puntuación de 0,4. Por otra parte, los ratones de los grupos control (PBS) y vehículo (gel HEC) comenzaron a mostrar los primeros signos de enrojecimiento e inflamación al cuarto día post-infección, con un aumento de la sintomatología hasta el momento del sacrificio entre los días 8 y 16 post-infección, con una puntuación igual a 4 y 3, respectivamente (**Figura 66C**).

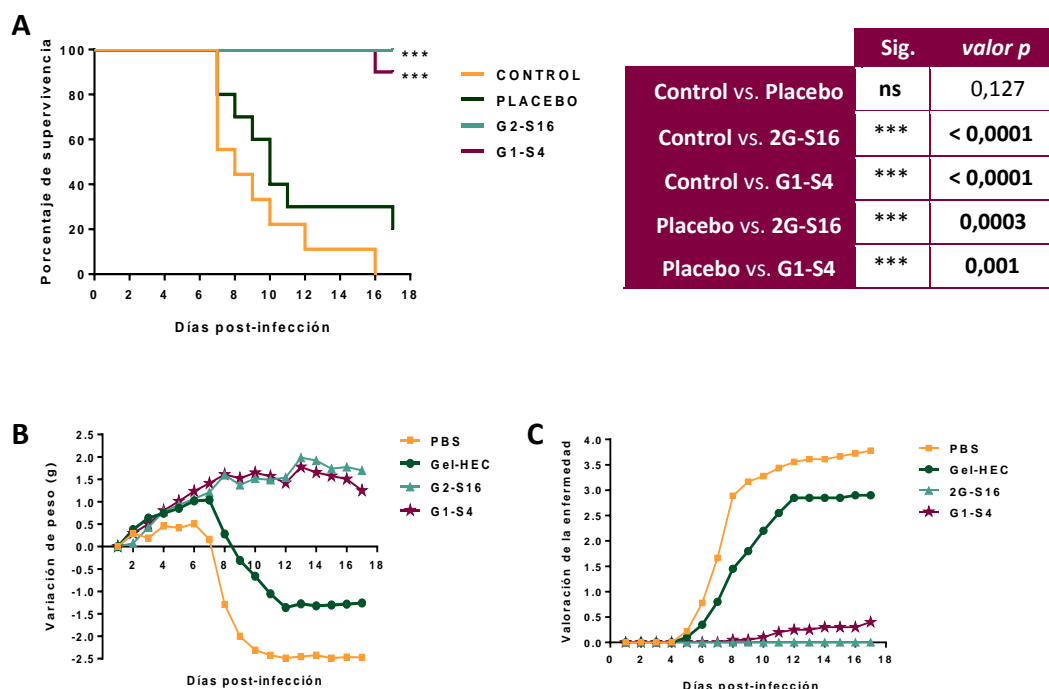


Figura 66: Actividad antiviral de los dendrímeros polianiónicos carboxilano *in vivo* en ratones hembras BALB/c frente a la infección vaginal por VHS-2. Ratones hembras BALB-C se trataron con medroxiprogesterona y se infectaron intravaginalmente con 10^5 PFU de VHS-2, 1 hora después del tratamiento correspondiente i) PBS, ii) gel HEC, iii) G2-S16 al 3% en gel HEC, iv) G1-S4 al 3% en gel HEC (10 ratones/grupo). Los ratones se examinaron diariamente para evaluar el peso corporal y la patología genital durante 17 días. **(A)** Curvas de supervivencia Kaplan Meier: reflejan los porcentajes de infección a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba no paramétrica Mantel-Cox entre los diferentes grupos para el análisis estadístico (** $p < 0,001$) (**Tabla 8**). **(B)** Curvas de variación del peso corporal: se expresan los valores medios del cambio de peso corporal en los 10 ratones del mismo grupo. Cada valor se calculó restando el peso del día 0 al peso del día n post-infección. **(C)** Curva de valoración de la enfermedad: la patología clínica se puntuó como se describe en el apartado de materiales y métodos 4.1 durante 17 días. Las puntuaciones de la lesión se expresan como los valores medios de los 10 ratones del mismo grupo.

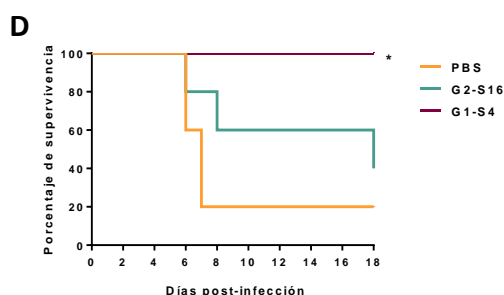
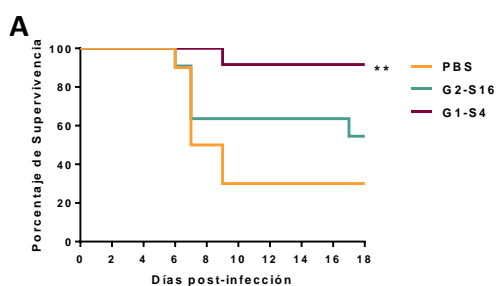
5.2. Actividad antiherpética de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 por administración rectal en ratones BALB/c

En el estudio de inhibición de la infección por el VHS-2 por vía rectal, en primer lugar, se analizó la capacidad de los dendrímeros para detener la infección en ratones machos BALB/c. Para ello, se emplearon 30 ratones machos BALB/c distribuidos en 3 grupos de estudio con ratones por grupo: i) grupo control tratado con PBS; ii) grupo de estudio tratado con G2-S16 al 3% en PBS y iii) grupo de estudio tratado con G1-S4 al 3% en PBS. Se anestesiaron los ratones tras ayuno de 24h por administración intraperitoneal con Ketamina y xilacina, y se les aplicó por vía tópica rectal los tres tratamientos. A los 30min se expusieron a una dosis letal de 10^5 PFU del

VHS-2. Los ratones se examinaron diariamente para controlar el peso corporal y la valoración de la patología anal puntuando la ausencia/presencia de sintomatología de la enfermedad durante 18 días.

El dendrímero G1-S4 alcanzó valores de inhibición del VHS-2 del 90% (** $p=0,002$), mientras que el dendrímero G2-S16 no evitó la infección por el VHS-2 con resultados significativos de supervivencia respecto a los obtenidos en el grupo control ($p=0,8744$) (**Figura 67A**). En el caso de la infección rectal, la pérdida de peso observada no fue tan marcada como en el de la infección vaginal, ya que, los síntomas y la muerte de los ratones infectados por el VHS-2 se produjeron más rápido sin dar tiempo a una gran variación de peso. A pesar de ello, se observó una marcada disminución en el peso corporal en el caso de los ratones machos del grupo control, mientras que los ratones tratados con G1-S4 mantuvieron su un crecimiento corporal normal (**Figura 67B**). En cuanto a la sintomatología, sólo un ratón tratado con G1-S4 mostró signos de infección por VHS-2, con una puntuación de la enfermedad por el VHS-2 de 0,45, mientras que los ratones machos tratados con el G2-S16 mostraron un patrón de la sintomatología más parecido al de los no tratados desde el día 5 post-infección con el VHS-2, con una puntuación de 1,9 y 2,6, respectivamente (**Figura 67C**).

Tras los resultados obtenidos, se probó la eficacia antiherpética de los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 vía rectal en ratones hembra BALB/c para descartar la influencia del género en los resultados obtenidos. El procedimiento del ensayo fue el mismo pero esta vez con 15 ratones hembras BALB/c (5 por grupo). Ambos dendrímeros mantuvieron el mismo patrón de inhibición a nivel rectal que el observado en los ratones machos BALB/c. El dendrímero G2-S16 no frenó la infección por el VHS-2 ($p=0,3026$) a nivel rectal en los ratones hembras BALB/c, mientras que el dendrímero G1-S4 alcanzó valores de inhibición frente al VHS-2 incluso del 100% con resultados significativos respecto a los ratones hembras controles tratados con PBS ($*p=0,0144$) (**Figura 67D**). En cuanto a la pérdida de peso, hubo una rápida y marcada disminución en el grupo control y el grupo tratado con el G2-S16, mientras que los ratones hembras tratadas con G1-S4 mantuvieron su relación de crecimiento corporal normal como se observó previamente ante la exposición vaginal de este dendrímero al VHS-2 (**Figura 67E**). Los síntomas en los ratones hembras infectados por vía rectal tanto del grupo control como del grupo del G2-S16 comenzaron a mostrarse en el quinto día tras la infección con el VHS-2 con un incremento rápido de la sintomatología hasta el momento del sacrificio entre los días 6 y 18 post-infección, con una puntuación de la enfermedad de 3,25 y 2,5, respectivamente. Mientras que ningún ratón hembra tratado a nivel rectal con el G1-S4 mostró signos de infección por el VHS-2 con una puntuación de la enfermedad igual a 0 (**Figura 67F**).



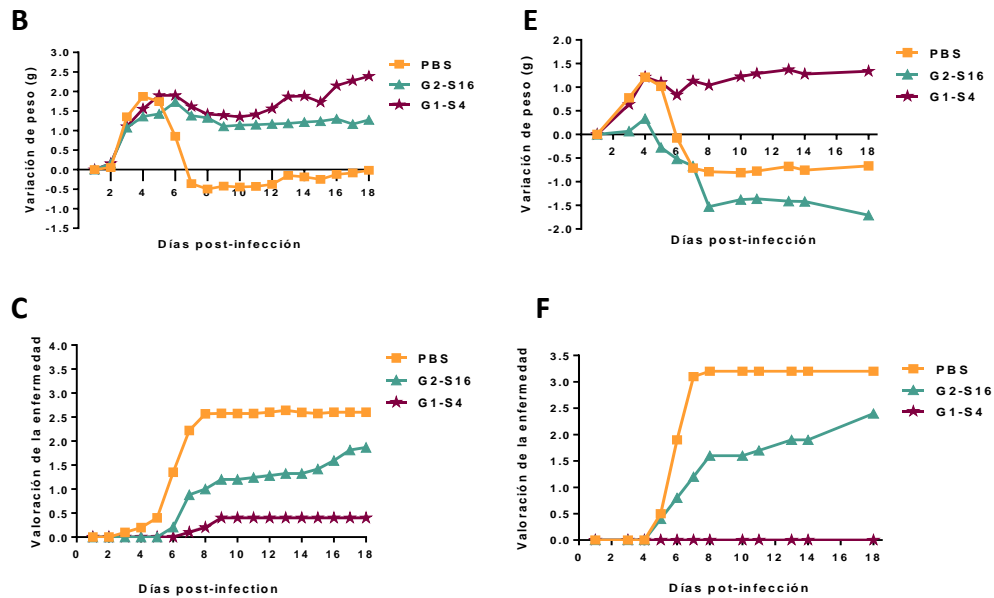


Figura 67: Actividad antiviral de los dendrímeros polianiónicos carboxilano *in vivo* en ratones machos y hembras BALB/c frente a la infección rectal por el VHS-2. Ratones machos (A, B, C) y hembras (D, E, F) BALB/c se mantuvieron en ayunas durante 24h, se les administró el tratamiento correspondiente i) PBS, ii) G2-S16 al 3% en PBS, iii) G1-S4 al 3% en PBS durante 30min y se infectaron a nivel rectal con 10^5 PFU del VHS-2 (10 ratones machos/grupo y 5 ratones hembra/grupo). Los ratones se examinaron diariamente para evaluar el peso corporal y la patología anal durante 18 días. **(A, D)** Curvas de supervivencia Kaplan Meier: reflejan los porcentajes de infección a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba no paramétrica Mantel-Cox para el análisis estadístico (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). **(B, E)** curvas de variación del peso corporal: se expresan los valores medios del cambio de peso corporal en los 10 ratones machos y 5 ratones hembras del mismo grupo. Cada valor se calculó restando el peso del día 0 al peso del día n post-infección. **(C, F)** curva de valoración de la enfermedad: la patología clínica se puntuó como se describe en el apartado de materiales y métodos 4.1. durante 18 días. Las puntuaciones de la lesión se expresan como los valores medios de los 10 ratones machos y 5 ratones hembras del mismo grupo.

Al comparar los resultados obtenidos entre ambos sexos, no se encontraron diferencias significativas, lo cual corroboró que la variabilidad en la eficacia antiviral de los dendrímeros dependiendo de la vía de administración no era debida al género. Por lo tanto, se unieron los resultados de ambos experimentos, para aumentar el tamaño muestral (n) obteniendo un total de 15 ratones por condición, i) grupo control tratado con PBS, ii) grupo tratado con G2-S16 al 3% en PBS y iii) grupo tratado con G1-S4 al 3% en PBS. Mientras que, el dendrímero G2-S16 no frenó la infección por el VHS-2 de manera significativa ($p=0,1550$), el G1-S4 consiguió frenar la infección por el VHS-2 en un 94,2% mostrando diferencias significativas (** $p < 0,0001$) en comparación con el grupo de control (**Figura 68A**). Los cambios en el peso corporal (**Figura 68B**) y la puntuación de la enfermedad para evaluar la patología clínica con valores de 0,25 para el tratamiento con G1-S4, 2 para G2-S16 y 2,75 para PBS (**Figura 68C**) se correlacionaron con los resultados de los porcentajes de supervivencia basados en los síntomas de la infección por el VHS-2.

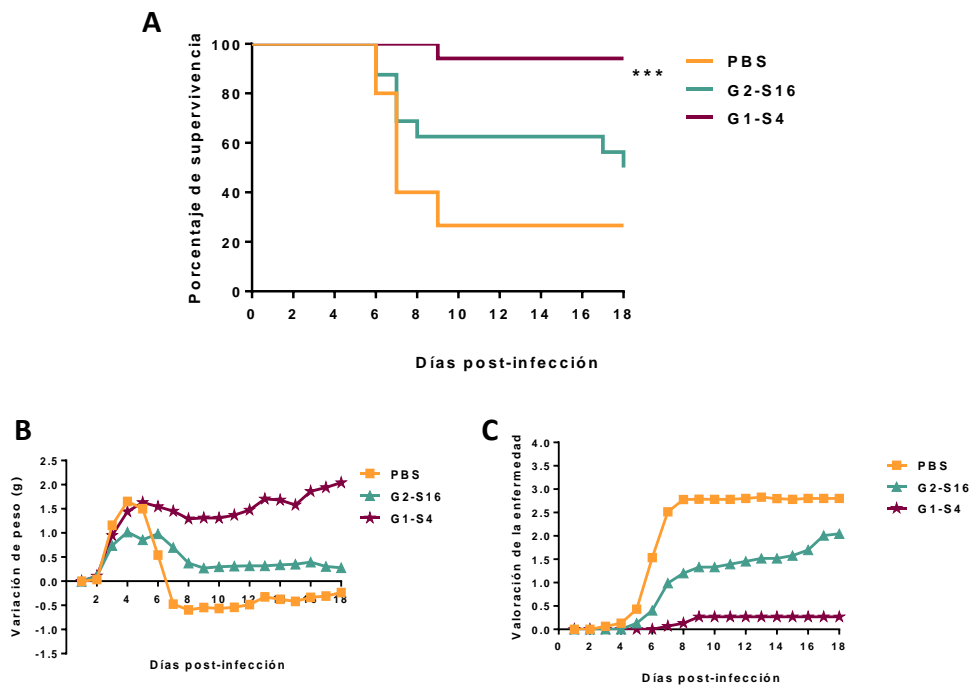


Figura 68: Actividad antiviral de los dendrímeros polianiónicos carboxilato *in vivo* en ratones BALB/c frente a la infección rectal por el VHS-2. Ratones machos y hembras BALB/C se mantuvieron en ayunas de 24h, se les aplicó el tratamiento correspondiente i) PBS, ii) G2-S16 al 3% en PBS, iii) G1-S4 al 3% en PBS durante 30min y se infectaron rectalmente con 10^5 PFU del VHS-2 (15 ratones/grupo). Los ratones se examinaron diariamente para evaluar el peso corporal y la de infección a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. **(A)** Curvas de supervivencia Kaplan Meier: reflejan los porcentajes de infección a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba no paramétrica Mantel-Cox para el análisis estadístico ($***p < 0,0001$). **(B)** curvas de variación del peso corporal: se expresan los valores medios del cambio de peso corporal en los 15 ratones del mismo grupo. Cada valor se calculó restando el peso del día 0 al peso del día n post-infección. **(C)** Curva de valoración de la enfermedad: la patología clínica se puntuó como se describe en el apartado de materiales y métodos 4.1 durante 18 días. Las puntuaciones de la lesión se expresan como los valores medios de los 15 ratones del mismo grupo.

En resumen, ambos dendrímeros inhiben la infección vaginal por el VHS-2 casi un 100%, sin embargo, el dendrímero G2-S16 con 16 grupos sulfonato en la superficie no inhibe la infección por el VHS-2 por a nivel rectal. Este hecho podría ser debido a que el dendrímero G2-S16 ejerce su efecto antiviral por unión a las proteínas de la superficie de la célula huésped, de modo que las diferencias entre el epitelio vaginal y el rectal podrían ser las responsables de esta pérdida de actividad anti-herpética. Sin embargo, el dendrímero G1-S4 con 4 grupos sulfato en la superficie se une directamente a la partícula viral bloqueando la unión del VHS-2 a la superficie celular, de modo que no se ve modificada su capacidad virucida por cambios en el epitelio celular o en el medio ambiente (modificaciones del pH entre valores de 3–7 no afectan a la actividad del dendrímero ³⁴⁶, pudiendo ejercer su acción de frenar la infección en ambos casos.

Para confirmar la actividad antiherpética rectal mostrada por el dendrímero G1-S4 se realizó un experimento nuevo en ratones machos BALB/c expuestos a una dosis de VHS-2 un logaritmo mayor que en el experimento anterior (10^6 PFU), ya que, en las infecciones por el VHS-2 adquiridas por sexo anal, la probabilidad de lesiones en el epitelio durante la exposición es mayor, incrementándose el riesgo de infección al hacer más accesible la entrada del VHS-2, siendo la principal vía de transmisión entre los hombres que mantiene sexo con hombre en

prácticas de riesgo ²⁷⁰. Para ello, se utilizaron 18 ratones machos BALB/c (6 ratones/grupo) i) tratados con PBS, ii) tratados con G2-S16 y iii) tratados con G1-S4 al 3% en PBS. Cabe destacar la capacidad del dendrímero G1-S4 para inhibir la infección por el VHS-2 significativamente en un 66,7% respecto al control (* $p=0,0233$), a pesar de la elevada dosis letal de virus, mientras que el G2-S16 perdió toda su actividad antiviral ante dicho incremento con un 16,7% de protección ($p=0,6677$) (**Figura 69A**). Estos datos justifican aún más la influencia de la variabilidad de los epitelios cuando se utilizan distintos tipos de dendrímeros, ya que si el dendrímero no inactiva el virus como lo hace el dendrímero G1-S4, la unión del dendrímero a la superficie del epitelio anal no es suficiente para bloquear la entrada del VHS-2 inhibiendo la infección viral. Los cambios en el peso corporal y la puntuación de la enfermedad reflejaron la sintomatología hasta el momento del sacrificio en todos los grupos entre los días 6 y 10 después de la infección (**Figura 69B-C**).

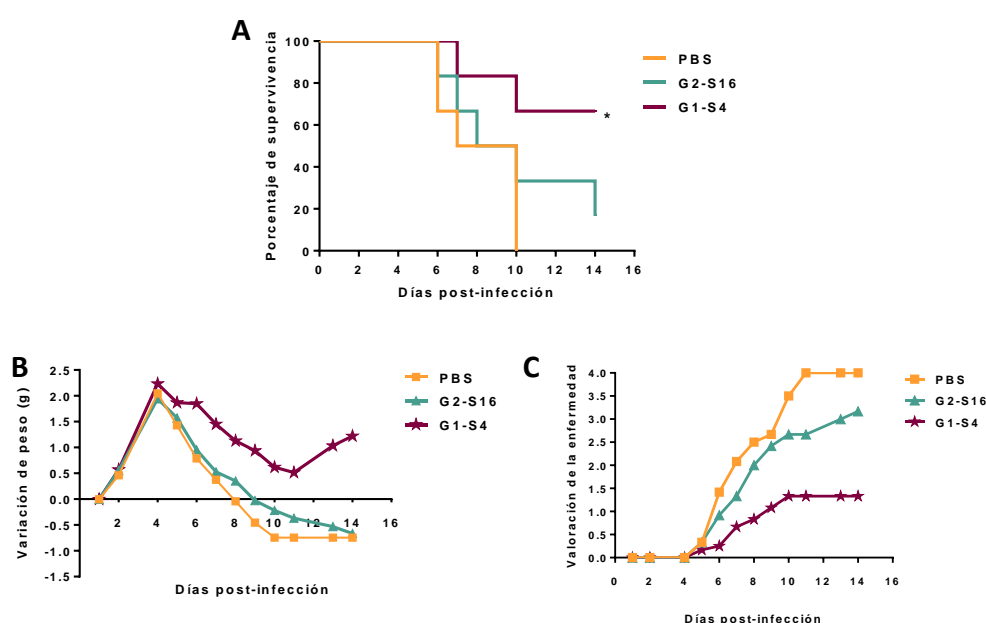


Figura 69: Actividad antiviral del dendrímero G1-S4 *in vivo* en ratones BALB/c utilizando dosis elevadas de VHS-2 por vía rectal. Ratones machos BALB/C se mantuvieron en ayunas durante 24h, se les aplicó el tratamiento correspondiente i) PBS, ii) G2-S16 al 3% en PBS, iii) G1-S4 al 3% en PBS durante 30min y se infectaron rectalmente con 10^6 PFU de VHS-2 (6 ratones/grupo). Los ratones se examinaron diariamente para evaluar el peso corporal y la patología anal durante 14 días. **(A)** Curvas de supervivencia Kaplan Meier: reflejan los porcentajes de infección a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba no paramétrica Mantel-Cox para el análisis estadístico (* $p<0,05$). **(B)** Curvas de variación del peso corporal: se expresan los valores medios del cambio de peso corporal en los 6 ratones del mismo grupo. Cada valor se calculó restando el peso del día 0 al peso del día n post-infección. **(C)** Curva de valoración de la enfermedad: la patología clínica se puntuó como se describe en el apartado de materiales y métodos 4.1. durante 14 días. Las puntuaciones de la lesión se expresan como los valores medios de los 6 ratones del mismo grupo.

Con el objetivo de incrementar los valores de protección a nivel rectal por el VHS-2 obtenidos con el dendrímero G2-S16, y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos *in vitro* frente al VIH-1 con la combinación G2-S16 + TFV ^{346,390} así como el efecto *in vivo* del TFV frente al VHS-2³³². Se realizó otro ensayo de infección rectal en 18 ratones machos BALB/c con una carga de 10^5 PFU del VHS-2 distribuidos en tres grupos i) tratados con PBS, ii) tratados con TFV al 1% en PBS, iii) tratados con G2-S16 al 3% + TFV al 1% en PBS. La combinación con TFV

incrementó la protección frente a la infección por el VHS-2 alrededor de un 66% ($p=0,1132$), aumentando el efecto antiviral *per se* del TFV que logró un 50% ($p=0,2549$) respecto al control en ambos casos. La combinación G2-S16 + TFV mostró un efecto sinérgico (**Figura 70A**). Los cambios en el peso corporal solo fueron marcados en el grupo control PBS y junto a la puntuación de la enfermedad reflejaron la sintomatología hasta el momento del sacrificio en todos los grupos entre el día 6 y el 18 después de la infección (**Figura 70B-C**).

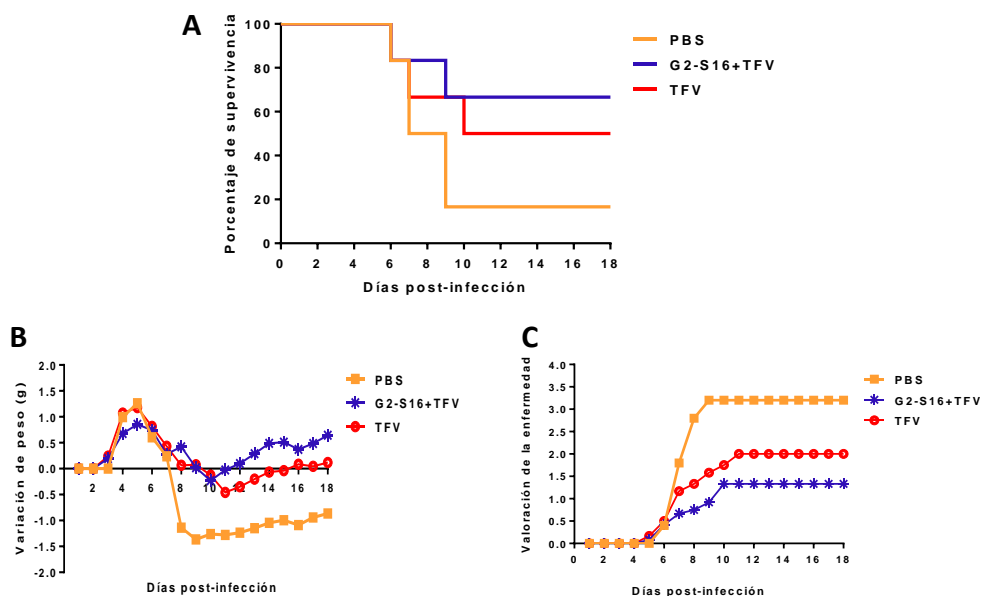


Figura 70: Incremento de la actividad antiherpética del dendrímero G2-S16 *in vivo* en ratones BALB/c vía rectal en combinación con TFV. Ratones machos BALB/C se mantuvieron en ayunas de 24h, se les aplicó el tratamiento correspondiente i) PBS, ii) TFV al 1%, iii) G2-S16 al 3% + TFV al 1% en PBS durante 30min y se infectaron rectalmente con 10^5 PFU de VHS-2 (6 ratones/grupo). Los ratones se examinaron diariamente para evaluar el peso corporal y la patología anal durante 18 días. **(A)** Curvas de supervivencia Kaplan Meier: reflejan los porcentajes de infección a lo largo del tiempo para cada grupo de tratamiento. Se empleó la prueba no paramétrica Mantel-Cox para el análisis estadístico y no se encontraron diferencias significativas. **(B)** Curvas de variación del peso corporal: se expresan los valores medios del cambio de peso corporal en los 6 ratones del mismo grupo. Cada valor se calculó restando el peso del día 0 al peso del día n post-infección. **(C)** Curva de valoración de la enfermedad: la patología clínica se puntuó como se describe en el apartado de materiales y métodos 4.1. durante 18 días. Las puntuaciones de la lesión se expresan como los valores medios de los 6 ratones del mismo grupo.

6. Biodistribución del dendrímero G2-STE15-FITC intravaginalmente

Teniendo en cuenta los resultados previos publicados por el grupo^{343,344,379} y los mostrados en esta Memoria, el dendrímero G2-S16 es un potencial candidato a microbicida de aplicación vaginal con actividad antiviral frente al VIH-1 y VHS-2, acorde con estudios previos publicados con el dendrímero SPL7013 (VivaGel™) en su entrada en fase clínica³⁹¹. Se evaluó como sería la biodistribución del dendrímero G2-S16 *in vivo* en la mucosa vaginal de ratones hembra BALB/c con el objetivo de estudiar la posible ventana de acción que tendría el microbicida tras su aplicación antes de requerir una nueva dosis. Para ello, se utilizó un dendrímero análogo en estructura al G2-S16 pero marcado con la molécula del fluorocromo

isocianato de fluoresceína (FITC), G2-STE15-FITC, que permitía su detección mediante el sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS), visualizando en tiempo real la presencia del dendrímero en la vagina por fluorescencia tras varias horas posteriores a su aplicación, ofreciendo un modelo más preciso de su biodistribución. Se administró intravaginalmente a 4 ratones hembras BALB/c el dendrímero G2-STE-15-FITC al 3% en gel HEC y se evaluó su presencia en dos ratones hembra BALB/c a los 30min y en otros dos a las 20h. Para ello, a cada tiempo se sacrificaron los ratones y se les retiró la piel para la toma de imágenes, observándose una señal brillante e intensa a ambos tiempos localizada exclusivamente en la vagina (**Figura 71 F-H**). A continuación, se extrajo el órgano del animal y se evaluó su fluorescencia, incrementando la señal detectada que confirmaba la presencia del dendrímero G2-STE-16-FITC en la vagina a lo largo del tiempo 30min vs 20h (**Figura 71 I-K**). Posteriormente se abrieron las vaginas sobre su eje longitudinal para evaluar la presencia del dendrímero G2-STE-15-FITC en la cara interna el tejido y además se lavaron 2 veces con PBS para retirar los posibles excesos del dendrímero y de este modo, solo evaluar el dendrímero G2-STE-15-FITC retenido en el tejido de la vagina donde ejercería su acción protectora incluso a varias horas tras su aplicación (**Tabla 9**).

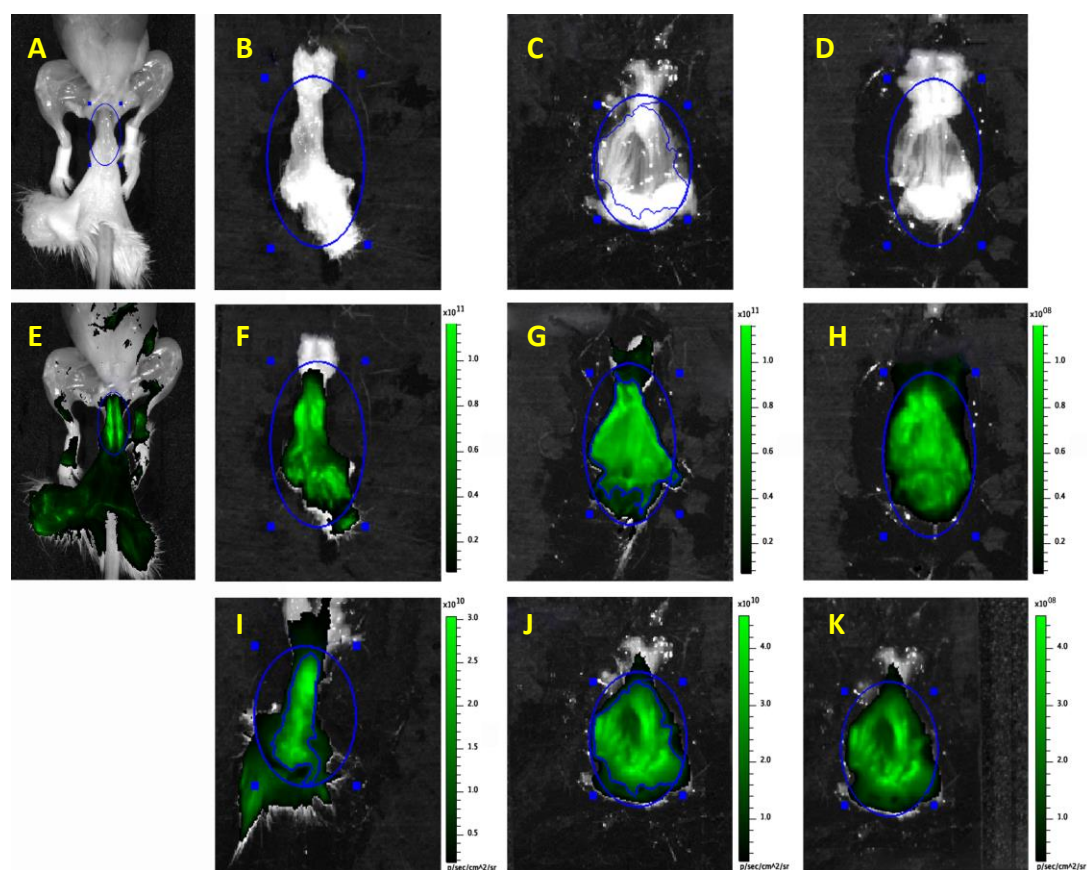


Figura 71. Biodistribución del dendrímero G2-STE15-FITC intravaginalmente en ratones hembras BALB/c. Visualización de la fluorescencia del dendrímero G2-STE15-FITC en las vaginas de las ratonas a los 30min (**F-H**) y 20h (**I-K**) tras su aplicación. A-D: imágenes reales de la vagina; E-K: imágenes de la fluorescencia del dendrímero en la vagina; A y E: parte posterior del ratón; B,F,I: vagina entera y C,D,G,H,J,K: vagina abierta en su eje longitudinal.

Tiempo de exposición	30 min	20 h
Vagina	4,064 E ¹¹	9,978 E ¹⁰
Cara interna de la vagina	2,695 E ¹¹	2,365 E ¹¹
Cara interna tras lavado con PBS	1,413 E ⁸	4,753 E ⁶

Tabla 9: Valores de fluorescencia emitidos por el dendrímero G2-STE15-FITC retenido en el tejido de la vagina de los ratones hembras BALB/c tras 30min y 20h de su aplicación. Los resultados muestran el valor medio de radiación emitido (p/s/cm²/sr).

7. Viabilidad de dosis consecutivas del dendrímero G2-S16 solo y en combinación con Tenofovir en ratones hembras BALB/c

Hasta la fecha se ha demostrado la eficacia del dendrímero G2-S16 *in vivo* por la administración intravaginal del microbicida G2-S16 al 3% en gel HEC en ratones humanizados h-BLT con un 84% de protección frente a la transmisión del VIH-1-R5_{JR-CSF} bloqueando las primeras etapas de entrada del virus en la interacción de la gp120 viral y el receptor CD4 celular, al unirse a las proteínas de la envuelta y evitar la transmisión célula-célula³⁵⁰. Por lo que uno de los objetivos principales de esta Memoria es mostrar que el microbicida formulado con el dendrímero G2-S16 se puede llevar a ensayo clínico 1a sin producir inflamación y/o activación celular a nivel vaginal en mujeres sanas, no VIH-1, sexualmente activas.

El primer paso fue evaluar si el dendrímero G2-S16 en ratones BALB/c a dosis consecutivas durante 7 días a nivel vaginal no producía irritación por acumulación del G2-S16 en la vagina. Se utilizaron 9 ratones hembra BALB/c, distribuidas en 5 grupos: i) grupo control blanco tratado únicamente con PBS; ii) grupo control vehículo tratado únicamente con gel HEC; iii) grupo irritación vaginal tratadas con N9 al 3% en gel HEC; iv) grupo de estudio tratado con G2-S16 al 3% en gel HEC y v) grupo de estudio tratado con G2-S16 al 3% y TFV al 1% en gel HEC. Los ratones hembra BALB/c se pusieron en ciclo estral por administración subcutánea de Depo-Provera y se les administró intravaginalmente 30µl del gel durante 7 días consecutivos, al octavo día se sacrificaron los ratones, se les extrajo la vagina y se realizó el análisis histológico.

En los dos grupos control i) blanco y ii) vehículo no se observaron lesiones histológicas significativas (**Figuras 72 A-D**). En el tratamiento con gel HEC se observó en una de las muestras un edema ligero pero en ambos grupos control la mucosa presentó un epitelio con capa superficial compuesta por células con contenido mucoso típica de la fase pro-estro del ciclo estral.

En las muestras del grupo iii) irritación de la mucosa tratados con N9, se observó una pérdida de las células mucosas del epitelio, e incluso en algunas zonas se observó ulceración del epitelio junto con otras zonas con ligera hiperplasia, es decir, un incremento del grosor del epitelio por aumento en el número de capas celulares (**Figura 72 E-H**). Además, en la submucosa se observó un infiltrado inflamatorio ligero constituido principalmente por neutrófilos y células plasmáticas, y una vasodilatación ligera y congestión junto a un edema mínimo (**Figura 72 G-H**).

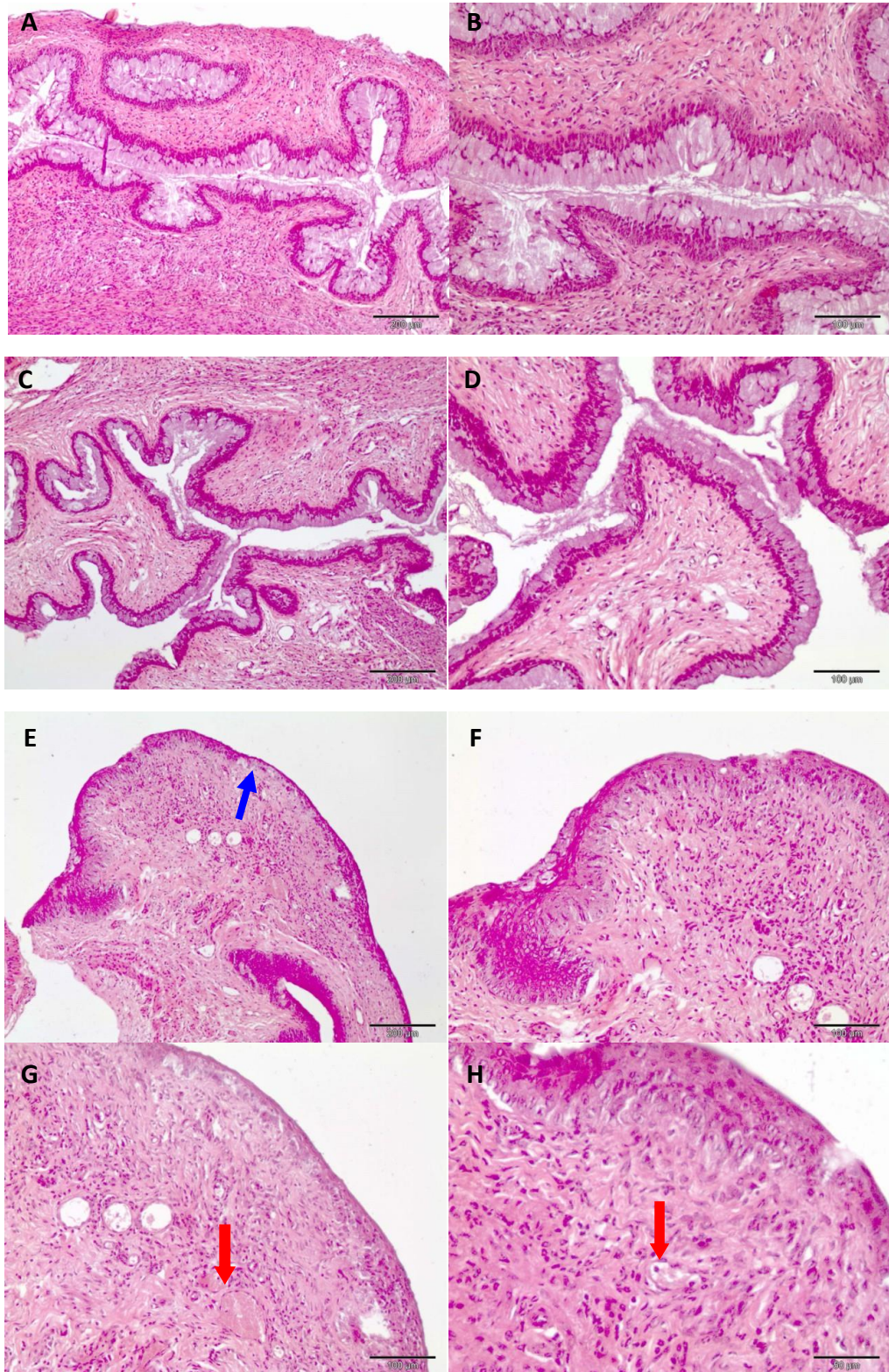


Figura 72 . Cortes histologicos de las vaginas de los ratones BALB/C hembras tras tratamiento durante 7 días consecutivos con PBS i) control blanco; gel HEC ii) control negativo o N9 al 3% en gel HEC iii) control irritación. **A y B:** i) Control blanco tratado con PBS. No se observa ningún tipo de lesiones histológicas. **C y D:** ii) Control negativo tratado con gel HEC, en el que tampoco se observan lesiones histológicas. **E-H:** iii) Control de irritación de la mucosa tratado con gel HEC al 3% N9. Se observa claramente, presencia de ulceración y células inflamatorias en la mucosa (flecha azul) e infiltrado inflamatorio en la submucosa con vasodilatación y congestión (flecha roja).

En el grupo de estudio de ratonas BALB/c iv) tratadas a nivel vaginal con G2-S16 al 3% en gel HEC, se observó que el epitelio vaginal mantuvo las células mucosas propias del pro-estro (**Figura 73 A-D**), observándose un aumento entre mínimo y leve del número de células inflamatorias en la submucosa, que en una de las muestras se vieron también en la luz de la vagina (**Figura 73B**), y también se observó congestión mínima.

En el caso del grupo de estudio de ratonas hembras BALB/c v) G2-S16 al 3% y TFV al 1% en gel HEC, una de las muestras histológicas fue similar a las del grupo iv), manteniéndose la morfología de la mucosa de la fase pro-estro e inflamación mínima. En la otra muestra, el epitelio apareció con una morfología de meta-estro con presencia de neutrófilos en la mucosa y submucosa en un grado normal para dicha fase del ciclo estral (**Figura 73 E-F**). Sólomente se observó un incremento mínimo en la congestión vascular y edema.

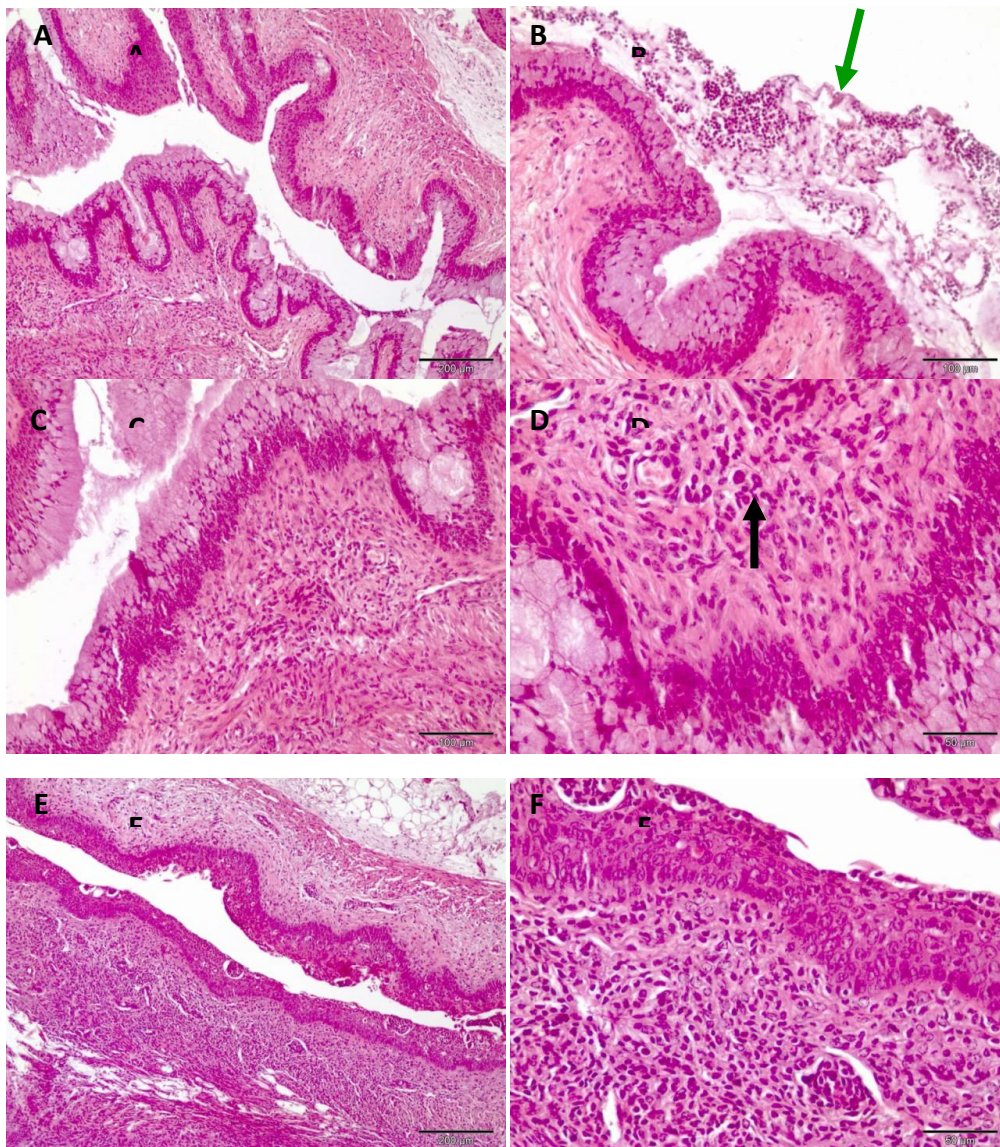


Figura 73. Cortes histológicos de las vaginas de los ratones hembra BALB/C grupos de estudio iv) y v) tras tratamientos consecutivos durante 7 días. A-D: Grupo de estudio iv) tratado con G2-S16 al 3% en gel HEC. **B:** presencia de neutrófilos en la luz vaginal (flecha verde). **D:** neutrófilos en la submucosa (flecha negra). **E y F:** Grupo estudio v) tratado con G2-S16 al 3% y TFV al 1% en gel HEC. Se observa infiltrado de neutrófilos en la mucosa y submucosa, normales en la fase de metaestro en la que está la mucosa.

No se apreciaron valores totales de irritación de la vagina en los ratones hembra BALB/c para los grupos control i) blanco y ii) vehículo, un valor medio para el grupo control iii) de irritación y un valor mínimo para los grupos de estudio iv) tratado con G2-S16 al 3% en gel HEC y v) tratado con G2-S16 al 3% y TFV al 1% en gel HEC (**Tabla 10**).

	i) Blanco	ii) Control negativo		iii) Control irritación		iv) G2-S16		v) G2-S16+TFV	
Tratamiento	PBS	Gel HEC		N9 3% en gel HEC		G2-S16 3% en gel HEC		G2-S16 3% y TFV 1% en gel HEC	
Número muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lesión epitelial	0	0	0	3	3	0	0	1	0
Infiltrado inflamatorio	0	0	0	2	2	1	2	1	0
Congestión vascular	0	0	0	2	2	1	0	1	1
Edema/fibrosis	0	0	1	1	1	0	0	0	1
Puntuación TOTAL	0	0	1	8	7	2	2	3	2
Fase del ciclo estral	P	P	P	PT	PT	P	P	P	M

Tabla 10: Marcador de irritación vaginal. Valoración de las lesiones epiteliales presentes en el tejido vaginal de los diferentes grupos de estudio de ratones hembras BALB/c tratados durante 7 días consecutivos, definidos por la combinación de la puntuación de los distintos parámetros que evalúan la integridad del epitelio vaginal.

8. Estudio de la eficacia antiviral frente al VIH-1 de los dendrímeros polianiónicos carbosilanos combinados con antirretrovirales en presencia de las fibrillas amiloides del semen (SEVI)

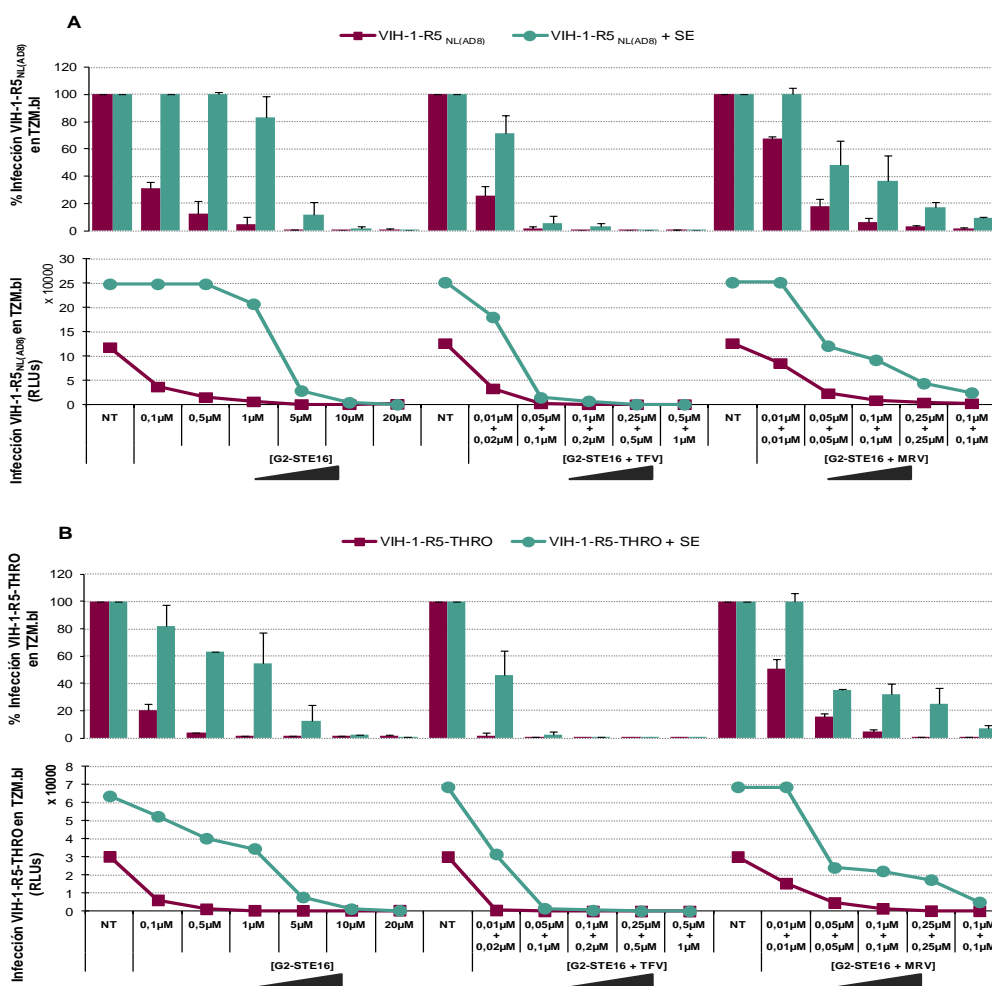
Basándose en el efecto aglutinador de las fibrillas amiloides asociadas al Alzheimer, se demostró por microscopía que el efecto de la fosfatasa alcalina prostática en el semen era debido a que también formaba dichas fibrillas denominadas SEVI (derivado de semen potenciador de la infección del virus), que capturan los viriones del VIH promoviendo su adhesión a las células diana, incrementando la capacidad infectiva del virus en varios órdenes de magnitud³⁶⁵. Tras numerosos fracasos en los ensayos clínicos de microbicidas como profilaxis anti-VIH-1, se ha encontrado que la inefectividad *in vivo* de los geles tópicos vaginales podría ser debido a la propia composición del semen, y no solo a la falta de adherencia o inducción de inflamación/citotoxicidad como se atribuía hasta la fecha³⁶⁴. Por todo ello, se evaluó si dendrímeros polianiónicos carbosilanos y sus combinaciones con antirretrovirales mantenían su eficacia antiviral frente a distintos aislados virales R5 trópicos en presencia y ausencia de semen.

8.1. Perfil inhibitorio de los dendrímeros G2-STE-16 y G3-S16 en la línea celular TZM.bl

En primer lugar, se utilizó la línea celular TZM.bl para determinar la actividad antiviral de los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16, solos y en combinación con TFV y MRV cuando se enfrentaban a aislados virales VIH-1 R5-trópicos expuestos o no a la presencia de semen. Los

dendrimeros mostraron un perfil inhibitor menos eficaz frente al aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)} y los virus fundadores (T/F) VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 en presencia de semen, pero conservaron su capacidad inhibitora frente a los virus R5-trópicos a concentraciones no tóxicas. Sin embargo, los dendrimeros combinados con los ARV y éstos *per se*, no presentaron apenas modificaciones en su efecto antiviral por la presencia del semen en el cultivo celular (**Figuras 74-75**).

G2-STE16 es un dendrímoro carbosilano de segunda generación que tiene grupos sulfonatos en su superficie³⁷⁸ que inhibió la infección por el aislado R5-HIV-1_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 en la línea celular TZM.bl en presencia de semen en un 98%, 99% y 99%, respectivamente, a partir de la concentración 10µM hasta la máxima concentración no tóxica (**Figura 74**). Cuando se combinó con los ARV, se alcanzaron mejores valores de inhibición para todos los aislados virales. Con la combinación, G2-STE16 y TFV se obtuvieron valores de inhibición frente a los aislados R5-HIV-1_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 del 94%, 97% y 98%, respectivamente, se consiguieron a la concentración de 0,05µM de G2-STE16 + 0,1µM de TFV. Sin embargo, con MRV, para obtener un efecto inhibitor frente a los tres aislados del VIH-1 del 90%, 93% y 87%, respectivamente se necesitó utilizar la máxima concentración analizada de 0,5µM de G2-STE16 + 0,5µM de MRV (**Figura 74 A-C**).



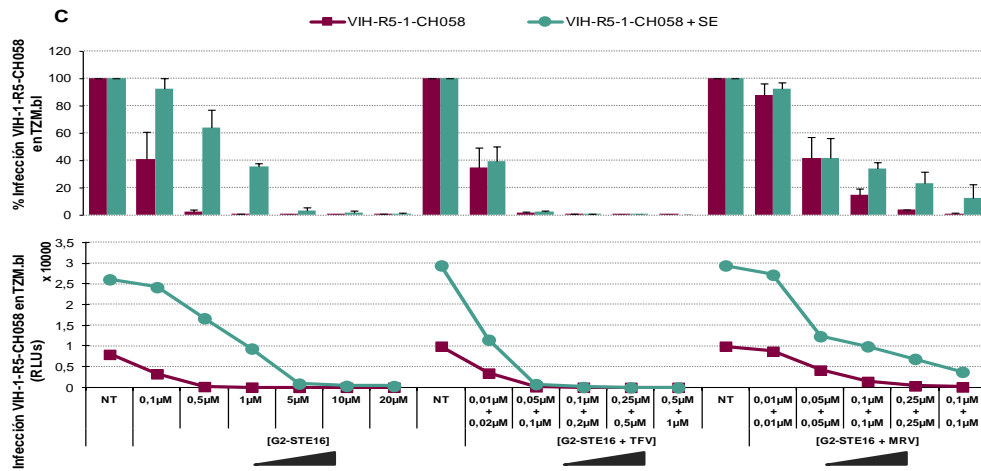
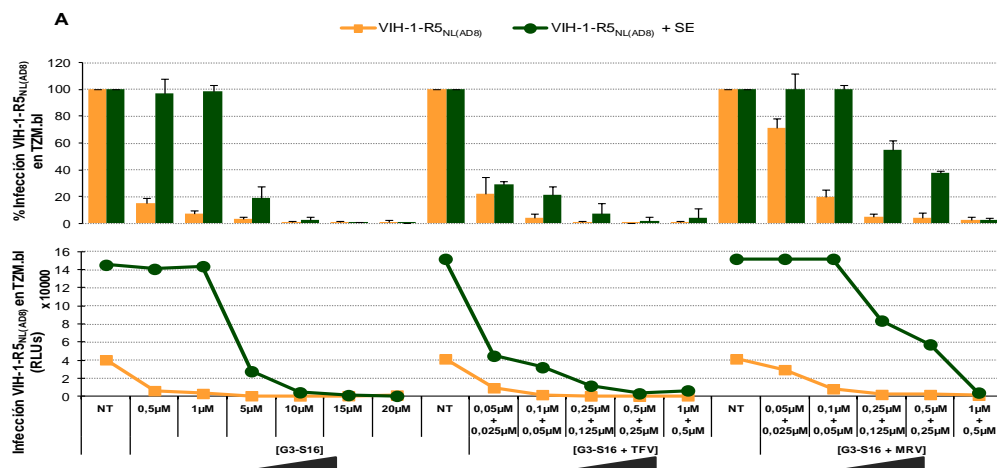


Figura 74. Efecto de SEVI sobre la actividad antiviral del dendrímero polianiónico carbosilano de segunda generación G2-STE16 solo y en combinación con ARV para bloquear la infección por aislados VIH-1 R5-trópicos en células TzM.bl. Las células se pre-trataron 1h con un gradiente de concentraciones de G2-STE16 desde 0,1µM a 20µM y en combinación con TFV y MRV en los ratios 1:2 y 1:1, respectivamente. Después de 1h, las células TzM.bl se infectaron con los aislados virales (A) VIH-1-R5_{NL(AD8)}, (B) VIH-1-R5-THRO y (C) VIH-1-R5-CH058 en ausencia y presencia de semen (SE) a una concentración de 20ng/10⁶células. La producción viral se cuantificó a las 48h post-infección por cuantificación de la expresión de la luciferasa. En los diagramas de barras (parte superior) se muestran los valores de los porcentajes de inhibición respecto a las células no tratadas y en los diagramas de puntos (parte inferior) se muestran los valores de infección por intensidad de luminiscencia (RLUs). Los datos representan la media ± SEM (n = 3).

El dendrímero G3-S16, es un dendrímero polianiónico carbosilano de tercera generación con grupos terminales sulfato³⁴². G3-S16 presentó mayor potencia anti-VIH-1 en presencia de las fibrillas amiloides del semen, con valores de inhibición frente a los aislados VIH-1-R5_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 del 93%, 96% y 82%, respectivamente, desde una concentración 5µM, menor que la que necesita el dendrímero de segunda generación G2-STE16. En cuanto a las combinaciones con TFV y MRV, los porcentajes de inhibición de la infección frente a los aislados VIH-1-R5_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 con TFV fueron de 92%, 94% y 97% respectivamente, a una concentración de 0,25µM G3-S16 + 0,125µM TFV, mientras que los valores de inhibición de la infección del 97 %, 92% y 78%, respectivamente, se obtuvieron con MRV a la concentración de 1µM G3-S16 + 0,5µM MRV en presencia de semen (Figuras 75 A-C).



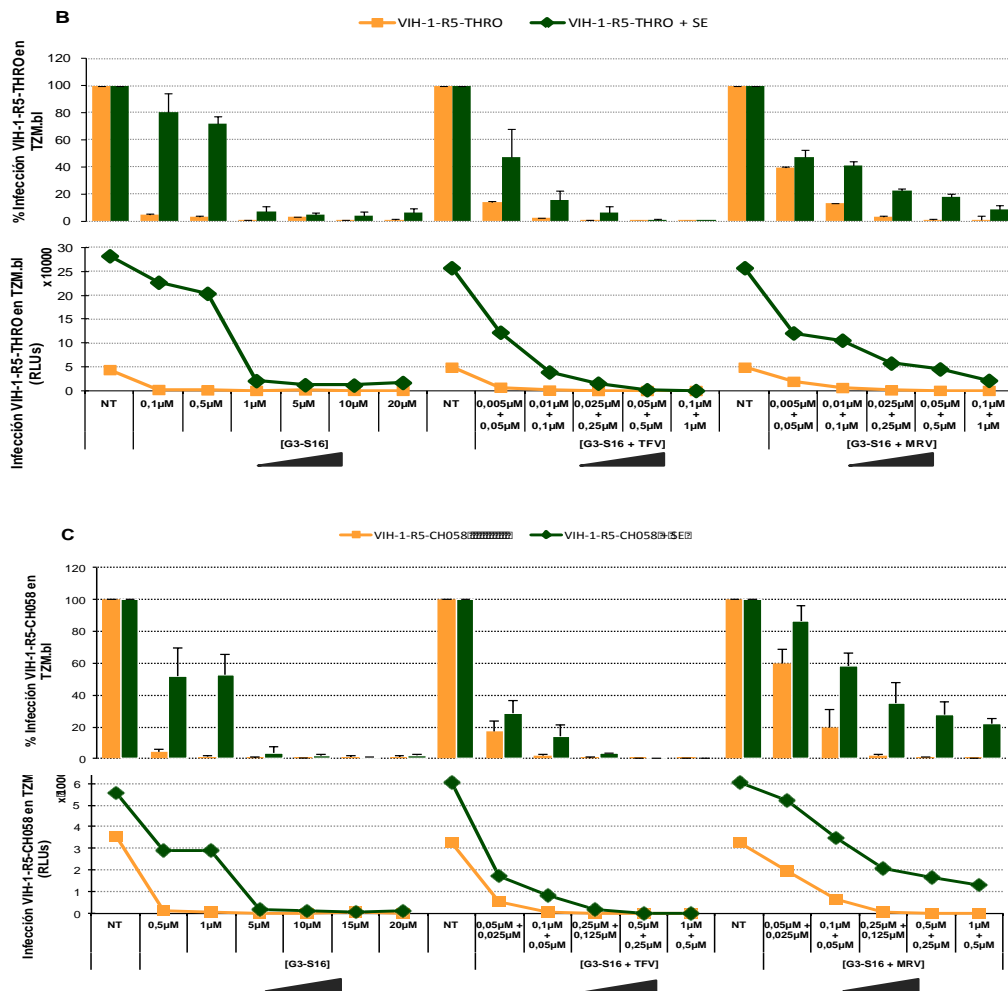


Figura 75. Efecto de SEVI sobre la actividad antiviral del dendrímero polianiónico carboxilano de tercera generación G3-S16 solo y en combinación con ARV para bloquear la infección por el VIH-1 R5-trópicos en células T2M.bl como microbicidas. Las células se pre-trataron 1h con un gradiente de concentraciones de G3-S16 desde 0,5µM a 20µM y en combinación con TFV y MRV en los ratios 2:1 y 2:1. Después de 1h, las células T2M.bl se infectaron con los aislados virales (A) VIH-R5-1_{NL(AD8)}, (B) VIH-1-R5-THRO y (C) VIH-1-R5-CH058 en ausencia y presencia de semen (SE) a una concentración de 20ng/10⁶células. La producción viral se cuantificó a las 48h post-infección por expresión de luciferasa. En los diagramas de barras (parte superior) se muestran los valores de los porcentajes de inhibición respecto a las células no tratadas y en los diagramas de puntos (parte inferior) se muestran los valores de infección por intensidad de luminiscencia (RLUs). Los datos representan la media ± SEM (n = 3).

Los ARV se analizaron en un rango de concentraciones desde 0,005µM a 1µM frente a los tres aislados VIH-1-R5_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058. En el caso del TFV, su efecto antiviral prácticamente no se modificó por su exposición al semen, con valores superiores al 90% de inhibición a concentración de 0,1µM frente a todos los aislados VIH-1 R5-trópicos, mientras que la capacidad de inhibición del MRV se alteró por la exposición al semen dependiendo del aislado viral, evitando la infección por VIH-1-R5_{NL(AD8)} en un 84% a 1µM, por VIH-1-R5-THRO en un 90% a 0,5µM y por VIH-1-R5-CH058 en un 60% a 1µM (dosis máxima analizada) (Figura 76 A-C).

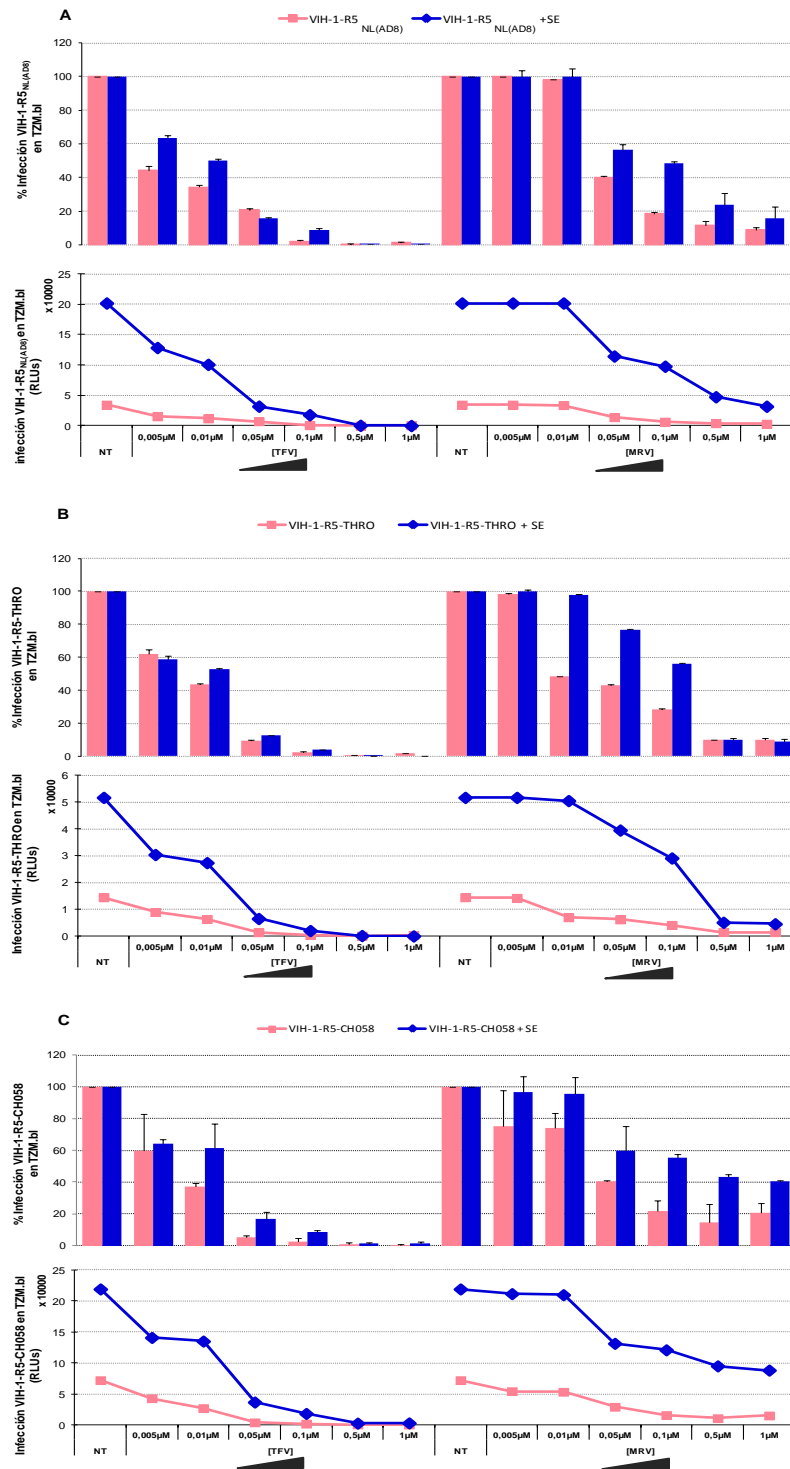


Figura 76. Efecto de SEVI sobre la actividad antiviral de los antirretrovirales TFV y MRV para bloquear la infección por el VIH-1 R5-trópicos en células TZM.bl. Las células se pre-trataron 1h con un gradiente de concentraciones de TFV y MRV desde 0,005 μ M a 1 μ M. Después de 1h, las células TZM.bl se infectaron con los aislados virales (A) VIH-1-R5_{NL(AD8)}, (B) VIH-1-R5-THRO y (C) VIH-1-R5-CH058 en ausencia y presencia de semen (SE) a una concentración de 20ng/10⁶células. La producción viral se cuantificó a las 48h post-infección midiendo la expresión de la luciferasa. En los diagramas de barras (parte superior) se muestran los valores de los porcentajes de inhibición respecto a las células TZM.bl no tratadas y en los diagramas de puntos (parte inferior) se muestran los valores de infección por intensidad de luminiscencia (RLUs). Los datos representan la media \pm SEM (n = 3).

Además, se determinó la eficacia y la potencia antiviral de los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16, de TFV y MRV y sus combinaciones frente a los aislados VIH-R5-1_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 expuestos o no a semen en las células TZM.bl en concordancia a la concentración necesaria para inhibir el 50% de infección (CI_{50}) (**Tabla 11**). El dendrímero G2-STE16 mostró los menores incrementos de CI_{50} frente a los tres aislados virales con un incremento de 31, 88 y 25, respectivamente, ya que su efecto inhibitorio se afectó menos por la presencia del semen. La menor actividad antiviral del G2-STE16 tanto en ausencia como en presencia de semen se confirmó de acuerdo con sus valores de CI_{50} para los tres aislados VIH-1 R5-trópicos 0,121 μ M vs. 3,718 μ M; 0,017 μ M vs. 1,486 μ M; 0,033 μ M vs. 0,810 μ M, respectivamente (**Tabla 11**). Aunque ambos dendrímeros presentaron un perfil inhibitorio similar, el incremento de CI_{50} que se observó para G3-S16 fue mucho mayor con un incremento de 688, 324 y 869 para los aislados VIH-1-R5_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058, respectivamente, debido a que el dendrímero G3-S16 tuvo mayor eficacia antiviral con valores de CI_{50} de 0,009 μ M, 0,005 μ M y 0,001 μ M en ausencia de semen en comparación con 6,027 μ M, 1,614 μ M y 0,635 μ M en presencia de semen, respectivamente (**Tabla 11**).

A pesar de la disminución en la capacidad inhibitoria de los dendrímeros por la presencia de las fibrillas amiloides en el semen, los dendrímeros permanecieron altamente activos frente a la infección por el VIH-1 a concentraciones no tóxicas.

Los ARV tuvieron la mejor eficacia con solo un incremento en la CI_{50} de 2 veces en presencia de semen en el ensayo de inhibición, excepto para MRV frente al aislado VIH-1-R5-CH058 que obtuvo un incremento de 8. Sin embargo, los valores de CI_{50} para TFV fueron menores frente a los aislados VIH-1-R5_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 (0,007 μ M vs. 0,016 μ M; 0,008 μ M vs. 0,012 μ M y 0,005 μ M vs. 0,010 μ M, respectivamente) respecto a los 0,287 μ M) en ausencia o presencia de semen (**Tabla 11**).

Independientemente del antirretroviral, los ratios de CI_{50} incrementaron entre 1 a 7 veces dependiendo de la potencia de la combinación de cada dendrímero con los ARV, indicando una recuperación de la capacidad antiviral en comparación con los dendrímeros solos. Aunque, en combinación con los ARV solo el dendrímero G2-STE16 presentó mejora en su capacidad antiviral, ya que el G3-S16 en combinación obtuvo mayores valores de CI_{50} . En cuanto a los ART, la capacidad de inhibición de ambos dendrímeros combinados con TFV siempre fue mayor que con MRV con menores valores de CI_{50} para todos los aislados VIH-1 R5-trópicos en presencia de SEVI.

En combinación con TFV frente al VIH-1-R5_{NL(AD8)}, G2-STE 16 mostró un incremento de 4 veces en su CI_{50} (0,005 μ M vs. 0,022 μ M), al contrario que G3-S16, el cual mantuvo sus valores de CI_{50} en 0,0035 μ M en ambas condiciones. Sin embargo, para los VIH-1 T/F el dendrímero de segunda generación mostró menores incrementos en los valores de CI_{50} que el de tercera generación en ausencia vs. presencia de semen, con un incremento de 3 (0,005 μ M vs. 0,0012 μ M) frente al VIH-1-R56-THRO y un incremento de 2 (0,008 μ M vs. 0,0013 μ M) frente al VIH-1-R5-CH058 para el G2-STE16 y un incremento del CI_{50} de 7 (0,010 μ M vs. 0,068 μ M) y 5 (0,011 μ M vs. 0,056 μ M), respectivamente, para G3-S16 (**Tabla 11**).

Compuestos	TZM.bl									CMSP		
	Cl ₅₀			Cl ₅₀			Cl ₅₀			Cl ₅₀		
	VIH-R5-1 _{NL(AD8)}	VIH-R5-1 _{NL(AD8)} + 10% SE	Fold Cl ₅₀	VIH-R5-1- THRO	VIH-R5-1- THRO +10% SE	Fold Cl ₅₀	VIH-R5-1- CH058	VIH-R5-1- CH058 + 10% SE	Fold Cl ₅₀	VIH-R5-1 _{NL(AD8)}	VIH-R5-1 _{NL(AD8)} +10% SE	Fold Cl ₅₀
G2-STE16	0,121 ± 0,014 μM	3,718 ± 2,095 μM	31	0,017 ± 0,010 μM	1,486 ± 1,234 μM	88	0,033 ± 0,015 μM	0,810 ± 0,445 μM	25	1,642 ± 1,311 μM	7,082 ± 1,248 μM	4
G2-STE16 + TFV	0,005 ± 0,002 μM	0,022 ± 0,005 μM	4	0,005 ± 0,004 μM	0,012 ± 0,007 μM	3	0,008 ± 0,005 μM	0,013 ± 0,001 μM	2	0,009 ± 0,002 μM	0,049 ± 0,006 μM	5
G2-STE16 + MRV	0,019 ± 0,007 μM	0,154 ± 0,016 μM	8	0,012 ± 0,001 μM	0,087 ± 0,099 μM	7	0,037 ± 0,001 μM	0,158 ± 0,020 μM	4	0,108 ± 0,011 μM	0,250 ± 0,012 μM	2
G3-S16	0,009 ± 0,219 μM	6,027 ± 4,192 μM	688	0,005 ± 0,005 μM	1,614 ± 0,865 μM	324	0,01 ± 0,000 0.02 μM	0,635 ± 0,182 μM	869	5,678 ± 0,315 μM	6,415 ± 0,097 μM	1
G3-S16 + TFV	0,035 ± 0,005 μM	0,036 ± 0,024 μM	1	0,010 ± 0,003 μM	0,068 ± 0,011 μM	7	0,011 ± 0,003 μM	0,056 ± 0,009 μM	5	0,024 ± 0,007 μM	0,053 ± 0,008 μM	2
G3-S16 + MRV	0,085 ± 0,048 μM	0,466 ± 0,009 μM	6	0,030 μM	0,051 μM	2	0,034 ± 0,012 μM	0,212 ± 0,015 μM	5	0,057 ± 0,000 μM	0,180 ± 0,004 μM	3
TFV	0,007 ± 0,001 μM	0,016 ± 0,003 μM	2	0,008 μM	0,012 μM	2	0,005 ± 0,001 μM	0,010 ± 0,008 μM	2	0,005 ± 0,005 μM	0,010 ± 0,010 μM	2
MRV	0,208 ± 0,011 μM	0,458 ± 0,051 μM	2	0,084 μM	0,206 μM	2	0,037 ± 0,012 μM	0,287 ± 0,170 μM	8	0,245 ± 0,000 μM	0,380 ± 0,453 μM	1,5

Tabla 11: Actividad antiviral de los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16 solos y en combinación con TFV o MRV frente a aislados VIH-1 R5-tropicos en presencia y ausencia de semen en células TZM.bl y CMSP. Valores e incrementos (Fold) de las Cl₅₀ de los dendrímeros polianiónicos carboxilano G2-STE16 y G3-S16 como antivirales frente a los aislados VIH-1-R5_{NL(AD8)}, VIH-1-R5-THRO y VIH-1-R5-CH058 expuestos a la presencia o ausencia de semen en los cultivos de células TZM.bl y CMSP. Cl₅₀: Concentración necesaria para inhibir el 50% de infección.

En combinación con MRV, los valores de CI_{50} para G2-STE16 y G3-S16 en presencia de semen frente al aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)} fueron 0,154 μ M y 0,466 μ M; para VIH-1-R5-THRO fueron 0,087 μ M y 0,051 μ M; y para VIH-1-R5-CH058 fueron 0,158 μ M y 0,212 μ M, y en ausencia de fibrillas mieloides en el cultivo fueron de 0,019 μ M y 0,085 μ M; 0,012 μ M y 0,030 μ M; y 0,037 μ M y 0,034 μ M, respectivamente, resultando unos ratios de CI_{50} para G2-STE16 de 8, 7 y 5 y para G3-S16 de 6, 2 y 5 (Tabla 11).

4.2. Perfil inhibitorio de los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16 y las combinaciones con ARV en células humanas primarias

Para confirmar los resultados en un modelo más fisiológico, se evaluaron los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16 frente al aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)} en CMSP. En primer lugar, se observó que los valores de inhibición eran ligeramente inferiores a los obtenidos en las células TZM.bl, pero con una tendencia similar. En presencia de semen, los dendrímeros alcanzaron su efecto antiviral a partir de concentraciones de 5 μ M para G2-STE16 y 10 μ M para G3-S16 con porcentajes de inhibición del 87% y 92%, respectivamente. Por el contrario, la capacidad protectora del TFV en CMSP frente al VIH-1 se vio alterada por la exposición del virus a las fibrillas amiloides del semen, con una inhibición del 74% a 1 μ M (máxima concentración analizada), en comparación con las células TZM.bl, que mostraron una eficacia del 90% a 0,1 μ M. El MRV mostró el mismo patrón observado en las células TZM.bl con un valor de inhibición del 90% a 1 μ M (Figura 77 A-C).

En las combinaciones con ARV realizadas en las CMSP se lograron mejores valores de inhibición con TFV que con MRV frente al aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)} expuesto al semen. G2-STE16 mostró un 82% de protección frente al VIH-1 a una concentración de 0,1 μ M + 1 μ M de TFV y G3-S16 inhibió la infección un 88% a una concentración de 0,05 μ M + 0,5 μ M de TFV. La eficacia inhibitoria de las combinaciones con MRV fue una inhibición del 90% para el G2-STE16 a 0,5 μ M + 0,5 μ M de MRV y del 93% para el G3-S16 a 1 μ M + 0,5 μ M MRV (Figura 77 A-B).

La capacidad de inhibición de los dendrímeros no se observó seriamente afectada por la presencia de semen en el cultivo celular, lo que condujo a mínimos cambios en los valores de CI_{50} con incrementos entre 1 y 5 veces. G2-STE16 mostró una CI_{50} de 1,642 μ M en ausencia y de 7,082 μ M en presencia de semen, con un incremento de 4; en combinación con TFV la CI_{50} fue de 0,009 μ M vs. 0,049 μ M, con un incremento de 5; y con MRV fue de 0,108 μ M vs. 0,250 μ M con un incremento de 2, respectivamente. La variación de CI_{50} para G3-S16 fue menos marcada por la exposición al semen, pero fue debido a que se obtuvieron peores valores de capacidad inhibitoria con una CI_{50} de 5,678 μ M en ausencia y de 6,415 μ M en presencia de SEVI, y en la combinación con TFV se produjo un incremento de 2 (0,024 μ M vs. 0,0053 μ M) y con MRV un incremento de 3 (0,057 μ M vs. 0,180 μ M). Para TFV y MRV solos, el incremento en los CI_{50} fue de 2 y 1,5, respectivamente. Sin embargo, cabe destacar que para el TFV la actividad antiviral se observó a baja concentración tanto en ausencia (0,005 μ M) como en presencia de semen (0,01 μ M), mientras que el MRV presentó valores más elevados (0,245 μ M vs. 0,380 μ M) (Tabla 11).

En resumen, los dendrímeros polianiónicos carboxilato son agentes antivirales eficaces frente a aislados virales VIH-1 R5-tropicos en ausencia o expuestos a semen, previniendo la infección en células TZM.bl y en CMSP a concentraciones no tóxicas, siendo mayor la eficiencia en combinación con los ARV estudiados, alcanzando su actividad anti-VIH-1 a concentraciones mínimas y sin apenas variaciones en los valores de sus CI_{50} .

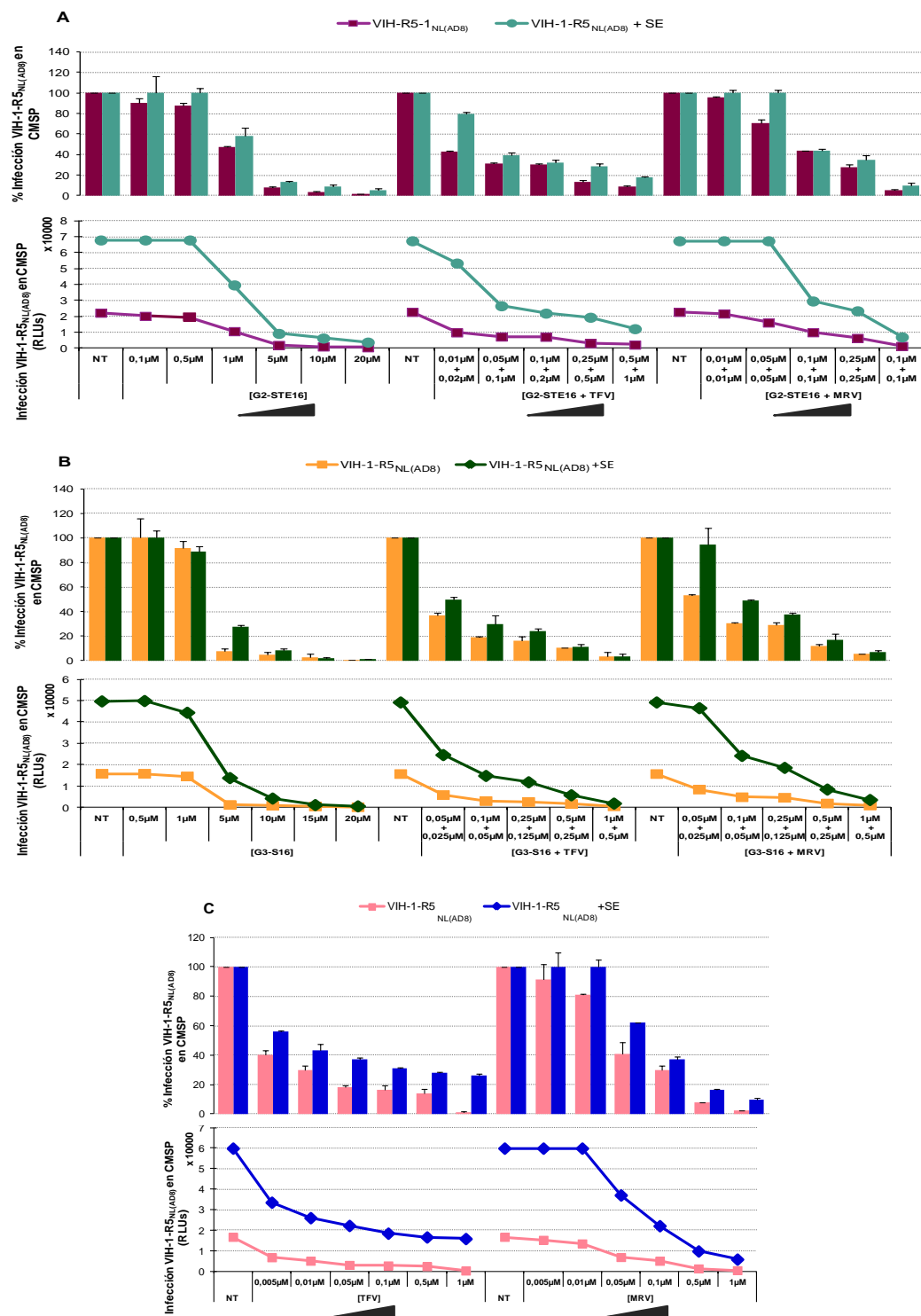


Figura 77. Efecto de SEVI sobre la actividad antiviral de los dendrímeros polianiónicos carboxilato G2-STE16 y G3-S16 solos y en combinación con ARV para bloquear la infección por el VIH-1_{NL(AD8)} en CMSP. Las células se pre-trataron 1h con un gradiente de concentraciones de (A) G2-S16 (0,1µM-20µM), (B) G3-STE16 (0,5µM-20µM) y en combinación con TFV en los ratios 1:2 y

2:1 y con MRV 1:1 y 2:1, respectivamente, así como con (C) TFV y MRV (0,005 μ M-1 μ M). Después de 1h, las CMSP se infectaron con el aislado viral VIH-1-R5_{NL(AD8)} en ausencia y presencia de semen (SE) a una concentración de 20ng/10⁶células. Tras 72h, se recolectaron los sobrenadantes y se presentaron sobre TZM.bl y la producción viral se midió a las 48h por cuantificación de la expresión de la luciferasa. En los diagramas de barras (parte superior) se muestran los valores de los porcentajes de inhibición respecto a las células no tratadas y en los diagramas de puntos (parte inferior) se muestran los valores de infección por intensidad de luminiscencia (RLUs). Los datos representan la media \pm SEM (n = 3).

9. Viabilidad del dendrímero G2-S16 en estadios embrionarios del pez cebra (PET)

La relación heterosexual sin protección es la primera ruta de transmisión del VIH-1, siendo responsable del 80% de las nuevas infecciones por el VIH-1 a nivel mundial. La presencia de inflamación en el tracto reproductivo femenino, aumenta el riesgo de transmisión heterosexual del VIH-1. El contacto del virus con las fibrillas amiloides presentes en el semen pueden aumentar transitoriamente la susceptibilidad a la infección por el VIH-1 al desencadenar una respuesta de inflamación localizada. Por ello, el siguiente planteamiento fue demostrar la bioseguridad del dendrímero G2-S16 en otro modelo animal, de modo, que en caso de atravesar la membrana epitelial no produzca toxicidad, seleccionando el embrión de pez cebra. En estos embriones pez cebra se realizó el ensayo FET para determinar cuál era la máxima dosis tolerada (MDT), la concentración letal 50 (LC₅₀) y la concentración mínima con efecto observado (LOEC) del dendrímero G2-S16. Los criterios de calidad establecidos para considerar como válido este ensayo fueron, una supervivencia de los huevos fertilizados en el grupo control y grupo vehículo mayor del 90% a las 96 horas post- fertilización (hpf) y una inducción de muerte mayor del 30% por el compuesto de referencia (3,4 – DCA) a las 96hpf. El ensayo realizado cumplió los criterios de calidad al obtenerse una supervivencia del 95,8% en el grupo control y del 100% en el grupo vehículo y una mortalidad del 45% de los animales con el compuesto de referencia (3,7 mg/L 3,4-DCA) a las 96hpf (**Tabla 12**).

A	CONTROLES				B	G2-S16				
	Tiempo (h)	24	48	72		96	Tiempo (h)	24	48	72
	Control	0	0	0	4,2	100 mg/L	0	0	0	0
	Vehículo	0	0	0	0	46 mg/L	5	5	5	5
	Control positivo	25	25	40	45	22 mg/L	0	0	5	10
						10 mg/L	0	0	0	0
						4,6 mg/L	5	5	5	5

Tabla 12. Porcentajes de mortalidad acumulativa en los embriones de pez cebra expuestos al dendrímero G2-S16. Los embriones se expusieron a 5 concentraciones del dendrímero G2-S16 (B), agua de dilución (AD, control), AD + 0,1% DMSO (vehículo) y 3,5 dicloroanilina (control positivo) (A) y se evaluó la viabilidad a 24, 48, 72 y 96h post-fertilización.

En primer lugar, se evaluó la mortalidad acumulativa en los embriones a las diferentes concentraciones del dendrímero G2-S16 a las 24, 48, 72 y 96h, sin registrarse mortalidad significativa en ninguna de las dosis de dendrímero G2-S16, siendo la supervivencia mayor del

90% en todos los casos (**Tabla 12**).

En segundo lugar se determinaron los efectos subletales definidos como ausencia de movimiento espontáneo, despigmentación, formación de edemas y/o formación de coágulos que indujo el dendrímero G2-S16 a cada concentración a los tiempos estudiados. Como se observa en la **Tabla 13** se registró 1 caso a las 96hpf en los grupos de 4,6mg/L, 10mg/L y 22mg/L, que se trató en todos los animales de edema de pericardio. En el resto de dosis y en los controles negativo y de vehículo, no se registró ningún efecto subletal. Por otra parte, el control positivo (3,4 DCA) a 3,7mg/L indujo la aparición de efectos subletales a partir de las 24hpf afectando a las 96hpf a un 35% del total de embriones (63,6% de los embriones viables).

A	Tiempo	CONTROLES				B	Tiempo	G2-S16			
		24	48	72	96			24	48	72	96
	Control	0	0	0	4,2		100 mg/L	0	0	0	0
	Vehículo	0	0	0	0		46 mg/L	0	0	0	0
	Control positivo	40	40	25	35		22 mg/L	0	0	0	5
							10 mg/L	0	0	0	5
							4,6 mg/L	0	0	0	5

Tabla 13. Porcentaje de embriones que sufren efectos subletales en función de la concentración del dendrímero G2-S16 y del tiempo de post-fertilización. Los embriones se expusieron a 5 concentraciones del dendrímero G2-S16 (B), agua de dilución (AD, control), AD + 0,1% DMSO (vehículo) y 3,5 dicloroanilina (control positivo) (A) y se evaluó la ausencia de movimiento espontáneo, despigmentación, formación de edemas y/o formación de coágulos a 24, 48, 72 y 96h post-fertilización.

9.1. Efectos teratogénicos del dendrímero G2-S16 a diferentes concentraciones y tiempos post-fertilización

Adicionalmente, se determinaron los efectos teratogénicos que indujo el dendrímero G2-S16 con cada una de las concentraciones evaluadas a los cuatro tiempos estudiados.

A	Tiempo	CONTROLES				B	Tiempo	G2-S16			
		24	48	72	96			24	48	72	96
	Control	0	0	0	0		100 mg/L	0	0	0	0
	Vehículo	0	0	0	0		46 mg/L	0	0	0	0
	Control positivo	40	40	25	20		22 mg/L	0	0	0	5
							10 mg/L	0	0	0	5
							4,6 mg/L	0	0	5	5

Tabla 14: Porcentaje de embriones de pez cebra con efectos teratogénicos en presencia del dendrímero G2-S16. Los embriones se expusieron a 5 concentraciones del dendrímero G2-S16 (B), agua de dilución (AD, control), AD + 0,1% DMSO (vehículo) y 3,5 dicloroanilina (control positivo) (A) y se evaluaron las malformaciones de órganos y estructuras, escoliosis, raquitismo y/o retardo generalizado del crecimiento a 24, 48, 72 y 96h post-fertilización.

Como se observa en la **Tabla 14** se registró 1 caso teratogénico a las 96hpf en los

grupos de 22mg/L, 10mg/L y 4,6mg/L. En todos los casos se trataba de malformación de la cola que en el grupo de baja concentración 4,6mg/L ya era evidente a las 72hpf. En las otras concentraciones y en los controles negativo y de vehículo, no se registró ningún efecto teratogénico. El control positivo (3,4 DCA) a 3,7 mg/L indujo la aparición de efectos teratogénicos a partir de las 24 hpf afectando a las 96 hpf a un total de 4 embriones (36,4% de los embriones viables) (Figura 78).

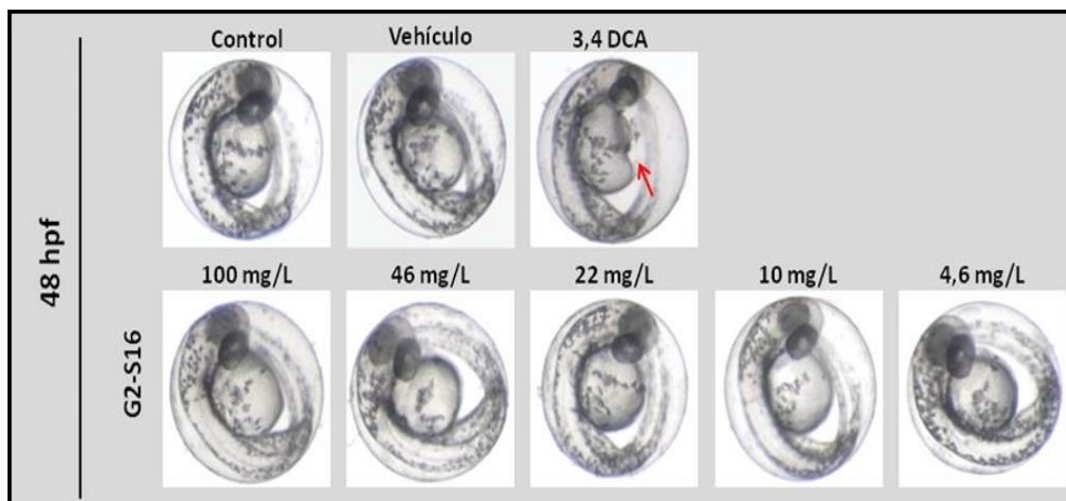


Figura 78: Imágenes estereomicroscópicas de los embriones de pez cebra expuestas al dendrímero a las 5 concentraciones de estudio del G2-S16, agua de dilución (AD, control), AD + 0,1% DMSO (vehículo) y 3,5 dicloroanilina (control positivo) a las 48h post-fertilización. Presencia de malformaciones (flecha roja).

9.2. Porcentaje de eclosión de los embriones en función de la concentración del dendrímero G2-S16 y el tiempo de estudio

A las 72hpf, se produce el proceso denominado decorionización del embrión, es decir, la ruptura del corion (membrana que rodea al embrión) para comenzar el proceso de estadio larvario, considerándose este parámetro como un marcador toxicológico adicional al estudio FET. Este fenómeno se considera muy importante para el estudio de toxicidad en el modelo del pez cebra, ya que, muestra la capacidad que tiene un compuesto de acelerar o retrasar el proceso de eclosión, el cual, está estrechamente relacionado con el desarrollo del embrión³⁹².

Se analizó por microscopía la decorionización de los embriones en cada una de las concentraciones del dendrímero G2-S16 analizadas (Figura 79).

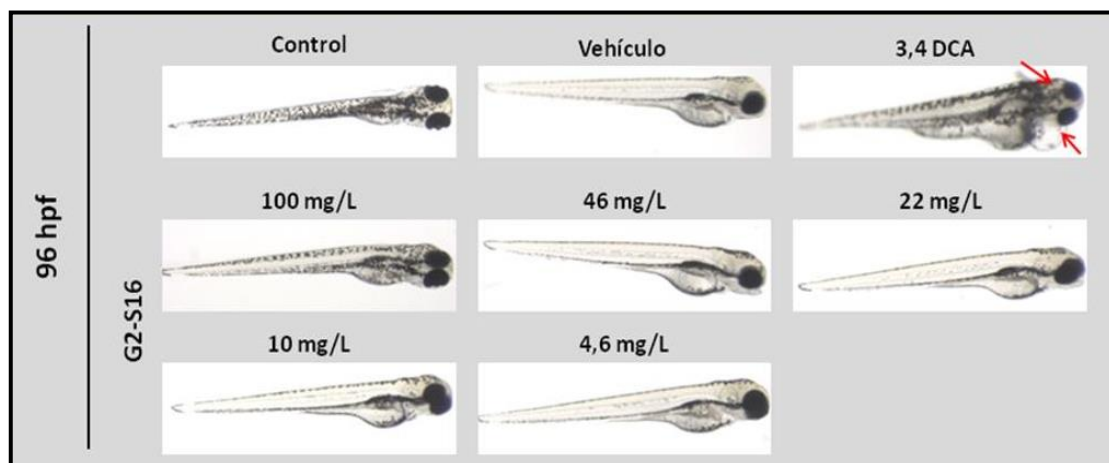


Figura 79: Imágenes estereomicroscópicas de los embriones de pez cebra expuestos al dendrímero G2-S16 a las 96 hpf. Se muestran imágenes representativas de los embriones de pez cebra sometidos a las 5 concentraciones de estudio del G2-S16, agua de dilución (AD, control), AD + 0,1% DMSO (vehículo) y 3,5 dicloroanilina (control positivo) a las 96h post-fertilización. Presencia de malformaciones (flecha inferior) y formación de edemas (flecha superior).

En la **Tabla 15** se observa que el porcentaje de eclosión en los embriones viables no se afectó en ninguna de las concentraciones utilizadas del dendrímero G2-S16, siendo del 100% en todos los grupos al finalizar el estudio.

A	Tiempo	CONTROLES			
		24	48	72	96
	Control	0	0	83,3	100
	Vehículo	0	0	100	100
	Control positivo	0	0	50	100

B	Tiempo	G2-S16			
		24	48	72	96
	100 mg/L	0	0	85	100
	46 mg/L	0	0	52,6	100
	22 mg/L	0	0	84,2	100
	10 mg/L	0	0	90	100
	4,6 mg/L	0	0	89,5	100

Tabla 15: Porcentajes de eclosión de los embriones viables en función de la concentración del dendrímero G2-S16 y del tiempo post-fertilización. Los embriones se expusieron a 5 concentraciones del dendrímero G2-S16 (**B**), agua de dilución (AD, control), AD + 0,1% DMSO (vehículo) y 3,5 dicloroanilina (control positivo) (**A**) y se evaluó la eclosión de los embriones a 24, 48, 72 y 96h post-fertilización

9.3. Determinación de los parámetros de concentración letal 50 y concentración máxima sin efecto y mínima con efecto

La **tabla 16** muestra los parámetros de concentración letal 50 (LC₅₀), concentración mínima con efecto observado (LOEC) y concentración máxima sin efecto observado (NOEC), también denominada como máxima dosis tolerada (MDT) a las 48 y 96hpf del dendrímero G2-S16. No se ha registrado ninguna anomalía ni mortalidad significativa en los embriones ya que los parámetros toxicológicos se encuentran por encima de la máxima concentración analizada.

	G2-S16	
	48hpf	96hpf
LC ₅₀	> 100 mg/L	
LOEC	> 100 mg/L	
NOEC	> 100 mg/L	

Tabla 16: Parámetros LC₅₀, LOEC y NOEC a 48 y 96hpf del dendrímero G2-S16. LC₅₀: concentración letal 50; LOEC: concentración mínima con efecto observado; NOEC: concentración máxima sin efecto observado.

10. Viabilidad y actividad antiviral de dendrones y nanopartículas de oro dendronizadas

10.1. Viabilidad de los dendrones y nanopartículas de oro analizadas

El dendrímero G2-S16 ha mostrado la mayor potencia para la formulación como gel microbicida frente al VIH-1 y VHS-2³⁴⁶⁻³⁵⁰ sin embargo, el elevado número de pasos sintéticos necesarios para su producción, es un notable inconveniente para llevarlo a gran escala hacia la clínica. Por ello, se han desarrollado otras estrategias sintéticas en la preparación de sistemas aniónicos como la adición tio-enol que también aporta propiedades anti-VIH-1³⁹⁰ y sistemas como los dendrones³⁷⁸. Los dendrones son moléculas similares a los dendrímeros con propiedades análogas, sin embargo, presentan forma cónica que les confiere dos funciones una sobre su superficie dendrónica con el mismo diseño funcional que los dendrímeros y otra en su punto focal con diferente funcionalidad, tales como anclaje³⁹³, modificador de las propiedades poliméricas o estabilizador para mejorar la actividad biológica³⁵⁹. Los dendrones tienen la capacidad de transformar la multivalencia en sistemas nanoscópicos mediante el proceso de dendronización³⁹³, sin necesidad de la síntesis de sistemas de alta generación.

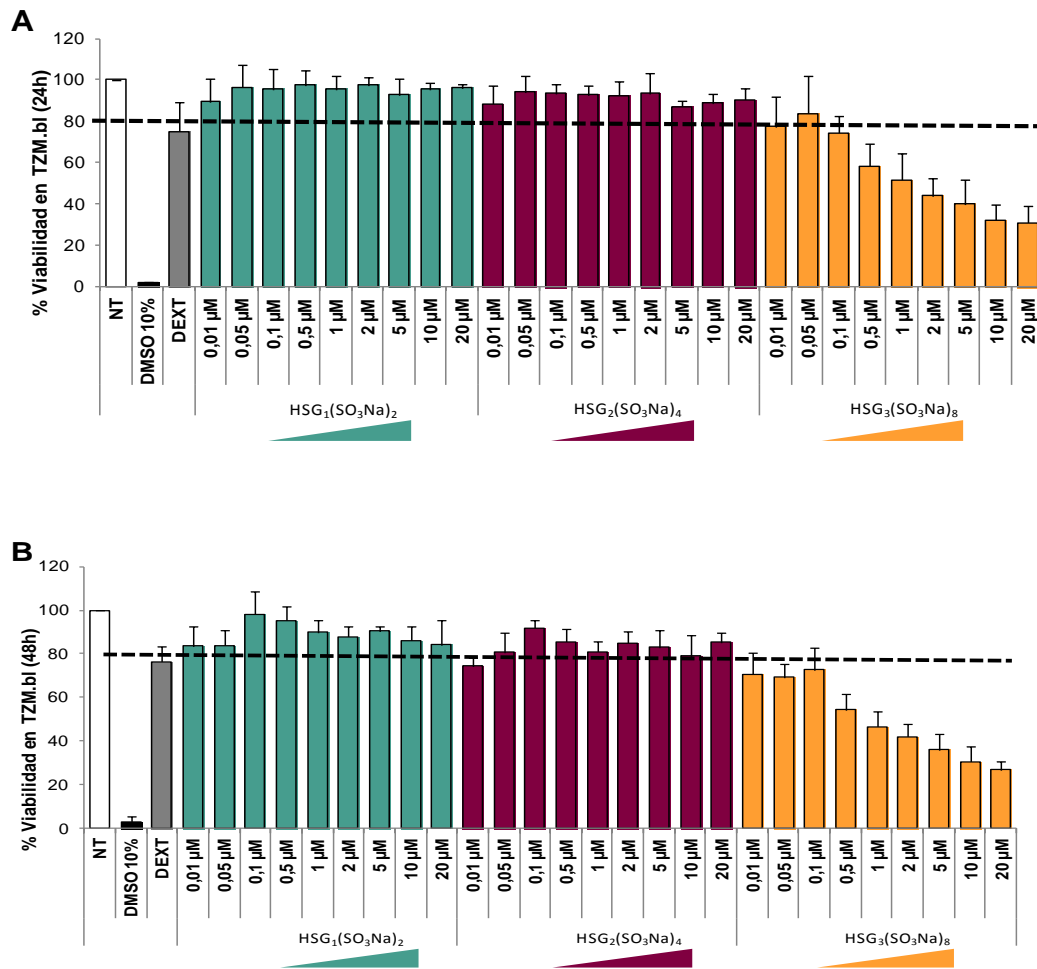
En esta Memoria se han empleado los dendrones de tipo carbosilano aniónicos con grupos sulfonatos en su superficie dendrónica y función tiol en su punto focal, HSG1(SO₃Na)₂, HSG2(SO₃Na)₄ y HSG3(SO₃Na)₈, y sus AuNPs Au@(SG1(SO₃Na)₂), Au@(SG2(SO₃Na)₄) y Au@(SG3(SO₃Na)₈) tras su estabilización con oro, como nuevas posibles terapias alternativas frente al VIH-1 en potenciales microbicidas.

Se analizó la viabilidad celular de los nanocompuestos mediante el ensayo de actividad metabólica MTT. Los dendrones y las AuNPs se testaron en la línea celular TZM.bl en un gradiente de concentración desde 0,01μM a 20μM y 0,01μg/mL a 100μg/mL, respectivamente a las 24h y 48h de tratamiento. Las concentraciones de los nanocompuestos cuya viabilidad celular fue mayor del 80% respecto al control sin tratamiento se consideraron como viables o no tóxicas (**Figura 80**).

Los dendrones HSG1(SO₃Na)₂ y HSG2(SO₃Na)₄ mostraron viabilidad a la máxima concentración analizada de 20μM. Sin embargo, el dendrón de tercera generación HSG3(SO₃Na)₈ fue tóxico a todas las concentraciones analizadas, por lo que se descartó para el siguiente ensayo de inhibición de la infección por el VIH-1 (**Figura 80 A-B**).

Las AuNPs, Au@(SG1(SO₃Na)₂) mostraron viabilidad hasta la concentración de 10µg/mL, las Au@(SG2(SO₃Na)₄) hasta la concentración de 1µg/mL y las Au@(SG3(SO₃Na)₈) hasta la concentración de 0,5µg/mL en células TZM.bl (Figura 80 C-D).

También se analizó la biocompatibilidad de las AuNPs tras 48h de tratamiento en células primarias humanas, CMSP, en un rango de concentración desde 1µg/mL a 100µg/mL, mostrando en todas las concentraciones valores de viabilidad superior al 95%, por lo que se seleccionó la concentración de 100µg/mL como la concentración viable en las CMSP (Figura 80E).



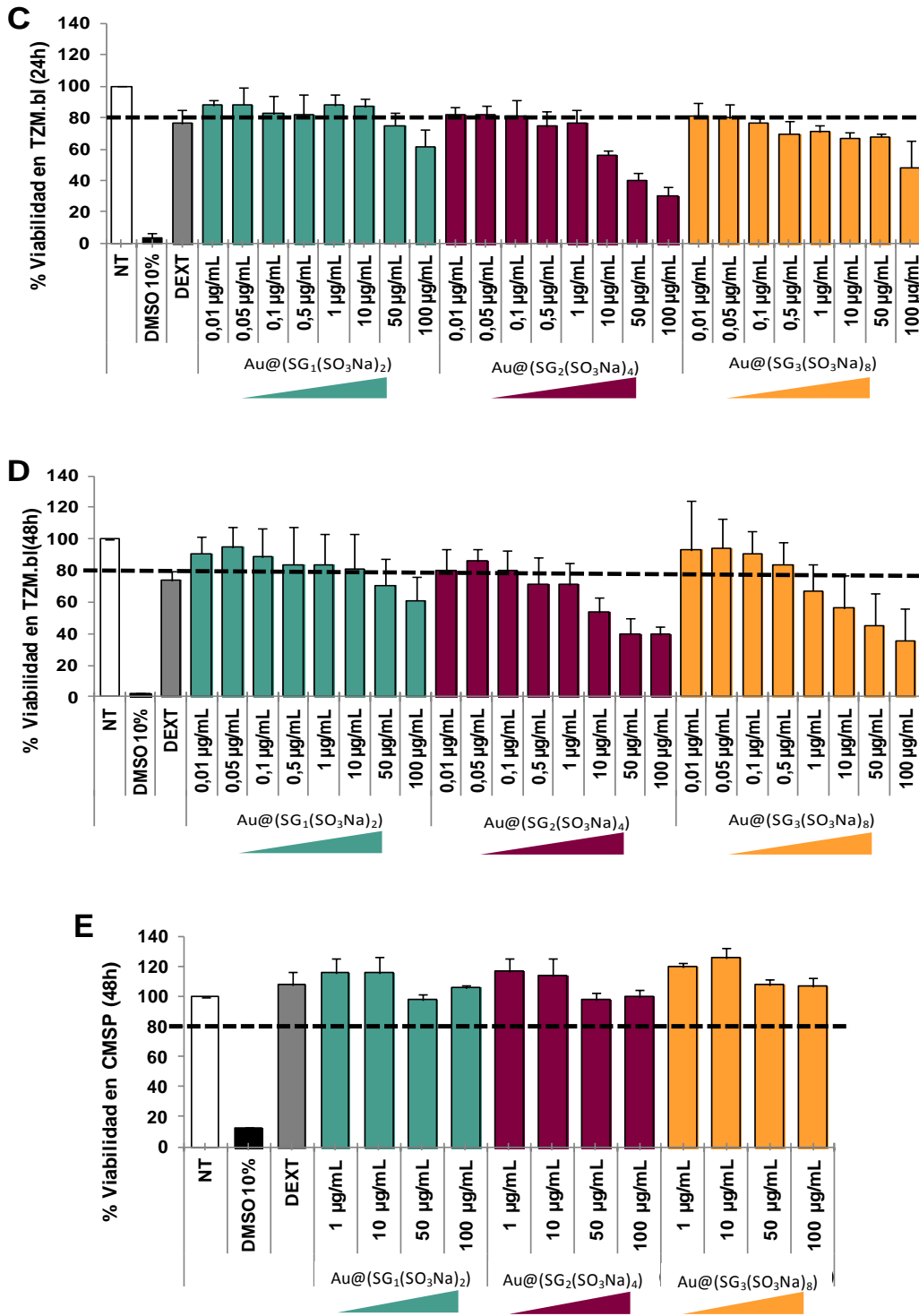


Figura 80. Viabilidad de los dendrones y nanopartículas carbosilano aniónicas de oro. Las células TZM.bl se incubaron en presencia de un gradiente de concentraciones desde 0,01µM a 20µM de los dendrones y 0,01µg/mL a 100 µg/mL de las AuNPs durante 24h (A, C) o 48h (B, D), y la CMSP desde 1µg/mL a 100 µg/mL de las AuNPs durante 48h (E). Como control negativo de muerte se utilizó dextrano a 10µM (polímero inocuo) y como control positivo de toxicidad DMSO al 10%. El límite de toxicidad celular se estableció por la línea discontinua en 80%. Los datos representan la media± SEM (n=3).

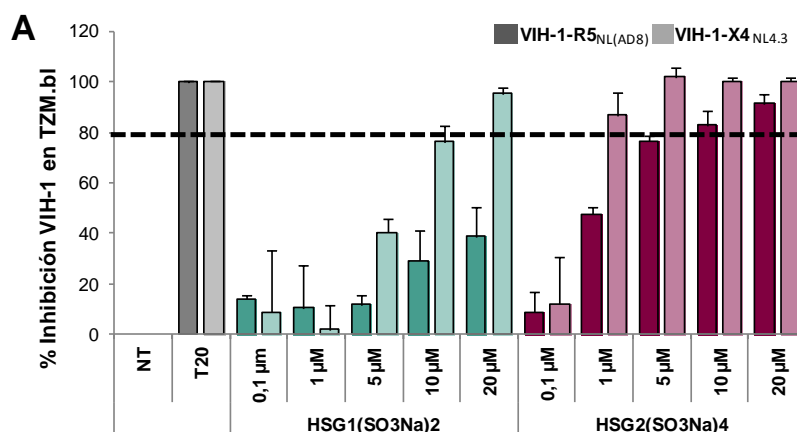
10.2. Actividad antiviral de los dendrones y nanopartículas de oro analizadas

Se evaluó la actividad antiviral de los dendrones y las AuNPs frente a los aislados de laboratorio VIH-1-R5_{NL(AD8)} y VIH-1-X4_{NL4.3} en la línea celular TZM.bl mediante método de cuantificación de infección viral por la actividad luciferasa. Los dendrones HSG1(SO₃Na)₂ y HSG2(SO₃Na)₄ inhibieron la replicación del aislado VIH-1-X4_{NL4.3} *in vitro* (**Figura 81A**) con una CI₅₀ de 4,16μM y 0,29μM, respectivamente. El efecto inhibitorio frente al aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)} sólo se observó en el dendrón de segunda generación HSG1(SO₃Na)₂ con una CI₅₀ de 1,35μM (**Tabla 17**). Las AuNPs presentaron un perfil similar de inhibición a los dendrones frente a los dos aislados virales. Los valores de infectividad menores del 20% se encontraron en el rango de 0,5μg/mL a 10μg/mL para Au@(SG1(SO₃Na)₂) y 0,1μg/mL a 0,5μg/mL para Au@(SG3(SO₃Na)₈), mientras que la AuNP de segunda generación Au@(SG2(SO₃Na)₄) presentó menor capacidad inhibitoria de la infección por el VIH-1, mostrando efecto antiviral del 80% solo a la concentración de 1μg/mL frente al aislado viral VIH-1-R5_{NL(AD8)}. Sin embargo, teniendo en cuenta los valores CI₅₀ (**Tabla 17**), el efecto inhibitorio fue mayor frente al aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)} que frente al VIH-1-X4_{NL4.3} para Au@(SG2(SO₃Na)₄) (0,11μg/mL vs. 0,22μg/mL) y Au@(SG3(SO₃Na)₈) (0,005μg/mL vs. 0,01μg/mL), a diferencia de Au@(SG1(SO₃Na)₂) (0,54μg/mL vs. 0,09μg/mL). Los resultados muestran que los dendrones tienen menor eficiencia como inhibidores de la infección por el VIH-1 que las nanopartículas de oro.

Compuesto	CI ₅₀ VIH-1-R5 _{NL(AD8)}	CI ₅₀ VIH-1-X4 _{NL4.3}
HSG1(SO ₃ Na) ₂	--- *	4,16μM
HSG2(SO ₃ Na) ₄	1,35μM	0,29μM
Au@(SG1(SO ₃ Na) ₂)	0,54μg/mL	0,09μg/mL
Au@(SG2(SO ₃ Na) ₄)	0,11μg/mL	0,22μg/mL
Au@(SG3(SO ₃ Na) ₈)	0,005μg/mL	0,01μg/mL

*Valor de CI₅₀ no disponible para HSG1(SO₃Na)₂ frente a los aislados virales VIH-1-R5_{NL(AD8)} y VIH-1 X4_{NL4.3}

Tabla 17. Efecto antiviral de los dendrones HSG1(SO₃Na)₂ y HSG2(SO₃Na)₄ y las nanopartículas de oro Au@(SG1(SO₃Na)₂), Au@(SG2(SO₃Na)₄) y Au@(SG3(SO₃Na)₈) frente al VIH-1-R5_{NL(AD8)} y al VIH-1-X4_{NL4.3}. Valores de concentración de los nanocompuestos cuya inhibición de la infección por el VIH-1 es del 50% (CI₅₀).



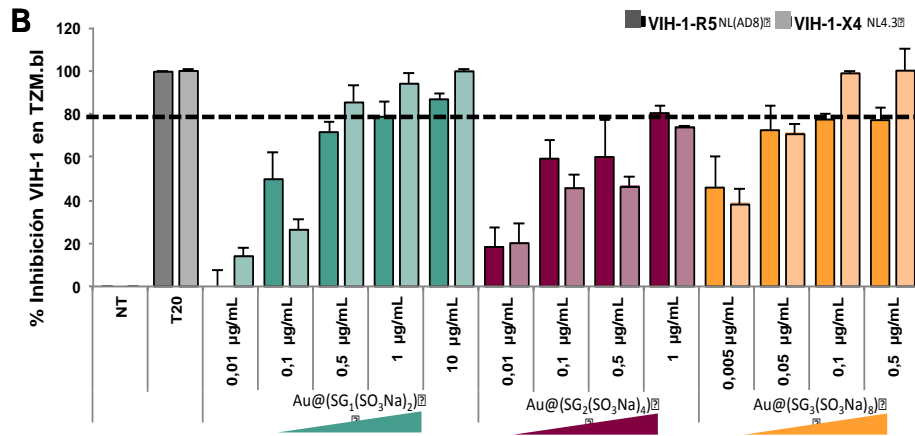


Figura 81. Inhibición de la infección por VIH-1-R5_{NL(AD8)} y VIH-1-X4_{NL4.3} en T2M.bl por los dendrones y nanopartículas aniónicas de oro. Se pre-trataron las células T2M.bl con un gradiente de concentraciones viables de los dendrones HSG₁(SO₃Na)₂ y HSG₂(SO₃Na)₄ (A) y nanopartículas de oro Au@(SG₁(SO₃Na)₂), Au@(SG₂(SO₃Na)₄) y Au@(SG₃(SO₃Na)₈) (B), durante 1h antes de la infección con los aislados VIH-1 R5 y X4 a la concentración de 20ng/10⁶células. Se lisaron las células T2M.bl y se determinaron los niveles de replicación viral a las 48h cuantificando la actividad luciferasa. Se utilizó el inhibidor de fusión del VIH-1 T20 a 20µM como control de la inhibición de la infección. La línea discontinua corresponde al 80% de efecto inhibitorio de la infección por el VIH-1. Se representa la media± SEM (n=3).

Para conocer el potencial que podrían tener las nanopartículas de oro como agente virucida, se analizaron en un modelo celular más fisiológico en CMSP estimuladas con PHA y con el aislado VIH-1-R5_{NL(AD8)}, ya que, es el virus mayoritario en la etapa de primoinfección en nuevas infecciones, a la concentración máxima viable de 100µg/mL. Los sobrenadantes de las CMSP pre-tratadas con las tres nanopartículas aniónicas de oro aniónicas se recogieron a las 72h post-infección y se cuantificó el antígeno p24 de la cápside viral por ELISA. Como se muestra en la **figura 82**, solo Au@(SG₃(SO₃Na)₈) presentó actividad antiviral frente al VIH-1-R5_{NLAD8}, frenando la infección alrededor del 80%, sin embargo las AuNPS de primera y segunda generación no inhibieron la replicación del VIH-1 en las células primarias humanas a la máxima concentración no tóxica.

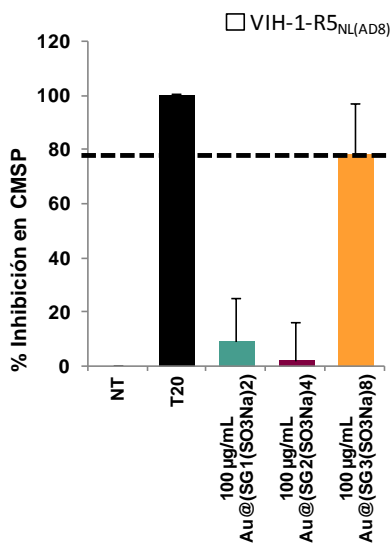
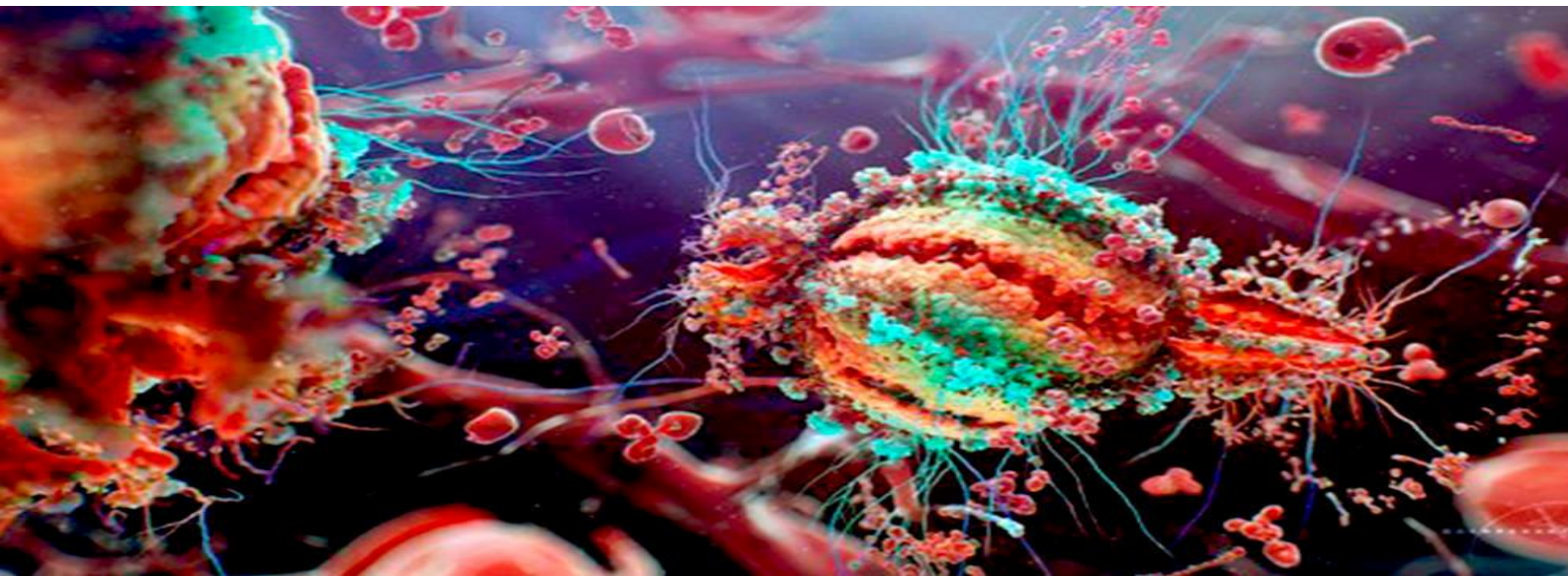


Figura 82. Inhibición de la infección por el VIH-1-R5_{NLAD8} en CMSP pre-tratadas con nanopartículas carboxilato aniónicas de oro. Las CMSP se pre-trataron durante 1h con las nanopartículas aniónicas Au@(SG₁(SO₃Na)₂), Au@(SG₂(SO₃Na)₄) y Au@(SG₃(SO₃Na)₈) a la concentración de 100µg/mL. Después, se infectaron las CMSP con 50ng/10⁶ células del VIH-1-R5_{NL(AD8)} durante 3h y se cuantificó la infección en el sobrenadante de las CMSP por ELISA de Ag p24^{gag} a las 72h. El inhibidor de fusión del VIH-1 T20 a 20µM se utilizó como control de inhibición de la infección de las CMSP. La línea discontinua corresponde al 80% de efecto inhibitorio de la infección por el VIH-1. Se representa la media± SEM (n=3).

5

DISCUSIÓN



SECCIÓN I: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS VIH/VHC

Durante la evolución de la hepatitis C crónica, la progresión de la fibrosis y la cirrosis hepática conlleva el desarrollo de complicaciones específicas de la enfermedad hepática avanzada con diferentes mecanismos inmunopatológicos, consecuencias de la disfunción inmune asociada a la cirrosis (CIAD)^{194,195}. En el CIAD aparecen alteraciones de la inmunidad innata y adaptativa, que abarcan desde el reconocimiento antigénico, a los mecanismos efectores y reguladores¹⁹⁴. Esta disfunción inmune favorece la persistencia de la inflamación que conduce a la progresión de la fibrosis hepática y al desarrollo de diferentes complicaciones (hipertensión portal y encefalopatía hepática). La consecuencia más severa del desequilibrio en los procesos pro- y anti-inflamatorios es el desarrollo de una disfunción inmune, con mayor translocación bacteriana y susceptibilidad a las infecciones, y el fracaso hepático agudo sobre crónico (ACLF)¹⁹⁵.

En esta Memoria se muestra una visión detallada de diversos marcadores relacionados con inmunidad innata y adquirida, translocación bacteriana, coagulación, inflamación y riesgo cardiovascular, en dos grupos control, sujetos sanos y pacientes mono infectados VIH en TARc, y en un grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC en distintos estadios de fibrosis que van desde la ausencia o presencia de fibrosis leve (<7,1 kPa) a la cirrosis avanzada compensada (>40 kPa). En este último grupo, en primer lugar, se analizó la asociación de la rigidez hepática, como variable continua, con los marcadores de sangre periférica; y en segundo lugar, se compararon los diferentes estadios de fibrosis/cirrosis de los pacientes coinfectados VIH/VHC. Destacar que no se encontraron diferencias relevantes, en los distintos marcadores analizados, entre pacientes con ausencia o presencia de fibrosis leve (F0/F1; <7,1 kPa), fibrosis significativa (F2; 7,1-9,4 kPa) y fibrosis avanzada (F3; 9,5-12,4 kPa) (datos no mostrados). Sin embargo, estos grupos (F0-F3) sí mostraron diferencias significativas relevantes con el grupo de pacientes con cirrosis (F4; ≥12,5 kPa), especialmente con el grupo que tenía valores de ≥40 kPa. Por ello, se reunieron a todos los pacientes coinfectados VIH/VHC con valores <12,5 kPa (F0-F3) en un solo grupo, ya que podrían servir de referencia para comparar frente a otros 3 grupos de pacientes cirróticos con valores mayores de rigidez hepática (12,5-25 kPa, 25-40 kPa, y >40 kPa).

El análisis estadístico se realizó primero sin ajustar y posteriormente ajustando por las principales características clínicas y epidemiológicas recogidas en el estudio, obteniendo datos crudos (análisis univariante) y valores estimados (modelos multivariantes). Sin embargo, en esta Memoria se ha dado más relevancia a los resultados obtenidos en los modelos multivariantes, por estar ajustados y mostrar valores menos sesgados que en el análisis univariante.

En esta Memoria se mostró que los valores de células T virgen, CD4+CD28+CD45RA+ y CD8+CD28+CD45RA+, estaban disminuidos levemente respecto a los controles sanos. Cuando las células T encuentran sus respectivos antígenos comienzan a diferenciarse en distintos tipos de células de memoria, pero la mayoría mueren transcurrido un tiempo y solo un pequeño porcentaje se mantienen en el organismo³⁹⁴. Este proceso de muerte celular inducida por apoptosis es un mecanismo general de homeostasis inmune a través de la regulación negativa de la expansión clonal de células activadas³⁹⁴. Sin embargo, la amplia diversidad del repertorio de células T del huésped debe ser preservada o el repertorio original se agotaría por sucesivos

encuentros con el patógeno^{395,396}. Para ello, existen dos mecanismos fisiológicos, la reposición continua de las células T virgen (timo) y el mantenimiento homeostático de la población de células T virgen (ganglios linfáticos periféricos)³⁹⁵⁻³⁹⁷; siendo este último el principal mecanismo de mantenimiento homeostático en los adultos^{396,398}. Bajo estos supuestos, los datos presentados en esta memoria podrían estar indicando una expansión clonal de las células T virgen en los pacientes coinfectados VIH/VHC, hecho que se vería reflejado en un porcentaje de células T virgen en sangre periférica similar a los de los grupos control, a pesar de la replicación activa del VHC, translocación bacteriana, y la generación continua de células T de memoria. Sin embargo, aún no se dispone de datos para verificar esta hipótesis, se tiene pendiente la determinación de TRECs (de sus siglas en inglés, *T-cell receptor excision circles*), cuya presencia indicaría un estadio temprano de maduración de la célula T.

La infección crónica por VIH dirige el desarrollo de las células T hacia estadios avanzados de diferenciación y agotamiento, acumulándose en el organismo³⁹⁵. Por otro lado, estudios sobre las células T CD8+ específicas en pacientes coinfectados VIH/VHC sugieren un fenotipo de memoria central en respuesta al VHC, probablemente debido al tropismo de los virus, ya que el VHC no infecta primariamente a las células T²⁴⁹; en concordancia con los valores de células T de memoria temprana (MTe), CD4+CD45RA-CD28+ y CD8+CD45RA-CD58+, que se han mostrado en los pacientes coinfectados VIH/VHC. Por el contrario, los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más bajos de células T de memoria tardía (MTa) CD4+CD45RA-CD28- y memoria en fase terminal (TEMRA), CD4+CD45RA+CD28- y CD8+CD45RA-CD28- que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Estos valores más bajos de células T memoria en estadios avanzados de diferenciación en los pacientes coinfectados VIH/VHC podrían deberse a que dichas células son retenidas en el hígado y eliminadas por apoptosis^{399,400}.

Cuando se analizaron los pacientes coinfectados VIH/VHC en función de su grado de rigidez hepática, no se encontró asociación significativa de las células T CD4+ y CD8+ virgen y memoria tardía. Sin embargo, las células T CD8+ memoria temprana disminuyeron a medida que aumenta el estadio de rigidez hepática y las células T CD8+ TEMRA tuvieron una asociación inversa. Cuando se estratificaron los pacientes coinfectados VIH/VHC por estadios de fibrosis, esta relación inversa entre la rigidez hepática y las células T CD4+ y CD8+ de memoria temprana, y directa con las células T CD4+ y CD8+ TEMRA se hizo más patente en los sujetos con >40 kPa.

La activación del sistema inmune es uno de los principales mecanismos patogénicos de la infección por el VIH y el VHC, siendo especialmente relevante el estudio de los marcadores de activación CD38 y HLADR en células T, los cuales definen la activación crónica del sistema inmune relacionado con progresión a SIDA, aparición de comorbilidades y muerte en pacientes infectados por VIH⁴⁰¹⁻⁴⁰³. La hepatitis C crónica también puede inducir activación crónica del sistema inmune, incrementando la expresión de CD38 y HLADR en las células T CD8+ de sangre periférica respecto a controles sanos^{404,405}, y pudiendo regresar a valores normales después de eliminar el VHC⁴⁰⁵. Además, los pacientes coinfectados VIH/VHC tienen niveles de activación inmune más elevados que los pacientes mono infectados VIH⁴⁰⁶. En esta Memoria, la coinfección VIH/VHC se asoció con mayor activación inmune, ya que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más elevados, de células T activadas que los controles sanos y los pacientes mono infectados VIH, tanto CD4+ (CD38+HLADR- y CD38+HLADR+), como CD8+ (CD38+HLADR-

CD38+HLADR+); así como menor frecuencia de células CD8+CD38-HLADR+, en concordancia con estudios previos⁴⁰⁷. Además, se observó que los niveles de células T CD8+ activadas fueron mayores a los de células T CD4+ activadas⁴⁰⁷.

Por otro lado, solo se encontró una asociación significativa entre la rigidez hepática y los niveles de células T CD8+CD38+HLADR- cuando se analizó como variable continua. Sin embargo, cuando se estratificó la población por estadios de rigidez hepática, se hizo más patente la asociación, mostrando valores más elevados de células T CD4+ y CD8+ activadas CD38+HLADR- y CD38+HLADR+, y valores más bajos de células CD38-HLADR+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC con >40kPa. A día de hoy, estos son los primeros datos que relacionan los valores elevados de células T activadas en pacientes coinfectados VIH/VHC con los estadios avanzados de cirrosis; de tal forma que estos pacientes con mayor activación crónica del sistema inmune tendrían mayor riesgo de progresión clínica, aparición de comorbilidades, y muerte.

Además, la continua activación del sistema inmune estaría induciendo la expansión de las células T con capacidad proliferativa CD28+³⁸⁶. En esta Memoria se muestra que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más altos de células T CD4+ virgen activadas (CD38+HLADR- y CD38-HLADR+) y células T CD4+ de memoria temprana activadas (CD38+HLADR- y CD38+HLADR+) que los controles sanos y los pacientes mono infectados VIH; mientras que, en las células T CD8+, los mayores niveles de activación sólo se encontraron en las células de memoria temprana CD38+HLADR-, y una fuerte disminución en las células CD8+CD38-HLADR+.

La diferenciación y maduración celular a estadios más avanzados conlleva la pérdida de CD28, clave para la interacción con las células presentadoras de Ag y modular la función de las células T, así como la adquisición de marcadores de últimos estadios de diferenciación como CD57 (marcador de senescencia de células T)³⁸⁶. En pacientes con hepatitis C, existen pocos datos previos sobre células T con fenotipo CD57+, y esos datos hacen referencia a linfocitos T estimulados en cultivo, pero no a la población total de sangre periférica^{408,409}. Así, se ha encontrado que los pacientes con hepatitis C tienen mayor frecuencia de células con fenotipo senescente CD57+ Ag-específicas que los controles sanos⁴⁰⁸, y menos linfocitos T CD8+CD57+ Ag-específicos con respecto a mono infectados VIH⁴⁰⁹. En esta Memoria, como era de esperar, se encontraron mayores niveles de expresión de CD57 en las células T CD8+ que en las células T CD4+. Sin embargo, se muestra una pérdida significativa de la expresión de CD57 en las células T CD4+ y CD8+ de sangre periférica respecto a los controles sanos y a los pacientes mono infectados VIH, más notable en las células con fenotipo efector CD28-. Esta disminución de expresión del marcador de senescencia CD57, quizás se deba a la capacidad del VHC para desarrollar un fenotipo de memoria temprana, reduciendo la acumulación de células T CD57+ en la sangre periférica²⁴⁹. Además, estos valores más bajos de células T con fenotipo CD57+ en los pacientes coinfectados VIH/VHC podrían deberse también a que dichas células son retenidas en el hígado y eliminadas por apoptosis^{399,400}.

Sin embargo, si se encontraron valores más elevados de células T CD4+ senescentes (CD28+CD57+ y CD28-CD57+) a medida que aumentaba la rigidez hepática, concretamente en las células T CD4+ de memoria temprana y en las células T CD4+ de memoria terminal, respectivamente. La expansión de células efectoras que pierden CD28 o expresan CD57 es

encontrada en muchas enfermedades, independientemente de la edad³⁹⁵, e indica una mala función del sistema inmune^{410,411}, siendo un factor de riesgo de aparición de comorbilidades⁴¹² y muerte no relacionada con SIDA^{411,413}. Nuestros datos podrían indicar que los pacientes coinfectados VIH/VHC en estadios avanzados de cirrosis tienen peor pronóstico por tener elevados porcentajes de células T CD45RA-CD28-CD57+, marcador de comorbilidad y mortalidad. A este respecto, tenemos pendiente de hacer la medición de los telómeros en células de sangre periférica, para evaluar la senescencia replicativa en los diferentes estadios de rigidez hepática.

En sangre periférica, los pacientes infectados por VIH tienen mayores porcentajes de células CD4+ Treg, a pesar de la pérdida de células T CD4+ asociada a la infección VIH; y estos valores elevados de células Tregs están relacionados con la progresión de la enfermedad⁴¹⁴⁻⁴¹⁶. En la hepatitis C crónica se ha encontrado una mayor frecuencia de células CD4+ Tregs circulantes que en controles sanos⁴¹⁷⁻⁴¹⁹. Sin embargo, los datos de células Tregs de sangre periférica en pacientes coinfectados VIH/VHC son algo contradictorios, ya que hay artículos que no encuentran diferencias entre pacientes mono infectados VIH y coinfectados VIH/VHC^{416,420}, mientras que otros sí encuentran valores más elevados en pacientes coinfectados VIH/VHC⁴²¹. Los datos mostrados en esta Memoria, apoyan los estudios previos en los cuales los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron valores más elevados de células CD4+ Tregs (CD4+CD25+CD127-), destacando la mayor proporción de Tregs memoria activadas (CD4+CD25+CD127-CD45RA-) respecto a los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Este incremento de células CD4+ Treg podría ser una de las causas por la que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron niveles bajos de células T efectoras, ya que uno de los efectos inmunosupresores de las Tregs es poder inducir muerte por apoptosis a células efectoras^{394,399}. Por otro lado, no se ha encontrado previamente una relación entre la frecuencia de células Tregs en sangre periférica y el estadio de fibrosis hepática en pacientes coinfectados VIH/VHC⁴²⁰⁻⁴²². Sin embargo, en esta Memoria, cuando se analizaron las células Tregs entre los distintos estadios de rigidez hepática, se encontró que, inicialmente, los porcentajes de células Tregs mostraron una tendencia a la baja desde el grupo F0-F3 (<12,5 kPa) a F4.1 (12,5 a 25 kPa) y posteriormente a F4.2 (25-40 kPa), siendo estos últimos los que tuvieron valores más bajos de células Tregs; para después aumentar bruscamente en el grupo F4.3 (>40 kPa). Por tanto, en esta Memoria se muestra una relación inversa entre los porcentajes de células Tregs y la progresión en los estadios de fibrosis, excepto para los pacientes con cirrosis severa (>40 kPa). Este aumento en las células Tregs de los sujetos con >40 kPa podría estar desencadenado por la exagerada hiperactivación inmune, en un intento de controlar este fenómeno, y por la disfunción inmune secundaria encontrada en estadios avanzados de cirrosis (CAID). En pacientes con hepatitis C crónica no hay datos que apoyen esta hipótesis. Sin embargo, en pacientes con hepatitis B crónica se ha observado que los sujetos que desarrollan ACLF tienen porcentajes más elevados de células Tregs activadas que los sujetos con cirrosis sin ACLF^{423,424}, y este aumento de células CD4+ Tregs se relaciona con peor pronóstico⁴²⁵. En base a estos datos previos en pacientes infectados por VHB, se podría pensar que los pacientes coinfectados VIH/VHC con elevados porcentajes de células Tregs podrían tener peor pronóstico clínico. Por otro lado, se ha descrito que ni los regímenes de AAD con y sin IFN α han sido capaces de normalizar las frecuencias y el estado de activación de las células Tregs un año después de la eliminación del

VHC⁴²⁶. Dicha persistencia de células Tregs inmunosupresores podría contribuir a desarrollar complicaciones de la enfermedad hepática incluso a largo plazo después de la cura del VHC⁴²⁶.

La translocación bacteriana y el grado de translocación bacteriana aumentan con la gravedad de la enfermedad hepática, especialmente en la etapa descompensada de la cirrosis^{187,195}. Además, los pacientes VIH también tienen translocación bacteriana debido a las alteraciones inmunológicas, principalmente en el GALT e hígado⁴²⁷.

El marcador de integridad de la barrera intestinal, e indirectamente de permeabilidad intestinal, FABP2⁴²⁸, se encontró elevado en los pacientes coinfectados VIH/VHC respecto a los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Además, los pacientes mono infectados VIH, en los que FABP2 es un marcador de morbilidad y mortalidad en la infección por VIH⁴²⁹, también presentaron valores plasmáticos más elevados de FABP2 que el grupo control sano. De modo que, los pacientes mono infectados VIH y coinfectados VIH/VHC mostraron un aparente fallo en la integridad de la pared intestinal, acompañado de mayor inflamación. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la rigidez hepática y los niveles plasmáticos de FABP2, cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos, en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

Los niveles de sCD14 en plasma son un marcador indirecto de translocación bacteriana e inflamación^{59,65}. Sujetos infectados por VIH y coinfectados VIH/VHC muestran niveles plasmáticos más elevados de sCD14 que controles sanos⁴³⁰⁻⁴³²; y se han asociado con morbilidad y mortalidad en la infección por VIH^{65,429,433,434} y en la hepatitis C crónica^{65,435}. En esta Memoria se muestra que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más altos de sCD14 que los controles sanos, pero no hubo diferencias con el grupo control de pacientes mono infectados VIH. Esto podría indicar que los pacientes coinfectados VIH/VHC tienen mayor riesgo de desarrollar comorbilidades y que los controles sanos, pero similar a los pacientes mono infectados VIH. Por otro lado, existen controversias respecto a la asociación de los niveles plasmáticos de sCD14 con estadios avanzados de la enfermedad hepática, aunque la mayoría de los artículos encuentran una asociación significativa^{65,261,435,436}. En esta Memoria no se encontró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de sCD14 y la rigidez hepática, cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos, en pacientes coinfectados VIH/VHC. Es posible que las características de los pacientes coinfectados VIH/VHC esté influyendo en esta falta de asociación, ya que alrededor del 50% de los pacientes coinfectados VIH/VHC fueron cirróticos, muchos de ellos en estadios avanzados de cirrosis. El sCD14 es una proteína soluble secretada por los hepatocitos (proteína de fase aguda), aparte de los monocitos/macrófagos (se libera de monocitos tras la activación); y los pacientes con cirrosis avanzadas tienen menor cantidad de hepatocitos funcionales, siendo menor la capacidad de secretar sCD14.

El LPS es un marcador directo de translocación bacteriana que actúa en el organismo activando el sistema inmune de forma generalizada¹⁸⁷. Se han encontrado niveles elevados de LPS en sangre periférica de pacientes cirróticos¹⁸⁷, infectados por VIH^{430,437} y coinfectados VIH/VHC⁴³⁸. Sin embargo, en esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más bajos de LPS que los dos grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Esta discrepancia en los valores plasmáticos de LPS entre los grupos de

estudio podría ser debido a que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más elevados de sCD14, molécula capaz de captar y eliminar el LPS de la circulación sistémica de forma eficiente⁴³⁹, haciendo que la concentración de LPS en plasma sea más baja. Pero tampoco podemos descartar que estos valores más bajos de LPS, en los sujetos coinfectados VIH/VHC, se puedan deber a la vida media corta del LPS⁴⁴⁰, ya que en esta Memoria, los sujetos coinfectados VIH/VHC comenzaron a recogerse en 2012 y los controles se han incluido en la última fase del estudio (2014-2015). Por otro lado, los niveles plasmáticos de LPS aumentan en estadios avanzados de la enfermedad hepática^{65,261}, y predice la gravedad de la enfermedad hepática y supervivencia a corto plazo de los pacientes cirróticos^{441,442}. En esta Memoria, se mostró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de LPS y la rigidez hepática, cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos, encontrándose los valores más elevados en los pacientes coinfectados por VIH/VHC con >40kPa.

La coagulopatía se ha relacionado con una mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y mortalidad por todas las causas entre las personas infectadas por el VIH⁴⁴³. En pacientes con hepatitis C hay menos información disponible sobre biomarcadores, pero se sabe que estos pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar una enfermedad tromboembólica^{444,445}.

El D-dímero es un producto de degradación de la fibrina, marcador de enfermedad tromboembólica⁴⁴⁶. Valores elevados de D-dímero se han asociado con trombosis, progresión clínica y muerte en pacientes infectados por VIH^{447,448} y pacientes cirróticos⁴⁴⁹⁻⁴⁵². En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de D-dímero que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Además, los pacientes coinfectados VIH/VHC con mayor rigidez hepática, especialmente en los sujetos con >40kPa, tuvieron valores muy elevados de D-dímero en plasma. Estos datos concuerdan con lo esperado, y estarían indicando un mayor riesgo de trombosis en los pacientes coinfectados VIH/VHC, en relación directa con el grado de rigidez hepática y destacando los sujetos con la fibrosis más avanzada (LSM >40kPa) como los que están en riesgo más elevado de enfermedad cardiovascular y muerte⁴⁵²⁻⁴⁵⁴.

El PAI-1 es el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la uroquinasa (uPA), dos activadores del plasminógeno, y por tanto de la fibrinólisis que desencadena la eliminación de los trombos de la sangre⁴⁵⁵. Niveles elevados de PAI-1 se relacionan con una mayor tendencia a la trombosis y fibrosis en el hígado⁴⁵⁵. Valores elevados de D-dímero se han asociado con riesgo de infarto y deterioro neurocognitivo en pacientes infectados por VIH^{447,456}. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de PAI-1 que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH, indicando un mayor riesgo clínico en los pacientes coinfectados VIH/VHC. Por otro lado, los valores plasmáticos de PAI-1 están asociados con la gravedad de la fibrosis en la enfermedad hepática grasa no alcohólica^{457,458}, pero no hay datos similares en pacientes con hepatitis C crónica. En esta Memoria, sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de PAI-1 y la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

IL-1RA es un marcador indirecto de inflamación, y sus valores elevados en plasma se asocian con progresión clínica en pacientes con hepatitis C^{459,460}, y desarrollo de comorbilidades

en pacientes infectados por VIH⁴⁶¹⁻⁴⁶³. Además, sus valores plasmáticos están más elevados que en controles sanos, tanto si son pacientes VIH+⁴⁶¹ como VHC+⁴⁵⁹. En esta Memoria no se encontraron diferencias significativas en los valores plasmáticos de IL-1RA entre los pacientes coinfectados VIH/VHC y los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Por un lado, los pacientes mono infectados VIH estaban en tratamiento antirretroviral, con carga viral controlada y células T CD4+ >500 cels/mm³ en la mayoría de los casos, y por lo tanto los datos obtenidos están en concordancia, ya que no se encontraron significativos niveles de IL-1RA con el grupo control sano. Por otro lado, es posible que el valor medio de IL-1RA de los pacientes coinfectados VIH/VHC de esta Memoria esté penalizado por los pacientes con cirrosis avanzada, los cuales presentaron valores plasmáticos muy bajos de IL-1RA, haciendo que las diferencias con los grupos control no sean significativas. En esta Memoria también se muestra como los pacientes coinfectados VIH/VHC con >40kPa tuvieron valores más bajos de IL-1RA, permitiendo la unión de IL-1 a su receptor y desencadenando una respuesta inflamatoria, que concuerda con el resto de los marcadores de inflamación y activación del sistema inmune encontrados en estos pacientes. Los valores más bajos de IL-1RA encontrados en los pacientes con >40kPa posiblemente sean debidos a una deficiente función hepática en estadios avanzados de cirrosis, ya que IL-1RA es una proteína de fase aguda secretada por los hepatocitos para regular la inflamación hepática excesiva^{464,465}. Destacar que este efecto inhibitor de IL-1RA es solo eficiente en una relación de al menos 100/1 de IL-1RA sobre IL-1⁴⁶⁶. Esta relación 100/1 se observa en los datos presentados en esta Memoria, y solo los pacientes con >40kPa podrían llegar a tener bajas concentraciones plasmáticas de IL-1RA, y que no estén ejerciendo una regulación potente de la acción de la IL-1.

TNF- α y TNFR1 se han asociado con progresión clínica en pacientes mono infectados VHC^{222,226,467,468} y mono infectados VIH⁴⁶⁹. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de TNF α y sTNFR1 que los dos grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH, en concordancia con lo esperado inicialmente en pacientes con hepatitis C crónica. Además, los pacientes coinfectados VIH/VHC con mayor rigidez hepática, especialmente los sujetos con >40kPa, tuvieron valores más elevados de sTNFR1. Estos datos también están en concordancia con lo publicado previamente, ya que los pacientes con hepatitis C crónica tienen niveles séricos elevados de TNFR1, independientemente del tipo de hepatitis⁴⁵⁹, reflejan la gravedad de la enfermedad hepática en pacientes infectados por VHC^{225,467,468} y predicen muerte en pacientes con cirrosis²²⁶. Sin embargo, también se encontró que a mayor rigidez hepática, valores más bajos de TNF α , especialmente en los pacientes con >40kPa. Esta discordancia en la asociación de los valores de sTNFR1 y TNF α con la rigidez hepática podría estar relacionado con el propio mecanismo de regulación del TNF α . A mayor nivel de inflamación, se produce mayor cantidad de sTNFR1, el cual puede bloquear y eliminar el TNF α de la circulación⁴⁷⁰. Sin embargo, tampoco hay que descartar que estos pacientes con cirrosis más avanzada muestren una menor producción TNF α debido a la alta presión de la translocación bacteriana sobre las células mieloides, en las cuales se podría haber inducido una disfunción inmune que provocaría una menor producción de citoquinas claves en el funcionamiento del sistema inmune¹⁹⁴. En este caso, es el TNF α el que está disminuido, pero esta disfunción inmune también queda reflejada en los resultados de otras citoquinas descritas en esta Memoria como IL-2, IL-17A, e IL-10, las cuales se encontraron en menor cantidad en los pacientes coinfectados VIH/VHC con >40kPa.

Las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-18, miembros de la familia de la IL-1, se han relacionado con progresión clínica en pacientes con hepatitis C⁴⁷¹⁻⁴⁷⁶ y desarrollo de comorbilidades en pacientes infectados por VIH^{477,478}. En la hepatitis C crónica, los niveles de IL-1 β en suero son más altos que en controles sanos¹⁴⁷. Además, se ha encontrado una elevación sistémica de la IL-18 en la coinfección por VIH/HCV versus mono infección por VIH o VHC⁴⁷⁹. En esta Memoria, se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores más elevados de IL1 β e IL-18 que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. De esta forma, los pacientes coinfectados VIH/VHC estarían en mayor riesgo de progresión clínica. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa de los niveles plasmáticos de IL1 β e IL-18 con la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos en pacientes coinfectados por VIH/VHC, a pesar de ser marcadores de daño hepático y progresión a cirrosis. Esta falta de asociación con la enfermedad hepática podría ser debido a una activación más severa del inflamósoma en los pacientes coinfectados VIH/VHC, induciendo una producción elevada de IL1 β e IL-18, y rompiendo la asociación directa entre valores plasmáticos de IL1 β e IL-18 y rigidez hepática.

La IL-6 es una citoquina pleitrópica, y cuyos valores plasmáticos se suele relacionar con inflamación, siendo un excelente predictor de progresión clínica y muerte en pacientes infectados por VIH^{401,443,469} y con hepatitis C crónica^{201,471,480,481}. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IL-6 que en los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Altos niveles séricos de IL-6, en pacientes con hepatitis C crónica, se asocian con mayor severidad de la fibrosis/cirrosis^{201,471}. En esta Memoria, los pacientes coinfectados VIH/VHC con mayor rigidez hepática, especialmente los sujetos con >40kPa, tuvieron valores plasmáticos más elevados de IL-6, estando en concordancia con lo esperado inicialmente en estos pacientes coinfectados VIH/VHC crónica. Sin embargo, habría que destacar los valores tan elevados de IL-6 en los sujetos con la fibrosis más avanzada (>40kPa), que podrían reflejar una mayor translocación bacteriana y una hiper-respuesta inflamatoria, y peor pronóstico clínico.

sICAM-1 y sVCAM-1, las formas solubles de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, son marcadores de inflamación relacionados con comorbilidades tales como la enfermedad cardiovascular⁴⁸², progresión a SIDA y muerte^{483,484}. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de sICAM-1 y sVCAM-1 que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Además, se encontró una asociación entre mayor rigidez hepática y valores plasmáticos más elevados de sICAM-1 y sVCAM-1 en los pacientes coinfectados VIH/VHC, indicando una posible asociación con progresión de la fibrosis hepática, en concordancia con lo esperado inicialmente en pacientes con hepatitis crónica C^{32,485,486}. A este respecto, destaca el marcado incremento en plasma de sICAM-1 y sVCAM-1 en los pacientes con la cirrosis más avanzada (>40kPa). Como en otros marcadores discutidos con anterioridad, niveles elevados de sICAM-1 y sVCAM-1 podrían estar reflejando una mayor translocación bacteriana y respuesta inflamatoria, que conducirían a la progresión clínica y muerte⁴⁸⁷.

MCP-1 se ha asociado con progresión clínica en pacientes infectados por VIH y se ha relacionado el desarrollo de inflamación intrahepática en pacientes con hepatitis C⁴⁸⁸. En esta Memoria se encontró que los pacientes mono infectados VIH y coinfectados VIH/VHC tuvieron

valores plasmáticos más elevados de MCP-1 que el grupo control sano, pero los dos grupos de sujetos VIH+, mono infectados y coinfectados, no tuvieron diferencias significativas, siendo los valores similares. Además, no se encontró asociación entre los valores plasmáticos de MCP-1 y la rigidez hepática en los pacientes coinfectados VIH/VHC. Por lo tanto, el valor plasmático de MCP-1 no sería un buen marcador de enfermedad en los pacientes coinfectados VIH/VHC.

IP-10 se ha asociado con progresión clínica en pacientes infectados por VIH⁴⁸⁹⁻⁴⁹³ y con hepatitis C^{494,495}. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IP-10 que los dos grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Además, los pacientes coinfectados VIH/VHC con mayor rigidez hepática, especialmente los sujetos con >40kPa, tuvieron valores plasmáticos más elevados de IP-10. En la infección por VHC, altos valores de IP-10 en plasma o suero se han asociado con mayor severidad de la enfermedad hepática^{32,438,471,496-498}. También se han encontrado valores plasmáticos más elevados de IP-10 en pacientes con ACLF que en pacientes con cirrosis descompensada, pero sin ACLF; asociándose con translocación bacteriana y muerte⁴⁸⁷. Por tanto, nuestros resultados están en concordancia con los datos descritos previamente en pacientes con hepatitis C crónica, pero habría que destacar el marcado incremento de IP-10 en los sujetos con cirrosis más avanzada (>40kPa). IP-10 es una quimioquina que participa directamente en la defensa contra el VHC, atrayendo a células CXCR3+ que tienen actividad antiviral^{494,495}. A este respecto, puede parecer inconsistente que los altos niveles de IP-10 sean indicativos de progresión de la enfermedad hepática y no de la eliminación del VHC. Una posible explicación sería que la liberación desproporcionada de IP-10 provoque la transmigración endotelial y quimiotaxis de células T al lóbulo hepático, expandiendo la inflamación al parénquima, y causando un daño excesivo, signo distintivo de la progresión de la hepatitis C⁴⁹⁹.

La IL-8 o CXCL8 es una quimioquina que induce la quimiotaxis de células portadores de los receptores CXCR1 y CXCR2, en particular neutrófilos⁵⁰⁰. La IL-8 se ha asociado con progresión clínica en pacientes infectados por VIH^{461,501} y con hepatitis C⁵⁰²⁻⁵⁰⁶. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IL-8 que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Estos valores más elevados estarían indicando un mayor riesgo de progresión clínica y muerte en los pacientes coinfectados VIH/VHC. Además, los pacientes coinfectados VIH/VHC con mayor rigidez hepática, especialmente los sujetos con >40kPa, tuvieron valores más elevados de IL-8 en plasma. Estos resultados están en concordancia con lo esperado inicialmente en pacientes con hepatitis crónica C^{471,507}, destacando el marcado incremento de IL-8 en los sujetos con la fibrosis más avanzada (>40kPa). Estos niveles elevados de IL-8 estarían reflejando una mayor translocación bacteriana y respuesta inflamatoria en los pacientes con cirrosis avanzada, los cuales tendrían peor pronóstico clínico.

La IL-17A es una citoquina reguladora, producida principalmente por las células T CD4+ Th17, que participa en la respuesta inflamatoria local protectora frente a patógenos en tejidos⁵⁰⁸. El aumento de IL-17A se ha relacionado con la severidad de la enfermedad hepática^{212,509}. En esta Memoria no se encontraron diferencias significativas en los valores plasmáticos de IL-17A entre los pacientes coinfectados VIH/VHC y los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Sin embargo, si se encontró una asociación inversa significativa entre los valores plasmáticos de IL-17A y la rigidez hepática, cuando se analizó como variable

continua o estratificada por rangos, especialmente en los pacientes con $>40\text{kPa}$ que tuvieron valores más bajos de IL-17A que los pacientes sin cirrosis ($<12.5\text{kPa}$). Esta asociación inversa entre los valores de IL-17A y la rigidez hepática posiblemente esté indicando, junto a IL-2 e IL-10, el progreso de la inmunodeficiencia secundaria que aparece en pacientes con cirrosis avanzada⁵¹⁰.

La IL-12p70, conocida como IL-12, es una citoquina producida en respuesta a PAMPs y promueve la respuesta inmune, bloqueando la respuesta Th2⁵¹¹. En la infección por VIH, los linfocitos de sangre periférica tienen deteriorada su capacidad de producir IL-12, lo cual indica que IL-12 puede jugar un papel clave en la infección VIH y progresión a SIDA⁵¹². Los pacientes infectados por VIH presentan valores plasmáticos de IL-12 más bajo que los controles sanos⁵¹³. En la infección por VHC, los pacientes infectados por VHC tienen valores plasmáticos de IL-12 más elevados que en controles sanos^{514,515}, y los pacientes coinfectados VIH/VHC tienen valores aún más elevados que los pacientes mono infectados por VIH o por VHC⁴⁷⁹. Con la progresión de la hepatitis C crónica, los valores séricos de IL-12 se elevan^{516,517}, pero se reduce en pacientes cirróticos descompensados con ACLF⁵⁰⁷. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IL-12 que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH en concordancia con la literatura científica ya que nuestros pacientes no están en cirrosis descompensada. Este dato indicaría una respuesta inmune Th1 más potente en los pacientes coinfectados VIH/VHC, que podría estar bloqueando la respuesta Th2, disminuyendo el valor de IL-4 como se ha mostrado anteriormente. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de IL-12 y la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

La IL-4 es una citoquina reguladora, producida principalmente por las células T CD4+ Th2, con acción anti-Th1⁵¹⁸. Los niveles de IL-4 aumentan con la progresión a SIDA⁵¹⁹ y promueven el depósito de colágeno en el hígado^{520,521}. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IL-4 que los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Estos valores elevados pueden ser un reflejo de del desarrollo de la fibrosis hepática en los pacientes coinfectados, ya que la IL-4 promueve la resolución de las lesiones hepáticas y favorece el proceso de cicatrización, aumentando el depósito de colágeno, como citoquina profibrótica^{520,521}. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de IL-4 y la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

La IL-10 es una citoquina reguladora, producida principalmente por las células T CD4+ Th2, con acción antiinflamatoria y supresora de la respuesta inmune^{85,522}. Los niveles de IL-10 aumentan con la progresión a SIDA^{523,524} y con la progresión de la fibrosis/cirrosis^{468,517}. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos más elevados de IL-10 que los dos grupos, sanos y pacientes mono infectados VIH. Estos valores elevados de IL-10 posiblemente sean un indicador de un mecanismo de compensación del proceso inflamatorio relacionado con la hepatitis C crónica^{468,507,517}. Además, se encontró una asociación inversa y significativa entre los valores plasmáticos de IL-10 y la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua, pero no cuando fue estratificada por rangos. Esta

asociación inversa posiblemente esté indicando que con la progresión de la fibrosis aumenté la disfunción del sistema inmune, entre otras cosas, debido a al aumento de la activación crónica del sistema inmune.

La IL-2 es una citoquina, producida por las células T CD4+, que es clave para el funcionamiento del sistema inmune⁵²⁵. Los niveles plasmáticos de IL-2 disminuyen a medida que progresa la infección VIH⁵²⁶ y la hepatitis C crónica⁵²⁷, asociándose con mal pronóstico clínico en ambas infecciones^{487,518,526,528}. En esta Memoria no se encontraron diferencias significativas en los valores plasmáticos de IL-2 entre los pacientes coinfectados VIH/VHC y los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH. Sin embargo, si se encontró una asociación inversa entre los niveles plasmáticos de IL-2 y la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos, especialmente en los pacientes con >40kPa que tuvieron los valores más bajos de IL-2. La falta de significación estadística cuando se comparan los tres grupos de estudio, quizás podría ser debida a que solo se encuentran valores realmente bajos en los pacientes con >40kPa, un grupo poco numeroso, siendo insuficiente para afectar de forma significativa al valor medio de IL-2 en el grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC. Por otro lado, la asociación inversa entre los valores plasmáticos de IL-2 y la rigidez hepática posiblemente esté indicando el progreso de la inmunodeficiencia secundaria que se produce en los pacientes con cirrosis, siendo mucho más pronunciada en estadios avanzados de cirrosis (<40kPa).

El IFN γ es una citoquina reguladora Th1 que se secreta en respuesta a estímulos inflamatorios⁵²⁹. En la infección VIH, baja producción de IFN γ se ha asociado con mayor replicación del VIH y más riesgo de progresión de la enfermedad⁴⁴³. En la hepatitis C crónica, se ha observado una disminución en la producción de IFN γ a medida que progresa la fibrosis hepática⁵²⁷ y se llega a la cirrosis descompensada⁵⁰⁷. En esta Memoria se encontró que los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron valores plasmáticos de IFN γ más elevados que en los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH, lo cual indicaría una mayor respuesta inmune Th1 en los pacientes coinfectados VIH/VHC que en los pacientes mono infectados VIH. Estos valores elevados de IFN γ en los pacientes coinfectados estarían en discordancia con lo esperado. Esto podría ser debido a que los pacientes coinfectados VIH/VHC tienen una inflamación más severa que estimularía de forma más potente la producción de IFN γ ⁵²⁹. Por otro lado, no se encontró una asociación significativa entre los niveles plasmáticos de IFN γ y la rigidez hepática cuando se analizó como variable continua o estratificada por rangos en pacientes coinfectados por VIH/VHC.

Limitaciones del estudio

En primer lugar, este estudio tiene un diseño transversal que implica una falta de uniformidad. En segundo lugar, este estudio tiene un número limitado de pacientes en algunos grupos de estudio, lo que podría limitar el logro de valores significativos en algunos grupos. En tercer lugar, la mayoría de los pacientes seleccionados cumplieron con los criterios de inclusión para comenzar el tratamiento antiviral contra el VHC (como, ausencia de abuso de alcohol en el momento de tratarse, recuento de células CD4 >200 células/mm³, buena adherencia al tratamiento y replicación controlada del VIH), y esto puede haber introducido un sesgo de selección en la muestra de estudio. En cuarto lugar, no se dispuso de un grupo control de pacientes mono infectados VHC para poder determinar con más exactitud las características

diferenciales de los pacientes coinfectados VIH/VHC; y tampoco se dispuso de pacientes coinfectados con cirrosis descompensada, para estudiar el perfil inmune en el estadio terminal de la enfermedad hepática. Finalmente, la recogida de las muestras a lo largo de varios años puede que esté influyendo en la estabilidad de las moléculas de vida media corta evaluadas, y por tanto en los resultados de algunos biomarcadores plasmáticos, ya que las muestras de los grupos control fueron recogidas más tarde que los pacientes coinfectados.

SECCIÓN II: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 Y VHS-2

Ante la falta de una vacuna eficaz frente a la VIH³¹² y el número de nuevas infecciones por el VIH estático desde el 2010, en 2,1 millones de nuevas infecciones al año, siguen existiendo grandes desafíos con la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para frenar las nuevas infecciones⁶. La transmisión sexual es responsable de más de un 80% de estas nuevas infecciones por el VIH y continúa siendo la ruta de transmisión más difícil de abordar, resultado de la exposición genital a células infectadas del líquido seminal o secreciones de la mucosa²⁸. Desde hace más de veinticinco años se está trabajando en el desarrollo de nuevas estrategias preventivas para frenar la infección por el VIH-1, especialmente en mujeres. Una de estas estrategias se centra en el desarrollo de microbicidas de uso tópico con gran potencial debido a que, en caso de ser eficaces, supondrían una ventaja frente al preservativo, uno de los métodos más eficaces, pero cuyo uso en algunos países está reducido por cuestiones culturales o países subdesarrollados, donde está prohibido o ni siquiera está disponible. Esto haría que las mujeres pudieran aplicarlo en el tracto genital femenino a su voluntad. Además sería un arma potente para combatir la infección por el VIH-1 en grupos especialmente expuestos como las mujeres que ejercen la prostitución o las mujeres víctimas de violaciones^{26,530-532}. Diversas investigaciones se han centrado en el estudio de los dendrímeros como microbicidas no específicos, habiéndose obtenido ya los primeros resultados positivos en ensayos clínicos en humanos⁵³³. Éste es el caso del SPL7013, un dendrímero polianiónico funcionalizado con 32 grupos naftalensulfonato terminales que llegó a fase clínica II^{349,534}. Sin embargo, debido a que tras 7-14 días consecutivos de aplicación del SPL7013 a nivel vaginal causaba procesos de inflamación e irritación, permitiendo nuevas infecciones por el VIH, se cerró el ensayo clínico.

El herpes genital es la ETS con mayor prevalencia mundial y aparece frecuentemente asociada con otras infecciones²⁶⁵. Estudios epidemiológicos sugieren que el VHS-2 aumenta el riesgo de adquisición del VIH-1 en aproximadamente tres veces^{302,303}. Esto pone de manifiesto la necesidad de una estrategia segura y efectiva para prevenir la coinfección. En este contexto, los dendrímeros carbosilano polianiónicos podrían ser buenos candidatos para el desarrollo de un microbicida dual frente al VIH-1 y el VHS-2, debido a su acción antiviral *in vitro* e *in vivo* anti-VIH demostrada^{342,343,350,379,390}. Por ello, tras una selección de dendrímeros *in vitro*³⁴⁶ se escogieron los dendrímeros G2-S16 y G1-S4 con actividad antiherpética y diferente modo de acción, para una posible estrategia de combinación no sólo con antirretrovirales, como se ha demostrado con el VIH y VHC^{519,535-537}, sino también para su administración vía vaginal y rectal en ratones BALB/c como posible microbicidas frente al VHS-2.

En esta Memoria se muestra como el dendrímero sulfonato G2-S16 aplicado intravaginalmente en 10 ratonas hembras BALB/c al 3% en gel HEC inhibió en un 100% la infección por una dosis letal de VHS-2 (10^5 PFU), mientras que el dendrímero sulfato G1-S4 al 3% en gel HEC protegió a 9 de 10 ratones. Sin embargo, cuando los ratones hembras y machos BALB/c se expusieron a VHS-2 por vía rectal, el G1-S4 mantuvo su protección en un 90% de los ratones, al contrario que el G2-S16 que sólo protegió al 33% de los ratones. Para confirmar la capacidad antiviral por vía rectal, se incrementó la carga viral un logaritmo (10^6 PFU de VHS-2), puesto que en las infecciones adquiridas vía anal, la probabilidad de rotura del epitelio es mayor incrementando el riesgo de infección, siendo una vía de transmisión al alza entre HSH en prácticas de riesgo²⁷⁰. Cabe destacar la capacidad del G1-S4 para inhibir en un 66.7% la infección a pesar de la elevada carga viral, aunque el G2-S16 perdió toda su actividad. La alta capacidad inhibitoria del G1-S4 contra el VHS-2, tanto a nivel vaginal como rectal, podría deberse en gran parte a su capacidad para realizar su función por unión directa a las partículas virales, independientemente del entorno en el que se encuentre. La gran diferencia morfológica y estructural entre el epitelio vaginal y rectal podría ser la causa de la diferente capacidad inhibitoria mostrada por el G2-S16, considerando que este dendrímero se une a las proteínas de las células epiteliales como análogo del heparán sulfato para llevar a cabo su actividad antiherpética. El epitelio multicapa de la vagina podría ofrecer una ventaja estructural sobre el epitelio columnar simple y el epitelio escamoso estratificado del recto^{348,538}. Con el objetivo de mejorar el efecto antiviral del G2-S16 en la infección rectal se combinó con TFV, para lo cual se tuvieron en cuenta estudios previos que han mostrado en modelos animales *in vivo* y en ensayos clínicos en humanos la actividad del TFV frente al VHS-2^{332,333}, junto a los buenos resultados obtenidos *in vitro* con la combinación del G2-S16 y TFV frente al VIH-1³⁹⁰. Cuando se aplicó rectalmente a ratones machos BALB/c la combinación G2-S16 al 3% y TFV al 1%, se incrementó la protección del G2-S16, consiguiéndose un 65% de protección, por sinergia de los diferentes mecanismos de acción, al estar actuando el G2-S16 a nivel de la entrada y el TFV inhibiendo la ADN polimerasa.

La transmisión del VIH-1 principalmente ocurre a través de la mucosa²⁶⁻²⁸. Las regiones más expuestas de la mucosa genital femenina (vagina, ectocérvix) y masculina (prepucio interno, uretra peneana y fosa navicular) son la principal entrada del virus, por su elevada extensión y frecuente pérdida de su integridad por las microabrasiones durante las relaciones sexuales^{35,36}. La actividad del dendrímero G2-S16 se debería limitar a estas regiones, pero debido a su proceso de síntesis, no fue posible su marcaje con una molécula del fluorocromo FITC, por ello para evaluar la biodistribución del G2-S16, se utilizó el dendrímero G2-STE-15-FITC, un análogo de su estructura pero debido a las características más sencillas de su síntesis se pudo marcar con FITC. Mediante un estudio de imagen *in vivo* por fluorescencia (IVIS), se demostró que incluso 20h después de la administración del dendrímero G2-STE-15-FITC, el dendrímero permaneció de forma exclusiva situado en la vagina de los ratones BALB/c (**Figura 71**). De tal forma que, cuando se aplica a nivel intravaginal la biodistribución del dendrímero G2-ST16-FITC está limitada al tejido vaginal, siendo de gran valor al mostrar una amplia ventana de acción desde la administración, debido a la capacidad del dendrímero de frenar la infección por el VIH-1 en las primeras etapas de unión/fusión del ciclo viral.

Este dato hizo que aunque ya se había demostrado que el dendrímero G2-S16 no producía inflamación o irritación a nivel vaginal en ratones BALB/c y CD1(ICR) a tiempos cortos de 24 y 72h^{316,342,344,350}, se evaluó que tampoco los produciría a tiempos largos con la administración del gel HEC al 3% de G2-S16 durante 7 días consecutivos, limitando su radio de acción a las regiones más expuestas de la mucosa vagina femenina. El experimento mostró claramente que el G2-S16 al 3% en gel HEC no produjo ningún tipo de alteración a nivel vaginal, siendo no tóxico, sin producción de inflamación o irritación tras su aplicación consecutiva durante 7 días en la vagina de ratones BALB/c, manteniendo las células mucosas propias de la fase pro-estro. Se demostró que este dendrímero G2-S16 es seguro en el desarrollo de un microbicida de uso tópico (**Tabla 10**). Además, el mismo experimento se hizo en combinación con TFV, mostrando que la combinación G2-S16 al 3% y TFV al 1% en gel HEC no es tóxica tras su aplicación durante 7 días consecutivos a nivel vaginal en ratones BALB/c. Teniendo en cuenta los resultados mostrados en esta tesis junto a estudios previos donde se había demostrado la capacidad de inhibición frente al VIH-1 y VHS-2 del TFV al 1% en ensayos clínicos³³³ y los datos previos del grupo que mostraban un 100% de inhibición de la infección por el VIH-1 *in vitro* por la combinación G2-S16+TFV³⁹⁰ y el 85% de inhibición de la infección por VIH-1 por el G2-S16 en ratones humanizados h-BLT³⁵⁰, refuerzan la idea de una estrategia de combinación para alcanzar el 100% de inhibición *in vivo* y no alteración a nivel vaginal, y por lo tanto con la posibilidad de poderlo llevar a la clínica.

Tras numerosos fracasos de los microbicidas en los ensayos clínicos^{323,360-362}, se ha demostrado que la reducción de la eficacia antiviral frente al VIH-1 de los polímeros aniónicos, así como la potencia antirretroviral de varios ARV podría deberse en parte a la propia composición del semen, ya que las pruebas preclínicas no reflejan fielmente las condiciones de la transmisión sexual del VIH al no ser en presencia de semen, principal vector de transmisión^{363,364}. Cuando previamente se había atribuido esa falta de eficacia antiviral frente a un amplio espectro de aislados VIH-1-R5³⁴⁹, falta de adherencia⁵³⁹ o la inducción de inflamación y efectos citotóxicos debido a la administración diaria del microbicida⁵³⁴. Se demostró por microscopía que la fosfatasa alcalina prostática formaba fibrillas denominadas SEVI (derivado de semen potenciador de la infección del virus), que capturan los viriones del VIH³⁶⁵, promoviendo su adhesión a las células diana, incrementando la capacidad infectiva del virus en varios órdenes de magnitud^{366,367}. Por todo ello, se evaluó si los dendrímeros polianiónicos carbosilanos G2-STE-16 y G3-S16 y sus combinaciones con TFV y MRV mantenían su eficacia antiviral frente a distintos aislados virales R5 trópicos en presencia y ausencia de semen.

A pesar de un marcado incremento en los valores CI_{50} entre 25 y 869 de los dendrímeros por la presencia del semen, se demostró claramente que G2-STE16 y G3-S16 conservaron su efecto inhibitorio a concentraciones no tóxicas en la línea celular TZM.bl a 10 μ M y 5 μ M, respectivamente. En las CMSP, los dendrímeros polianiónicos mostraron menores aumentos en los valores CI_{50} de 2 a 5 veces, pero se necesitaron concentraciones de 10 μ M. A diferencia de los polianiones presentados en otros estudios^{362,540-545}, los dendrímeros polianiónicos impiden la infección por el VIH no sólo por neutralización de las cargas negativas del virus, sino también por una unión competitiva a las dianas virales, el complejo gp120 y el receptor celular CD4 y los coreceptores CXCR4 y/o CCR5. Sin embargo, cuando los dendrímeros se combinaron con ARV^{390,536}, se demostró una alta protección frente a la infección por el VIH en

presencia de las fibrillas amiloides del semen, como se muestra por los incrementos menores en los valores CI_{50} de 2 a 8 veces y a dosis más bajas. La recuperación de la capacidad antiviral en presencia de SEVI de los dendrímeros polianiónicos en combinación con TFV en comparación con MRV podría ser debida a que el MRV es un inhibidor de entrada por el correceptor CCR5, mientras que el TFV actúa como un inhibidor de la RT, de modo que la acción a diferentes niveles del ciclo viral podrían producir un sinergismo que contrarresta mejor el aumento de infectividad del VIH por el semen. Estos hallazgos hacen plantearse la idea de que los tratamientos futuros no solo deberían estar dirigidos frente al VIH, sino también frente a las fibrillas amiloides del semen como objetivo para la reducción de la propagación de la infección por el VIH, así como en combinación con antirretrovirales.

Finalmente y debido a los nuevos resultados aportados en esta Memoria y que ya se había demostrado la seguridad *in vitro* e *in vivo* del dendrímero G2-S16, considerado como un posible candidato para su desarrollo como un microbicida de uso tópico^{343,344,350,536,546} se profundizó en su investigación para demostrar su bioseguridad en caso de atravesar la barrera epitelial. Aunque los roedores son los modelos estándar para realizar estudios de toxicidad de fármacos^{343,344,350,536,546} ha emergido como una herramienta importante los estudios en otro modelo animal, el embrión de pez cebra (*Danio rerio*)^{547,548}. El genoma del pez cebra tiene aproximadamente un 70% de homología con el genoma humano. A su favor está su tamaño pequeño, desarrollo rápido, transparencia óptica, utilización de espacios pequeños, cuidado y fácil manipulación de las crías⁵⁴⁹. De tal forma que se han analizado un gran número de sustancias con modos de acción, solubilidad, volatilidad e hidrofobicidad diferentes teniendo buenos resultados en el embrión de pez cebra^{381,382}. Por lo tanto, se utilizaron embriones del pez cebra para estudiar la mortalidad embrionaria, los efectos subletales y efectos teratogénicos del dendrímero G2-S16, ya que son pruebas estándar recomendadas por la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *Test Guideline 236. Guideline for Testing of Chemicals, Fish Embryo Acute toxicity (Fet) Test*; OECD Publishing: Paris, France, 2013] con una excelente correlación con los ensayos de toxicidad en peces adultos^{382,550}. No se encontraron diferencias significativas a nivel de mortalidad, efectos subletales o teratogénicos cuando los embriones de pez cebra se trataron con el dendrímero G2-S16 a 100mg/L en comparación con el control negativo (**Figuras 78-79**). De tal forma que las máximas dosis toleradas (MDT) a 48 y 96hpf fueron todas > 100mg/L. Este dato indica que el resultado es muy favorable para la tolerancia de este dendrímero G2-S16 *in vivo*, incrementando las posibilidades de éxito en el caso que se llegara a un ensayo clínico fase 1a.

El dendrímero G2-S16 ha mostrado una gran capacidad para la formulación como gel microbicida frente al VIH-1 y VHS-2^{346,350}, sin embargo, el elevado número de pasos sintéticos para su producción, conlleva un inconveniente para llevarlo a gran escala hacia la clínica. Por ello, se han desarrollado otras estrategias sintéticas estables como los dendrones³⁷⁸, moléculas similares a los dendrímeros con propiedades análogas, pero que presentan forma cónica confiriéndoles dos funciones, una sobre su superficie dendrónica y otra en su punto focal. Además, los dendrones tienen la capacidad de transformar la multivalencia en sistemas nanoscópicos mediante el proceso de dendronización³⁹³, generando nanopartículas (NP) que pueden ser funcionalizadas con un amplio abanico de sistemas en el campo de la biomedicina³⁵¹.

Destacan especialmente las NP de oro. En esta Memoria se han estudiado dendrones de primera HSG1(SO₃Na)₂, segunda HSG2(SO₃Na)₄ y tercera HSG3(SO₃Na)₈ generación, así como sus nanopartículas carbosilanos aniónicas de oro Au@(SG1(SO₃Na)₂), Au@(SG2(SO₃Na)₄) y Au@(SG3(SO₃Na)₈). En primer lugar se analizó su bioseguridad en varios tipos celulares presentando una viabilidad mayor al 80% en el caso de los dendrones HSG1(SO₃Na)₂ y HSG2(SO₃Na)₄, y las AuNPs, Au@(SG1(SO₃Na)₂), Au@(SG2(SO₃Na)₄) y Au@(SG3(SO₃Na)₈), en los cuales se evaluó la capacidad de inhibir la transmisión del VIH-1, con el fin de determinar y caracterizar su potencial uso como microbicidas.

En la transmisión heterosexual del VIH-1, los virus dominantes son principalmente de tropismo R5 y están implicados en la fase aguda o primeras etapas de la infección⁵⁵¹. Pero hay que tener en cuenta que también se han encontrado variantes VIH-1 con tropismo X4 presentes en semen, aunque se desconoce el papel que puede jugar este tropismo viral en los primeros pasos de la infección por transmisión sexual⁵⁵². Aunque los dendrones HSG1(SO₃Na)₂ y HSG2(SO₃Na)₄ inhibieron la replicación viral del VIH-1 X4 trópico en la línea celular TZM.bl, el efecto inhibitorio frente al aislado viral VIH-1-R5 trópico sólo se observó en el dendrón de segunda generación, indicando en comparación con otros estudios realizados con dendrímeros carbosilanos con grupos sulfonatos, como el dendrímero G2-S16, que ambos dendrones por sí solos tienen poca eficiencia como inhibidores de la infección por el VIH-1^{343,344,350}. Sin embargo, las AuNPs inhibieron de igual forma los aislados virales VIH-1 R5 y X4 con un porcentaje de inhibición de la infección alto, siendo el efecto inhibitorio mayor para Au@(SG₂(SO₃Na)₄) y Au@(SG₃(SO₃Na)₈). Se sugiere que la diferente actividad de las AuNPs se debe a su menor citotoxicidad, siendo en el caso particular de Au@(SG₂(SO₃Na)₄), la que menor exposición de los grupos sulfonato presentó por el plegado posterior del sistema resultando en una pequeña disminución de su actividad antiviral, y al igual que su dendrímero tuvo mayor actividad inhibitoria frente al aislado viral R5 trópico. Por lo tanto, los resultados obtenidos enfatizan la importancia de la dendronización al disminuir la toxicidad y aumentar la actividad antiviral frente al VIH-1 con respecto a los dendrones.

6

CONCLUSIONES



SECCIÓN 1: ESTUDIO DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES COINFECTADOS VIH/VHC:

1. Los pacientes coinfectados VIH/VHC, con respecto a los grupos control, sanos y pacientes mono infectados VIH, tuvieron un sistema inmune más activado y mayor inflamación. Así, los pacientes coinfectados VIH/VHC tuvieron mayores porcentajes de células T de memoria temprana, T activadas y Tregs, junto a valores plasmáticos más elevados de biomarcadores de translocación bacteriana, inflamación, disfunción endotelial, coagulopatía, y citoquinas reguladoras del sistema inmune (Th1 y Th2).
2. Dentro del grupo de pacientes coinfectados VIH/VHC, la rigidez hepática (kPa) se asoció con la disfunción del sistema inmune. Así, se encontró una relación positiva de los valores de rigidez hepática con marcadores de activación y senescencia del sistema inmune, translocación bacteriana, inflamación, disfunción endotelial y coagulopatía; mientras que se encontró una relación inversa con los valores plasmáticos de citoquinas relacionadas con la función inmune.
3. Los pacientes coinfectados VIH/VHC con cirrosis avanzada (>40 kPa) tuvieron el nivel más elevado de disfunción del sistema inmune, sobresaliendo sobre el resto de pacientes. Así, estos pacientes con >40kPa tuvieron mayores porcentajes de células T activadas, senescentes y Tregs, así como valores más elevados de marcadores de translocación bacteriana, inflamación, disfunción endotelial y coagulopatía; mientras que también mostraron los valores plasmáticos más bajos de citoquinas relacionadas con la función inmune y la proteína reguladora de la inflamación IL-1RA.
4. En global, los pacientes coinfectados VIH/VHC presentaron una disfunción inmune directamente relacionada con el grado de rigidez hepática, siendo más acusada en los pacientes con cirrosis avanzada (<40kPa).

SECCIÓN 2: ESTUDIO DE MICROBICIDAS FRENTE A INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL: VIH-1 Y VHS-2

5. La aplicación tópica del dendrímero de segunda generación G2-S16 al 3% bloqueó la transmisión vaginal del VHS-2 en un 100% en ratones BALB/c, pero, no bloqueó la transmisión rectal del VHS-2. Por otra parte, la aplicación tópica del dendrímero de primera generación G1-S4 al 3% bloqueó la transmisión vaginal del VHS-2 en un 90 % en ratones BALB/c, o más importante, este dendrímero bloqueó también en un 90% la transmisión rectal del VHS-2.
6. Utilizando un dendrímero análogo en estructura al G2-S16 pero marcado con FITC, G2-STE15-FITC se muestra que el dendrímero queda retenido en el tejido de la vagina donde ejerce su acción protectora incluso a 20 horas tras su aplicación. Además, el dendrímero G2-S16 ha demostrado ser bioseguro, no afectando a la mortalidad, efectos subletales o teratogénicos en los embriones del pez cebra (*Danio rerio*), modelo animal, diferente a los roedores, pero cada vez con mayor importancia en estudios de toxicología. De tal forma que, en el caso de que el dendrímero atravesara la membrana epitelial no produciría toxicidad.

7. El pre-tratamiento a nivel vaginal durante 7 días consecutivos de ratones hembras BALB/c con el dendrímero G2-S16 al 3% o la combinación G2-S16 al 3% y TFV 1% no produjo irritación vaginal ni inflamación. Los dendrímeros G2-STE16 y G3-S16 per se y en combinados con TFV o MRV mantuvieron su efecto antiviral en presencia de semen en el cultivo celular. Cuando se combinaron con los ARV, mantuvieron sus valores de inhibición frente a todos los aislados virales.
8. Los nuevos datos relacionados con el dendrímero G2-S16 indican que podría llevarse a fase clínica 1a.
9. Los dendrones son menos eficiente que las nanopartículas de oro como inhibidores de la infección por VIH-1. Los resultados obtenidos enfatizan la importancia de la dendronización al disminuir la toxicidad y aumentar la actividad antiviral frente al VIH-1 con respecto a los dendrones.

7

BIBLIOGRAFÍA



1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-871.
2. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;224(4648):500-503.
3. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012;18(3):182-192.
4. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*. 2002;296(5577):2354-2360.
5. Li G, Piampongsant S, Faria NR, et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology*. 2015;12:18.
6. UNAIDS. *Global AIDS Response Progress Reporting (GARPR)* Geneva, Switzerland: UNAIDS-Joint United Nations Programme on HIV/AIDS;2016.
7. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999;285(1):1-32.
8. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J*. 1991;5(10):2349-2360.
9. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:1-25.
10. Lazar DC, Morris KV, Saayman SM. The emerging role of long non-coding RNAs in HIV infection. *Virus Res*. 2016;212:114-126.
11. Sattentau QJ, Weiss RA. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell*. 1988;52(5):631-633.
12. Sattentau QJ. The role of the CD4 antigen in HIV infection and immune pathogenesis. *AIDS*. 1988;2 Suppl 1:S11-16.
13. Chiang K, Rice AP. MicroRNA-mediated restriction of HIV-1 in resting CD4+ T cells and monocytes. *Viruses*. 2012;4(9):1390-1409.
14. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008;319(5865):921-926.
15. Bushman FD, Malani N, Fernandes J, et al. Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000437.
16. Weiss RA. Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. *BMC Biol*. 2013;11:57.
17. Ambrose Z, Aiken C. HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*. 2014;454-455:371-379.
18. Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10).
19. Wong RW, Mamede JI, Hope TJ. Impact of Nucleoporin-Mediated Chromatin Localization and Nuclear Architecture on HIV Integration Site Selection. *J Virol*. 2015;89(19):9702-9705.
20. Craigie R, Bushman FD. Host Factors in Retroviral Integration and the Selection of Integration Target Sites. *Microbiol Spectr*. 2014;2(6).
21. Mbonye U, Karn J. Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology*. 2014;454-455:328-339.
22. Jeang KT. Multi-Faceted Post-Transcriptional Functions of HIV-1 Rev. *Biology (Basel)*. 2012;1(2):165-174.

23. Pilcher CD, Eron JJ, Jr., Galvin S, Gay C, Cohen MS. Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J Clin Invest*. 2004;113(7):937-945.
24. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996;271(5255):1582-1586.
25. Rice AP. Roles of microRNAs and long-noncoding RNAs in human immunodeficiency virus replication. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015;6(6):661-670.
26. Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(1):25-34.
27. Hu Q, Frank I, Williams V, et al. Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp Med*. 2004;199(8):1065-1075.
28. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):447-457.
29. Miller CJ, Li Q, Abel K, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. 2005;79(14):9217-9227.
30. Sodora DL, Gettie A, Miller CJ, Marx PA. Vaginal transmission of SIV: assessing infectivity and hormonal influences in macaques inoculated with cell-free and cell-associated viral stocks. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998;14 Suppl 1:S119-123.
31. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*. 2001;357(9263):1149-1153.
32. Patel P, Borkowf CB, Brooks JT, Lasry A, Lansky A, Mermin J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS*. 2014;28(10):1509-1519.
33. Carias AM, McCoombe S, McRaven M, et al. Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J Virol*. 2013;87(21):11388-11400.
34. Miller CJ, Shattock RJ. Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect*. 2003;5(1):59-67.
35. Norvell MK, Benrubi GI, Thompson RJ. Investigation of microtrauma after sexual intercourse. *J Reprod Med*. 1984;29(4):269-271.
36. Van Howe RS. Does circumcision influence sexually transmitted diseases?: a literature review. *BJU Int*. 1999;83 Suppl 1:52-62.
37. Mostad SB, Overbaugh J, DeVange DM, et al. Hormonal contraception, vitamin A deficiency, and other risk factors for shedding of HIV-1 infected cells from the cervix and vagina. *Lancet*. 1997;350(9082):922-927.
38. Dezzutti CS, Guenther PC, Cummins JE, Jr., et al. Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 2001;183(8):1204-1213.
39. Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med*. 1997;3(1):42-47.
40. Wu Z, Chen Z, Phillips DM. Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J Infect Dis*. 2003;188(10):1473-1482.
41. Masters WH, Johnson VE. The artificial vagina: anatomic, physiologic, psychosexual function. *West J Surg Obstet Gynecol*. 1961;69:192-212.
42. Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod*. 2007;13(7):491-501.

43. Maher D, Wu X, Schacker T, Horbul J, Southern P. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11504-11509.
44. Li Z, Palaniyandi S, Zeng R, Tuo W, Roopenian DC, Zhu X. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(11):4388-4393.
45. Alfsen A, Yu H, Magerus-Chatinet A, Schmitt A, Bomsel M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell*. 2005;16(9):4267-4279.
46. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-597.
47. Hladik F, Doncel GF. Preventing mucosal HIV transmission with topical microbicides: challenges and opportunities. *Antiviral Res*. 2010;88 Suppl 1:S3-9.
48. Gougeon ML. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(5):392-404.
49. Douek DC. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev*. 2003;5(3):172-177.
50. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008;372(9635):293-299.
51. Guaraldi G, Prakash M, Moecklinghoff C, Stellbrink HJ. Morbidity in older HIV-infected patients: impact of long-term antiretroviral use. *AIDS Rev*. 2014;16(2):75-89.
52. Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, et al. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 2017;187(1):44-52.
53. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15035.
54. Allers K, Hutter G, Hofmann J, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(10):2791-2799.
55. Symons J, Vandekerckhove L, Hutter G, et al. Dependence on the CCR5 coreceptor for viral replication explains the lack of rebound of CXCR4-predicted HIV variants in the Berlin patient. *Clin Infect Dis*. 2014;59(4):596-600.
56. Balabanova Y, Ignatyeva O, Fiebig L, et al. Survival of patients with multidrug-resistant TB in Eastern Europe: what makes a difference? *Thorax*. 2016;71(9):854-861.
57. Anton PA, Elliott J, Poles MA, et al. Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue. *AIDS*. 2000;14(12):1761-1765.
58. Somsouk M, Estes JD, Deleage C, et al. Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection. *AIDS*. 2015;29(1):43-51.
59. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-1371.
60. Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, et al. Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals. *J Clin Invest*. 2012;122(1):62-69.
61. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One*. 2008;3(6):e2516.

62. Kim CJ, McKinnon LR, Kovacs C, et al. Mucosal Th17 cell function is altered during HIV infection and is an independent predictor of systemic immune activation. *J Immunol.* 2013;191(5):2164-2173.
63. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol.* 2013;21(1):6-13.
64. d'Ettorre G, Paiardini M, Zaffiri L, et al. HIV persistence in the gut mucosa of HIV-infected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS. *Curr HIV Res.* 2011;9(3):148-153.
65. Sandler NG, Koh C, Roque A, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology.* 2011;141(4):1220-1230, 1230 e1221-1223.
66. Baroncelli S, Galluzzo CM, Pirillo MF, et al. Microbial translocation is associated with residual viral replication in HAART-treated HIV+ subjects with <50copies/ml HIV-1 RNA. *J Clin Virol.* 2009;46(4):367-370.
67. Waki K, Freed EO. Macrophages and Cell-Cell Spread of HIV-1. *Viruses.* 2010;2(8):1603-1620.
68. Allers K, Fehr M, Conrad K, et al. Macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients. *J Infect Dis.* 2014;209(5):739-748.
69. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature.* 2001;410(6831):980-987.
70. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008;214(2):231-241.
71. Nasi M, Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Persistent inflammation in HIV infection: established concepts, new perspectives. *Immunol Lett.* 2014;161(2):184-188.
72. Klatt NR, Chomont N, Douek DC, Deeks SG. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev.* 2013;254(1):326-342.
73. Abbink TE, Berkhout B. HIV-1 reverse transcription initiation: a potential target for novel antivirals? *Virus Res.* 2008;134(1-2):4-18.
74. Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, et al. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation. *Mitochondrion.* 2011;11(5):750-755.
75. Pinti M, Mussini C, Cossarizza A. Mitochondrial DNA: a proinflammatory 'enemy from within' during HIV infection? *Cell Death Dis.* 2012;3:307.
76. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S45-57.
77. WHO. *Combating Hepatitis B and C to Reach Elimination by 2030.* Geneva: World Health Organization;2016.
78. Manns MP, Buti M, Gane E, et al. Hepatitis C virus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17006.
79. WHO. *Draft Global Health Sector Strategies Viral Hepatitis 2016–2021.* Assembly WHOS-NWH; 11-29-2016 2016.
80. Sibley A, Han KH, Abourached A, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus infections with today's treatment paradigm - volume 3. *J Viral Hepat.* 2015;22 Suppl 4:21-41.

81. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-327.
82. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77-87.
83. Collaborators TPOH. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2016;Vol. 2 (3):161–176.
84. PetruzzIELLO A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016;22(34):7824-7840.
85. Aguilera A, Navarro D, Rodriguez Frias F, et al. Prevalence and distribution of hepatitis C virus genotypes in Spain during the 2000-2015 period (The GEHEP 005 study). *J Viral Hepat*. 2017.
86. Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol*. 2008;48(1):148-162.
87. Urbanus AT, van de Laar TJ, Stolte IG, et al. Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: an expanding epidemic. *AIDS*. 2009;23(12):F1-7.
88. Schmidt AJ, Falcato L, Zahno B, et al. Prevalence of hepatitis C in a Swiss sample of men who have sex with men: whom to screen for HCV infection? *BMC Public Health*. 2014;14:3.
89. Kouyos RD, Rauch A, Braun DL, et al. Higher risk of incident hepatitis C virus coinfection among men who have sex with men, in whom the HIV genetic bottleneck at transmission was wide. *J Infect Dis*. 2014;210(10):1555-1561.
90. Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016;388(10049):1081-1088.
91. Wedemeyer H, Duberg AS, Buti M, et al. Strategies to manage hepatitis C virus (HCV) disease burden. *J Viral Hepat*. 2014;21 Suppl 1:60-89.
92. Gane E, Kershenovich D, Seguin-Devaux C, et al. Strategies to manage hepatitis C virus (HCV) infection disease burden - volume 2. *J Viral Hepat*. 2015;22 Suppl 1:46-73.
93. Alfaleh FZ, Nugrahini N, Maticic M, et al. Strategies to manage hepatitis C virus infection disease burden - volume 3. *J Viral Hepat*. 2015;22 Suppl 4:42-65.
94. Negro F, Forton D, Craxi A, Sulkowski MS, Feld JJ, Manns MP. Extrahepatic morbidity and mortality of chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1345-1360.
95. van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, et al. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA*. 2012;308(24):2584-2593.
96. You S, Rice CM. 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J Virol*. 2008;82(1):184-195.
97. Cordek DG, Bechtel JT, Maynard AT, Kazmierski WM, Cameron CE. Targeting the Ns5a Protein of Hcv: An Emerging Option. *Drugs Future*. 2011;36(9):691-711.
98. Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*. 1998;12(1):67-83.

99. Li HF, Huang CH, Ai LS, Chuang CK, Chen SS. Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry. *J Biomed Sci.* 2009;16:89.
100. Freedman H, Logan MR, Law JL, Houghton M. Structure and Function of the Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins E1 and E2: Antiviral and Vaccine Targets. *ACS Infect Dis.* 2016;2(11):749-762.
101. Cook GA, Opella SJ. NMR studies of p7 protein from hepatitis C virus. *Eur Biophys J.* 2010;39(7):1097-1104.
102. Franck N, Le Seyec J, Guguen-Guillouzo C, Erdtmann L. Hepatitis C virus NS2 protein is phosphorylated by the protein kinase CK2 and targeted for degradation to the proteasome. *J Virol.* 2005;79(5):2700-2708.
103. Levin MK, Gurjar M, Patel SS. A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(5):429-435.
104. Tanji Y, Hijikata M, Satoh S, Kaneko T, Shimotohno K. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J Virol.* 1995;69(3):1575-1581.
105. Gretton SN, Taylor AI, McLauchlan J. Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 5):1415-1421.
106. Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology.* 2001;284(1):1-12.
107. Wang C, Gale M, Jr., Keller BC, et al. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell.* 2005;18(4):425-434.
108. You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol.* 2004;78(3):1352-1366.
109. Chevaliez S, Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle. 2006.
110. Colina R, Casane D, Vasquez S, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 1):31-37.
111. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science.* 1998;282(5386):103-107.
112. Ogata N, Alter HJ, Miller RH, Purcell RH. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(8):3392-3396.
113. Farci P, Shimoda A, Coiana A, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science.* 2000;288(5464):339-344.
114. Dustin LB, Bartolini B, Capobianchi MR, Pistello M. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(10):826-832.
115. Andre P, Komurian-Pradel F, Deforges S, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol.* 2002;76(14):6919-6928.
116. Barth H, Schafer C, Adah MI, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41003-41012.
117. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12766-12771.

118. Feneant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses*. 2014;6(2):535-572.
119. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998;282(5390):938-941.
120. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 2007;446(7137):801-805.
121. Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med*. 2011;17(5):589-595.
122. Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*. 2009;457(7231):882-886.
123. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*. 2012;18(2):281-285.
124. Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology*. 2008;47(1):17-24.
125. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013;19(7):837-849.
126. Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol*. 1999;73(2):1165-1174.
127. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:167-198.
128. Bishe B, Syed G, Siddiqui A. Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses*. 2012;4(10):2340-2358.
129. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*. 2011;19(2):95-103.
130. Herker E, Harris C, Hernandez C, et al. Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1. *Nat Med*. 2010;16(11):1295-1298.
131. Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):e1002302.
132. Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol*. 1999;73(12):9718-9725.
133. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008;47(2):729-736.
134. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009;29 Suppl 1:74-81.
135. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):911-922.
136. Horner SM. Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. *J Mol Biol*. 2014;426(6):1198-1209.
137. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*. 2008;454(7203):523-527.
138. Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, et al. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):e1002289.

139. Fredericksen B, Akkaraju GR, Foy E, et al. Activation of the interferon-beta promoter during hepatitis C virus RNA replication. *Viral Immunol.* 2002;15(1):29-40.
140. Wang N, Liang Y, Devaraj S, Wang J, Lemon SM, Li K. Toll-like receptor 3 mediates establishment of an antiviral state against hepatitis C virus in hepatoma cells. *J Virol.* 2009;83(19):9824-9834.
141. Lee J, Wu CC, Lee KJ, et al. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(6):1828-1833.
142. Dansako H, Yamane D, Welsch C, et al. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003345.
143. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe.* 2012;12(4):558-570.
144. Dolganiuc A, Oak S, Kodys K, et al. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology.* 2004;127(5):1513-1524.
145. Machida K, Cheng KT, Sung VM, Levine AM, Fong S, Lai MM. Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6. *J Virol.* 2006;80(2):866-874.
146. Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1beta via caspase-1-inflammasome complex. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 2):235-246.
147. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, et al. IL-1beta production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003330.
148. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461(7265):798-801.
149. Kelly C, Klenerman P, Barnes E. Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut.* 2011;60(9):1284-1293.
150. Bellecave P, Sarasin-Filipowicz M, Donze O, et al. Cleavage of mitochondrial antiviral signaling protein in the liver of patients with chronic hepatitis C correlates with a reduced activation of the endogenous interferon system. *Hepatology.* 2010;51(4):1127-1136.
151. Li K, Foy E, Ferreón JC, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2992-2997.
152. Zhang Z, Kim T, Bao M, et al. DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity.* 2011;34(6):866-878.
153. Larrubia JR, Benito-Martinez S, Miquel J, et al. Bim-mediated apoptosis and PD-1/PD-L1 pathway impair reactivity of PD1(+)/CD127(-) HCV-specific CD8(+) cells targeting the virus in chronic hepatitis C virus infection. *Cell Immunol.* 2011;269(2):104-114.
154. Edwards VC, Tarr AW, Urbanowicz RA, Ball JK. The role of neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 1):1-19.
155. Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(14):6025-6030.
156. Zeisel MB, Cosset FL, Baumert TF. Host neutralizing responses and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2008;48(1):299-307.

157. Racanelli V, Frassanito MA, Leone P, et al. Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J Virol*. 2006;80(8):3923-3934.
158. Sherman AC, Sherman KE. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection: navigating CHASM. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2015;12(3):353-361.
159. Barth H, Ulsenheimer A, Pape GR, et al. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood*. 2005;105(9):3605-3614.
160. Schildberg FA, Hegenbarth SI, Schumak B, Scholz K, Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):957-967.
161. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 2006;69(3):129-141.
162. Takaki A, Wiese M, Maertens G, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med*. 2000;6(5):578-582.
163. Kaplan DE, Sugimoto K, Newton K, et al. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 2007;132(2):654-666.
164. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1745-1754.
165. Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist J, et al. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol*. 2008;82(4):1827-1837.
166. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology*. 2008;134(7):1927-1937, 1937 e1921-1922.
167. Cox AL, Mosbrugger T, Mao Q, et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med*. 2005;201(11):1741-1752.
168. Abel M, Sene D, Pol S, et al. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2006;44(6):1607-1616.
169. Alatrakchi N, Graham CS, van der Vliet HJ, Sherman KE, Exley MA, Koziel MJ. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J Virol*. 2007;81(11):5882-5892.
170. Yoon JH, Gores GJ. Death receptor-mediated apoptosis and the liver. *J Hepatol*. 2002;37(3):400-410.
171. Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2005;79(12):7860-7867.
172. Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):201-213.
173. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *J Hepatol*. 2017;66(1):153-194.
174. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005;436(7053):967-972.
175. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-982.

176. Martinot-Peignoux M, Stern C, Maylin S, et al. Twelve weeks posttreatment follow-up is as relevant as 24 weeks to determine the sustained virologic response in patients with hepatitis C virus receiving pegylated interferon and ribavirin. *Hepatology*. 2010;51(4):1122-1126.
177. Lynch SM, Wu GY. Hepatitis C Virus: A Review of Treatment Guidelines, Cost-effectiveness, and Access to Therapy. *J Clin Transl Hepatol*. 2016;4(4):310-319.
178. Taylor MW, Grosse WM, Schaley JE, et al. Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. *J Interferon Cytokine Res*. 2004;24(2):107-118.
179. Burstow NJ, Mohamed Z, Gomaa AI, et al. Hepatitis C treatment: where are we now? *Int J Gen Med*. 2017;10:39-52.
180. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet*. 2008;372(9635):321-332.
181. Abaira García LGS, GP, A., Otero Antón, B., Suárez López, E. *Guía de Práctica Clínica de la Hepatitis C*. Santiago de Compostela 2009.
182. Myrmet H, Ulvestad E, Asjo B. The hepatitis C virus enigma. *APMIS*. 2009;117(5-6):427-439.
183. Poynard T, Morra R, Ingiliz P, et al. Biomarkers of liver fibrosis. *Adv Clin Chem*. 2008;46:131-160.
184. Alberti A, Benvegnu L, Boccato S, Ferrari A, Sebastiani G. Natural history of initially mild chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis*. 2004;36(10):646-654.
185. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:425-456.
186. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(2):209-218.
187. Pinzone MR, Celesia BM, Di Rosa M, Cacopardo B, Nunnari G. Microbial translocation in chronic liver diseases. *Int J Microbiol*. 2012;2012:694629.
188. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-293.
189. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg*. 1964;1:1-85.
190. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45(3):797-805.
191. Asrani SK, Kamath PS. Natural history of cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013;15(2):308.
192. Moreau R, Arroyo V. Acute-on-chronic liver failure: a new clinical entity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(5):836-841.
193. Wong F, Bernardi M, Balk R, et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut*. 2005;54(5):718-725.
194. Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014;61(6):1385-1396.
195. Dirchwolf M, Ruf AE. Role of systemic inflammation in cirrhosis: From pathogenesis to prognosis. *World J Hepatol*. 2015;7(16):1974-1981.
196. Sipeki N, Antal-Szalmás P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2564-2577.
197. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol*. 2006;44(1):217-231.
198. Bruns T, Zimmermann HW, Stallmach A. Risk factors and outcome of bacterial infections in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2542-2554.

199. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2008;28(1):26-42.
200. Jalan R, Gines P, Olson JC, et al. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol.* 2012;57(6):1336-1348.
201. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology.* 1993;104(5):1492-1497.
202. Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrec D, Moreau R. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol.* 2006;45(2):280-289.
203. Coant N, Simon-Rudler M, Gustot T, et al. Glycogen synthase kinase 3 involvement in the excessive proinflammatory response to LPS in patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* 2011;55(4):784-793.
204. Galbois A, Thabut D, Tazi KA, et al. Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology.* 2009;49(1):175-184.
205. Munoz L, Albillos A, Nieto M, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology.* 2005;42(2):411-419.
206. Fernandez J, Ruiz del Arbol L, Gomez C, et al. Norfloxacin vs ceftriaxone in the prophylaxis of infections in patients with advanced cirrhosis and hemorrhage. *Gastroenterology.* 2006;131(4):1049-1056; quiz 1285.
207. Keeffe EB, Iwarson S, McMahon BJ, et al. Safety and immunogenicity of hepatitis A vaccine in patients with chronic liver disease. *Hepatology.* 1998;27(3):881-886.
208. Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, et al. Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol.* 2005;42(2):195-201.
209. Berres ML, Schnyder B, Yagmur E, et al. Longitudinal monocyte human leukocyte antigen-DR expression is a prognostic marker in critically ill patients with decompensated liver cirrhosis. *Liver Int.* 2009;29(4):536-543.
210. Berry PA, Antoniadis CG, Carey I, et al. Severity of the compensatory anti-inflammatory response determined by monocyte HLA-DR expression may assist outcome prediction in cirrhosis. *Intensive Care Med.* 2011;37(3):453-460.
211. Ubeda M, Munoz L, Borrero MJ, et al. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis. *Hepatology.* 2010;52(6):2086-2095.
212. Lemmers A, Gustot T, Durnez A, et al. An inhibitor of interleukin-6 trans-signalling, sgp130, contributes to impaired acute phase response in human chronic liver disease. *Clin Exp Immunol.* 2009;156(3):518-527.
213. Le Moine O, Deviere J, Devaster JM, et al. Interleukin-6: an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* 1994;20(6):819-824.
214. Mackenzie I, Woodhouse J. C-reactive protein concentrations during bacteraemia: A comparison between patients with and without liver dysfunction. *Intensive Care Med.* 2006;32(9):1344-1351.
215. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology.* 2003;37(1):208-217.
216. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, et al. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology.* 2012;55(3):709-719.

217. Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet*. 2004;363(9421):1608-1610.
218. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;60(1):197-209.
219. Giannelli V, Di Gregorio V, Iebba V, et al. Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(45):16795-16810.
220. Shawcross DL, Austin MJ, Abeles RD, et al. The impact of organ dysfunction in cirrhosis: survival at a cost? *J Hepatol*. 2012;56(5):1054-1062.
221. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1246-1256, 1256 e1241-1245.
222. Moreau R, Jalan R, Gines P, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*. 2013;144(7):1426-1437, 1437 e1421-1429.
223. Albillos A, Hera Ad Ade L, Reyes E, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol*. 2004;40(4):624-631.
224. Papp M, Sipeki N, Vitalis Z, et al. High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013;59(3):457-466.
225. Trebicka J, Krag A, Gansweid S, et al. Soluble TNF-alpha-receptors I are prognostic markers in TIPS-treated patients with cirrhosis and portal hypertension. *PLoS One*. 2013;8(12):e83341.
226. Grunhage F, Rezori B, Neef M, et al. Elevated soluble tumor necrosis factor receptor 75 concentrations identify patients with liver cirrhosis at risk of death. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(11):1255-1262.
227. Giron-Gonzalez JA, Martinez-Sierra C, Rodriguez-Ramos C, et al. Adhesion molecules as a prognostic marker of liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(2):217-224.
228. McCashland TM, Preheim LC, Gentry MJ. Pneumococcal vaccine response in cirrhosis and liver transplantation. *J Infect Dis*. 2000;181(2):757-760.
229. Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S121-131.
230. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R, et al. Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2010;52(6):2044-2052.
231. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest*. 1999;104(9):1223-1233.
232. Tazi KA, Moreau R, Herve P, et al. Norfloxacin reduces aortic NO synthases and proinflammatory cytokine up-regulation in cirrhotic rats: role of Akt signaling. *Gastroenterology*. 2005;129(1):303-314.
233. Rasaratnam B, Kaye D, Jennings G, Dudley F, Chin-Dusting J. The effect of selective intestinal decontamination on the hyperdynamic circulatory state in cirrhosis. A randomized trial. *Ann Intern Med*. 2003;139(3):186-193.
234. Wright G, Davies NA, Shawcross DL, et al. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology*. 2007;45(6):1517-1526.

235. Jover R, Rodrigo R, Felipe V, et al. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(6):1257-1266.
236. Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(8):1505-1516.
237. Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, et al. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*. 2010;77(6):527-535.
238. Gomez H, Ince C, De Backer D, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014;41(1):3-11.
239. Berenguer J, Alejos B, Hernando V, et al. Trends in mortality according to hepatitis C virus serostatus in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 2012;26(17):2241-2246.
240. Lopez-Dieguez M, Montes ML, Pascual-Pareja JF, et al. The natural history of liver cirrhosis in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS*. 2011;25(7):899-904.
241. Macias J, Berenguer J, Japon MA, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfected with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology*. 2009;50(4):1056-1063.
242. Cotte L, Pugliese P, Valantin MA, et al. Hepatitis C treatment initiation in HIV-HCV coinfected patients. *BMC Infect Dis*. 2016;16:345.
243. Hawkins C, Grant J, Ammerman LR, et al. High rates of hepatitis C virus (HCV) cure using direct-acting antivirals in HIV/HCV-coinfected patients: a real-world perspective. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(9):2642-2645.
244. Brau N WD, Kottlil S, et al. . Sofosbuvir/velpatasvir fixed dose combination for 12 weeks in patients co-infected with HCV and HIV-1: the phase 3 ASTRAL-5 study. 21st International AIDS Conference; 02-2016, 2016; Boston, MA.
245. Terilli RR, Cox AL. Immunity and hepatitis C: a review. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2013;10(1):51-58.
246. Hufert FT, Schmitz J, Schreiber M, Schmitz H, Racz P, von Laer DD. Human Kupffer cells infected with HIV-1 in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993;6(7):772-777.
247. Rotman Y, Liang TJ. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. *J Virol*. 2009;83(15):7366-7374.
248. Iannello A, Debbeche O, Samarani S, Ahmad A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):27-49.
249. Kim AY, Chung RT. Coinfection with HIV-1 and HCV--a one-two punch. *Gastroenterology*. 2009;137(3):795-814.
250. Netski DM, Mosbrugger T, Astemborski J, Mehta SH, Thomas DL, Cox AL. CD4+ T cell-dependent reduction in hepatitis C virus-specific humoral immune responses after HIV infection. *J Infect Dis*. 2007;195(6):857-863.
251. Graham CS, Baden LR, Yu E, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2001;33(4):562-569.
252. Blackard JT, Sherman KE. HCV/ HIV co-infection: time to re-evaluate the role of HIV in the liver? *J Viral Hepat*. 2008;15(5):323-330.

253. Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology*. 2003;38(6):1468-1476.
254. Munshi N, Balasubramanian A, Koziel M, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C and human immunodeficiency virus envelope proteins cooperatively induce hepatocytic apoptosis via an innocent bystander mechanism. *J Infect Dis*. 2003;188(8):1192-1204.
255. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(8):583-594.
256. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;46(1):48-57.
257. Graham CS, Wells A, Liu T, et al. Antigen-specific immune responses and liver histology in HIV and hepatitis C coinfection. *AIDS*. 2005;19(8):767-773.
258. Nunez M, Soriano V, Lopez M, et al. Coinfection with hepatitis C virus increases lymphocyte apoptosis in HIV-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2006;43(9):1209-1212.
259. Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, et al. Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunity*. 2001;15(6):871-882.
260. Mastroianni CM, Lichtner M, Mascia C, Zuccala P, Vullo V. Molecular mechanisms of liver fibrosis in HIV/HCV coinfection. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9184-9208.
261. Balagopal A, Philp FH, Astemborski J, et al. Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C. *Gastroenterology*. 2008;135(1):226-233.
262. Ryan P, Berenguer J, Michelaud D, et al. Insulin resistance is associated with advanced liver fibrosis and high body mass index in HIV/HCV-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009;50(1):109-110.
263. Perez-Matute P, Perez-Martinez L, Blanco JR, Oteo JA. Role of mitochondria in HIV infection and associated metabolic disorders: focus on nonalcoholic fatty liver disease and lipodystrophy syndrome. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:493413.
264. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet*. 2007;370(9605):2127-2137.
265. Looker KJ, Margaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One*. 2015;10(1):e114989.
266. WHO. *Guidelines for the Treatment of Genital Herpes Simplex Virus 2016*. Geneva: World Health Organization;2016.
267. Pinninti SG, Kimberlin DW. Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *Am J Perinatol*. 2013;30(2):113-119.
268. Looker KJ, Margaret AS, May MT, et al. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. *Lancet Glob Health*. 2017;5(3):e300-e309.
269. Kaushic C, Roth KL, Anipindi V, Xiu F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: the role of female sex hormones in regulating susceptibility and immune responses. *J Reprod Immunol*. 2011;88(2):204-209.
270. Okuku HS, Sanders EJ, Nyiro J, et al. Factors associated with herpes simplex virus type 2 incidence in a cohort of human immunodeficiency virus type 1-seronegative Kenyan men and women reporting high-risk sexual behavior. *Sex Transm Dis*. 2011;38(9):837-844.
271. Wildy P, Russell WC, Horne RW. The morphology of herpes virus. *Virology*. 1960;12:204-222.

272. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol.* 1998;72(3):2010-2021.
273. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 2006;117(1):90-104.
274. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol.* 1974;14(1):8-19.
275. Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* 2003;77(19):10179-10185.
276. Krummenacher C, Baribaud F, Ponce de Leon M, et al. Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus. *Virology.* 2004;322(2):286-299.
277. Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses.* 2012;4(5):800-832.
278. Radtke K, Kieneke D, Wolfstein A, et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1000991.
279. Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol.* 2009;83(4):1660-1668.
280. Boehmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:347-384.
281. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(13):1635-1652.
282. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):423-429.
283. Schiffer JT, Wald A, Selke S, Corey L, Magaret A. The kinetics of mucosal herpes simplex virus-2 infection in humans: evidence for rapid viral-host interactions. *J Infect Dis.* 2011;204(4):554-561.
284. Pellet PE RB. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: virology F, ed. *5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.* Philadelphia 2007:2480-2499.
285. Lachmann R. Herpes simplex virus latency. *Expert Rev Mol Med.* 2003;5(29):1-14.
286. Efstathiou S, Preston CM. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res.* 2005;111(2):108-119.
287. Freeman EE, White RG, Bakker R, et al. Population-level effect of potential HSV2 prophylactic vaccines on HIV incidence in sub-Saharan Africa. *Vaccine.* 2009;27(6):940-946.
288. Johnston C, Koelle DM, Wald A. Current status and prospects for development of an HSV vaccine. *Vaccine.* 2014;32(14):1553-1560.
289. Gottlieb SL, Low N, Newman LM, Bolan G, Kamb M, Broutet N. Toward global prevention of sexually transmitted infections (STIs): the need for STI vaccines. *Vaccine.* 2014;32(14):1527-1535.
290. Stanfield B, Kousoulas KG. Herpes Simplex Vaccines: Prospects of Live-attenuated HSV Vaccines to Combat Genital and Ocular infections. *Curr Clin Microbiol Rep.* 2015;2(3):125-136.
291. Chu CF, Meador MG, Young CG, Strasser JE, Bourne N, Milligan GN. Antibody-mediated protection against genital herpes simplex virus type 2 disease in mice by Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Reprod Immunol.* 2008;78(1):58-67.

292. Wakim LM, Jones CM, Gebhardt T, Preston CM, Carbone FR. CD8(+) T-cell attenuation of cutaneous herpes simplex virus infection reduces the average viral copy number of the ensuing latent infection. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(8):666-675.
293. St Leger AJ, Hendricks RL. CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. *J Neurovirol.* 2011;17(6):528-534.
294. Blank H, Haines HG. Experimental human reinfection with herpes simplex virus. *J Invest Dermatol.* 1973;61(4):223-225.
295. Mertz GJ, Schmidt O, Jourden JL, et al. Frequency of acquisition of first-episode genital infection with herpes simplex virus from symptomatic and asymptomatic source contacts. *Sex Transm Dis.* 1985;12(1):33-39.
296. Peng T, Zhu J, Phasouk K, Koelle DM, Wald A, Corey L. An effector phenotype of CD8+ T cells at the junction epithelium during clinical quiescence of herpes simplex virus 2 infection. *J Virol.* 2012;86(19):10587-10596.
297. Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, et al. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3496-3501.
298. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Katz DR, Chain BM. Glycoprotein-dependent and TLR2-independent innate immune recognition of herpes simplex virus-1 by dendritic cells. *J Immunol.* 2008;180(11):7525-7536.
299. Nazli A, Yao XD, Smieja M, Rosenthal KL, Ashkar AA, Kaushic C. Differential induction of innate anti-viral responses by TLR ligands against Herpes simplex virus, type 2, infection in primary genital epithelium of women. *Antiviral Res.* 2009;81(2):103-112.
300. Iijima N, Linehan MM, Zamora M, et al. Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med.* 2008;205(13):3041-3052.
301. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature.* 2009;462(7272):510-513.
302. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS.* 2006;20(1):73-83.
303. Serwadda D, Gray RH, Sewankambo NK, et al. Human immunodeficiency virus acquisition associated with genital ulcer disease and herpes simplex virus type 2 infection: a nested case-control study in Rakai, Uganda. *J Infect Dis.* 2003;188(10):1492-1497.
304. Kaul R, Pettengell C, Sheth PM, et al. The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. *J Reprod Immunol.* 2008;77(1):32-40.
305. Zhu J, Hladik F, Woodward A, et al. Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition. *Nat Med.* 2009;15(8):886-892.
306. Todd J, Riedner G, Maboko L, et al. Effect of genital herpes on cervicovaginal HIV shedding in women co-infected with HIV AND HSV-2 in Tanzania. *PLoS One.* 2013;8(3):e59037.
307. Augenbraun M, Feldman J, Chirgwin K, et al. Increased genital shedding of herpes simplex virus type 2 in HIV-seropositive women. *Ann Intern Med.* 1995;123(11):845-847.
308. Wald A, Link K. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. *J Infect Dis.* 2002;185(1):45-52.
309. Celum C, Wald A, Lingappa JR, et al. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. *N Engl J Med.* 2010;362(5):427-439.

310. Isaacman-Beck J, Hermann EA, Yi Y, et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: Macrophage tropism, alternative coreceptor use, and the molecular anatomy of CCR5 utilization. *J Virol*. 2009;83(16):8208-8220.
311. Alexander M, Lynch R, Mulenga J, Allen S, Derdeyn CA, Hunter E. Donor and recipient envs from heterosexual human immunodeficiency virus subtype C transmission pairs require high receptor levels for entry. *J Virol*. 2010;84(8):4100-4104.
312. Wang HB, Mo QH, Yang Z. HIV vaccine research: the challenge and the way forward. *J Immunol Res*. 2015;2015:503978.
313. Shin SY. Recent update in HIV vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res*. 2016;5(1):6-11.
314. Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med*. 2012;366(1):34-43.
315. Sepulveda-Crespo D, Cena-Diez R, Jimenez JL, Angeles Munoz-Fernandez M. Mechanistic Studies of Viral Entry: An Overview of Dendrimer-Based Microbicides As Entry Inhibitors Against Both HIV and HSV-2 Overlapped Infections. *Med Res Rev*. 2017;37(1):149-179.
316. Sanchez-Rodriguez J, Vacas-Cordoba E, Gomez R, De La Mata FJ, Munoz-Fernandez MA. Nanotech-derived topical microbicides for HIV prevention: the road to clinical development. *Antiviral Res*. 2015;113:33-48.
317. Jain S, Mayer KH. Practical guidance for nonoccupational postexposure prophylaxis to prevent HIV infection: an editorial review. *AIDS*. 2014;28(11):1545-1554.
318. Tanphaichitr N, Srakaew N, Alonzi R, et al. Potential Use of Antimicrobial Peptides as Vaginal Spermicides/Microbicides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(1).
319. Lederman MM, Offord RE, Hartley O. Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(5):371-382.
320. Roddy RE, Zekeng L, Ryan KA, Tamoufe U, Weir SS, Wong EL. A controlled trial of nonoxynol 9 film to reduce male-to-female transmission of sexually transmitted diseases. *N Engl J Med*. 1998;339(8):504-510.
321. Wilkinson D, Ramjee G, Tholandi M, Rutherford G. Nonoxynol-9 for preventing vaginal acquisition of HIV infection by women from men. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002(4):CD003936.
322. Schreiber CA, Meyn LA, Creinin MD, Barnhart KT, Hillier SL. Effects of long-term use of nonoxynol-9 on vaginal flora. *Obstet Gynecol*. 2006;107(1):136-143.
323. Fichorova RN, Tucker LD, Anderson DJ. The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis*. 2001;184(4):418-428.
324. Weber J, Desai K, Darbyshire J. The development of vaginal microbicides for the prevention of HIV transmission. *PLoS Med*. 2005;2(5):e142.
325. Tao W, Richards C, Hamer D. Enhancement of HIV infection by cellulose sulfate. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24(7):925-929.
326. Baranova EO, Shastina NS, Shvets VI. [Polyanionic inhibitors of HIV adsorption]. *Bioorg Khim*. 2011;37(5):592-608.
327. Keller MJ, Mesquita PM, Torres NM, et al. Postcoital bioavailability and antiviral activity of 0.5% PRO 2000 gel: implications for future microbicide clinical trials. *PLoS One*. 2010;5(1):e8781.
328. Network MT. Understanding the Results of CAPRISA 004. 2010.
329. Network MT. Phase 1 Evaluation of Coitus on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tenofovir 1% Gel Following Pericoital or Daily Gel Dosing. 2013a

330. Friend DR, Kiser PF. Assessment of topical microbicides to prevent HIV-1 transmission: concepts, testing, lessons learned. *Antiviral Res.* 2013;99(3):391-400.
331. Network MT. A Phase 2 Randomized Sequence Open Label Expanded Safety and Acceptability Study of Oral Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Fumarate Tablet and Rectally-Applied Tenofovir Reduced-Glycerin 1% Gel. 2013b.
332. Andrei G, Lisco A, Vanpouille C, et al. Topical tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication. *Cell Host Microbe.* 2011;10(4):379-389.
333. McConville C, Boyd P, Major I. Efficacy of Tenofovir 1% Vaginal Gel in Reducing the Risk of HIV-1 and HSV-2 Infection. *Clin Med Insights Womens Health.* 2014;7:1-8.
334. Moss JA, Malone AM, Smith TJ, et al. Simultaneous delivery of tenofovir and acyclovir via an intravaginal ring. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):875-882.
335. Nel A, van Niekerk N, Kapiga S, et al. Safety and Efficacy of a Dapivirine Vaginal Ring for HIV Prevention in Women. *N Engl J Med.* 2016;375(22):2133-2143.
336. Mayer KH, Peipert J, Fleming T, et al. Safety and tolerability of BufferGel, a novel vaginal microbicide, in women in the United States. *Clin Infect Dis.* 2001;32(3):476-482.
337. Bayer LL, Jensen JT. ACIDFORM: a review of the evidence. *Contraception.* 2014;90(1):11-18.
338. Gupta SK, Nutan. Clinical use of vaginal or rectally applied microbicides in patients suffering from HIV/AIDS. *HIV AIDS (Auckl).* 2013;5:295-307.
339. Antimisiaris SG, Mourtas S. Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;92:123-145.
340. Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanomedicine. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2434-2443.
341. Baert L, van 't Klooster G, Dries W, et al. Development of a long-acting injectable formulation with nanoparticles of rilpivirine (TMC278) for HIV treatment. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(3):502-508.
342. Vacas Cordoba E, Arnaiz E, Rellosó M, et al. Development of sulphated and naphthylsulphonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *AIDS.* 2013;27(8):1219-1229.
343. Chonco L, Pion M, Vacas E, et al. Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release.* 2012;161(3):949-958.
344. Briz V, Sepulveda-Crespo D, Diniz AR, et al. Development of water-soluble polyanionic carbosilane dendrimers as novel and highly potent topical anti-HIV-2 microbicides. *Nanoscale.* 2015;7(35):14669-14683.
345. Vacas-Cordoba E, Maly M, De la Mata FJ, Gomez R, Pion M, Munoz-Fernandez MA. Antiviral mechanism of polyanionic carbosilane dendrimers against HIV-1. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:1281-1294.
346. Cena-Diez R, Vacas-Cordoba E, Garcia-Broncano P, et al. Prevention of vaginal and rectal herpes simplex virus type 2 transmission in mice: mechanism of antiviral action. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:2147-2162.
347. Vacas-Cordoba E, Climent N, De La Mata FJ, et al. Dendrimers as nonviral vectors in dendritic cell-based immunotherapies against human immunodeficiency virus: steps toward their clinical evaluation. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(17):2683-2702.
348. das Neves J, Nunes R, Rodrigues F, Sarmiento B. Nanomedicine in the development of anti-HIV microbicides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;103:57-75.
349. Telwatte S, Moore K, Johnson A, et al. Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1. *Antiviral Res.* 2011;90(3):195-199.

350. Sepulveda-Crespo D, Serramia MJ, Tager AM, et al. Prevention vaginally of HIV-1 transmission in humanized BLT mice and mode of antiviral action of polyanionic carboxilane dendrimer G2-S16. *Nanomedicine*. 2015;11(6):1299-1308.
351. El-Ansary A, Al-Daihan S. On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. *J Toxicol*. 2009;2009:754810.
352. Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2011;40(1):44-56.
353. Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release*. 2011;149(1):65-71.
354. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):615-627.
355. Quadros ME, Marr LC. Silver nanoparticles and total aerosols emitted by nanotechnology-related consumer spray products. *Environ Sci Technol*. 2011;45(24):10713-10719.
356. Faunce T, Watal A. Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(4):617-632.
357. Nanotechnologies TPoE. An Inventory of Nanotechnology-based Consumer Products Currently on the Market. 2017; http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft.
358. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*. 2009;38(6):1759-1782.
359. Cho TJ, Zangmeister RA, Maccuspie RI, Patri AK, Hackley VA. Newkome-type dendron stabilized gold nanoparticles: Synthesis, reactivity, and stability. *Chem Mater*. 2011;23(10):2665-2676.
360. Grant RM, Hamer D, Hope T, et al. Whither or wither microbicides? *Science*. 2008;321(5888):532-534.
361. Vanpouille C, Arakelyan A, Margolis L. Microbicides: still a long road to success. *Trends Microbiol*. 2012;20(8):369-375.
362. McCormack S, Ramjee G, Kamali A, et al. PRO2000 vaginal gel for prevention of HIV-1 infection (Microbicides Development Programme 301): a phase 3, randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet*. 2010;376(9749):1329-1337.
363. Neurath AR, Strick N, Li YY. Role of seminal plasma in the anti-HIV-1 activity of candidate microbicides. *BMC Infect Dis*. 2006;6:150.
364. Zirafi O, Kim KA, Roan NR, et al. Semen enhances HIV infectivity and impairs the antiviral efficacy of microbicides. *Sci Transl Med*. 2014;6(262):262ra157.
365. Munch J, Rucker E, Standker L, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell*. 2007;131(6):1059-1071.
366. Kim KA, Yolamanova M, Zirafi O, et al. Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology*. 2010;7:55.
367. Roan NR, Muller JA, Liu H, et al. Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. *Cell Host Microbe*. 2011;10(6):541-550.
368. Boeras DI, Hraber PT, Hurlston M, et al. Role of donor genital tract HIV-1 diversity in the transmission bottleneck. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):E1156-1163.
369. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, et al. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science*. 2004;303(5666):2019-2022.

370. Wilen CB, Parrish NF, Pfaff JM, et al. Phenotypic and immunologic comparison of clade B transmitted/founder and chronic HIV-1 envelope glycoproteins. *J Virol.* 2011;85(17):8514-8527.
371. Chohan B, Lang D, Sagar M, et al. Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J Virol.* 2005;79(10):6528-6531.
372. Nawaz F, Cicala C, Van Ryk D, et al. The genotype of early-transmitting HIV gp120s promotes alpha (4) beta(7)-reactivity, revealing alpha (4) beta(7) +/CD4+ T cells as key targets in mucosal transmission. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001301.
373. Zhang H, Rola M, West JT, et al. Functional properties of the HIV-1 subtype C envelope glycoprotein associated with mother-to-child transmission. *Virology.* 2010;400(2):164-174.
374. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell.* 2009;139(3):499-511.
375. Berenguer J, Alvarez-Pellicer J, Martin PM, et al. Sustained virological response to interferon plus ribavirin reduces liver-related complications and mortality in patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Hepatology.* 2009;50(2):407-413.
376. Castera L. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(2):291-303.
377. Garcia-Merino I, de Las Cuevas N, Jimenez JL, et al. The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology.* 2009;6:27.
378. Galan M, Sanchez Rodriguez J, Jimenez JL, et al. Synthesis of new anionic carbosilane dendrimers via thiol-ene chemistry and their antiviral behaviour. *Org Biomol Chem.* 2014;12(20):3222-3237.
379. Rasines B, Sanchez-Nieves J, Maiolo M, et al. Synthesis, structure and molecular modelling of anionic carbosilane dendrimers. *Dalton Trans.* 2012;41(41):12733-12748.
380. Gong E, Matthews B, McCarthy T, et al. Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Res.* 2005;68(3):139-146.
381. Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(8):1768-1783.
382. Lammer E, Carr GJ, Wendler K, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2009;149(2):196-209.
383. Knobel M, Busser FJ, Rico-Rico A, et al. Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ Sci Technol.* 2012;46(17):9690-9700.
384. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496(7446):498-503.
385. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.
386. Larbi A, Fulop T. From "truly naive" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A.* 2014;85(1):25-35.
387. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med.* 2011;62:141-155.

388. Rosenblum MD, Way SS, Abbas AK. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):90-101.
389. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, et al. Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra136.
390. Sepulveda-Crespo D, Lorente R, Leal M, et al. Synergistic activity profile of carbosilane dendrimer G2-STE16 in combination with other dendrimers and antiretrovirals as topical anti-HIV-1 microbicide. *Nanomedicine.* 2014;10(3):609-618.
391. McGowan I, Gomez K, Bruder K, et al. Phase 1 randomized trial of the vaginal safety and acceptability of SPL7013 gel (VivaGel) in sexually active young women (MTN-004). *AIDS.* 2011;25(8):1057-1064.
392. Alfaro JM, Prades A, del Carmen Ramos M, et al. Biomedical properties of a series of ruthenium-N-heterocyclic carbene complexes based on oxidant activity in vitro and assessment in vivo of biosafety in zebrafish embryos. *Zebrafish.* 2010;7(1):13-21.
393. Paez J.I. MM, Brunetti V., and Strumia M.C. Dendronization: A useful synthetic strategy to prepare multifunctional materials. *Polymers.* 2012;4(1):355-395.
394. Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(8):650-658.
395. Fulop T, Larbi A, Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol.* 2013;4:271.
396. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):512-522.
397. Takada K, Jameson SC. Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):823-832.
398. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008;29(6):848-862.
399. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):51-62.
400. Crispe IN, Dao T, Klugewitz K, Mehal WZ, Metz DP. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunol Rev.* 2000;174:47-62.
401. Nixon DE, Landay AL. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):498-503.
402. Younas M, Psomas C, Reynes J, Corbeau P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Med.* 2016;17(2):89-105.
403. Lederman MM, Funderburg NT, Sekaly RP, Klatt NR, Hunt PW. Residual immune dysregulation syndrome in treated HIV infection. *Adv Immunol.* 2013;119:51-83.
404. Shen T, Zheng J, Xu C, et al. PD-1 expression on peripheral CD8+ TEM/TEMRA subsets closely correlated with HCV viral load in chronic hepatitis C patients. *Virology.* 2010;7:310.
405. Markowitz M, Deren S, Cleland C, et al. Chronic Hepatitis C Virus Infection and the Proinflammatory Effects of Injection Drug Use. *J Infect Dis.* 2016;214(9):1376-1382.
406. Sajadi MM, Pulijala R, Redfield RR, Talwani R. Chronic immune activation and decreased CD4 cell counts associated with hepatitis C infection in HIV-1 natural viral suppressors. *AIDS.* 2012;26(15):1879-1884.
407. d'Ettorre G, Ceccarelli G, Serafino S, et al. Dominant enrichment of phenotypically activated CD38(+) HLA-DR(+) CD8(+) T cells, rather than CD38(+) HLA-DR(+) CD4(+) T cells, in HIV/HCV coinfecting patients on antiretroviral therapy. *J Med Virol.* 2016;88(8):1347-1356.

408. Barathan M, Mohamed R, Saeidi A, et al. Increased frequency of late-senescent T cells lacking CD127 in chronic hepatitis C disease. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(5):466-474.
409. Harcourt GC, Donfield S, Gomperts E, et al. Longitudinal analysis of CD8 T-cell responses to HIV and hepatitis C virus in a cohort of co-infected haemophiliacs. *AIDS*. 2005;19(11):1135-1143.
410. Unemori P, Leslie KS, Hunt PW, et al. Immunosenescence is associated with presence of Kaposi's sarcoma in antiretroviral treated HIV infection. *AIDS*. 2013;27(11):1735-1742.
411. Deeks SG, Verdin E, McCune JM. Immunosenescence and HIV. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(4):501-506.
412. Kaplan RC, Sinclair E, Landay AL, et al. T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *J Infect Dis*. 2011;203(4):452-463.
413. Lee SA, Sinclair E, Jain V, et al. Low proportions of CD28- CD8+ T cells expressing CD57 can be reversed by early ART initiation and predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis*. 2014;210(3):374-382.
414. Schulze Zur Wiesch J, Thomssen A, Hartjen P, et al. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *J Virol*. 2011;85(3):1287-1297.
415. Suchard MS, Mayne E, Green VA, et al. FOXP3 expression is upregulated in CD4T cells in progressive HIV-1 infection and is a marker of disease severity. *PLoS One*. 2010;5(7):e11762.
416. Rallon NI, Lopez M, Soriano V, et al. Level, phenotype and activation status of CD4+FoxP3+ regulatory T cells in patients chronically infected with human immunodeficiency virus and/or hepatitis C virus. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(1):35-43.
417. Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, et al. Identification and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008;82(10):5043-5053.
418. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology*. 2003;38(6):1437-1448.
419. Li S, Gowans EJ, Chougnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol*. 2008;82(1):21-30.
420. Cho H, Kikuchi M, Li Y, et al. Induction of Multiple Immune Regulatory Pathways with Differential Impact in HCV/HIV Coinfection. *Front Immunol*. 2014;5:265.
421. Hartling HJ, Gaardbo JC, Ronit A, et al. CD4(+) and CD8(+) regulatory T cells (Tregs) are elevated and display an active phenotype in patients with chronic HCV mono-infection and HIV/HCV co-infection. *Scand J Immunol*. 2012;76(3):294-305.
422. Rallon NI, Barreiro P, Soriano V, Garcia-Samaniego J, Lopez M, Benito JM. Elevated TGF-beta1 levels might protect HCV/ HIV-coinfected patients from liver fibrosis. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(1):70-76.
423. Yang J, Yi P, Wei L, et al. Phenotypes and clinical significance of circulating CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells (Tregs) in patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF). *J Transl Med*. 2012;10:193.
424. Dong X, Gong Y, Zeng H, et al. Imbalance between circulating CD4+ regulatory T and conventional T lymphocytes in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. *Liver Int*. 2013;33(10):1517-1526.

425. Shen C, Yan WZ, Zhao CY, et al. Increased CD4+CD25+ regulatory T cells correlate with poor short-term outcomes in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48(2):137-146.
426. Langhans B, Nischalke HD, Kramer B, et al. Increased peripheral CD4+ regulatory T cells persist after successful direct-acting antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2016.
427. Debes JD, Bohjanen PR, Boonstra A. Mechanisms of Accelerated Liver Fibrosis Progression during HIV Infection. *J Clin Transl Hepatol.* 2016;4(4):328-335.
428. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:189.
429. Hunt PW, Sinclair E, Rodriguez B, et al. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2014;210(8):1228-1238.
430. Scully E, Lockhart A, Huang L, et al. Elevated Levels of Microbial Translocation Markers and CCL2 Among Older HIV-1-Infected Men. *J Infect Dis.* 2016;213(5):771-775.
431. Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, et al. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis.* 2015;211(1):19-27.
432. Sacchi P, Cima S, Corbella M, et al. Liver fibrosis, microbial translocation and immune activation markers in HIV and HCV infections and in HIV/HCV co-infection. *Dig Liver Dis.* 2015;47(3):218-225.
433. Tenorio AR, Zheng Y, Bosch RJ, et al. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis.* 2014;210(8):1248-1259.
434. Sandler NG, Wand H, Roque A, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis.* 2011;203(6):780-790.
435. Andrade BB, Hullsiek KH, Boulware DR, et al. Biomarkers of inflammation and coagulation are associated with mortality and hepatitis flares in persons coinfecting with HIV and hepatitis viruses. *J Infect Dis.* 2013;207(9):1379-1388.
436. Peters L, Neuhaus J, Duprez D, et al. Biomarkers of inflammation, coagulation and microbial translocation in HIV/HCV co-infected patients in the SMART study. *J Clin Virol.* 2014;60(3):295-300.
437. Vassallo M, Mercie P, Cottalorda J, Ticchioni M, Dellamonica P. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Virology.* 2012;9:174.
438. Shmagel KV, Saidakova EV, Shmagel NG, et al. Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection. *HIV Med.* 2016;17(8):581-589.
439. Tapping RI, Tobias PS. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J Biol Chem.* 1997;272(37):23157-23164.
440. Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* 2013;33(1):31-39.
441. Chan CC, Hwang SJ, Lee FY, et al. Prognostic value of plasma endotoxin levels in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32(9):942-946.
442. Lin RS, Lee FY, Lee SD, et al. Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol.* 1995;22(2):165-172.
443. Leeansyah E, Malone DF, Anthony DD, Sandberg JK. Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;8(2):117-124.

444. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, et al. The risk of coronary artery disease and cerebrovascular disease in patients with hepatitis C: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2016;221:746-754.
445. Ambrosino P, Tarantino L, Criscuolo L, Nasto A, Celentano A, Di Minno MN. The risk of venous thromboembolism in patients with hepatitis C. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2016;116(5):958-966.
446. Olson JD. D-dimer: An Overview of Hemostasis and Fibrinolysis, Assays, and Clinical Applications. *Adv Clin Chem.* 2015;69:1-46.
447. Montoya JL, Iudicello J, Oppenheim HA, et al. Coagulation imbalance and neurocognitive functioning in older HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS.* 2017;31(6):787-795.
448. Funderburg NT. Markers of coagulation and inflammation often remain elevated in ART-treated HIV-infected patients. *Curr Opin HIV AIDS.* 2014;9(1):80-86.
449. Saray A, Mesihovic R, Gornjakovic S, et al. Association between high D-dimer plasma levels and ascites in patients with liver cirrhosis. *Med Arch.* 2012;66(6):372-374.
450. Primignani M, Dell'Era A, Bucciarelli P, et al. High-D-dimer plasma levels predict poor outcome in esophageal variceal bleeding. *Dig Liver Dis.* 2008;40(11):874-881.
451. Drolz A, Horvatits T, Roedl K, et al. Coagulation parameters and major bleeding in critically ill patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2016;64(2):556-568.
452. Li Y, Qi X, Li H, et al. D-dimer level for predicting the in-hospital mortality in liver cirrhosis: A retrospective study. *Exp Ther Med.* 2017;13(1):285-289.
453. Gram J, Duscha H, Zurborn KH, Bruhn HD. Increased levels of fibrinolysis reaction products (D-dimer) in patients with decompensated alcoholic liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol.* 1991;26(11):1173-1178.
454. Dai J, Qi X, Peng Y, et al. Association between D-dimer level and portal venous system thrombosis in liver cirrhosis: a retrospective observational study. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):15296-15301.
455. Yamamoto K, Takeshita K, Saito H. Plasminogen activator inhibitor-1 in aging. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(6):652-659.
456. Knudsen A, Katzenstein TL, Benfield T, et al. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 predicts myocardial infarction in HIV-1-infected individuals. *AIDS.* 2014;28(8):1171-1179.
457. Jin R, Krasinskas A, Le NA, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and severity of liver injury and cardiovascular risk in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatr Obes.* 2016.
458. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2017;65(1):65-77.
459. Tilg H, Vogel W, Wiedermann CJ, et al. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists in liver disease. *Hepatology.* 1993;18(5):1132-1138.
460. Hsieh YC, Lee KC, Yang YY, Huo TI, Huang YH, Lin HC. Interleukin-1 receptor antagonist correlates with hepatic venous pressure gradient and predicts occurrence of overall complications and bacterial infections in patients with cirrhosis. *Hepatol Res.* 2015;45(3):294-304.
461. Haissman JM, Vestergaard LS, Sembuche S, et al. Plasma cytokine levels in Tanzanian HIV-1-infected adults and the effect of antiretroviral treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;52(4):493-497.

462. Catania A, Manfredi MG, Airaghi L, et al. Plasma concentration of cytokine antagonists in patients with HIV infection. *Neuroimmunomodulation*. 1994;1(1):42-49.
463. Kreuzer KA, Dayer JM, Rockstroh JK, Sauerbruch T, Spengler U. The IL-1 system in HIV infection: peripheral concentrations of IL-1beta, IL-1 receptor antagonist and soluble IL-1 receptor type II. *Clin Exp Immunol*. 1997;109(1):54-58.
464. Gabay C, Gigley J, Sipe J, Arend WP, Fantuzzi G. Production of IL-1 receptor antagonist by hepatocytes is regulated as an acute-phase protein in vivo. *Eur J Immunol*. 2001;31(2):490-499.
465. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest*. 1997;99(12):2930-2940.
466. Arend WP, Welgus HG, Thompson RC, Eisenberg SP. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest*. 1990;85(5):1694-1697.
467. Moura AS, Carmo RA, Teixeira AL, Leite VH, Rocha MO. Soluble inflammatory markers as predictors of liver histological changes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(9):1153-1161.
468. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol*. 1997;109(3):458-463.
469. Piggott DA, Varadhan R, Mehta SH, et al. Frailty, Inflammation, and Mortality Among Persons Aging With HIV Infection and Injection Drug Use. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(12):1542-1547.
470. Van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(5-6):311-319.
471. Andersen ES, Ruhwald M, Moessner B, et al. Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(6):761-766.
472. Sharma A, Chakraborti A, Das A, Dhiman RK, Chawla Y. Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):e514-522.
473. Bouzgarrou N, Hassen E, Schvoerer E, et al. Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection. *J Med Virol*. 2008;80(4):607-614.
474. Ishii K, Takamura N, Shinohara E, et al. Intracellular cytokine analysis of CD4-positive T cells predictive of sustained response to interferon therapy for patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2002;47(4):778-783.
475. Abbate I, Romano M, Longo R, et al. Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN-related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients. *J Med Virol*. 2003;70(4):581-587.
476. Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, et al. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Infect Dis*. 2011;203(8):1087-1095.
477. Iannello A, Samarani S, Debbeche O, et al. Potential role of IL-18 in the immunopathogenesis of AIDS, HIV-associated lipodystrophy and related clinical conditions. *Curr HIV Res*. 2010;8(2):147-164.
478. Yearley JH, Xia D, Pearson CB, Carville A, Shannon RP, Mansfield KG. Interleukin-18 predicts atherosclerosis progression in SIV-infected and uninfected rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) on a high-fat/high-cholesterol diet. *Lab Invest*. 2009;89(6):657-667.

479. Veenhuis RT, Astemborski J, Chattergoon MA, et al. Systemic Elevation of Proinflammatory Interleukin 18 in HIV/HCV Coinfection versus HIV or HCV Mono-infection. *Clin Infect Dis*. 2016.
480. Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, et al. Impact of serum levels of interleukin-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(2):379-388.
481. de Oca Arjona MM, Marquez M, Soto MJ, et al. Bacterial translocation in HIV-infected patients with HCV cirrhosis: implication in hemodynamic alterations and mortality. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56(5):420-427.
482. Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pages M. Circulating biomarkers. *Thromb Res*. 2012;130 Suppl 1:S12-15.
483. Sipsas NV, Sfrikakis PP, Touloumi G, Pantazis N, Choremi H, Kordossis T. Elevated serum levels of soluble immune activation markers are associated with increased risk for death in HAART-naive HIV-1-infected patients. *AIDS Patient Care STDS*. 2003;17(4):147-153.
484. Graham SM, Rajwans N, Jaoko W, et al. Endothelial activation biomarkers increase after HIV-1 acquisition: plasma vascular cell adhesion molecule-1 predicts disease progression. *AIDS*. 2013;27(11):1803-1813.
485. Kaplanski G, Farnarier C, Payan MJ, Bongrand P, Durand JM. Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis. *Dig Dis Sci*. 1997;42(11):2277-2284.
486. Bruno CM, Sciacca C, Cilio D, et al. Circulating adhesion molecules in patients with virus-related chronic diseases of the liver. *World J Gastroenterol*. 2005;11(29):4566-4569.
487. Sole C, Sola E, Morales-Ruiz M, et al. Characterization of Inflammatory Response in Acute-on-Chronic Liver Failure and Relationship with Prognosis. *Sci Rep*. 2016;6:32341.
488. Ansari AW, Schmidt RE, Shankar EM, Kamarulzaman A. Immuno-pathomechanism of liver fibrosis: targeting chemokine CCL2-mediated HIV:HCV nexus. *J Transl Med*. 2014;12:341.
489. Noel N, Boufassa F, Lecuroux C, et al. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4(+) T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS*. 2014;28(4):467-476.
490. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, et al. HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood*. 2011;117(19):5142-5151.
491. Keating SM, Golub ET, Nowicki M, et al. The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. *AIDS*. 2011;25(15):1823-1832.
492. Cassol E, Malfeld S, Mahasha P, et al. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010;202(5):723-733.
493. Stiksrud B, Lørvik KB, Kvale D, et al. Plasma IP-10 Is Increased in Immunological Non-Responders and Associated With Activated Regulatory T Cells and Persisting Low CD4 Counts. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;73(2):138-148.
494. Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology*. 2009;49(2):676-688.
495. Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(3):577-594 e571.

496. Reiberger T, Aberle JH, Kundi M, et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. *Antivir Ther.* 2008;13(8):969-976.
497. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol.* 2003;74(3):360-369.
498. Berenguer J, Fernandez-Rodriguez A, Jimenez-Sousa MA, et al. High plasma CXCL10 levels are associated with HCV-genotype 1, and higher insulin resistance, fibrosis, and HIV viral load in HIV/HCV coinfecting patients. *Cytokine.* 2012;57(1):25-29.
499. Oo YH, Banz V, Kavanagh D, et al. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J Hepatol.* 2012;57(5):1044-1051.
500. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol.* 2008;9(9):949-952.
501. Thea DM, Porat R, Nagimbi K, et al. Plasma cytokines, cytokine antagonists, and disease progression in African women infected with HIV-1. *Ann Intern Med.* 1996;124(8):757-762.
502. Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One.* 2011;6(6):e21381.
503. Langhans B, Kramer B, Louis M, et al. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3(+)/CD4(+) regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2013;59(2):229-235.
504. Shimoda K, Begum NA, Shibuta K, et al. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1998;28(1):108-115.
505. Mahmood S, Sho M, Yasuhara Y, et al. Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 2002;24(4):413-419.
506. Asselah T, Bieche I, Laurendeau I, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;129(6):2064-2075.
507. Dirchwolf M, Podhorzer A, Marino M, et al. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. *Cytokine.* 2016;77:14-25.
508. Kilian E, Valentina D, Andrea C. IL-17 and IL-22 in immunity: driving protection and pathology. *Eur J Immunol.* 2017.
509. Paquissi FC. Immune Imbalances in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: From General Biomarkers and Neutrophils to Interleukin-17 Axis Activation and New Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2016;7:490.
510. Fischer J, Silva TE, Soares ESPE, et al. From stable disease to acute-on-chronic liver failure: Circulating cytokines are related to prognosis in different stages of cirrhosis. *Cytokine.* 2017;91:162-169.
511. Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):559-568.
512. Villinger F, Ansari AA. Role of IL-12 in HIV infection and vaccine. *Eur Cytokine Netw.* 2010;21(3):215-218.
513. Shang H, Jiang Y, Zhang Z, et al. Study on immunological status of Chinese HIV-infected individuals. *Microbiol Immunol.* 2004;48(11):883-888.
514. Afify M, Hamza AH, Alomari RA. Correlation Between Serum Cytokines, Interferons, and Liver Functions in Hepatitis C Virus Patients. *J Interferon Cytokine Res.* 2017;37(1):32-38.

515. Schvoerer E, Navas MC, Thumann C, et al. Production of interleukin-18 and interleukin-12 in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection before antiviral therapy. *J Med Virol.* 2003;70(4):588-593.
516. Quiroga JA, Martin J, Navas S, Carreno V. Induction of interleukin-12 production in chronic hepatitis C virus infection correlates with the hepatocellular damage. *J Infect Dis.* 1998;178(1):247-251.
517. El-Emshaty HM, Nasif WA, Mohamed IE. Serum Cytokine of IL-10 and IL-12 in Chronic Liver Disease: The Immune and Inflammatory Response. *Dis Markers.* 2015;2015:707254.
518. Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993;14(3):107-111.
519. Sindhu S, Toma E, Cordeiro P, Ahmad R, Morisset R, Menezes J. Relationship of in vivo and ex vivo levels of TH1 and TH2 cytokines with viremia in HAART patients with and without opportunistic infections. *J Med Virol.* 2006;78(4):431-439.
520. Hams E, Bermingham R, Fallon PG. Macrophage and Innate Lymphoid Cell Interplay in the Genesis of Fibrosis. *Front Immunol.* 2015;6:597.
521. Aoudjehane L, Pissaia A, Jr., Scatton O, et al. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest.* 2008;88(9):973-985.
522. Sziksz E, Pap D, Lippai R, et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:764641.
523. Ameglio F, Cordiali Fei P, Solmone M, et al. Serum IL-10 levels in HIV-positive subjects: correlation with CDC stages. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1994;8(2):48-52.
524. Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol.* 1999;116(1):115-120.
525. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):180-190.
526. Miedema F. Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodef Rev.* 1992;3(3):173-193.
527. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(8):509-523.
528. Patel K, Remlinger KS, Walker TG, et al. Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(12):2113-2120 e2111-2113.
529. Lin FC, Young HA. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(4):369-376.
530. Gibson RM, Arts EJ. Past, present, and future of entry inhibitors as HIV microbicides. *Curr HIV Res.* 2012;10(1):19-26.
531. Quinones-Mateu ME, Vanham G. HIV microbicides: where are we now? *Curr HIV Res.* 2012;10(1):1-2.
532. Shattock RJ, Rosenberg Z. Microbicides: topical prevention against HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(2):a007385.
533. Jimenez JL, Pion M, de la Mata FJ, Gomez, R., Muñoz, E., Leal, M. and Muñoz-Fernandez, MA. Dendrimers as topical microbicides with activity against HIV. *New Journal of Chemistry.* 2012;36(2):299-309.

534. Moscicki AB, Kaul R, Ma Y, et al. Measurement of mucosal biomarkers in a phase 1 trial of intravaginal 3% StarPharma LTD 7013 gel (VivaGel) to assess expanded safety. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;59(2):134-140.
535. Xiao F, Fofana I, Thumann C, et al. Synergy of entry inhibitors with direct-acting antivirals uncovers novel combinations for prevention and treatment of hepatitis C. *Gut.* 2015;64(3):483-494.
536. Cordoba EV, Arnaiz E, De La Mata FJ, et al. Synergistic activity of carbosilane dendrimers in combination with maraviroc against HIV in vitro. *AIDS.* 2013;27(13):2053-2058.
537. Sepulveda-Crespo D, Jimenez JL, Gomez R, et al. Polyanionic carbosilane dendrimers prevent hepatitis C virus infection in cell culture. *Nanomedicine.* 2017;13(1):49-58.
538. Tanaka E, Noguchi T, Nagai K, Akashi Y, Kawahara K, Shimada T. Morphology of the epithelium of the lower rectum and the anal canal in the adult human. *Med Mol Morphol.* 2012;45(2):72-79.
539. Marrazzo JM, Ramjee G, Richardson BA, et al. Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med.* 2015;372(6):509-518.
540. Bernstein DI, Stanberry LR, Sacks S, et al. Evaluations of unformulated and formulated dendrimer-based microbicide candidates in mouse and guinea pig models of genital herpes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3784-3788.
541. Price CF, Tyssen D, Sonza S, et al. SPL7013 Gel (VivaGel(R)) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans. *PLoS One.* 2011;6(9):e24095.
542. Huskens D, Vermeire K, Profy AT, Schols D. The candidate sulfonated microbicide, PRO 2000, has potential multiple mechanisms of action against HIV-1. *Antiviral Res.* 2009;84(1):38-47.
543. Mohan P, Schols D, Baba M, De Clercq E. Sulfonic acid polymers as a new class of human immunodeficiency virus inhibitors. *Antiviral Res.* 1992;18(2):139-150.
544. Van Damme L, Govinden R, Mirembe FM, et al. Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med.* 2008;359(5):463-472.
545. Rusconi S, Moonis M, Merrill DP, et al. Naphthalene sulfonate polymers with CD4-blocking and anti-human immunodeficiency virus type 1 activities. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(1):234-236.
546. Cordoba EV, Pion M, Rasines B, et al. Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies. *Nanomedicine.* 2013;9(7):972-984.
547. Strahle U, Scholz S, Geisler R, et al. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol.* 2012;33(2):128-132.
548. Olivares CI, Field JA, Simonich M, Tanguay RL, Sierra-Alvarez R. Arsenic (III, V), indium (III), and gallium (III) toxicity to zebrafish embryos using a high-throughput multi-endpoint in vivo developmental and behavioral assay. *Chemosphere.* 2016;148:361-368.
549. C L. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture.* 2007;269(1-4):1-20.
550. Planchart A, Mattingly CJ, Allen D, et al. Advancing toxicology research using in vivo high throughput toxicology with small fish models. *ALTEX.* 2016;33(4):435-452.
551. Saba E, Grivel JC, Vanpouille C, et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunol.* 2010;3(3):280-290.

552. Grivel JC, Shattock RJ, Margolis LB. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med.* 2011;9 Suppl 1:S6.

Tabla 18. Resumen de los valores crudos de subpoblaciones de células T CD4+ en los 3 grupos de estudio incluidos en la tesis.

Subpoblaciones CD4+ (%)	Control sano (0)	VIH+ (1)	VIH/VHC+ (2)	MW (0-2)	MW (1-2)	MW (0-1)
CD4+CD45RA+CD28-	2,26 (0,51 - 7,54)	1,12 (0,42 - 3,99)	1,3 (0,42 - 3,11)	,049	,526	,206
CD4+CD45RA-CD28+	47,58 (41,89 - 56,35)	55,47 (47,94 - 71,6)	60,48 (49,84 - 70,04)	,000	,240	,023
CD4+CD45RA+CD28+	41,97 (30,36 - 53,74)	34,79 (19,76 - 46,02)	32,91 (23,92 - 42,73)	,027	,989	,114
CD4+CD38+HLADR+	0,14 (0,1 - 0,26)	0,26 (0,16 - 0,51)	0,85 (0,4 - 1,99)	,000	,000	,008
CD4+CD38+HLADR-	3,54 (2,16 - 5,66)	2,67 (1,79 - 4,98)	5,86 (3,08 - 12,85)	,001	,000	,146
CD4+CD38-HLADR+	1,8 (1,05 - 2,54)	2,11 (1,25 - 3,69)	2,26 (1,1 - 4,02)	,112	,940	,179
CD4+CD45RA+CD28+CD38+HLADR-	4,87 (2,92 - 6,57)	3,23 (2,24 - 5,44)	7,66 (3,33 - 20,33)	,010	,000	,055
CD4+CD45RA+CD28+CD38+HLADR+	0,03 (0,01 - 0,06)	0,08 (0,04 - 0,17)	0,26 (0,11 - 0,64)	,000	,000	,000
CD4+CD45RA+CD28+CD38-HLADR+	0,17 (0,08 - 0,3)	0,16 (0,08 - 0,7)	0,63 (0,25 - 1,97)	,000	,000	,643
CD4+CD45RA-CD28+CD38+HLADR-	3,55 (2,39 - 4,81)	2,63 (1,9 - 4,59)	5,31 (2,96 - 9,35)	,000	,000	,536
CD4+CD45RA-CD28+CD38+HLADR+	0,23 (0,16 - 0,39)	0,24 (0,14 - 0,53)	0,68 (0,34 - 1,46)	,000	,000	,787
CD4+CD45RA-CD28+CD38-HLADR+	2,9 (1,65 - 4,2)	3,28 (1,98 - 4,91)	2,34 (1,04 - 4,16)	,111	,015	,530
CD4+CD25+CD127-	4,51 (3,31 - 5,36)	6,11 (4,58 - 7,19)	8,14 (6,42 - 10,17)	,000	,000	,000
CD4+CD25+CD127-CD45RA-	5,86 (4,06 - 8,19)	7,8 (5,7 - 10,12)	10,77 (8,19 - 13,69)	,000	,000	,011
CD4+CD25+CD127-CD45RA+	2,95 (2,06 - 3,83)	3,17 (1,82 - 5,5)	3,16 (2,08 - 4,42)	,489	,567	,442
CD4+CD28+CD57+	0,63 (0,29 - 2,25)	0,82 (0,44 - 1,62)	0,67 (0,34 - 1,1)	,490	,051	,445
CD4+CD28-CD57+	3,73 (0,34 - 10,04)	1,79 (0,74 - 7,16)	0,65 (0,13 - 3,01)	,005	,001	,839
CD4+CD45RA+CD28+CD57+	0,22 (0,09 - 1,36)	0,28 (0,19 - 1,13)	0,31 (0,18 - 0,65)	,466	,688	,324
CD4+CD45RA+CD28-CD57+	1,55 (0,11 - 9,83)	0,64 (0,14 - 4,89)	0,24 (0,05 - 1,19)	,007	,003	,757
CD4+CD45RA-CD28+CD57+	1,01 (0,53 - 1,92)	0,89 (0,55 - 2,01)	0,79 (0,4 - 1,42)	,088	,047	,935
CD4+CD45RA-CD28-CD57+	3,4 (0,43 - 6,65)	2,51 (0,89 - 8,2)	0,65 (0,12 - 3,5)	,003	,001	,915

Abreviaturas: VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHC, virus de la hepatitis C; MW, Test de Mann-Whitney.

Tabla 19. Resumen de los valores crudos de subpoblaciones de células T CD8+ en los 3 grupos de estudio incluidos en la tesis.

Subpoblaciones CD8+ (%)	Control sano (0)	VIH+ (1)	VIH/VHC+ (2)	MW (0-2)	MW (1-2)	MW (0-1)
CD8+CD45RA+CD28-	28,81 (21,54 - 41,3)	28,55 (18,47 - 37,85)	21,61 (12,32 - 32,26)	,007	,009	,721
CD8+CD45RA-CD28+	22,1 (13,62 - 31,49)	23,41 (15,58 - 34,18)	29,59 (19,96 - 39,49)	,004	,017	,440
CD8+CD45RA+CD28+	33,89 (23,83 - 49,95)	24,02 (15,27 - 37,62)	28,58 (20,06 - 38,12)	,084	,074	,020
CD8+CD38+HLADR+	0,7 (0,48 - 1,36)	1,27 (0,85 - 1,77)	1,26 (0,58 - 2,58)	,021	,912	,014
CD8+CD38+HLADR-	5,09 (3,69 - 7,01)	5,07 (3,27 - 8,35)	10,07 (5,31 - 16,99)	,000	,000	,988
CD8+CD38-HLADR+	2,05 (0,94 - 2,86)	2,02 (0,98 - 4,65)	1,12 (0,52 - 2,64)	,036	,001	,524
CD8+CD45RA+CD28+CD38+HLADR-	7,99 (5,46 - 10,75)	5,9 (4,19 - 11,44)	8,92 (4,45 - 16,14)	,361	,052	,229
CD8+CD45RA+CD28+CD38+HLADR+	0,19 (0,1 - 0,4)	0,2 (0,14 - 0,5)	0,42 (0,16 - 0,9)	,001	,019	,359
CD8+CD45RA+CD28+CD38-HLADR+	0,64 (0,31 - 1,21)	0,45 (0,23 - 1,35)	0,76 (0,29 - 1,92)	,463	,201	,511
CD8+CD45RA-CD28+CD38+HLADR-	3,54 (2,08 - 4,6)	4,16 (2,67 - 6,68)	7,57 (4,2 - 13,32)	,000	,000	,109
CD8+CD45RA-CD28+CD38+HLADR+	1,78 (0,99 - 3,48)	2,12 (1,23 - 3,18)	1,85 (0,84 - 3,52)	,946	,406	,423
CD8+CD45RA-CD28+CD38-HLADR+	4,01 (1,62 - 6,57)	2,91 (1,59 - 6,4)	1,06 (0,32 - 2,7)	,000	,000	,575
CD8+CD28+CD57+	2,51 (1,57 - 3,53)	2,15 (1,3 - 4,2)	2,17 (1,19 - 3,51)	,323	,222	,892
CD8+CD28-CD57+	23,08 (13,39 - 34,19)	24,66 (13,71 - 37,15)	19,08 (10,68 - 29,24)	,378	,023	,437
CD8+CD45RA-CD28+CD57+	4,05 (2,52 - 5,24)	3,42 (2,26 - 7)	3,54 (1,89 - 5,89)	,761	,438	,754
CD8+CD45RA-CD28-CD57+	11,16 (4,97 - 25,1)	19,84 (9,67 - 28,19)	13,36 (7,36 - 24,17)	,522	,041	,071
CD8+CD45RA+CD28+CD57+	1,74 (0,61 - 3,36)	1,18 (0,58 - 2,48)	0,92 (0,4 - 1,59)	,006	,034	,409
CD8+CD45RA+CD28-CD57+	29,39 (12,51 - 39,34)	30,92 (15,56 - 45,91)	22,97 (11,62 - 33,27)	,246	,032	,530

Abreviaturas: VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHC, virus de la hepatitis C; MW, Test de Mann-Whitney.

Tabla 20. Resumen de los valores de los biomarcadores plasmáticos en los 3 grupos de estudio incluidos en la tesis.

Biomarcadores	Control sano (0)	VIH+ (1)	VIH/VHC+ (2)	MW (0-2)	MW (1-2)	MW (0-1)
sCD14 (ng/mL)	3,32 (2,25 - 3,95)	3,68 (2,04 - 5,3)	5,07 (3,34 - 7,4)	,000	,005	,310
FABP2 (pg/mL)	0,47 (0,32 - 0,69)	0,58 (0,41 - 1,3)	0,67 (0,35 - 1,58)	,050	,623	,086
LPS (UE/mL)	1,31 (0,85 - 4,65)	1,21 (0,87 - 2,01)	1,37 (1,03 - 1,87)	,765	,437	,667
IL-8 (pg/mL)	1,19 (1,19 - 2,77)	2,51 (1,19 - 3,62)	5,15 (3,62 - 11,25)	,000	,000	,129
IP-10 (pg/mL)	26,65 (20,09 - 50,48)	28,38 (19,69 - 39,91)	203,7 (111,33 - 350,55)	,000	,000	,892
MCP1 (pg/mL)	12,47 (9,17 - 21,72)	29,8 (19,06 - 38)	20,71 (10,95 - 41,22)	,005	,071	,000
IL1RA (pg/mL)	156,11 (96,8 - 226,26)	157,49 (107,91 - 253,84)	133,26 (66,31 - 448,86)	,721	,566	,585
IL-18 (pg/mL)	87,42 (55,94 - 147,25)	133,59 (90,5 - 198,13)	247,67 (128,2 - 507,2)	,000	,000	,025
PAI1_1000	4,93 (3,7 - 8,56)	6,71 (5,07 - 9,2)	10,04 (7,05 - 12,81)	,000	,000	,048
DDIMER (ng/mL)	23,49 (10,81 - 62,25)	27,74 (12,12 - 51,35)	33,27 (12,43 - 77,76)	,293	,245	,905
TNFR1 (ng/mL)	1,46 (0,2 - 2,16)	1,39 (0,43 - 2,1)	2,26 (1,28 - 3,59)	,000	,000	,909
svCAM1 (ng/mL)	309,79 (172,43 - 456,36)	334,24 (207,51 - 632,41)	1592,34 (754,2 - 3160,27)	,000	,000	,218
siCAM1 (ng/mL)	416,9 (107,67 - 854,81)	569,75 (213,55 - 1249,07)	2119,27 (1103,98 - 3859,33)	,000	,000	,118
IFN-g (pg/mL)	4,84 (3,45 - 8,5)	4,84 (2,61 - 9,44)	10,37 (3,1 - 26,53)	,023	,002	,864
IL-1b (pg/mL)	0,59 (0,17 - 1,5)	0,58 (0,25 - 0,98)	1,23 (0,53 - 2,32)	,006	,000	,675
IL-10 (pg/mL)	0,53 (0,35 - 1,54)	0,85 (0,45 - 1,74)	1,33 (0,8 - 2,64)	,001	,002	,404
IL-12p70 (pg/mL)	1,7 (0,86 - 3,22)	1,63 (1,09 - 3,22)	2,04 (1,17 - 4)	,283	,118	,937
IL-17A (pg/mL)	0,94 (0,48 - 2,1)	1,49 (0,98 - 2,26)	1,21 (0,55 - 2,69)	,493	,261	,117
IL-2 (pg/mL)	3,57 (1,01 - 4,09)	1,91 (1,01 - 5)	3,57 (0,95 - 6,6)	,793	,825	,471
IL-4 (pg/mL)	3,02 (1,39 - 6,12)	3,25 (1,87 - 5,34)	2,96 (1,73 - 6,77)	,435	,757	,727
IL- 6 (pg/mL)	2,01 (1,43 - 3,65)	3,39 (2,27 - 3,97)	5,4 (3,67 - 8,1)	,000	,000	,010
TNF-a (pg/mL)	1,53 (0,65 - 3,54)	1,68 (0,76 - 3,04)	2,16 (0,86 - 4,78)	,138	,144	,781

Abreviaturas: VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHC, virus de la hepatitis C; MW, Test de Mann-Whitney.

Tabla 21. Resumen de los valores de subpoblaciones de células T CD4+ en los 4 grupos de pacientes coinfectados clasificados en estratos de rigidez hepática.

Subpoblaciones CD4+ (%)	<12.5 kPa (0)	12.5-25 kPa (1)	25-40 kPa (2)	>40 kPa (3)	MW (0-3)	MW (1-3)	MW (2-3)	MW (0-2)	MW (1-2)	MW (0-1)
CD4+CD45RA+CD28-	1,52 (0,61 - 3,58)	0,99 (0,26 - 2,36)	0,81 (0,27 - 2,1)	1,63 (0,52 - 6,32)	,757	,151	,140	,034	,747	,020
CD4+CD45RA-CD28+	57,71 (47,46 - 69,86)	60,68 (53,62 - 68,16)	66,88 (56,76 - 72,78)	62,29 (50,63 - 74,01)	,422	,854	,368	,014	,067	,167
CD4+CD45RA+CD28+	35,13 (24,08 - 45,02)	33,1 (24,07 - 41,91)	29,9 (21,28 - 36,04)	30,06 (16,49 - 37,66)	,140	,248	,928	,034	,108	,481
CD4+CD38+HLADR+	0,96 (0,51 - 2,09)	0,77 (0,29 - 1,58)	0,52 (0,39 - 1,15)	1,36 (0,72 - 5,19)	,165	,035	,017	,031	,514	,063
CD4+CD38+HLADR-	6,08 (3,59 - 14)	5,51 (2,91 - 12,35)	4,54 (2,27 - 6,41)	8,72 (4,6 - 21,58)	,305	,103	,020	,017	,133	,187
CD4+CD38-HLADR+	2,83 (1,16 - 4,81)	2,12 (1,09 - 3,96)	1,22 (0,92 - 2,54)	2,59 (0,79 - 3,95)	,393	,865	,251	,003	,100	,117
CD4+CD45RA+CD28+CD38+HLADR-	8,48 (3,79 - 22,42)	7,05 (3,16 - 15,88)	4,97 (2,1 - 9,11)	11,93 (3,5 - 28,46)	,556	,163	,031	,014	,130	,118
CD4+CD45RA+CD28+CD38+HLADR+	0,24 (0,11 - 0,67)	0,25 (0,11 - 0,64)	0,2 (0,05 - 0,61)	0,42 (0,2 - 1,09)	,232	,238	,311	,427	,462	,993
CD4+CD45RA+CD28+CD38-HLADR+	0,5 (0,23 - 2,35)	0,68 (0,26 - 1,94)	0,61 (0,23 - 1,03)	0,8 (0,49 - 1,91)	,311	,400	,147	,608	,359	,737
CD4+CD45RA-CD28+CD38+HLADR-	5,32 (3,16 - 9,7)	5,45 (2,83 - 8,56)	3,5 (2,59 - 6,61)	6,97 (3,91 - 20,45)	,171	,117	,027	,032	,107	,480
CD4+CD45RA-CD28+CD38+HLADR+	0,76 (0,37 - 1,58)	0,5 (0,31 - 1,3)	0,52 (0,26 - 0,97)	1,98 (0,47 - 3,12)	,102	,013	,009	,023	,473	,050
CD4+CD45RA-CD28+CD38-HLADR+	2,93 (1,37 - 5,37)	2,22 (0,84 - 3,67)	1,35 (0,79 - 2,32)	2,47 (0,89 - 4,4)	,456	,647	,091	,000	,041	,033
CD4+CD25+CD127-	8 (6,16 - 10,08)	8,54 (6,49 - 10,83)	7,26 (6,24 - 8,81)	8,56 (6,48 - 11,66)	,381	,580	,126	,211	,078	,443
CD4+CD25+CD127-CD45RA-	11,02 (8,42 - 13,3)	11,12 (8,4 - 14,16)	8,77 (7,35 - 10,96)	12,55 (7,96 - 18,42)	,273	,295	,039	,014	,016	,712
CD4+CD25+CD127-CD45RA+	3,13 (2,31 - 4,04)	2,92 (1,67 - 5,08)	3,42 (2,5 - 4,26)	4,01 (1,9 - 5,26)	,393	,587	,536	,589	,794	,912
CD4+CD28+CD57+	0,62 (0,34 - 0,99)	0,71 (0,35 - 1,1)	0,57 (0,25 - 1,65)	0,8 (0,39 - 1,12)	,309	,452	,628	,643	,867	,648
CD4+CD28-CD57+	0,57 (0,15 - 2,83)	0,52 (0,08 - 2,79)	0,76 (0,1 - 3,36)	1,83 (0,38 - 4,29)	,095	,023	,290	,965	,450	,144
CD4+CD45RA+CD28+CD57+	0,29 (0,18 - 0,63)	0,29 (0,17 - 0,65)	0,3 (0,2 - 0,65)	0,48 (0,32 - 0,89)	,045	,082	,156	,788	,873	,952
CD4+CD45RA+CD28-CD57+	0,27 (0,08 - 1,79)	0,1 (0,03 - 0,71)	0,2 (0,04 - 1,29)	0,73 (0,26 - 1,43)	,121	,004	,043	,245	,574	,007
CD4+CD45RA-CD28+CD57+	0,75 (0,41 - 1,28)	0,95 (0,41 - 1,42)	0,65 (0,29 - 2,03)	0,98 (0,35 - 1,69)	,483	,580	,677	,900	,885	,712
CD4+CD45RA-CD28-CD57+	0,71 (0,13 - 2,82)	0,55 (0,07 - 3,22)	0,81 (0,09 - 4,76)	1,71 (0,18 - 4,38)	,300	,116	,551	,990	,437	,191

Abreviaturas: MW, Test de Mann-Whitney, kPa, kilo Pascales.

Tabla 22. Resumen de los valores de subpoblaciones de células T CD8+ en los 4 grupos de pacientes coinfectados clasificados en estratos de rigidez hepática.

Subpoblaciones CD8+ (%)	<12.5 kPa (0)	12.5-25 kPa (1)	25-40 kPa (2)	>40 kPa (3)	MW (0-3)	MW (1-3)	MW (2-3)	MW (0-2)	MW (1-2)	MW (0-1)
CD8+CD45RA+CD28-	21,24 (12,95 - 31,54)	18,82 (10,41 - 30,51)	24,23 (13,06 - 34,43)	29,66 (23,17 - 35,68)	,013	,012	,192	,547	,225	,356
CD8+CD45RA-CD28+	30,38 (22,23 - 41,33)	29,86 (18,85 - 38,1)	29,97 (20,13 - 38,33)	24,39 (16,04 - 33,25)	,086	,213	,170	,760	,844	,606
CD8+CD45RA+CD28+	27,7 (20,12 - 37,02)	34,57 (21,69 - 41,58)	27,8 (17,81 - 43)	25,89 (18,11 - 36,31)	,681	,190	,669	,919	,375	,099
CD8+CD38+HLADR+	1,27 (0,63 - 2,76)	1,23 (0,5 - 2,41)	1,3 (0,44 - 2,21)	1,48 (0,51 - 5,21)	,635	,271	,356	,420	,867	,265
CD8+CD38+HLADR-	9,72 (4,8 - 16,62)	10 (5,83 - 16,59)	10,51 (5,55 - 15,57)	19,92 (7,96 - 36,5)	,003	,009	,015	,748	,937	,417
CD8+CD38-HLADR+	1,19 (0,59 - 3,47)	1,19 (0,4 - 2,36)	0,9 (0,55 - 1,34)	1 (0,27 - 2,35)	,273	,587	,910	,126	,402	,254
CD8+CD45RA+CD28+CD38+HLADR-	9,11 (5,11 - 16,05)	8,11 (4,24 - 12,86)	10,14 (3,2 - 16,28)	14,96 (7,38 - 27,95)	,043	,023	,087	,834	,716	,300
CD8+CD45RA+CD28+CD38+HLADR+	0,35 (0,17 - 0,95)	0,41 (0,17 - 0,8)	0,6 (0,1 - 0,92)	1,03 (0,34 - 2,42)	,037	,017	,034	,939	,870	,952
CD8+CD45RA+CD28+CD38-HLADR+	0,68 (0,28 - 2,05)	0,72 (0,27 - 2,13)	0,77 (0,35 - 1,79)	0,82 (0,43 - 2,1)	,571	,547	,661	,890	,796	,969
CD8+CD45RA-CD28+CD38+HLADR-	7,19 (4 - 12,32)	8,21 (4,57 - 13,23)	7,22 (3,83 - 10,45)	14,27 (6,04 - 27,9)	,007	,035	,018	,745	,320	,313
CD8+CD45RA-CD28+CD38+HLADR+	1,97 (0,95 - 3,86)	1,67 (0,75 - 3,25)	1,59 (0,48 - 2,93)	2,8 (0,62 - 5,29)	,811	,408	,233	,102	,406	,232
CD8+CD45RA-CD28+CD38-HLADR+	1,39 (0,4 - 3,35)	1,01 (0,25 - 2,17)	0,9 (0,24 - 1,31)	0,51 (0,27 - 2,41)	,074	,501	,866	,022	,244	,094
CD8+CD28+CD57+	2,17 (1,26 - 3,32)	2,2 (1,07 - 3,63)	2,09 (1,31 - 4,51)	2,24 (1,15 - 3,48)	,841	,742	,753	,509	,421	,785
CD8+CD28-CD57+	20,4 (11,86 - 28,56)	15,57 (9,38 - 27,86)	18,57 (11,36 - 31,63)	27,13 (18,78 - 38,45)	,035	,016	,126	,851	,345	,206
CD8+CD45RA-CD28+CD57+	3,46 (1,8 - 5,15)	3,93 (1,91 - 6,72)	3,43 (1,86 - 7,53)	3,64 (1,89 - 6,68)	,584	,948	,893	,613	,958	,362
CD8+CD45RA-CD28-CD57+	15,01 (6,32 - 24,16)	12,66 (7,96 - 21,79)	12,01 (7,4 - 28,95)	20,64 (10,1 - 37,93)	,163	,064	,301	,888	,756	,511
CD8+CD45RA+CD28+CD57+	0,93 (0,45 - 1,59)	0,64 (0,3 - 1,54)	1,06 (0,43 - 1,75)	1,14 (0,85 - 2,03)	,199	,051	,574	,574	,140	,062
CD8+CD45RA+CD28-CD57+	23,49 (11,81 - 32,15)	18,32 (9,05 - 32,95)	22,93 (13,71 - 35,6)	33,65 (21,48 - 39,12)	,048	,010	,156	,849	,170	,111

Abreviaturas: MW, Test de Mann-Whitney, kPa, kilo Pascales.

Tabla 23. Resumen de los valores de los biomarcadores plasmáticos en los 4 grupos de pacientes coinfectados clasificados en estratos de rigidez hepática.

Biomarcadores	<12.5 kPa (0)	12.5-25 kPa (1)	25-40 kPa (2)	>40 kPa (3)	MW (0-3)	MW (1-3)	MW (2-3)	MW (0-2)	MW (1-2)	MW (0-1)
sCD14 (ng/mL)	4,78 (3,19 - 7,07)	4,97 (3,19 - 7,48)	4,91 (3,47 - 6,61)	6,98 (4,43 - 10,6)	,081	,154	,100	,865	,820	,650
FABP2 (pg/mL)	0,64 (0,32 - 1,42)	0,56 (0,32 - 1,53)	0,97 (0,37 - 2,16)	1,23 (0,38 - 2,49)	,082	,149	,529	,198	,242	,941
LPS (UE/mL)	1,34 (0,96 - 1,74)	1,32 (0,94 - 2)	1,74 (1,26 - 2,19)	1,55 (1,15 - 2,27)	,121	,245	,761	,013	,085	,756
IL-8 (pg/mL)	4,17 (2,78 - 6,36)	5,6 (4,06 - 9,95)	11,92 (6,26 - 20,93)	18,76 (9,14 - 31,47)	,000	,000	,027	,000	,004	,005
IP-10 (pg/mL)	171,26 (110,41 - 258,35)	189,2 (79,13 - 329,01)	336,08 (146,2 - 455,04)	406,97 (203,74 - 689,54)	,000	,003	,283	,010	,035	,921
MCP1 (pg/mL)	18,24 (10,03 - 39,3)	23,22 (12,6 - 39,18)	25,25 (11,34 - 43,51)	27,86 (10,61 - 52,04)	,234	,750	,787	,370	,986	,227
IL1RA (pg/mL)	132,66 (66,31 - 439,59)	130,64 (66,31 - 557,33)	172,8 (77,68 - 792,25)	199,15 (66,31 - 322,12)	,963	,560	,613	,551	,306	,441
IL-18 (pg/mL)	231,14 (121,19 - 569,92)	301,38 (145,6 - 612,36)	254,3 (129,54 - 465,43)	253,97 (155,12 - 377,66)	,828	,508	,787	,954	,450	,353
PAI1_1000	9,67 (6,97 - 12,08)	8,82 (5,79 - 12,82)	10,69 (7,67 - 14,39)	13,24 (10,07 - 15,48)	,003	,004	,121	,387	,255	,485
DDIMER (ng/mL)	26,59 (11,42 - 64,73)	32,93 (13,56 - 79,82)	23,53 (8,42 - 68,18)	132,22 (59,48 - 280,1)	,000	,000	,002	,959	,686	,353
TNFRI (ng/mL)	1,93 (1,19 - 3,31)	2,03 (1,18 - 3,08)	2,57 (1,3 - 5,37)	3,47 (2,27 - 4,55)	,003	,003	,498	,089	,124	,968
svCAM1 (ng/mL)	1150,26 (650,01 - 2079,41)	2133,53 (930,95 - 4668,47)	1429,06 (927,19 - 4203,7)	3516,84 (1108,1 - 5549,89)	,000	,214	,079	,021	,428	,000
siCAM1 (ng/mL)	1873,44 (1020,3 - 3284,79)	2195,26 (1128,53 - 4053,34)	2400,27 (1195,04 - 4242,64)	3870,53 (1122,43 - 12077,97)	,070	,126	,188	,350	,793	,341
IFN-g (pg/mL)	10,62 (2,7 - 32,35)	6,61 (1,92 - 18,49)	12,13 (4,68 - 30,37)	18,55 (6,03 - 28,89)	,212	,017	,280	,931	,128	,101
IL-1b (pg/mL)	1,32 (0,71 - 2,5)	0,85 (0,5 - 1,95)	1,59 (0,45 - 2,82)	0,52 (0,17 - 2,12)	,087	,375	,192	,744	,208	,075
IL-10 (pg/mL)	1,41 (0,93 - 2,86)	1,25 (0,68 - 2,2)	1,27 (0,74 - 2,65)	1,48 (1,13 - 2,71)	,835	,290	,490	,402	,610	,133
IL-12p70 (pg/mL)	2,3 (1,42 - 4,14)	1,59 (0,86 - 3,4)	2,11 (1,09 - 4,11)	1,59 (0,57 - 4)	,249	,933	,706	,421	,287	,013
IL-17A (pg/mL)	1,46 (0,83 - 3,46)	1,06 (0,48 - 2,58)	0,65 (0,44 - 1,79)	0,95 (0,32 - 2,61)	,053	,537	,850	,015	,454	,027
IL-2 (pg/mL)	3,57 (0,95 - 7,31)	1,82 (0,64 - 6,92)	2,91 (0,95 - 3,57)	0,95 (0,64 - 3,57)	,028	,256	,358	,101	,926	,093
IL-4 (pg/mL)	3,5 (1,73 - 7,48)	2,37 (1,73 - 6,15)	2,52 (1,43 - 6,77)	1,75 (1,16 - 6,72)	,144	,839	,733	,179	,927	,055
IL- 6 (pg/mL)	4,64 (3,34 - 7,74)	4,97 (3,64 - 6,91)	6,74 (4,63 - 12,12)	9,11 (6 - 19,99)	,000	,000	,025	,015	,036	,634
TNF-a (pg/mL)	2,95 (1,13 - 5,81)	1,97 (0,86 - 4,91)	1,5 (0,65 - 3,54)	0,83 (0,23 - 2,31)	,003	,053	,148	,058	,677	,084

Abreviaturas: MW, Test de Mann-Whitney, kPa, kilo Pascales.

Publicaciones y Patente

