

Universitat ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Medicina
Departament de Medicina i Cirurgia

universitat



Immunogenètica i immunopatogènia de la infecció
pel VIH-1 en la població espanyola. Influència sobre la
història natural de la infecció.

Dirigida pels Professors Dr. Cristóbal Richart Jurado i
Dr. Francesc Vidal i Marsal.

Tesi doctoral presentada per José Joaquin Peraire Forner per optar al
grau de Doctor

Tarragona 2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMMUNOGENÈTICA I IMMUNOPATOGÈNIA DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1 EN LA POBLACIÓ ESPANYOLA.
INFLUÈNCIA SOBRE LA HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ.
Jose Joaquin Peraire Forner
ISBN:978-84-691-9481-2/DL:T-23-2009

Cristóbal Richart Jurado, Cap de Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Tarragona
Joan XXIII i Catedràtic de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, i Francesc Vidal i
Marsal, Cap Clínic del Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII
i Catedràtic de Medicina de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona,

CERTIFIQUEN QUE:

La Tesi Doctoral titulada “ **Immunogenètica i immunopatogènia de la infecció pel VIH-1 en la població espanyola. Influència sobre la història natural de la infecció**”, presentada per José Joaquin Peraire Forner, ha estat realitzada sota la nostra direcció i compleix els requisits necessaris per a optar al grau de Doctor en Medicina.

Per a que així consti i tingui els efectes oportuns, signem la present.

Tarragona, setembre 2008.

Dr. Cristóbal Richart Jurado

Dr. Francesc Vidal i Marsal

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
IMMUNOGENÈTICA I IMMUNOPATOGÈNIA DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1 EN LA POBLACIÓ ESPANYOLA.
INFLUÈNCIA SOBRE LA HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ.
Jose Joaquin Peraire Forner
ISBN:978-84-691-9481-2/DL:T-23-2009

DEDICATORIA

*A la meva estimada Mayte
i a les meves filles Maria i Caterina,
per donar sentit a tot el que faig.*

AGRAÏMENTS

Al Prof. Dr. Cristobal Richart Jurado, per la confiança dipositada i les facilitats donades des d'un principi.

Al Prof. Dr. Francesc Vidal i Marçal, per les seves ensenyances, el seu constant estímul, suport i amistat .

A la Dra Consuelo Viladés Laborda i Dr. Sergi Veloso, companys i amics de la Unitat de VIH de l'Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, per la seva esforçada col·laboració en el desenvolupament dels treballs d'aquesta tesi.

Als companys del Servei de Medicina Interna pel seu suport i bons consells.

A tots els companys dels hospitals que han col·laborat en els estudis que formen part d'aquesta tesi, sense els quals hauria estat impossible realitzar-la.

A Monserrat Vargas i Marta Sanjuán, infermeres de l'hospital de dia de l'Hospital Joan XXIII, per la seva col·laboració en les extraccions de sang.

A tot el personal de la Unitat de Recerca de l'Hospital Joan XXIII, especialment a la Dra. Monserrat Bronch, Carmen Aguilar i Eva Gonzalez, per la tasca de laboratori desenvolupada en els treballs d'aquesta tesi.

A l'equip del Laboratori de Recerca Mitocondrial de la Fundació Clínic-IDIBAPS, per la seva col·laboració.

A la Dra. Cristina Gutierrez Forner per la seva ajuda i paciència durant l'anàlisi dels resultats.

A la Dra. Monserrat Olona i Dr. Miguel López Dupla per la seva col·laboració en l'anàlisi estadística.

A tots i cadascun dels nostres pacients, veritables protagonistes d'aquests treballs, per la sempre desinteressada disposició a col·laborar.

A José Vicente Feliú Marzá, per ser un exemple d'amistat.

Per finalitzar, a la tota meva família, especialment als meus pares, per tot el suport donat durant els anys de formació com a metge i investigador.

ABREVIATURES

ADN: àcid desoxiribonucleic.

ADNases: desoxiribonucleases.

ADNmt: ADN mitocondrial.

ADNn: ADN nuclear.

AIF: factor inductor d'apoptosi; o *apoptosis inducing factor*.

ARN: àcid ribonucleic.

ARNasa: ribonucleasa.

ARNm: ARN missatger.

ARNr: ARN ribosòmic.

ATP: adenosina trifosfat.

C I: complex I o NADH-coQ reductasa.

C II: complex II o succinat-CoQ reductasa.

C III: complex III o CoQH₂-cit c reductasa.

C IV: complex IV o citocrom c oxidasa.

C V: complex V o ATP sintetasa.

CAD: ADNasa activada per caspasa; o caspase activated DNAase.

CCR2-64I: polimorfisme en la posició -64 del receptor de CCR2.

CCR5Δ32: deleció de 32 parells de bases en el receptor de CCR5.

Cit c: citocrom c.

CMSP: cèl·lules mononuclears de sang perifèrica.

CoQ: coenzim Q.

CRM: cadena respiratòria mitocondrial.

CTE: cadena de transport electrònic.

CTL: limfòcits T CD8+ citotòxics.

ELISA: enzimoimmunoassaig; o *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*.

IL-2: interleucina tipus 2.

ITIAN: inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsids.

GALT: limfòcits del sistema immune associat a mucoses.

gp: complexos glicoprotèids.

HLA: complex major d'histocompatibilitat.

HTLV-2: virus limfotrópic humà de cèl·lules T tipus 2 o; *human T-lymphotropic virus type 2*.

KIR: receptors tipus immunoglobulina de les cèl·lules NK; o *killer cell immunoglobulin-like receptors*.

LTNP: pacients infectats pel VIH no progressadors o progressadors lents; o *long term non progressor*.

MCP-2: proteïna 2 quimiotàctica per monòcits.

MCP-3: proteïna 2 quimiotàctica per monòcits.

MIP-1α: proteïna inflamatòria dels macròfags 1α; o *macrophage inflammatory protein 1α*.

MIP-1β: proteïna inflamatòria dels macròfags 1β o *macrophage inflammatory protein 1β*.

M-tròpiques: soques víriques monocitotòpiques.

NK: cèl·lula assassina natural, o *natural killer*.

NF-kB: factor de transcripció nuclear kappa B; o *nuclear factor kB*.

NO: òxid nítric.

nSI: soques no inductores de sincitis.

PCR: reacció en cadena de la polimerasa; o *polymerase chain reaction*.

PT: pacients infectats pel VIH-1 progressadors típics.

PTP: porus de transició; o *permeability transition pore*.

RANTES : *regulated upon activation normal T expressed and secreted*.

SDF-1: factor tipus 1 derivat de l'estroma; o *stromal derived factor type 1*.

SDF-1 3'A: polimorfisme de SDF-1 a la posició 801 (G>A) de la regió no traslladada 3' de la seqüència de referència.

SI: soques inductores de sinciti.

SIDA: Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida.

Sistema OXPHOS: sistema de fosforilació oxidativa.

SMAC-Diablo: *second mitochondria-derived activator of caspases*, o la seva forma homòloga al ratolí Diablo.

SNP: Polimorfisme de nucleòtid simple; o *single nucleotide polymorphism*.

TARGA: tractament antiretroviral de gran eficàcia.

TI: transcriptasa inversa.

TNF α : factor de necrosi tumoral α .

TRAIL: lligand inductor d'apoptosi relacionat amb el TNF; o *TNF-related apoptosis-inducing ligand*.

T-tròpiques: soques viriques limfotòpiques.

VHC: virus de la hepatitis C.

VHG o GBV-C: virus de la hepatitis G.

VHS-2: virus herpes simple tipus 2.

VIH: virus de la immunodeficiència humana.

VIH-1: virus de la immunodeficiència humana tipus 1.

VIH-2: virus de la immunodeficiència humana tipus 2.

$\Delta\Psi_{mt}$: potencial de membrana mitocondrial.

Índex

1 INTRODUCCIÓ	17
1.1 Epidemiologia de la infecció pel VIH	19
1.2 Estructura del VIH-1	21
1.3 Immunopatogènia de la infecció pel VIH-1	23
1.3.1 Cicle biològic del VIH-1	23
1.3.2 L'entrada del VIH-1 en la cèl·lula	26
Els receptors cel·lulars de quimiocines i els seus lligands naturals, les quimiocines.	26
El receptors de quimiocines com a coreceptors del VIH-1	28
Tropisme viral i inhibició per quimiocines	28
Variants genètiques dels coreceptors i infecció pel VIH-1	30
1.3.3 Mecanismes de propagació viral	31
1.3.4 Mecanismes de pèrdua limfocitària	33
1.3.5 Resposta immune front al VIH -1	37
2 HISTÒRIA NATURAL DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1	41
2.1 Fases de la infecció	43
2.2 Categories de pacients segons la velocitat de progressió	46
2.2.1 Progressadors típics (PT)	46
2.2.2 No progressadors o progressadors lents (LTNP) i <i>controladors d'elit</i>	46
2.2.3 Progressadors ràpids	47
2.3. Factors que modulen la història natural	47
2.3.1 Factors virals	48
2.3.2 Factors ambientals	48
2.3.3 Factors de l'hoste	49
3 DANY MITOCONDRIAL PEL VIH-1	53
3.1 Estructura i característiques principals del mitocondri	55
3.2 El sistema OXPHOS	57
3.3 Mitocondri i apoptosi	59

3.4 El VIH-1 com agent lesiu mitocondrial	62
4 HIPÒTESIS I OBJECTIUS	65
4.1 Hipòtesis	67
4.2 Objectius	70
5 METODOLOGIA	73
5.1 Disseny des estudis	75
5.2 Pacients estudiats	75
5.3 Variables dels estudis	77
5.4 Recollida de mostres	78
5.5 Metodologia de laboratori	79
5.6 Anàlisi estadístic	83
6 ESTUDIS	85
6.1 Estudi 1	87
" La falta d'associació de la variant al·lèlica SDF-1 3'A amb infecció pel VIH-1 no progressiva s'estén més enllà de 16 anys"	
6.2 Estudi 2	93
"Els polimorfismes en el promotor del gen de la quimiocina RANTES no s'associen a infecció pel VIH-1 no progressiva de més de 16 anys d'evolució"	
6.3 Estudi 3	101
"Absència de polimorfismes en la regió C-terminal de CXCR4 en espanyols infectats pel VIH-1 i en no infectats"	
6.4 Estudi 4	105
"Els pacients infectats pel VIH-1 no progressadors (LTNP) tenen un dany mitocondrial més lleu i una menor apoptosi aconduïda pel mitocondri en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica que els progresadors típics"	

7. DISCUSSIÓ	115
8. CONCLUSIONS	127
9. BIBLIOGRAFIA	133

1. Introducció

1.1 Epidemiologia de la infecció pel VIH.

D'ençà l'aparició dels primers casos de la Síndrome d'Immunodeficiència Adquirida (SIDA) a l'any 1981,^{1,2} la infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) ha representat un dels principal problemes sanitaris a nivell mundial, i ha provocat la mort de milions de persones. Des d'un inici, la infecció s'ha expandit de manera exponencial per totes les àrees del món, de manera que es pot parlar d'una autèntica pandèmia. Tanmateix, actualment representa una infecció emergent en alguns països de l'antiga Unió Soviètica i del sud-est asiàtic.

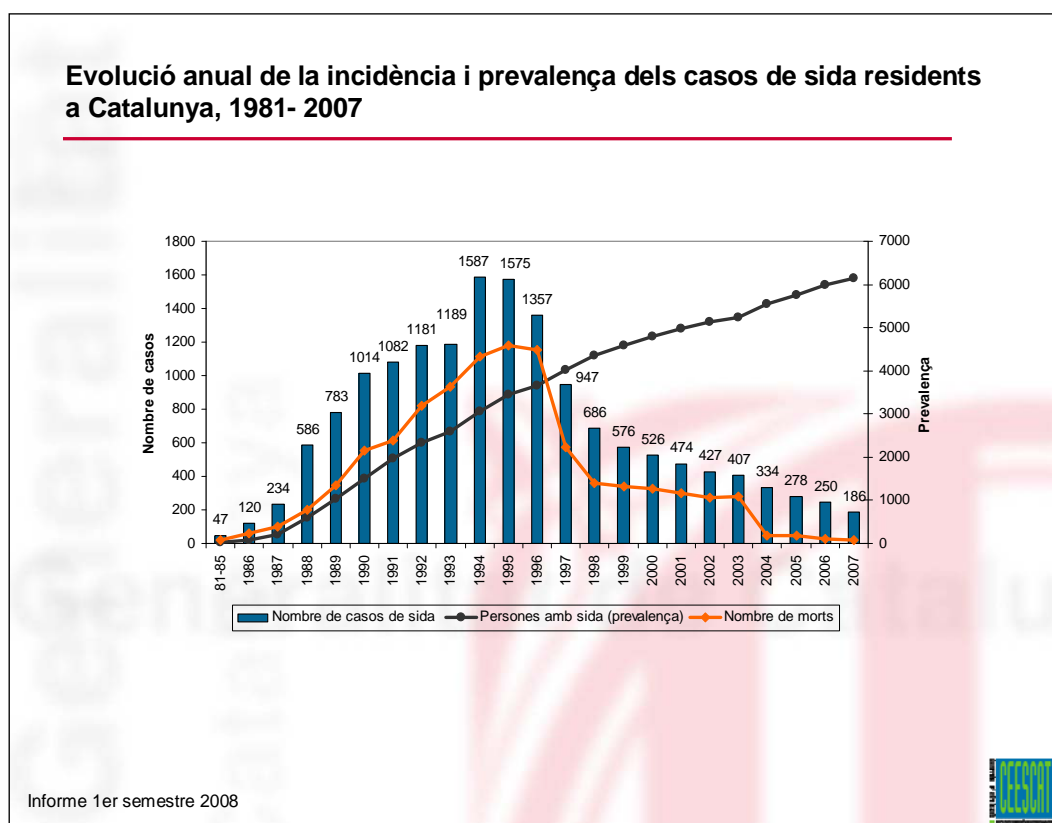
El programa de la SIDA de Nacions Unides calcula que fins a finals de l'any 2007 hi han 33.2 milions de persones vives infectades pel VIH, la majoria de les quals (22.5 milions) viuen a l'Àfrica subsahariana, produint un marcat descens en l'esperança de vida d'aquests països. Del total d'infectats, 2.1 milions corresponen a nens de menys de 15 anys. L'any 2007 uns 2.5 milions de persones han contret la infecció i 2.1 milions han mort per malalties relacionades amb el SIDA.³ La Taula 1 ens il·lustra dades de l'estat actual de la pandèmia pel VIH en el món.

Taula 1. Dades de Nacions Unides de la pandèmia.

	Adults i nens vivint amb VIH	Adults i nens nous infectats amb VIH	Prevalença adults (15-49) [%]	Adults i nens morts per SIDA
Àfrica subsahariana	22.5 milions [20.9 – 24.3 milions]	1.7 milions [1.4 – 2.4 milions]	5.0% [4.6% – 5.5%]	1.6 milions [1.5 – 2.0 milions]
Àfrica del Nord i Orient Mitjà	380 000 [270 000 – 500 000]	35 000 [16 000 – 65 000]	0.3% [0.2% – 0.4%]	25 000 [20 000 – 34 000]
Àsia meridional i sudoriental	4.0 milions [3.3 – 5.1 milions]	340 000 [180 000 – 740 000]	0.3% [0.2% – 0.4%]	270 000 [230 000 – 380 000]
Àsia oriental	800 000 [620 000 – 960 000]	92 000 [21 000 – 220 000]	0.1% [<0.2%]	32 000 [28 000 – 49 000]
Amèrica Latina	1.6 milions [1.4 – 1.9 milions]	100 000 [47 000 – 220 000]	0.5% [0.4% – 0.6%]	58 000 [49 000 – 91 000]
Carib	230 000 [210 000 – 270 000]	17 000 [15 000 – 23 000]	1.0% [0.9% – 1.2%]	11 000 [9800 – 18 000]
Europa oriental i Àsia central	1.6 milions [1.2 – 2.1 milions]	150 000 [70 000 – 290 000]	0.9% [0.7% – 1.2%]	55 000 [42 000 – 88 000]
Europa occidental i central	760 000 [600 000 – 1.1 million]	31 000 [19 000 – 86 000]	0.3% [0.2% – 0.4%]	12 000 [<15 000]
Amèrica del Nord	1.3 milions [480 000 – 1.9 milions]	46 000 [38 000 – 68 000]	0.6% [0.5% – 0.9%]	21 000 [18 000 – 31 000]
Oceania	75 000 [53 000 – 120 000]	14 000 [11 000 – 26 000]	0.4% [0.3% – 0.7%]	1200 [<500 – 2700]
TOTAL	33.2 milions [30.6 – 36.1 milions]	2.5 milions [1.8 – 4.1 milions]	0.8% [0.7% - 0.9%]	2.1 milions [1.9 – 2.4 milions]

Afortunadament, en els últims anys l'eficàcia de les campanyes de prevenció desenvolupades per evitar nous contagis, han produït una desacceleració en el nombre de nous casos. De la mateixa manera, l'èxit del tractament antiretroviral de gran eficàcia (TARGA), el qual està disponible des de 1996, ha suposat una dràstica reducció de la mortalitat pel VIH, així com de nous casos de SIDA. La trista realitat és, però, que només el països rics han pogut gaudir dels avenços del tractament, mentre que les poblacions dels països en vies de desenvolupament encara demanen ajuda per combatre la pandèmia. La Figura 1 exposa l'evolució epidemiològica de la infecció pel VIH a Catalunya.

Figura 1. Mostra la evolució anual i la incidència dels casos diagnosticats de SIDA a Catalunya



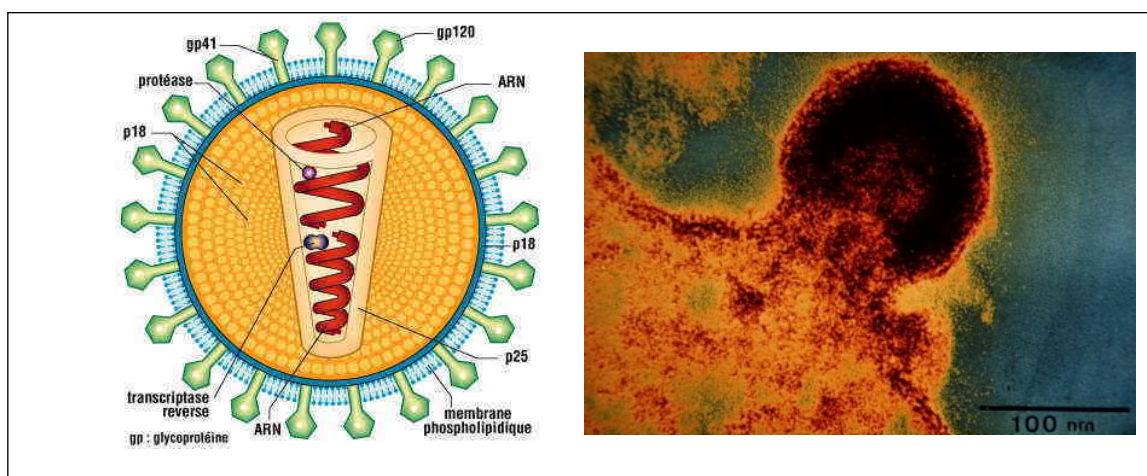
1.2 Estructura del VIH-1.

El VIH forma part de la família dels retrovirus, i com a tal, es caracteritza per tenir en el seu interior un enzim denominat transcriptasa inversa (TI), una ADN-polimerasa-ARN dirigida que, una vegada en l'interior de la cèl·lula que infecta, li permet sintetitzar dues cadenes d'ADN a partir de l'ARN del genoma víric.

Es coneixen dos tipus de VIH, el VIH-1 i VIH-2. La majoria de casos d'infecció són pel VIH-1. El VIH-2 es localitza fonamentalment a l'Àfrica occidental i la seva patogenicitat es clarament inferior a la del VIH-1. Els treballs d'aquesta tesi fan referència únicament a pacients infectats pel VIH-1.

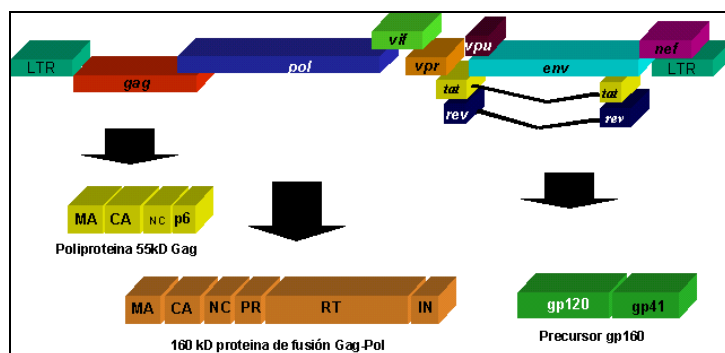
El VIH-1 és una partícula esfèrica de 80-100 nm de diàmetre. L'estructura del virió presenta tres capes: la interna o core formada per dues cadenes idèntiques d'ARN de polaritat positiva, nucleoproteïnes amb diverses funcions (p6 i p7) i enzims necessaris per la seva replicació; una càpsida icosaèdrica formada per la proteïna p24, i un embolcall compost per una bicapa lipídica derivada de la cèl·lula hoste infectada, on s'integren setanta-dos complexos glicoprotèids virals (gp) com gp160 amb les dues subunitats gp120 i gp 41, diverses molècules d'adhesió i els antígens de histocompatibilitat (HLA) de la classe I i II derivats de la cèl·lula hoste (Figura 2).

Figura 2. Estructura del VIH-1



El genoma del virus està format per 9.200 parells de bases, és responsable de la síntesi proteica, i està constituït per tres gens estructurals: *gag*, *pol* i *env*, que són presents en tots els retrovirus; i per sis gens addicionals, dos de reguladors (*tat* i *rev*) i quatre d'accessoris (*vif*, *vpr*, *vpu* i *nef*), absolutament necessaris per la replicació viral, ja que codifiquen per les proteïnes que controlen l'expressió vírica, la infectivitat i que condicionen la interacció virus-cèl·lula (Figura 3). El gen *gag* codifica per les proteïnes estructurals de la càpsida i core (p17, p24, p7, p6), *pol* pels enzims (TI, proteasa, integrasa, ARNasa) i *env* per les glicoproteïnes de l'embolcall (gp41, gp120) responsables de la unió i fusió del virus i la cèl·lula. A la Taula 2 s'indiquen els productes dels gens i les seves principals funcions.

Figura 3. Genoma del VIH-1 i proteïnes que codifica.



Taula 2. Descripció dels gens i la funció principal de les proteïnes del VIH-1.

Gen	Precursor	Proteïna	Funció
<i>gag</i>	p55	p17	Proteïna estructural de la matriu
		p24	Proteïna estructural principal de la nucleocàpsida
	p15	p9	Proteïna estructural de la nucleocàpsida
		P7	Proteïna estructural de la nucleocàpsida, associada a l'ARN viral
<i>pol</i>	p190	p11	Activitat proteasa
		p13	Activitat ARNasa
		p66; p51	Activitat transcriptasa inversa (TI)
		p32	Activitat integrasa
<i>Env</i>	gp160	Gp120	Proteïna extracel·lular, permet la unió del virus a la cèl·lula
		Gp41	Proteïna transmembrana, permet la fusió del virus a la cèl·lula
<i>Tat</i>		Tat (p14)	Activador potent de la transcripció viral
<i>Rev</i>		Rev (p18)	Regula l'expressió dels gens estructurals
<i>Nef</i>		Nef (p27)	Pleiotròpica, necessària per la producció vírica i la progressió de la malaltia
<i>vif</i>		Vif (p23)	Promou la infectivitat del virus extracel·lular
<i>vpr</i>		Vpr (p15)	Activador dèbil de la transcripció viral

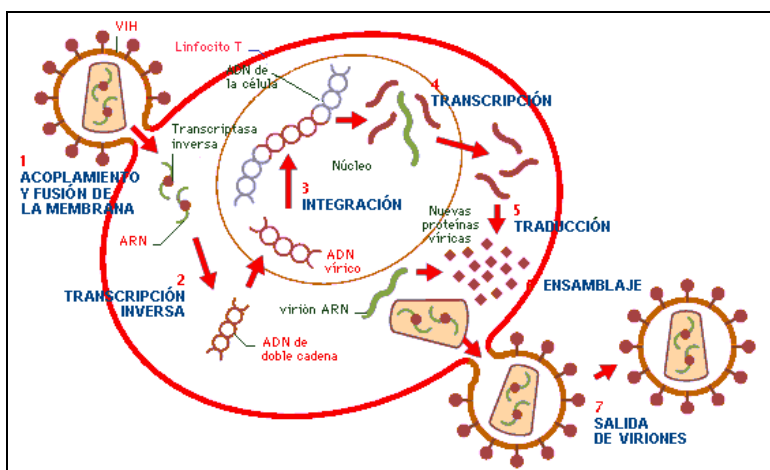
1.3 Immunopatogènia de la infecció pel VIH-1.

1.3.1 Cicle biològic del VIH-1.

El VIH-1 presenta dues característiques fonamentals: una elevada cinètica de replicació i una gran variabilitat genètica. La primera es deguda a la gran capacitat de replicació que presenta, al voltant de 10 milions de cicles per dia. La segona a la poca fiabilitat del seu principal enzim, la TI, que comet una errada cada 10^3 - 10^4 operacions que realitza (a títol d'exemple, l'ADN polimerasa nuclear comet una errada cada 10^6) causant d'aquesta manera una gran quantitat de virus defectius i quasiespècies que li permetran escapar al control de la resposta immune específica.⁴

El VIH-1 es capaç d'infectar totes aquelles cèl·lules que expressen en la seva superfície el receptor denominat CD4. Aquesta proteïna està present en la superfície dels limfòcits T col·laboradors i en les cèl·lules del sistema mononuclear-fagocític. Globalment, el seu cicle biològic es divideix en dos etapes ben diferenciades: la fase inicial que culmina amb la integració de l'ADN viral en el genoma de la cèl·lula hoste, i la fase tardana que inclou la transcripció del genoma viral, la síntesi i processament de les seves proteïnes, l'assemblatge i la generació d'una progènie infecciosa (Figura 4).⁵ L'expressió gènica del virus comença amb l'expressió inicial dels gens reguladors i es completa amb l'expressió tardana dels gens estructurals. Tanmateix, el període de latència pot frenar l'aparició de nous virions, de manera parcial o total durant molts anys.

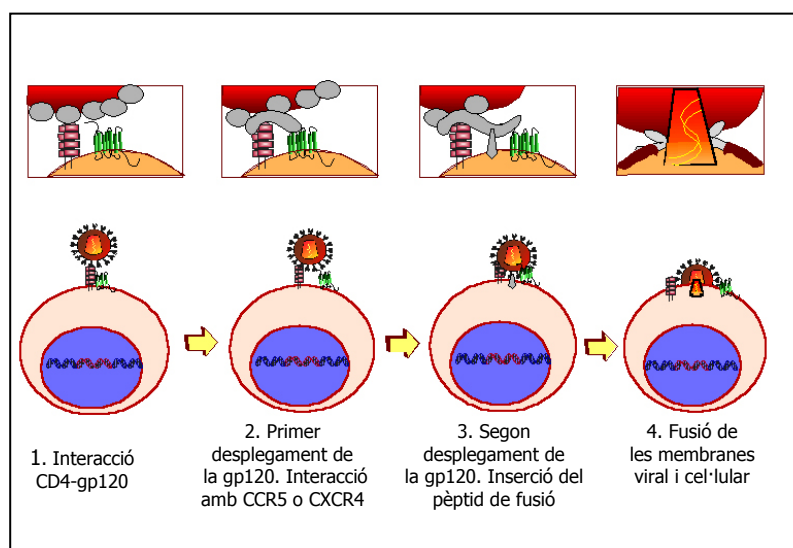
Figura 4. Cicle biològic VIH



Absorció, fusió i internalització del viri.

El virus, per poder entrar a l'interior de les cèl·lules de l'hoste, necessita a més del receptor CD4, interaccionar amb un coreceptor que pertany a la família dels receptors de les quimiocines, usualment CCR5 i/o CXCR4 (vegi's més endavant). La unió de la gp120 amb el receptor CD4 de la superfície cel·lular provoca un canvi conformacional que permet la interacció amb el coreceptor i la posterior fusió de l'embolcall viral i la membrana de la cèl·lula. Una vegada produïda la fusió entre les membranes viral i cel·lular es produeix la internalització de la nucleocàpsida i la posterior pèrdua de la càpsida del genoma víric. Aquest pas és inhibït per proteïnes cel·lulars, la més important i coneguda recentment és la TRIM5 α .⁶ La Figura 5 il·lustra els mecanismes d'entrada del VIH a la cèl·lula hoste.

Figura 5. Mecanismes d'entrada del VIH a la cèl·lula



Transcripció inversa.

La síntesi d'una doble cadena d'ADN a partir de l'ARN viral es realitza pel complex enzimàtic de la TI. Per poder completar aquesta síntesi d'ADN proviral la cèl·lula ha d'estar activada, en la fase G1 del cicle cel·lular. En cas contrari l'ADN no integrat es degrada en un breu període de temps per les ADNases cel·lulars.⁷

Integració.

L'ADN proviral s'uneix a factors cel·lulars i virals (proteïna Vpr) formant el complex de preintegració. Aquest complex es transportat al nucli cel·lular on s'integra al genoma de la cèl·lula hoste mitjançant l'acció de l'enzim integrasa, constituint la forma proviral del VIH-1.⁵ El virus es pot mantenir en aquest estat latent, replicar de manera controlada, o bé iniciar una replicació massiva amb la lisi de la cèl·lula hoste.

Transcripció.

A partir de l'estat de provirus la replicació comença amb la transcripció de l'ADN viral a ARN missatger (ARNm). Aquest pas depèn d'una sèrie de factors cel·lulars. El factor més important es el NF-kB, complex de proteïnes que només es troba com a factor activat en els limfòcits actius i no en repòs.⁸ Així doncs, clàssicament s'ha considerat que els limfòcits CD4+ representen un doble nínxol ecològic dintre del cicle vital del VIH-1: en estat de repòs permet la latència vírica al no tenir factors cel·lulars activats; al contrari, l'activació cel·lular activa els factors (NF-kB, entre altres) que permeten el inici de la transcripció i posterior formació de proteïnes virals. No obstant això, en els últims anys s'han descrit una sèrie de factors cel·lulars associats a l'estat de latència com la proteïna Murr-1⁹ i l'APOBC3G, un factor de restricció cel·lular que no permet la replicació viral.¹⁰

Transport i traducció.

La proteïna viral Tat augmenta la taxa de transcripció de l'ADN viral una vegada s'ha iniciat la transcripció. L'ARNm es sintetitza en forma d'un únic transcrit, de manera que ha de ser transportat al citoplasma i processat en ARN de diferents mides. Ambdós processos són duts a terme per una altra proteïna viral, Rev. Als ribosomes aquest ARNm serà traduït sintetitzant-ne les proteïnes virals.

Processament, assemblatges de proteïnes i sortida.

Una vegada sintetitzades les proteïnes han de ser processades abans de ser assemblades en partícules virals. En aquest procés intervé les proteïnes virals Vif, Vpu i proteasa. La maduració finals dels virions i l'assemblatge correcte de les proteïnes es produirà durant el procés de gemació de les partícules virals a través de la membrana de la cèl·lula hoste. En aquest assemblatge participen nombrosos factors cel·lulars.¹¹

1.3.2 L'entrada del VIH-1 en la cèl·lula.

Atés que un dels objectius d'aquesta tesi és la influència de les variants al·lèliques de les quimiocines i els seus receptors sobre la història natural de la infecció pel VIH-1, descriurem amb més detall les seves principals característiques i la implicació en la infecció pel VIH-1.

Els receptors cel·lulars de quimiocines i els seus lligands naturals, les quimiocines .

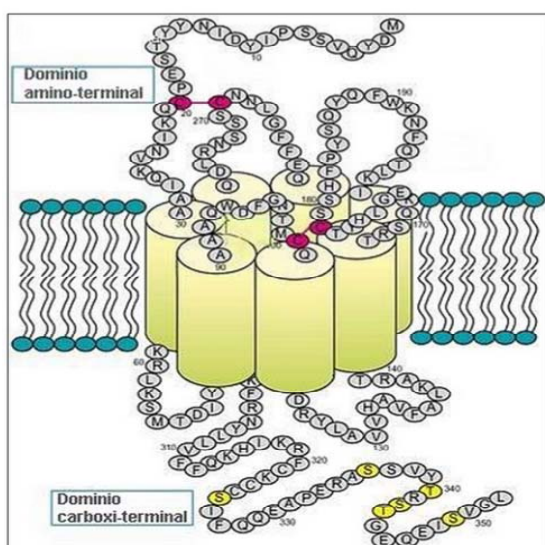
Com s'ha comentat a l'apartat anterior (pag.24), per penetrar en les cèl·lules diana, el virus utilitza de manera necessària, a més dels del receptor CD4, diversos coreceptors majors (CCR5 i CXCR4) que pertanyen a la família dels receptors de les quimiocines. Experimentalment s'ha demostrat que pot utilitzar també com a coreceptors altres receptors de quimiocines (anomenats menors): CX3CR1, CCR2.¹² El coneixement d'aquests coreceptors i dels seus lligands naturals les quimiocines, ha proporcionat noves i interessants dades sobre la interacció entre el virus i la cèl·lula hoste.

Les quimiocines són citocines que presenten característiques bioquímiques comuns i que tenen propietats quimiotàctiques pels leucòcits i per algunes cèl·lules no hematopoètiques. Actualment, n'hi ha més de cinquanta identificades en l'ésser humà.¹³ Son uns petits pèptids de 8 a 12 kDa que estan produïts per nombrosos tipus de cèl·lules en resposta a estímuls exògens com toxines o microorganismes, o endògens, com altres citocines (IL-1 i TNF α). Una característica molecular essencial de les quimiocines és la conservació de quatre residus cisteïna que estan units formant

dos ponts disulfur, necessaris per a la activitat de la molècula. S'han classificat en quatre grups, d'acord amb el nombre de cisteïnes i a si les dues primeres cisteïnes estan o no separades per un altre aminoàcid,^{14,15} i són: CXC (quimiocines α), CC (quimiocines β), C i CX3C.

Les accions de les quimiocines estan modulades per una família de receptors que s'expressen en diferents tipus de cèl·lules, que presenten set dominis transmembrana acoblats a proteïnes G, i que tenen un grau elevat d'homologia (Figura 6).¹⁴ Actualment s'han identificat sis receptors per a quimiocines CXC, deu per a CC i un per a C i CX3C, en essers humans.¹⁶ L'expressió d'aquests receptors en diferents tipus cel·lulars i les unions entre quimiocines i receptors son molt variables, doncs, mentre que alguns receptors es poden unir a diferents quimiocines (l·ligands), com CCR5 que es pot unir a RANTES (*regulated upon activation normal T expressed and secreted*), MIP-1 α (proteïna inflamatòria dels macròfags 1 α ; o *macrophage inflammatory protein*), MIP-1 β , MCP-2 (proteïna 2 quimiotàctica per monòcits) i MCP-3, altres receptors son específics per a una sola quimiocina, com CX3CR1 per CX3CL1 o fractalkina. D'altra banda, hi ha quimiocines que es poden unir a més d'un receptor, com RANTES --una quimiocina CC que té un paper destacable en la infecció pel VIH-1--, que es pot unir a CCR1, CCR2, CCR5 i CCR9.^{13,14} El sistema quimiocina-receptor es considera una unitat funcional i la seva unió indueix l'activació de les fosfolipases i desencadena una cascada de senyals que determinaran la resposta d'una cèl·lula determinada.

Figura 6. Receptors de quimiocines



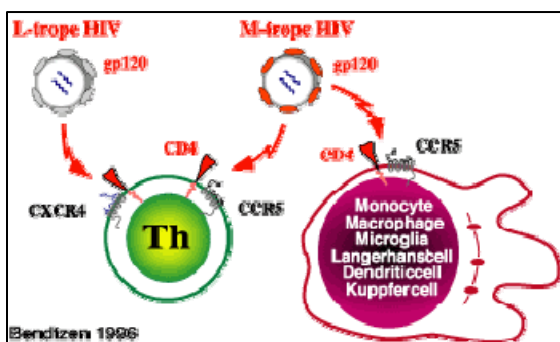
El receptors de quimiocines com a coreceptors del VIH-1.

Les quimiocines i els seus receptors han estat implicats en la patogènia de diferents malalties, entre les que es compten fenòmens al·lèrgics, arteriosclerosi, psoriasi, malària, i, atès que tenen un paper crític en la resposta immune contra els virus, en la infecció pel VIH-1. En aquest sentit, i tal com ha estat comentat, els receptors son usats pel VIH-1 per a penetrar dins de les cèl·lules diana.¹⁷ A aquests receptors de quimiocines se'ls anomena coreceptors del VIH-1 i, entre aquests, els que son utilitzats per la majoria de soques de VIH son CCR5 i CXCR4.¹⁸ A CCR5 s'hi poden lligar diverses quimiocines CC: RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2 i MCP-3, mentre que CXCR4 només té un únic lligand, la quimiocina SDF-1 (factor tipus 1 derivat de l'estroma; o *stromal derived factor type 1*), també denominada CXCL12.¹⁹ Addicionalment, algunes soques de VIH-1 poden utilitzar alternativament qualsevol d'aquests 2 coreceptors o, fins i tot d'altres, com CCR2, CCR3 i CX3R1.²⁰

Tropisme viral i inhibició per quimiocines.

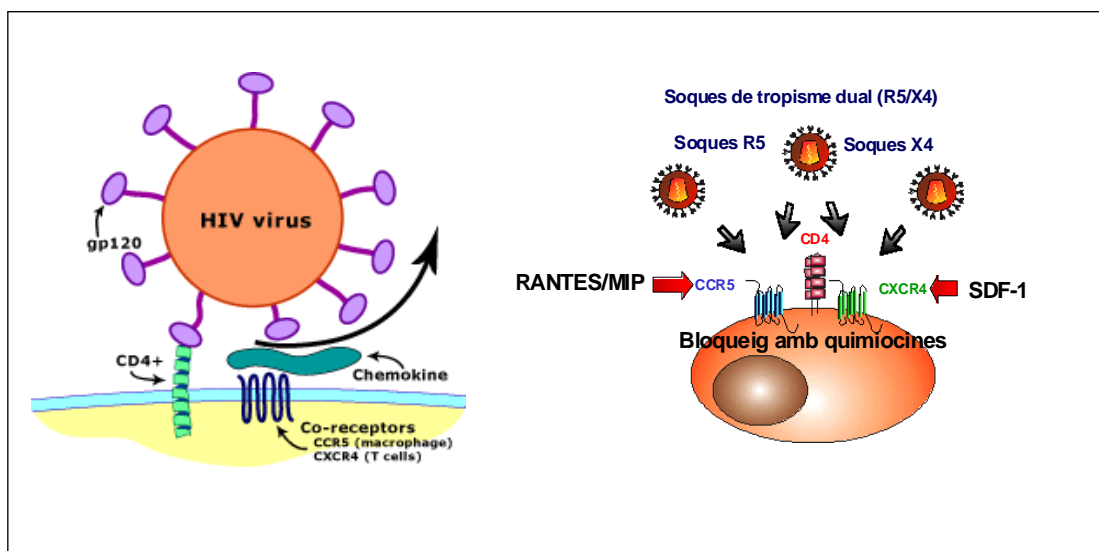
CCR5 és el principal coreceptor utilitzat per les soques de VIH amb tropisme pels monòcits i macròfags (M-tròpiques) i és essencial per a la transmissió del virus. Aquestes soques son les predominants en les fases inicials de la infecció i se les anomena R5 (antigament nSI o no inductores de sincitis).^{21,22} Per altra banda, les soques de VIH-1 amb tropisme pels limfòcits (T-tròpiques) utilitzen preferentment CXCR4, són les predominants en les fases avançades de la malaltia i contribueixen significativament a la reducció de limfòcits CD4+. Se les anomena X4 (antigament SI o inductores de sincitis).²⁰ Cal destacar l'existència de soques amb un tropisme dual anomenades R5/X4 (Figura 7).

Figura 7 . Tropisme viral.



S'ha demostrat que en la transmissió del VIH-1 per via sexual, les cèl·lules presentadores (cèl·lules de Langerhans i dendrítiques), així com els epitelis vaginal i intestinal secreten la quimiocina SDF-1, induint la endocitosi i bloqueig del coreceptor CXCR4.²³ Al contrari, les cèl·lules de Langerhans i els limfòcits del sistema immune associat a mucoses (GALT), que estan extraordinàriament activats, presenten el receptor CCR5 el la seva superfície, la qual cosa explicaria la baixa transmissibilitat de les variats X4 i la selecció de soques R5 en fases inicial de la infecció. Així mateix, la cèl·lula dendrítica és una cèl·lula productora de SDF-1, la qual cosa explicaria que els limfòcits que acudeixen a la presentació del virus per la cèl·lula dendrítica, tenen bloquejat el receptor CXCR4 per la quimiocina SDF-1, quedant lliure el coreceptor CCR5. En les fases avançades, la destrucció i desestructuració del sistema limfoide provocaria la destrucció de les cèl·lules productores de SDF-1, facilitant l'emergència de variants X4 al disminuir els nivells tissulars de SDF-1, amb la consegüent ràpida disminució del nombre de limfòcits CD4+. En conclusió, queda demostrat que SDF-1 es un potent mecanisme antiviral, no només en els epitelis, sinó també en la sinapsi immunològica, ja que al ser produït per les cèl·lules dendrítiques frena la propagació del virus (Figura 8).

Figura 8. Coreceptors del VIH i inhibició per quimiocines.



Variants genètiques dels coreceptors, quimiocines i infecció pel VIH.

En general, les quimiocines i els seus receptors cel·lulars són molècules polimòrfiques. Atesa la importància dels coreceptors per a la penetració del virus a la cèl·lula diana, els polimorfismes de nucleòtid simple (SNP; *o single nucleotide polymorphism*) en els gens que codifiquen per a quimiocines i receptors, els quals poden condicionar l'expressió i activitat d'aquestes molècules, podrien tenir una influència significativa en la patogènia i progressió de la malaltia.

Hom considera d'especial interès l'observació de que individus mutants homozigots que presenten una deleció de 32 parells de bases en el receptor CCR5 (al·lel CCR5 Δ 32) tenen una resistència natural a la infecció pel VIH^{19,20}, mentre que els mutants heterozigots es comporten com a no progressadors a llarg termini.²⁴⁻²⁷ Més recentment, han estat identificats una sèrie de SNP en la regió promotora del gen CCR5 que també s'han associat amb modificacions en el curs de la infecció.²⁸⁻³⁰ Altres variants genètiques estudiades, pel que fa als coreceptors, han estat un SNP en la posició -64 del CCR2 (CCR2-64I), que s'ha associat també a resistència a la infecció i a progressió lenta,^{27,31} també l'expressió de l'haplotip I249M280 del coreceptor CX3CR1 que s'ha associat a progressió ràpida,³² encara que altres autors no han trobat aquesta associació.³³⁻³⁵ Respecte al coreceptor CXCR4, a pesar de la seva importància, els estudis sobre possibles variants genètiques en el gen que el codifica són limitats, i no s'ha observat una clara influència sobre el risc d'infecció i la seva progressió.^{26,36-40}

Pel que fa a les quimiocines, la descripció d'un SNP de SDF-1 (únic lligand de CXCR4,) a la posició 801 (G>A) de la regió no traslladada 3' de la seqüència de referència (SDF-1 3'A), ha motivat diversos estudis, amb resultats contradictoris. Mentre que en alguns s'ha documentat que l'expressió de l'al·lel variant s'associa a no progressió a llarg termini, en altres no s'ha confirmat aquesta troballa.^{27,29,41-45} Les dades són particularment discordants i escasses en pacients no progressadors o progressadors lents (LTNP, *long term non progressors*).⁴⁶⁻⁵¹ Respecte a la quimiocina RANTES (principal lligand de CCR5) s'han descrit diversos SNP en el promotor del gen,

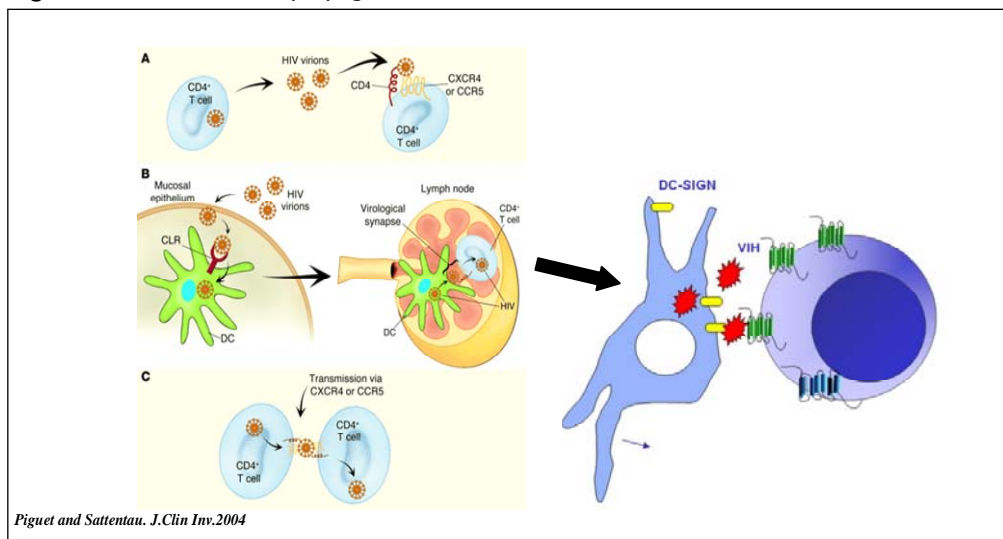
en les posicions -28(C>G), -109(T>C) i -403(G>A), que poden modular la història natural de la infecció pel VIH-1, amb una progressió clínica, virològica i immunològica més lenta de la infecció en la majoria dels estudis,⁵²⁻⁵⁹ encara que cap d'aquests han estat realitzats en LTNP.

Sembla clar, doncs, que les quimiocines i els seus receptors cel·lulars tenen un paper cabdal en la malaltia associada al VIH-1. La informació actualment disponible converteix a qualsevol gen relacionat amb aquestes molècules, que sigui polimòrfic, en candidat a que sigui estudiada la seva influència en la patogènia i història natural de la infecció pel VIH-1. Es per aquest motiu que els estudis immunogenètics d'aquesta tesi van dirigits a valorar la influència en la història natural de la infecció dels SNP en els gens que codifiquen els dos coreceptors majors que utilitza el VIH-1 (CCR5 i CXCR4) i en els seus principal lligands RANTES i SDF-1 en la població espanyola.

1.3.3 Mecanismes de propagació viral.

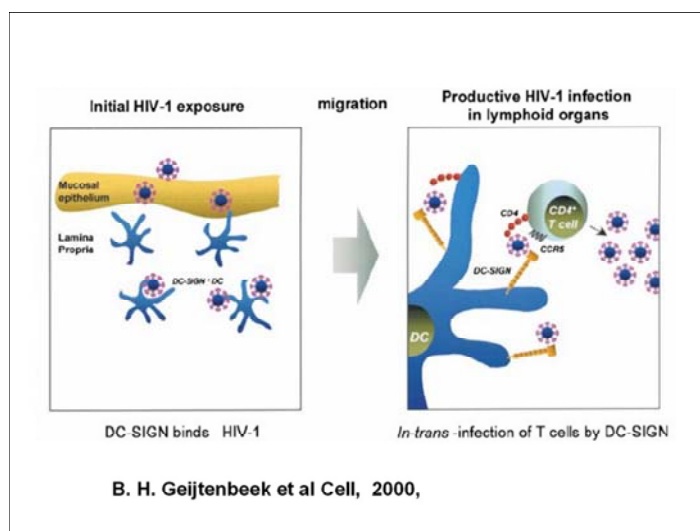
El coneixement dels coreceptors que utilitza el VIH-1, ens ha permet profunditzar en els mecanismes de propagació de la infecció. Una vegada s'ha produït la infecció del VIH-1, el virus es propaga dins de l'organisme per tres vies (Figura 9): a) transmissió de virions solubles lliures en la sang de cèl·lula a cèl·lula; b) mitjançant la sinapsi virològica des de la cèl·lula dendrítica presentadora del virus als limfòcits CD4+; i, c) per transmissió directa entre limfòcits CD4+.⁶⁰

Figura 9. Mecanismes de propagació viral.



En la sinapsi virològica, mecanisme fonamental de propagació del virus, intervenen una sèrie de molècules situades en la superfície de la membrana cel·lular, els glicosaminoglicans que s'adhereixen amb baixa afinitat als virus amb embolcall, i una sèrie de lecitines de tipus B denominades DC-SIGN i L-SIGN que de manera més important contribueixen a la patogènia de la infecció.⁶¹ Aquestes proteïnes uneixen diferents tipus de virus amb embolcall, entre ells el VIH-1. DC-SIGN actua com un concentrador de virus. La seva funció es adherir les partícules virals circulants en la superfície de les cèl·lules dendrítiques per a posteriorment endocitar-les i iniciar el procés de presentació antigènica en el context del sistema HLA classe II. És per aquest motiu, que les cèl·lules dendrítiques es troben plenes de partícules virals en la seva superfície externa. DC-SIGN no es un receptor pròpiament dit, ja que la unió al VIH-1 es produeix per mediació de grups carbohidrats i no per estructures conformacionals, motiu pel qual no tenen la especificitat dels receptors (Figura 10). Tanmateix, la unió del VIH-1 a aquestes proteïnes facilita i incrementa la infecció dels limfòcits del voltant. Aquest fenomen representa que les cèl·lules dendrítiques i els òrgans limfoides siguin el gran reservori on la infecció s'estableix i es transmet als limfòcits CD4+.

Figura 10. Cèl·lula dendrítica i DC-SIGN capturant VIH-1



1.3.4 Mecanismes de pèrdua limfocitària.

La conseqüència immunològica fonamental de la infecció pel VIH-1 és una disminució progressiva del número de limfòcits CD4+, amb la consegüent immunodepressió cel·lular. Els mecanismes pels quals es produeix aquesta limfocitopènia son diversos i es descriuen tot seguit.

a) Redistribució limfocitària.

L'acumulació de partícules viral en els òrgans limfoides origina un reclutament de limfòcits en aquest nivell. Així doncs, la disminució de limfòcits CD4+ no només es deu a la seva destrucció, sinó també a un segrest en els òrgans limfàtics.

b) Efecte citopàtic directe del virus.

Una part important de la destrucció dels limfòcits CD4+ es deguda a l'efecte citopàtic directe sobre la cèl·lula infectada que provoca la replicació viral. Però aquest efecte citopàtic, no explica tots els efectes de disregulació immune que es produeixen a la SIDA.

c) Destrucció immunomediada.

Els limfòcits CD4+ infectats expressen els pèptids virals en les molècules de HLA de la classe I de la seva superfície. Aquest fenomen condiona que siguin susceptibles a ser reconeguts i destruïts pels limfòcits T CD8+ citotòxics (CTL).

d) Inducció d'apoptosi per proteïnes viral de l'embolcall (gp120, Vpr, Tat).

L'apoptosi o mort cel·lular programada representa un mecanisme fisiològic mitjançant el qual la cèl·lula es "suïcida" de manera controlada. Aquests mecanismes són naturals i necessaris per

controlar el creixement cel·lular descontrolat, adoptant un paper crucial en tots els sistemes de desenvolupament.

Com es descriurà de manera més detallada més endavant, la mort cel·lular induïda per l'apoptosi es produeix per dos vies: la **via extrínseca**, activada per la unió en la membrana plasmàtica de citocines de la família del TNF a receptors cel·lulars com Fas o CD95 que activen una sèrie de reaccions bioquímiques de mort cel·lular, i la **via intrínseca**, que no requereix una senyal externa a la cèl·lula i és iniciada per una sèrie de sensors intracel·lulars que modulen l'activitat de proteïnes de la família Bcl-2, que alteren la permeabilitat mitocondrial. Encara que les dues vies son desencadenades per mecanismes diferents, aquestes comparteixen rutes bioquímiques comunes i condueixen a un mateix punt final, que és la fragmentació del l'ADN i posterior mort de la cèl·lula.

S'ha demostrat l'existència d'apoptosi induïda pel VIH-1 sobre limfòcits CD4+ no infectats,⁶² i representa un mecanisme indirecte complementari a l'efecte citopàtic directe de destrucció limfàtica. Tant el contacte de les partícules virals com de la proteïna gp120 amb els limfòcits CD4+ indueixen apoptosi sobre cèl·lules no infectades. Els mecanismes moleculars que intervenen en aquesta inducció a través de la interacció de l'embolcall de les partícules virals i els receptors cel·lulars són múltiples i impliquen tant a la via extrínseca com intrínseca. La unió de la gp120 a CD4+ activa la via CD95-CD95L i incrementa la susceptibilitat de l'apoptosi induïda per Fas.⁶³ D'altra banda aquesta interacció disminueix els nivells de Bcl-2 (factor antiapoptòtic)⁶⁴ i activa la caspasa-3.⁶⁵ La inducció de l'apoptosi també es produeix per la interacció de l'embolcall amb el coreceptor CXCR4 i durant el procés de fusió.⁶⁶

També s'ha descrit un efecte proapoptòtic de la proteïna viral reguladora Vpr. Aquesta proteïna desenvolupa un paper accessori en la replicació del VIH en el limfòcits, però imprescindible en els macròfags. La inducció de l'apoptosi per Vpr es produeix per la via intrínseca mitjançant la unió amb la proteïna translocadora d'adenina en la membrana interna del mitocondri.^{67,68} Aquesta proteïna es molt tòxica en forma soluble sobre el sistema nerviós.

Una altra proteïna viral, Tat, també presenta funcions proapoptòtiques, especialment sobre cèl·lules del sistema nerviós.^{60,70} En les cèl·lules del sistema nerviós l'apoptosi es independent de TNF i es produeix per la via intrínseca mitjançant la inducció de l'òxid nítric (NO) i alteracions en la regulació del calci intracel·lular. En els limfòcits T la desenvolupa mitjançant diverses vies que incrementen l'expressió de CD95L, la inducció de caspases i a través l'alteració dels microtúbuls dels citoesquelet del la cèl·lula, desencadenant l'apoptosi via mitocondrial.⁷¹⁻⁷³

Altres proteïnes del VIH-1 com Nef, Vpu i Env també s'ha vist que indueixen apoptosi per diferents mecanismes (Taula 3).⁷⁴⁻⁷⁸

Diversos paràmetres d'apoptosi són mesurats en l'estudi immunopatogènic d'aquesta tesi amb l'objectiu de relacionar-los amb paràmetres de toxicitat mitocondrial i progressió de la infecció pel VIH-1.

Taula 3. Inducció d'apoptosi per proteïnes virals.

<p><u>Gp120. Destrucció de CD4+</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Activa via CD95-CD95L i incrementa la susceptibilitat a la mort per FAS (Oyaizu N. Blood 1994)• Disminueix Bcl2 (Hashimoto F, Bood 1997) i activa caspasa 3 (Cicala C, PNAS 2003)• Interacció amb CXCR4 (Blanco J, Virology 2000) <p>Aquests efectes són inhibits per CD4 soluble i la deleció del domini transmembrana de CD4+.</p> <p><u>Vpr. Actua a través de la via intrínseca</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Interacciona amb l'Adenina nucleòtid translocasa (ANT) en el mitocondri (Jacotot E, J Exp Med 2000; Brenner C, JCI 2003) <p>Pot ser secretada i es molt neurotòxica.</p> <p><u>Tat. Actua a través de la via intrínseca i extrínseca.</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Molt tòxica en SNC (Kim TA, J Immunol 2003; Haughley NJ, J AIDS 2002), especialment en la seva forma soluble• Proapoptòtica per incrementar CD95L (Yang Y, J Biol Chem 2002), activació de caspasa 3 (Bartz SR, J Virol 1999) i alteracions de microtúbuls (Chen D, EMBO 2002). <p><u>Nef. Indueix lisis en CTL</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Indueix CD95L en la cèl·lula infectada i provoca apoptosi en CTL dels voltants. (Xu XN, J Exp Med 1997)• Interacciona amb p53 (Greenway AL, J virol 2002) <p><u>Vpu. Actua a través de la via extrínseca</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Bloqueja els proteasomes i incrementa els nivells de IκB, disminueix Bcl-x (Akari H, J Exp Med 2001)• Incrementa la susceptibilitat al killing per Fas (Casella CR, J virol 1999) <p><u>Env. Conduïx l'activació via mitocondrial de l'apoptosi independent de caspases</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Desplaça equilibri entre Bax (proapoptòtica) i Bcl-2 (antiapoptòtica) cap a la primera (Torre D, Clin Infect Dis 2005)
--

e) Hiperactivació i esgotament immune (activació crònica i mort cel·lular).

L'intensa replicació viral indueix un excés de càrrega antigènica i una activació continuada del sistema immunològic que comporta un increment en el nombre de cicles de divisió dels limfòcits. Aquesta elevada cinètica dificulta la homeòstasi normal del compartiment de limfòcits activats que són destruïts per programes d'apoptosi després d'un determinat nombre de cicles, reduint la generació de limfòcits memòria. En aquest aspecte destaca el paper de la proteïna viral Nef.⁷⁹

f) Disminució de la producció de limfòcits a nivell central i perifèric.

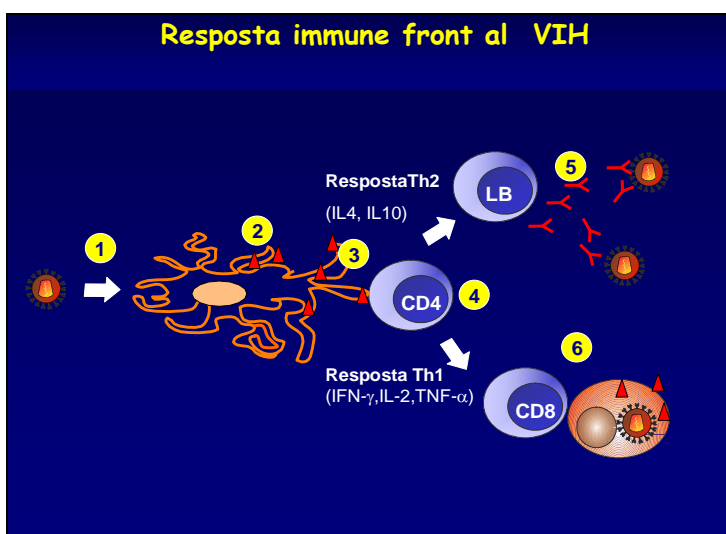
Durant la fase crònica de la infecció, existeix un bloqueig en l'entrada dels limfòcits CD4+ en cicles de divisió. S'ha observat un increment en la cinètica de divisió limfocitària, especialment de la subpoblació de CD4+, durant la reconstitució immune que es presenta després d'iniciar un TARGA respecte a subjectes infectats sense tractament. Només quan s'adquireix una càrrega viral indetectable el sistema es capaç d'entrar en el cicle de mitosi amb una major velocitat. Així doncs, el VIH produeix un bloqueig en la proliferació i diferenciació limfocitària, tant a nivell central com a perifèric.⁸⁰

Probablement tots aquests mecanismes descrits participen en la disminució dels limfòcits CD4+. En fases inicials de la infecció, quan encara no s'ha desenvolupat la resposta immune, la gran replicació viral provoca la destrucció directa dels limfòcits CD4+, juntament a l'apoptosi dels limfòcits preferentment del sistema GALT. Ja en fases més avançades, i amb la resposta immune cel·lular en marxa, a aquests mecanismes se li afegiria la destrucció immunomediada dels limfòcits infectats per les clones de CTL específiques i per mecanisme d'esgotament immunològic, que seria predominant en fases avançades. El segrestament en òrgans limfoides i el bloqueig tímic es produiria en fases de virèmia alta, ja que el control de la replicació viral s'associa a una redistribució dels limfòcits memòria a sang perifèrica de manera immediata i amb un increment diferit en 4-12 setmanes del nombre de limfòcits *naïves* portadors de TRECs, que indica la generació recent per òrgans limfoides centrals.

1.3.5 Resposta immune front al VIH-1.

La resposta immune front al VIH-1 hauria de ser capaç de neutralitzar tant les partícules virals solubles com de destruir les cèl·lules que ja han estat infectades. La primera funció la duen a terme els anticossos, especialment aquell amb capacitat neutralitzant, la segona depèn de la immunitat cel·lular, particularment de la resposta dels CTL. A més d'aquests efectors específics, el sistema immune disposa d'una sèrie de mecanismes inespecífics (no mediat pel sistema de reconeixement HLA) com el complement, el lisozim, mediadors solubles (interferons, citocines, quimiocines) i l'activitat citotòxica natural (NK) que contribueixen al control de la infecció. Les etapes requerides per a desenvolupar la resposta immune específica estan representades en la Figura 11 i es detallen tot seguit: 1) Les cèl·lules especialitzades en la presentació antigènica (dendrítiques, cèl·lules de Langerhans) fagociten les partícules virals i processen les seves proteïnes. 2) Aquestes cèl·lules presenten els antígens en la seva superfície associats al complex HLA de la classe II. 3) El limfòcits CD4+ reconeixeran els antígens virals en la superfície de les cèl·lules dendrítiques i s'activaran. 4) Mitjançant la resposta Th1 i Th2 activaran als CTL i els limfòcits tipus B respectivament. 5) Finalment els limfòcits B produiran anticossos front les partícules virals solubles. 6) Els CTL destruiran les cèl·lules infectades pel VIH-1.

Figura 11. Resposta immune front al VIH-1.



Desafortunadament, aquesta resposta immune només serà capaç de controlar el virus però no eradicar-lo, ja que el virus desenvolupa una sèrie de mecanismes per a escapar de la resposta immune.

Resposta immunològica i escapament viral.

Com s'ha descrit abans, la infecció pel VIH-1 desenvolupa una gran resposta amb anticossos dirigits contra la proteïnes de l'embolcall viral, core, matriu i proteïnes reguladores. Tanmateix la producció d'anticossos neutralitzants és escassa i molt aviat s'observa un escapament viral als mateixos.

Atès que l'embolcall del virus presenta una gran flexibilitat i variabilitat estructural, la seva neutralització pels anticossos es molt difícil. L'embolcall en la seva forma nativa oculta els dominis d'interacció amb els coreceptors virals. Les zones de les proteïnes que es troben exposades corresponen als epítops que poden ser modificats sense que s'alterin les propietats de la interacció amb els receptors. Com s'ha exposat anteriorment, només després de la unió amb el receptor CD4 els dominis d'interacció amb els coreceptors són exposats. Així doncs, la falta d'efectivitat de la resposta immunològica està condicionada per l'alta variabilitat de les regions exposades i més immunògens de la gp160 mitjançant mutacions dels epítops reconeguts.⁸¹ Això no obstant, els epítops reconeguts pels receptors virals, que estan molt més conservats i serien capaços d'induir la producció d'anticossos neutralitzants d'ampli espectre, només s'exposen quan la proteïna es desplega per la unió al receptor CD4. Altres mecanismes d'escapament viral són la glicosilació dels residus aminoàcids dels epítops reconeguts pels anticossos neutralitzants i la formació d'una estructura denominada "escut glucano" que resulta de la glicosilació de múltiples residus que envolten aquest epítops i que els protegeix de la unió als anticossos neutralitzants.⁸¹

Resposta cel·lular i escapament viral.

La resposta cel·lular dels CTL i dels limfòcits CD4+ és essencial per controlar la replicació viral en les fases inicials de la infecció en que el sistema immune està relativament conservat.⁸² El VIH-1 és capaç d'evadir aquesta resposta per diversos de mecanismes. En la infecció pel VIH-1 es produeix una insuficient síntesis de perforines i granzimes per part dels CTL, molècules que són necessàries per la destrucció viral.⁸³ Un altre mecanisme seria el de mutació de l'epítot mitjançant la qual el virus sintetitza pèptids que no s'encasten adequadament a la molècula de HLA, no presentant-se correctament.⁸⁴ El VIH-1 també pot escapar degut a la inducció de l'apoptosi en els CTL a través de la proteïna viral Nef.

Factors solubles.

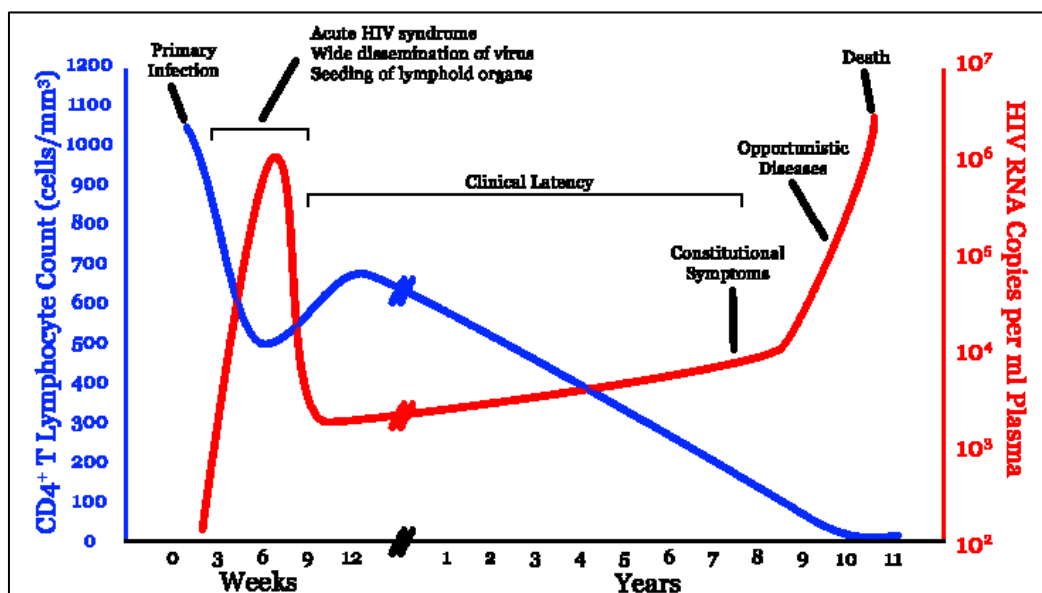
Quan els CTL s'activen, sintetitzen gran quantitat de substàncies, no sols perforines i granzimes, sinó interferons i quimiocines. Es previsible que la síntesis de quimiocines protegeixi de la infecció a les cèl·lules que es troben al voltant dels virus que s'està replicant en la proximitat. Com ja s'ha esmentat, es molt probable que aquest sigui un mecanisme antiviral molt important en el context de la resposta immune.

2. Història natural de la infecció pel VIH-1.

2.1 Fases de la infecció.

El curs natural de la infecció pel VIH-1 es desenvolupa típicament de manera crònica i pot variar d'un pacient a un altre. Després de l'entrada del virus en l'organisme, s'inicia una infecció en la qual es distingeixen una sèrie de fases o estadis evolutius ben definits amb una durada variable que depèn, com després es comentarà, d'una sèrie de factors tant virals com de l'hoste. Les distintes fases en que es divideix la història natural de la infecció són: fase aguda o primoinfecció, que va des del moment del contagi fins a que es produeix la seroconversió; fase crònica o asimptomàtica, que té durada variable, i en la que hi ha un equilibri entre la replicació viral i la resposta immunològica del pacient; i la fase final a partir del diagnòstic de SIDA, a la qual s'arriba com a conseqüència de la ruptura d'aquest equilibri, augmentant la càrrega viral i deteriorant-se la funció immunitària. Finalment, arriba la mort del pacient deguda als tumors o les infeccions oportunistes (Figura 12). Evidentment la utilització de TARGA des de l'any 1996 ha modificat la història natural de la malaltia de manera espectacular.

Figura 12 . Història natural de la infecció pel VIH-1.



Fase aguda.

Entre 2 i 4 setmanes després del contagi, al voltant d'un 50% de pacients presenten una primoinfecció clínica d'intensitat variable, caracteritzada per un quadre pseudomononucleòsic.⁸⁴ Amb tot, la infecció aguda pot ocasionar quadres diversos com meningitis o inclús infeccions oportunistes. L'única diferència identificada entre els pacients que presenten primoinfecció simptomàtica respecte aquells que no la presenten és la càrrega viral plasmàtica en el *steady-state* (càrrega viral estable assolida després de 6-12 mesos de la infecció, quan s'estableix l'equilibri entre la replicació viral i la resposta immune) que és menor en els pacients amb primoinfecció asimptomàtica.⁸⁶

Durant aquesta fase es produeix una intensa virèmia (entre 10^5 i 10^7 còpies d'ARN viral per ml de plasma)⁸⁷ i una depleció massiva dels limfòcits CD4+ memòria específics pel VIH-1.⁸⁸ Unes 20 setmanes després del contagi, amb una gran variabilitat interpersonal, es desencadena la resposta immunològica específica que redueix la càrrega viral fins arribar a una situació d'equilibri dinàmic entre la replicació viral i la resposta immune, amb càrregues virals plasmàtiques de 10^2 - 10^6 còpies/ml i recuperació del nombre de limfòcits CD4+. El diagnòstic de la infecció aguda pel VIH consisteix principalment en la detecció de l'ARN víric a plasma mitjançant la tècnica d'amplificació basada en la reacció en cadena de la polimerasa (*PCR*; o *polymerase chain reaction*).⁸⁹ La detecció de l'antigen viral p24 a través d'un enzimoinmunoassaig (*ELISA*; o *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), constitueix una prova diagnòstica alternativa a l'anterior. Tot i que resulta altament específica, és menys sensible que la primera, i sovint s'utilitza com a complementària. Els anticossos específics contra el VIH-1 no és detecten durant les primeres setmanes de la infecció, ja que fins el moment de la seroconversió del pacient infectat (que sol tenir lloc al cap de 4-12 setmanes després del contagi) no es produeix una resposta humoral productora d'anticossos.

Fase crònica.

Durant aquest fase es produeix un equilibri dinàmic entre la replicació viral i la resposta immunològica, que manté al pacient en estat de latència clínica malgrat la persistència de la replicació viral. L'activació persistent del sistema immune, permetrà mantenir controlada la replicació massiva durant força anys, encara que durant aquesta fase la replicació viral es molt elevada als òrgans limfoides.⁹⁰ Amb el temps, els mecanismes d'immunosupressió i destrucció dels limfòcits CD4+ pel VIH-1 juntament a l'aparició de variants més agressives del virus, trencaran aquest equilibri i el sistema immunitari patirà una incapacitat progressiva per a controlar la replicació que conduirà a l'aparició de les malalties oportunistes de la fase final de SIDA. La càrrega viral assolida quan s'arriba a l'equilibri dinàmic (*steady-state*), serà un dels principals factors pronòstics del temps de evolució a SIDA.⁹¹

La velocitat amb la que es produeix el deteriorament progressiu del sistema immune, no es igual en tots els pacients, i com es descriurà en el següent apartat (secció 2.2, pàgina 46), es diferencien tres grans grups de pacients depenen d'aquesta velocitat de progressió a SIDA.

Fase final o de SIDA.

Aquesta fase es caracteritza per una disminució de l'activitat dels CTL anti-VIH, destrucció de l'arquitectura limfàtica, gran increment de la taxa de replicació viral i un recompte de limfòcits CD4+ inferior a 200/ μ l. Tot plegat conduirà al pacient a un estat clínic simptomàtic amb l'aparició de infeccions oportunistes i tumors definatoris de SIDA.

Per sort, des que es disposa del TARGA, el curs natural de la infecció ha variat de manera espectacular, perllongant-se la fase asimptomàtica de la malaltia i assolint en la majoria dels casos una interrupció de l'evolució cap a SIDA.

2.2 Categories de pacients segons la velocitat de progressió.

Progressadors típics (PT).

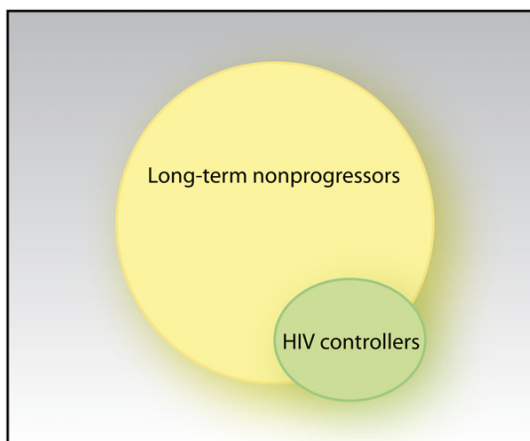
Representen a la majoria de persones infectades, al voltant del 80-90%. Aquests progressadors típics presenten una evolució caracteritzada per una progressiva davallada dels limfòcits CD4+ durant un període de 7 a 10 anys, fins a presentar finalment malalties definitòries de SIDA.⁹² Després de la primoinfecció presenten una disminució molt marcada de la càrrega viral amb una important resposta CTL que disminuirà progressivament al llarg del temps.

No progressadors o progressadors lents (LTNP, *long term non progressor*) i *controladors d'elit o naturals*.

Aquest grup representa al voltant del 1-5% dels pacients infectats.⁹³ Es tracta de pacients asimptomàtics durant més de 15-20 anys que sense haver rebut tractament antiretroviral presenten una xifra de limfòcits CD4+ de més de 500/ μ l.^{93,94} La càrrega viral d'aquest pacients és molt baixa (menys de 5.000 còpies/ml). Tanmateix, Goudsmit et al, han demostrat en la cohort d'Amsterdam que el 95 % dels pacients infectats pel VIH-1 considerats inicialment LTNP, han presentat una evolució a SIDA o signes de progressió de la infecció,⁹⁵ fet confirmat també per altres autors.⁹⁶ Per tant és més acurat parlar de progressadors lents més que de no progressadors a llarg termini.

Dintre d'aquest grup de pacients, en els últims anys s'ha diferenciat un subgrup denominat *controladors d'elit o naturals*, que són aquells pacients que al llarg de la infecció mai han presentat una càrrega viral per sobre dels límits de detecció utilitzats en la pràctica clínica (< 50 còpies ARN/ml). Diversos estudis han posat en evidència que els *controladors d'elit* presenten uns nivells d'ADN proviral en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) extremadament baixos i una menor replicació viral *in vivo*.⁹⁶ Aquests *controladors d'elit* representen menys de l'1% del total de pacients infectats, com s'il·lustra en la Figura 13.⁹⁷⁻⁹⁹

Figura 13. Distribució LTNP i controladors d'elit



Els LTNP i els *controladors d'elit* per les seves característiques tant interessants d'alentiment de la progressió, juntament amb el progressadors típics constitueixen la base de pacients dels estudis d'aquesta tesi.

Progressadors ràpids.

Es tracta de pacients que presenten un curs cap a SIDA molt accelerat, entre 1 a 5 anys després de la infecció i representen al voltant del 5-10% de total de persones infectades.¹⁰⁰ Aquests pacients presenten una ràpida disminució de la resposta CTL amb la consegüent davallada del nombre de limfòcits CD4+. La càrrega viral després de la primoinfecció no disminueix de manera important i es sol associar a fenotips virals més agressius (inductors de sincitis).

2.3. Factors que modulen la història natural.

La història natural de la infecció pel VIH-1 varia àmpliament entre els infectats. Els factors responsables d'aquesta diversitat estan per determinar, però es creu que hi ha una complexa interacció de factors virals, ambientals i de l'hoste, molts dels quals estan tot just començant a ser coneguts, que determina el curs de la infecció.

2.3.1 Factors virals.

A banda de la dosi de VIH-1 infectant,¹⁰¹ cal destacar el paper de les soques del VIH-1 amb capacitat de induir la formació de sincitis (SI). Aquestes soques tenen incrementada la capacitat destructora dels limfòcits T degut a una elevada capacitat citopàtica respecte a les soques nSI.¹⁰² Altres factors importants i que s'han relacionat amb un alentiment de la progressió de la infecció han estat: una atenuació en la capacitat de replicació del virus deguda a una deleció del gen *Nef*,¹⁰³ encara que aquesta atenuació no comporta necessàriament un estat de LTNP *in vivo*;¹⁰⁴ mutacions o delecions en els gens reguladors o accessoris (*rev*, *tat*, *vpr*, i *vpu*);^{105,106} l'alta variabilitat de les regions exposades i més immunògenes de la gp160 mitjançant mutacions dels epítops de l'embolcall que dificultarà el reconeixement per part dels CTL;¹⁰⁷ i l'aparició de mutacions puntuals degudes a la pressió efectuada pels antiretrovirals, que disminueixen la seva capacitat de replicació.

Recentment, Blankson i col·laboradors han aconseguit aïllar el VIH-1 en 4 de 10 *controladors d'elit*, demostrant que aquests virus exhibeixen una normal cinètica de replicació *in vitro* i no presenten insercions o delecions en els seus gens, fet que suggereix que els factors dels hosts tenen un pes molt més elevat que els virals en el control de la infecció.¹⁰⁸

2.3.2 Factors ambientals.

La coexistència d'altres infeccions víriques, també s'ha relacionat amb la variabilitat en la història natural. Estudis recents suggereixen que certs patògens poden atenuar la infecció pel VIH-1 i reduir la seva progressió. Aquests inclouen el virus de la hepatitis G (VHG o GBV-C) i el HTLV-2 (virus limfotrópic humà de cèl·lules T tipus 2 o; *human T-lymphotropic virus type 2*).

La coinfecció amb el VHG o GBV-C, un flavivirus no hepatotrópic relacionat amb el virus de la hepatitis C i relativament comú en els pacients infectats pel VIH-1, es relaciona amb un alentiment de la progressió de la infecció pel VIH-1.¹⁰⁹ El mecanisme pel qual beneficia a la infecció pel VIH-1

no es ben conegut, però s'ha vist que el GBV-C disminueix disponibilitat dels coreceptors CCR5 i CXCR4 mitjançant la inducció de la síntesis de les quimiocines específiques, lligands naturals dels coreceptors.¹¹⁰ També s'ha observat una disminució de la transcripció del VIH-1 des de l'ADN integrat en les persones coinfectades amb aquests virus.¹¹¹

El HTLV-2 es un altre virus que sembla atenuar la progressió de la infecció pel VIH-1.^{112,113} Aquest virus indueix la producció de diverses quimiocines com CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) i CCL5 (RANTES), lligands naturals del coreceptor CCR5, resultant una inhibició de la replicació del VIH-1. Recentment, s'ha demostrat que una sobrerregulació de la quimiocina CCL3L1 o MIP-1 α (lligand de CCR5) observada en persones coinfectades HTLV2-/VIH-1, produeix un potent efecte inhibidor de les soques amb tropisme R5.¹¹⁴

Per altra banda, la coinfecció amb el virus de la hepatitis C (VHC), clarament s'ha relacionat amb un increment en la progressió de la infecció.¹¹⁵ També, s'ha demostrat que el virus del herpes simple tipus 2 (VHS-2) no només és un factor independent de transmissibilitat del VIH-1, sinó que incrementa la seva replicació.¹¹⁶

2.3.2 Factors de l'hoste.

Entre els factors genètics de l'hoste cal mencionar els diferents patrons del HLA, i les variants genètiques dels coreceptors cel·lulars del virus. En referència al sistema HLA, els al·lels HLA de la classe I B27 i B57 s'han relacionat amb una progressió més lenta de la infecció; concretament HLA B*5701 i, en menor mesura, HLA B27 estan més presents entre els *controladors d'elit* que en els progressadors típics en les cohorts Nord-americanes i Europees.^{117,118} També s'ha demostrat una alta associació entre B27, B57 i LTNP.¹¹⁸ Associacions més robustes amb els LTNP, s'han observat amb els al·lels B14 i C8.¹¹⁹ Altres serotips HLA relacionats amb progressió lenta han estat els homocigots per Bw4.¹²⁰ Al contrari, el B35, Cw4 i potser els al·lels B8 s'han associat amb una progressió accelerada.¹²¹

Pel que fa referència al efecte de les variants genètiques dels coreceptors del VIH-1 i dels seus lligands naturals les quimiocines, objectiu de tres dels estudis d'aquesta tesi, ja s'ha tractat anteriorment (secció 1.3.2, pàgina 30)

En els últims anys, s'han descrit una sèrie de factors intracel·lulars de l'hoste que redueixen la replicació viral. Entre aquests factors cal destacar l'APOBEC3G, un enzim cel·lular que restringeix la replicació viral. Aquesta citidina deaminasa, en absència de la proteïna viral Vif (proteïna que accelera la degradació de APOBEC3G), es capaç d'induir una hipermutació de l'ADN produït durant la transcripció inversa, mitjançant la qual la replicació viral es atenuada.¹²²⁻¹²³ Un altre dels mediadors de la resistència antiviral cel·lular innata és TRIM5 α , que és capaç de bloquejar la replicació abans de l'inici de la transcripció inversa.⁶ No està clar si variacions genètiques en aquest factors de l'hoste poden modular la història natural de la infecció.

Tanmateix, sí que sembla que presenten un paper més important en la modulació de la història natural, les variacions genètiques dels receptors de les cèl·lules NK (*natural killer*), denominats KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), que regulen la funció d'aquestes cèl·lules. Les NK representen la primera línia defensiva contra les infeccions virals, previ al desenvolupament de la resposta immune adaptativa. Estudis recents, han demostrat que els individus que coexpressen KIR3DS1 (un receptor regulador de la superfície de les NK) junt a HLA-Bw4-80I presenten una menor càrrega viral en el *steady-state*, i un alentiment en la progressió de la infecció.¹²⁴ Altres associacions relacionades amb una progressió més lenta han estat HLA B57 i alts nivells de KIR3DL1 (inhibidor del receptor).¹²⁵

Menció especial ha de fer-se als mecanismes immunològics del sistema immune adaptatiu dels pacients LTNP i *controladors d'elit*. Aquests pacients presenten una activitat efectora immune molt superior a la observada en els pacients que progressen ràpidament.¹²⁶ L'activitat citotòxica dels CTL està incrementada a través de la producció de la proteïna citolítica perforina¹²⁷ i de múltiples citocines (interferó- γ , MIP-1 β , TNF- α , IL-2, i/o CD107a),^{128,129} la qual cosa es relaciona amb el control complet sobre el VIH-1 d'almenys alguns *controlador d'elit*. Així mateix, l'activitat

col·laboradora dels limfòcits CD4+ també esta augmentada. S'ha observat que tan els *controladors d'elit* com els LTNP presenten limfòcits CD4+ que expressen elevades quantitats de IL-2 específica i interferó- γ en resposta als pèptids del VIH-1.^{130,131} També s'ha observat títols més elevats d'anticossos neutralitzats en aquests pacients.

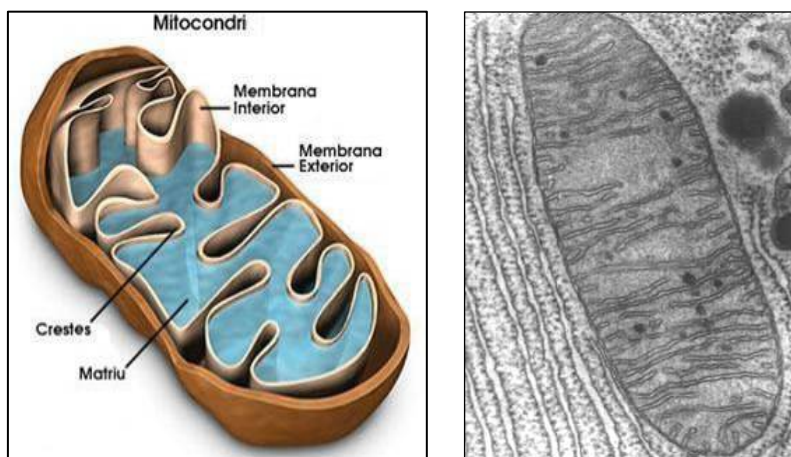
3. Dany mitocondrial pel VIH-1

3.1 Estructura i característiques principals del mitocondri.

Els mitocondris són orgànuls cel·lulars que es troben en la majoria de les cèl·lules eucariotes. Són considerats els motors cel·lulars, ja que són els principals productors d'energia química en forma d'adenosina trifosfat (ATP), que és indispensable per les activitats vitals bàsiques de les cèl·lules. L'ATP es genera a través de l'anomenada fosforilació oxidativa i representa el pas final del metabolisme energètic als organismes aeròbics.

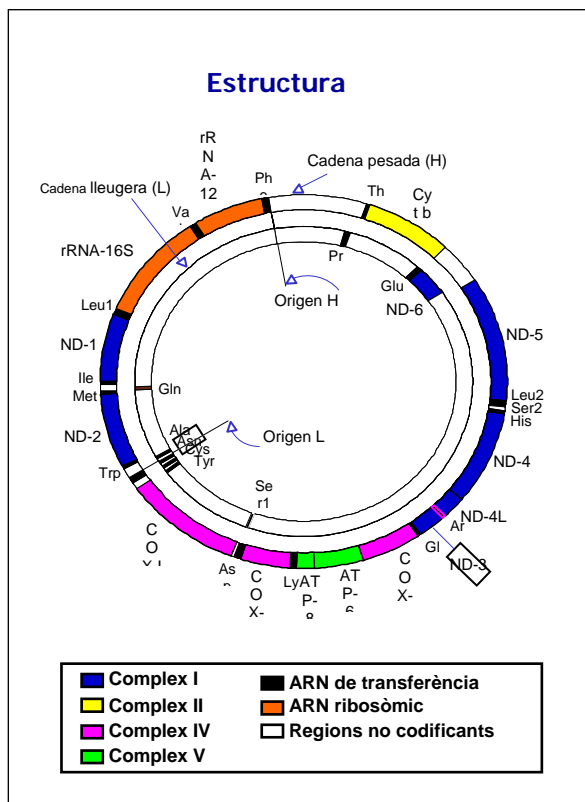
Els mitocondris es descriuen com orgànuls cilíndrics d'aproximadament 1 μm de diàmetre fins a 10 μm de llarg, mida similar a la de les cèl·lules bacterianes de les quals deriven, segons la teoria endosimbiòtica.¹³² En la seva estructura es distingeix una membrana externa i una interna que delimiten l'espai intermembrana i que en el seu conjunt engloben la matriu mitocondrial. La membrana interna presenta una sèrie d'invaginacions anomenades crestes mitocondrials que permeten incrementar la seva superfície (Figura 14). Cal destacar que l'ADN mitocondrial (ADNmt) i la cadena respiratòria mitocondrial (CRM), responsable de la fosforilació oxidativa, s'ubiquen a la matriu mitocondrial i a la membrana interna respectivament. El nombre, mida i localització dels mitocondris varia depenent dels teixits. Així doncs, els teixits metabòlicament més actius, i que per tant necessiten una major quantitat d'energia (múscul, fetge), les seves cèl·lules presenten un número més important de mitocondris.

Figura 14. Estructura mitocondrial i detall al microscopi electrònic



L'ADNmt humà presenta una estructura circular de doble cadena en disposició helicoidal. Té 16.569 parells de bases, s'hereta per via materna i representa al voltant del 0,5-1% del contingut d'ADN total de la cèl·lula. Es localitza a la matriu mitocondrial en un nombre variable. Conté un total de 37 gens que codifiquen per a 13 polipèptids que formen part de quatre complexos enzimàtics (C I, C III, C IV i C V) del sistema OXPHOS (fosforilació oxidativa), 22 ARN de transferència i 2 ARN ribosòmics (ARNr) que intervenen en la traducció mitocondrial. Aquest gens mitocondrials es repliquen, es transcriuen i es tradueixen a l'interior de la matriu mitocondrial, mitjançant enzims codificats per gens nuclears.¹³³ Un d'aquests enzims, l'ADN polimerasa γ , és responsable de la replicació de l'ADNmt, té unes capacitats reparatives molt limitades, que juntament amb el fet que es troba en un medi ric en radicals lliures d'oxigen i l'absència d'histones, deriva en un major nombre de mutacions en l'ADNmt respecte a les que es produeixen en l'ADN nuclear (ADNn). L'ADNmt es replica de forma no sincrònica amb la divisió cel·lular. L'estructura i les principals característiques del genoma mitocondrial es presenten en la Figura 15 i Taula 4.

Figura 15. Estructura genoma mitocondrial



Taula 4. Característiques del genoma mitocondrial

- ADN circular de doble cadena (H i L) (16.569 pb).
- Replicació exclusiva per l'ADNpol- γ .
- Herència exclusivament per via materna.
- Replicació no sincrònica amb la divisió cel·lular.
- Codi genètic diferent del universal.
- Taxa de mutació 10-20 vegades superior a la de l'ADNn, afavorida per molècules ROS, manca d'histones i mecanismes pobres de reparació d'errors.
- Repartició a l'atzar de l'ADNmt entre les cèl·lules filles durant la divisió cel·lular. Heteroplàsmia.
- Estructura altament compactada, sense introns i alguns gens solapats.
- Conté dos orígens de replicació (O_H i O_L).
- La majoria de gens estructurals no contenen codó de terminació, sinó una T o TA.
- Les 2 cadenes d'ADNmt es transcriuen en forma de 3 molècules policistròniques. Després de procesar-se s'originen els 13 ARNm, 2 ARNr i 22 ARNt madurs.

La depleció de l'ADNmt en les cèl·lules d'un determinat teixit tindrà més o menys transcendència en la funcionalitat mitocondrial d'acord amb la intensitat de la depleció. Així doncs, la mesura del contingut de l'ADNmt pot ser de utilitat per a determinar l'existència d'un trastorn mitocondrial, encara que el seu descens en relació amb el contingut d'ADNn no implica necessàriament un trastorn funcional.^{134,135} S'ha descrit la presència de depleció, delecions i mutacions de l'ADNmt en alguns teixits com a conseqüència de la inhibició de l'ADN polimerasa γ per part dels inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsids (ITIAN), les quals poden conduir, en determinats casos, a un deteriorament de la funció de la CRM.¹³⁶

En el nostre estudi immunopatogènic es determina l'ADNmt, com a un paràmetre indicador de toxicitat mitocondrial, mitjançant una PCR quantitativa a temps real que aporta avantatges respecte a altres mètodes: ràpida i senzilla, elevada reproductivitat, sensibilitat i mínima contaminació.

3.2 El sistema OXPHOS .

El sistema OXPHOS mitocondrial és el responsable de dur a terme la fosforilació oxidativa, que implica la síntesis d'ATP necessari per la vida cel·lular. Aquest sistema està constituït per la cadena de transport electrònic (CTE) o CRM i el complex enzimàtic ATP sintetasa que, en el seu conjunt, permeten l'oxidació de molècules orgàniques per obtenir ATP. La funció del sistema OXPHOS en qualsevol cèl·lula és la transferència d'elèctrons des de molècules orgàniques fins a l'oxigen i la traducció de l'energia resultant en ATP.

La CTE està constituïda per quatre complexos enzimàtics, denominats complex I (C I), C II, C III i C IV. El complex enzimàtic ATP sintetasa es denomina C V (Figura 16). Cada complex està format per diverses subunitats proteïques, parcialment codificades per l'ADN mitocondrial, excepte el C II que està totalment codificat pel genoma nuclear (Figura 17). Altres molècules que formen part del sistema OXPHOS són el coenzim Q (CoQ) i el citocrom c (Cit c), que es mouen lliurement per la membrana interna mitocondrial que conté CTE.

Figura 16. Estructura i funcionament del sistema OXPHOS

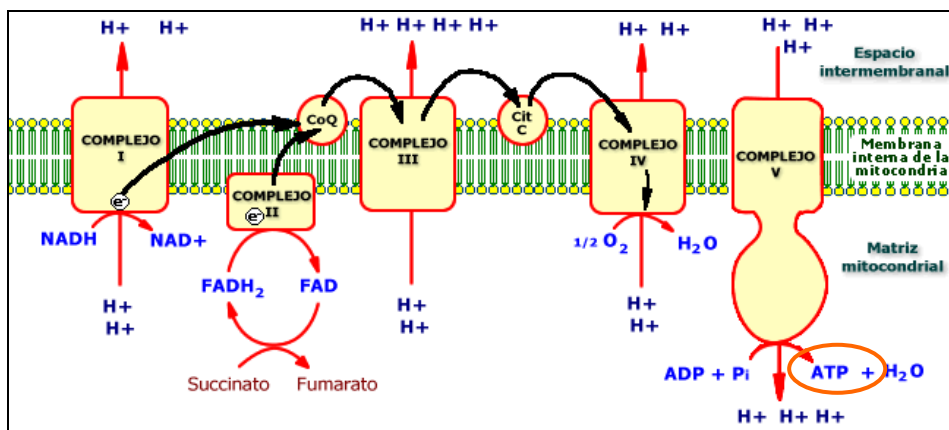
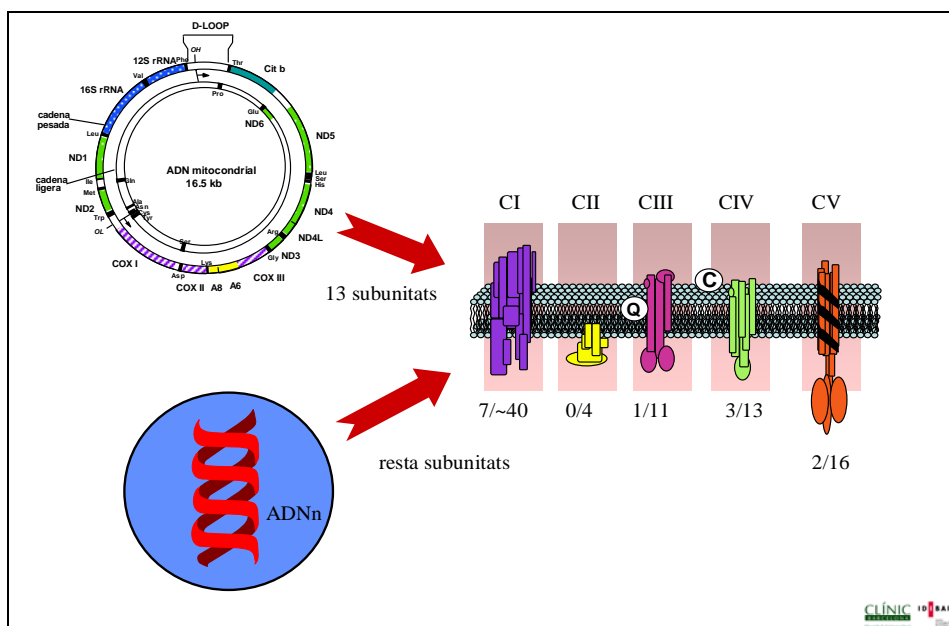


Figura 17 . Codificació de les subunitats proteïques dels complexos del sistema OXPHOS



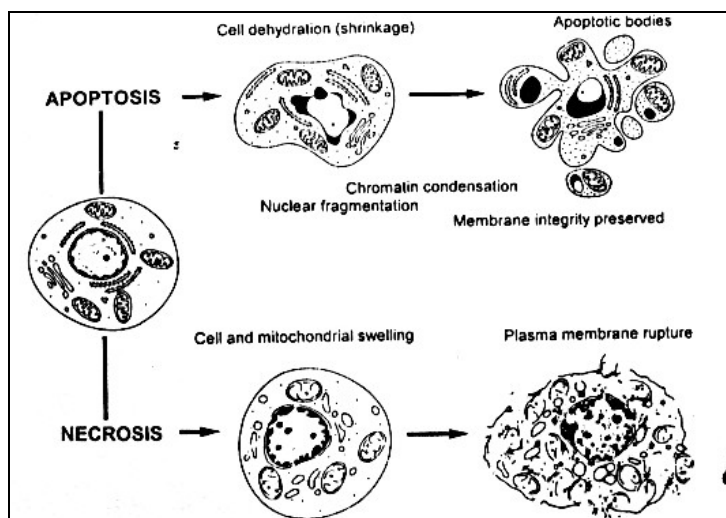
La determinació de l'activitat mitocondrial de cadascun dels complexos enzimàtics de la CTE es realitza mitjançant espectrofotometria.

3.3 Mitochondri i apoptosi.

El mitocondri té les funcions de produir energia química i regular els processos d'apoptosi cel·lular. La mort cel·lular programada o apoptosi es una de les àrees actualment més investigada de la biologia molecular. Consisteix en un programa fisiològic i actiu de suïcidi cel·lular, essencial per a mantenir un equilibri homeostàtic en els teixits proliferatius en els organismes pluricel·lulars. La homeòstasi del nombre de cèl·lules en els diferents teixits es manté tant pel creixement cel·lular com per l'apoptosi. Les alteracions en el control normal de l'apoptosi, ja sigui per excés o defecte, s'associen a una ampla varietat processos patològics, com es el cas de les proliferacions malignes, els processos neurodegeneratius o la infecció pel VIH-1. Cal mencionar que, accidentalment, la cèl·lula també pot morir per un procés diferent de destrucció conegut com necrosi, conseqüència d'agressions físiques, químiques o biològiques.

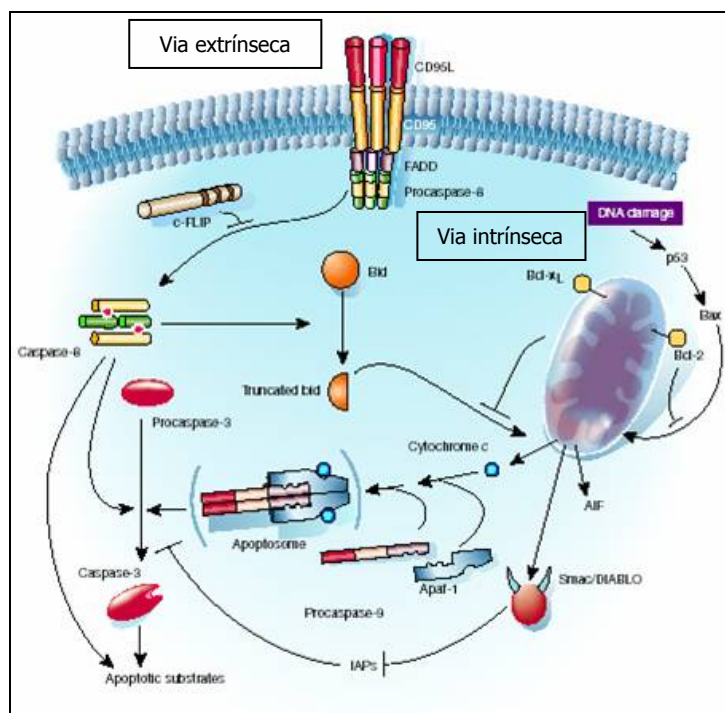
L'apoptosi representa un col·lapse cel·lular codificat genèticament i caracteritzat per un encongiment cel·lular, condensació nuclear i citoplasmàtica, fragmentació de proteïnes, agregació de la cromatina i degradació de l'ADN, que culmina en una fase final en que la cèl·lula es trenca formant unes vesícules envoltades de membrana plasmàtica anomenades "cossos apoptòtics", que seran reconeguts i eliminats pels macròfags sense desenvolupar cap tipus de reacció inflamatòria (Figura 18).

Figura 18. Mecanismes de mort cel·lular



Una varietat d'esdeveniments assenyalen al mitocondri com el centre clau de l'apoptosi.¹³⁷ Els mitocondris estan implicats en les dues vies principals d'apoptosi: la via extrínseca i la via intrínseca, en les que les caspases (cisteïnes-proteases cel·lulars), representen el centre efector de l'apoptosi (figura 19).

Figura 19. Vies de l'apoptosi cel·lular.

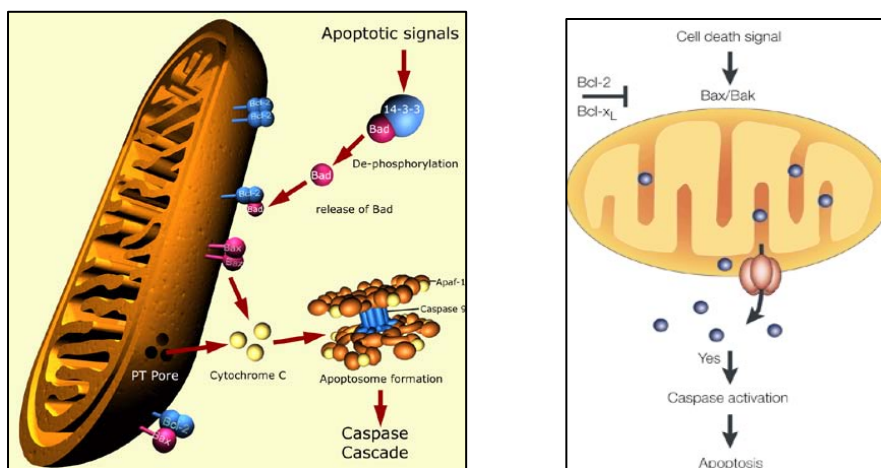


La via extrínseca està mediada per una sèrie de receptors cel·lulars ("receptors de mort") de la família del receptor TNF- α (TNFR1), Fas (CD95) i els receptors del lligand inductor d'apoptosi relacionat amb el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL). La unió del lligand inductor d'apoptosi amb el seu receptor posa en marxa l'activació al citosol cel·lular de la caspasa-8, que activa per proteòlisi la proteïna proapoptòtica Bid, de la família de proteïnes Bcl-2. Aquesta proteïna activa Bid truncada (Bidt), es trasllada al mitocondri on interacciona amb altres membres de la família Bcl-2. Tot seguit, el procés apoptòtic es duu a terme dintre del mitocondri, punt on conflueix amb la via intrínseca de l'apoptosi. Cal tenir en compte, que en moltes condicions, aquest solapament es mínim i les dues vies operen de manera independent.¹³⁸ La caspasa-8 activada pot directament activar altres membres de la família de les caspases (caspasa-3 efectora) i induir l'apoptosi sense intervenció del mitocondri.

A través de la via intrínseca o mitocondrial, s'inicia l'apoptosi davant d'una situació d'estrès cel·lular (d'any del ADN, disminució d'ATP...) que compromet el funcionament normal de la cèl·lula.

Els senyals intracel·lulars o extracel·lulars que indueixen l'apoptòsi alteren l'equilibri de diferents proteïnes de la família Bcl-2 amb efectes proapoptòtics (Bax, Bak) i antiapoptòtics (Bcl-2, Bcl-X L). La funció clau dels membres de la família de Bcl-2 es la alliberació de factors proapoptòtics, en particular el citocrom c, des de l'espai intermembrana del mitocondri al citosol cel·lular. La ràtio Bax/Bcl-2 regula la permeabilitat de la membrana mitocondrial externa. Quan l'equilibri entre les dues proteïnes es desplaça cap a Bax, s'afavoreix el procés apoptòtic. Aleshores, es forma un porus de transició (PTP; *permeability transition pore*) que fa la membrana mitocondrial externa més permeable (Figura 20). En conseqüència, es perd el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mt}$), i es produeix l'alliberament al citosol cel·lular de diferents proteïnes apoptogèniques mitocondrials com citocrom c, SMAC-Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspases*) i el factor d'inducció d'apoptosi (AIF; *apoptosis inducing factor*). El citocrom c interacciona i s'uneix amb la proteïna citosòlica APAF-1, que a la vegada interacciona amb la procaspasa-9 per formar el complex multiproteic apoptosoma. La formació de l'apoptosoma indueix l'activació per proteòlisi de la caspasa-9, que successivament activa la caspasa-3 efectora. Aquesta caspasa-3 efectora indueix l'activació irreversible d'una cascada de reaccions catalitzades per les caspases per finalment activar la proteïna ADNasa activada per caspasa (CAD; *caspase activated DNAase*), encarregada de la degradació de l'ADNn, conduint a la mort cel·lular.

Figura 20. Porus de transició (PTP; *permeability transition pore*)



En el nostre estudi immunopatogènic es va decidir determinar en les CMSP la caspasa-3 com efector final irreversible de l'entrada en apoptosi, així com la caspasa-9 i la ràtio caspasa-9/Bcl-2 com marcador d'activitat apoptòtica mitocondrial.

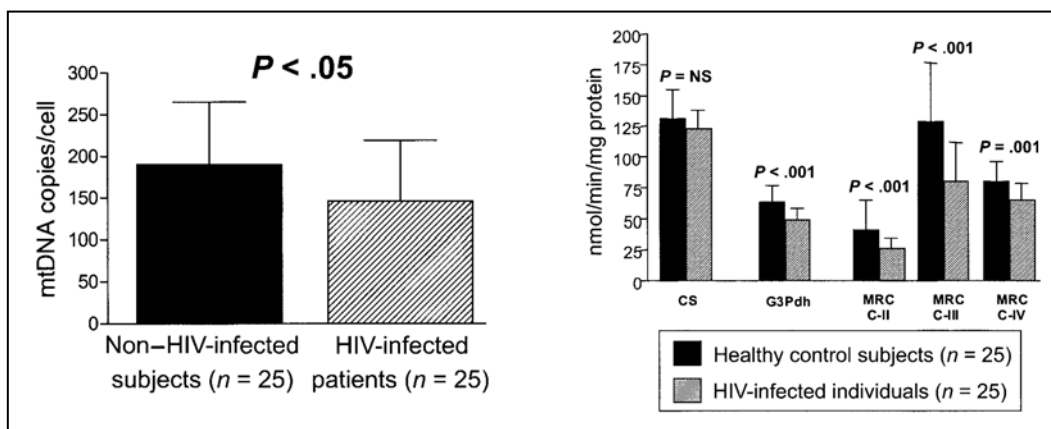
3.4 El VIH-1 com agent lesiu mitocondrial.

Es àmpliament conegut que el tractament antiretroviral amb ITIAN pot causar efectes adversos deguts a toxicitat mitocondrial, mitjançant la inhibició de l'ADN polimerasa γ , enzim encarregat de replicar i reparar l'ADNmt. Tanmateix, en els darrers anys, diversos estudis han demostrat que la pròpia infecció pel VIH-1 pot induir efectes tòxics sobre el mitocondri. L'any 2002, Côté i col·laboradors demostraren que el contingut d'ADNmt en les CMSP de pacients asimptomàtics infectats pel VIH-1 i que mai havien rebut tractament antiretroviral es trobava significativament reduït respecte al contingut d'ADNmt persones sanes no infectades pel VIH-1.¹³⁹ Aquestes troballes han estat confirmades per altres autors.¹³⁹⁻¹⁴² No obstant això, aquest resultat es tracta de dades indirectes obtingudes en estudis en els que el principal objectiu no estava dirigit a investigar els efectes del VIH-1 en el mitocondri. Per això, aquest estudis no clarifiquen si la depleció d'ADNmt es una troballa aïllada o està associada a un dany enzimàtic mitocondrial més extens que condicioni un increment del dany oxidatiu.

Recentment, Miro i col·laboradors., demostraren no sols una reducció de la quantitat de ADNmt en CMSP de pacients asimptomàtics infectats pel VIH-1 respecte a persones sanes, sinó també una reducció de les activitats enzimàtiques mitocondrials. Concretament van trobar una reducció de l'activitat dels complexos C II, C III i C IV de la CRM del 41%, 38% i un 19% respectivament, així com de l'activitat de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (enzim que no forma part de la CRM) del 22%. També es va evidenciar un increment de la peroxidació lipídica de les membranes dels pacients infectats pel VIH-1 respecte als no infectats. Tot plegat demostra que la infecció pel VIH-1 està associada no només a una depleció de l'ADNmt, sinó també a un dany extens de la CRM i d'altres sistemes enzimàtics mitocondrials, així com a un major dany oxidatiu.¹⁴³ L'existència d'alteracions tant en els enzims codificats pel ADNmt com d'altres no codificats per ell, indiquen

que la depleció de l'ADNmt s'ha d'interpretar en el context d'un dany cel·lular generalitzat produït pel VIH-1 (Figura 21).

Figura 21. Quantificació de ADNmt i activitat enzimàtica.



Actualment es creu que les alteracions mitocondrials associades a la infecció pel VIH-1 poden estar relacionades amb l'activació de l'apoptosi cel·lular induïda per les partícules víriques, o pels antígens del propi VIH-1, desenvolupant no només un paper important en la depleció dels limfòcits CD4+,⁶³⁻⁷⁸ sinó també en la depleció d'ADNmt i en les alteracions funcionals del mitocondri. Les proteïnes del VIH-1 inductores d'apoptosi i el mecanisme pel qual la induïxen, s'han descrit anteriorment.

Amb la finalitat d'avaluar si el increment de l'apoptosi de les CMSP induïda per la infecció VIH-1 pot associar-se a una disfunció mitocondrial difusa en diferents tipus de pacients infectats, particularment progressadors lents i progressadors típics, i valorar els seu possible paper en la modulació de la història natural de la infecció, ha motivat la realització de l'estudi immunopatogènic d'aquesta tesi.

De manera ideal els estudis de la funció mitocondrial es realitzen en teixits musculars o en aquells implicats en les patologies associades a defectes mitocondrials. No obstant això, sovint se utilitzen CMSP, molt més fàcils d'obtenir i que permet fer estudis longitudinals amb molt poques molèsties per als pacients. A més a més, dades obtingudes de CMSP demostren resultats congruents quan

es comparen amb les documentades als teixits diana,¹⁴⁴ i per tant les CMSP es consideren un bon model per a estudi del d'any mitocondrial induït pel VIH-1 a diferents òrgans..

4. Hipòtesis i objectius.

Diferenciem els estudis d'aquesta tesi en estudis immunogenètics (estudi 1, 2 i 3) i immunopatogènics (estudi 4).

Estudi 1: "La falta d'associació de la variant al·lèlica SDF-1 3'A amb infecció pel VIH-1 no progressiva s'estén més enllà de 16 anys".

Estudi 2: "Els polimorfismes en el promotor del gen de la quimiocina RANTES no s'associen a infecció pel VIH-1 no progressiva de més de 16 anys d'evolució".

Estudi 3: "Absència de polimorfismes de la regió C-terminal de CXCR4 en espanyols infectats pel VIH-1 i en no infectats".

Estudi 4: "Els pacients infectats pel VIH-1 no progressadors (LTNP) tenen un dany mitocondrial més lleu i una menor apoptosi aconduïda pel mitocondri en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica que els progressadors típics"

4.1 Hipòtesis.

Estudis immunogenètics.

Si es considera que:

1. El VIH-1 utilitza com a receptor necessari per a penetrar en les cèl·lules diana el receptor major de quimiocines CCR5 i CXCR4. In vitro s'ha observat que poden utilitzar també altres receptor com CX3CR1 i CCR2. Els principals lligand naturals de CCR5 i CXCR4 són les quimiocines RANTES i SDF-1 respectivament.

2. Està demostrat que les quimiocines poden bloquejar el coreceptor i disminuir la seva disponibilitat per a ser utilitzat pel VIH-1 per a penetrar en la cèl·lula.

3. Es coneix que certes variants al·lèliques en els gens que codifiquen aquestes quimiocines i els seus receptors cel·lulars poden modular el risc de la infecció i la seva progressió. Aquest fet està molt probablement relacionat amb les modificacions en la entrada del VIH-1 en la cèl·lula diana en individus portadors de mutacions.

4. Existeixen alguns estudis contradictoris sobre la influència d'aquestes variants genètiques de les quimiocines i els seus receptors sobre el risc d'infecció pel VIH-1 i la seva història natural.

5. No hi ha cap estudi en la població caucàsica espanyola i particularment en pacients infectats pel VIH-1 progressadors lents que avaluï la influència sobre aquest estat clínic de les variants al·lèliques en els gens que codifiquen les quimiocines i els seus receptors.

Pensem:

1. Les variacions genètiques descrites en les quimiocines i en els seus receptors poden modificar la disponibilitat del coreceptor per a ser utilitzat pel VIH-1 i modular la història natural de la infecció, particularment la dels progressadors lents.

2. Es precisa d'un estudi amb un nombre important de pacients, particularment de progressadors lents, per a poder donar una resposta.

Estudis immunopatogènics.

D'altra banda, si es considera que:

1. La infecció pel VIH-1 pot induir dany mitocondrial.
2. S'ha demostrat que la disminució de l'ADNmt està relacionat amb una disfunció mitocondrial.
3. No es coneix si la disfunció mitocondrial té alguna conseqüència sobre la integritat cel·lular, ni si aquesta influeix en la història natural de la malaltia.
4. Se sap que en el pacients VIH-1 progressadors típics la mort cel·lular per l'apoptosi és responsable, almenys en part, de la progressiva disminució del número de limfòcits CD4+ i que en els progressadors lents és acceptat que la resistència a l'apoptosi induïda pel VIH és un del mecanismes per mantenir alts el recompte de limfòcits CD4.

Pensem:

1. El increment de l'apoptosi de les CMSP induïda per la infecció VIH-1 pot associar-se a una disfunció mitocondrial difusa.
2. Es precisa d'un estudi amb un número important de pacients, particularment de progressadors lents i progressadors típics per a poder realitzar aquest estudi i intentar valorar la seva possible realció amb la història natural de la infecció.

4.2 Objectius

OBJECTIU PRINCIPAL:

Estudis Immunogenètics.

Determinar si ser portador de les variants al·lèliques de les quimiocines RANTES (-28G, -109C, -403 A), SDF-1 (801A) i dels coreceptors CCR5 (Δ 32) i CXCR4 (si son presents) modulen el risc de infecció pel VIH-1 i/o alteren la història natural de la infecció pel VIH-1, particularment en els progressadors lents, en una cohort de pacients blancs espanyols.

Estudi Immunopatogènic.

Determinar si existeix una relació entre diversos marcadors d'apoptosi i de dany mitocondrial induïts pel VIH-1 en les CMSP de pacients infectats pel VIH-1, avaluant-ne el seu possible lligam amb la història natural de la infecció.

OBJECTIUS SECUNDARIS:

Estudis immunogenètics:

1. Determinar la freqüència al·lèlica i les distribucions genotípiques a la nostra població dels polimorfismes genètics estudiats.
2. Avaluar la existència de determinats haplotips o genotips que es transmetin en desequilibri de lligament i la seva influència en la història natural de la infecció.

3. Avaluar si la càrrega viral plasmàtica pot estar condicionada per la expressió d'alguna de les variants genètiques estudiades.

Estudi immunopatogènic.

Avaluar si la càrrega viral plasmàtica del VIH-1 pot estar relacionada amb el dany mitocondrial i l'apoptosi en les CMSP.

5. Metodologia

5.1 Disseny dels estudis.

Estudis d'immunogenètica: Es tracta d'estudis transversals multicèntrics d'associació genètica de casos i controls.

Estudi d'immunopatogènia: Estudi transversal multicèntric amb la participació de tres grups: controls sans, infectats pel VIH-1 progressadors típics sense TARGA i infectats pel VIH-1 progressadors lents.

5.2 Pacients estudiats.

Tots els pacients i els controls són caucàsians i espanyols, majors de 18 anys i han signat consentiment informat escrit. S'exclouen immigrants d'altres països, incloent aquells d'altres països europeus i els seus descendents.

5.2.1 Pacients.

Els pacients provenen de 7 centres participants en aquest projecte (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Hospital General de Granollers, Hospital del Mar de Barcelona, Hospital Clínic Universitari de Barcelona, Hospital Mútua de Terrassa i Hospital Universitari Sant Joan de Reus).

S'estudien dos grups de pacients infectats pel VIH-1 :

- Progressadors lents o no progressadors (LTNP): Pacients asimptomàtics infectats pel VIH-1 des de fa més de 16 anys que, en absència de tractament antiretroviral, mantenen una xifra de limfòcits CD4+ persistentment per sobre de 500 cel/ μ l i una càrrega viral

plasmàtica del VIH-1 repetidament de menys de 5.000 còpies/ml. Dins d'aquest grup s'avaluen també els *controladors d'elit o naturals*, que són aquells pacients que al llarg de la infecció mai han presentat una càrrega viral per sobre dels límits de detecció utilitzats en la pràctica clínica (< 50 còpies ARN/ml).

- Progressadors típics (PT):

Estudis immunogenètics: Pacients amb infecció pel VIH-1 que han progressat a malaltia avançada, normalment amb l'aparició d'una condició definitiva de categoria C d'acord amb els criteris de la classificació de 1993 dels Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), amb càrrega viral plasmàtica per sobre de 35.000 còpies/ml i una progressiva disminució dels limfòcits CD4+ amb xifres de menys de 350 cel/μl el almenys una ocasió durant els primers 10 anys des de la infecció. En aquells pacients en que la data de la infecció es desconeguda s'assumeix com a data d'infecció aquella intermèdia entre l'última data amb serologia negativa i la primera positiva.

Estudi d'immunopatogènia: Amb la finalitat d'eliminar la interferència de la possible toxicitat mitocondrial per part del TARGA, s'han reclutat només pacients PT sense TARGA. Pacients amb infecció pel VIH-1 que han progressat amb una càrrega viral plasmàtica per sobre de 35.000 còpies/ml i una progressiva disminució des limfòcits CD4+ amb xifres de menys de 350 cel/μl en almenys dues ocasions durant els primers 8 anys, i que no han rebut prèviament ni reben actualment TARGA, totalment asimptomàtics i que no han patit cap infecció oportunista fins el reclutament. En aquells pacients en que la data de la infecció es desconeguda s'assumeix com a data d'infecció aquella intermèdia entre l'última data amb serologia negativa i la primera positiva. Cap d'aquests pacients inclosos no presenten antecedents personals o familiars de malaltia mitocondrial ni condicions conegudes de dany mitocondrial, tal com fàrmacs, abús d'alcohol o dany hepàtic.

5.2.2 Controls.

Els controls provenen d'un únic centre (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII). Es tracta de controls sans, constituïts per donadors voluntaris de sang i personal sanitari. En l'estudi d'immunopatogènia cap dels individus inclosos no presenten antecedents personals o familiars de malaltia mitocondrial ni condicions conegudes de dany mitocondrial, tal com fàrmacs, abús d'alcohol o dany hepàtic.

5.3 Variables dels estudis:

Estudis immunogenètics:

- a. Dades clíniques. S'ha realitzat una història clínica completa a cada pacient, amb anotació de la data d'infecció i les malalties oportunistes.
- b. Càrrega viral plasmàtica del VIH-1.
- c. Recompte de limfòcits CD4+.
- d. SNP de RANTES: -28(C>G), -109(T>C), -403(G>A).
- e. SNP de SDF-1: 801(G>A).
- f. SNP de CXCR4.
- g. SNP CCR5Δ32.

Estudi immunopatogènic.

- a. Dades clíniques. S'ha realitzat una història clínica completa a cada pacient, amb anotació de la data d'infecció i les malalties oportunistes.
- b. Càrrega viral del VIH-1.
- c. Recompte de limfòcits CD4+.

- d. Quantificació d'ADNmt en les CMSP.
- e. Activitat d'enzims mitocondrials (C II, C III i C IV de la CRM).
- f. Paràmetres d'apoptosi en les CMSP (caspasa-3, caspasa-9, índex caspasa-9/Bcl-2).

5.4 Recollida de mostres.

Obtenció de sang i plasma.

Estudis immunogenètics:

Després d'un dejú de 12 hores com a mínim, s'extreuen de la vena antecubital 2 tubs de 5 ml de sang amb EDTA (1mg/ml) com a anticoagulant. Immediatament després de l'extracció, un tub de 5 ml es destina a determinació de limfòcits CD4+ i l'altre tub es centrifuga a 3500 rpm durant 15 minuts i a 4°C. Es separa el plasma en al.liqüotes i es guarden congelades a -80°C fins el seu processament per les determinacions de càrrega viral. La resta de mostra s'utilitza per l'extracció d'ADN.

Estudi immunopatogènic:

Després d'un dejú de 12 hores com a mínim, s'extrauen de la vena antecubital 20 ml de sang amb EDTA com a anticoagulant que es destinen per la obtenció de CMSP.

Obtenció d'ADN (estudis immunogenètics).

S'obté a partir de 500 µl de sang total. S'extrau de manera automàtica mitjançant l'extractor *MagNa Pure LC Instrument (Roche diagnostics, Basel, Switzerland)*. L'ADN es quantifica per

espectrofotometria . Les mostres d'ADN s'emmagatzemen a -80°C fins el seu processament per la determinació dels polimorfismes dels gens RANTES , SDF-1 β , CXCR4 i CCR5.

Obtenció cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (estudi immunopatogènic).

S'aïllen per mig d'una centrifugació en un gradient densitat Ficoll (*Histopaque®-1077, Sigma diagnostics, St. Louis, MO*). Després de l'aïllament, les cèl·lules són resuspeses en una solució de tampó fosfat salí i s'emmagatzemen a -80°C fins el seu processament per les determinacions bioquímiques i genètiques.

5.5 Metodologia de laboratori.

Tota la metodologia de laboratori es descriu de manera detallada en cadascun dels estudis que constitueixen aquesta tesi.

Estudis immunogenètics:

- a) Càrrega viral: La càrrega viral a plasma es determina mitjançant els test de quantificació *Cobas Amplicor HIV-1 Monitor test Ultra Sensitive (Roche Diagnostics)* i utilitzant el sistema *COBAS AMPLICOR versió 1.5 (Roche Diagnostics)* per al seu anàlisi. El protocol seguit és el recomanat pel fabricant.

- b) Determinació de limfòcits CD4+: Les cèl·lules s'analitzen mitjançant un panell d'anticossos monoclonals amb tres marcadors per tub i conjugats amb fluoresceïn-isotiocianat (FITC), ficoeritrina (PE) i per CP (TriTest CD4/CD8/CD3 en tubs trucount). Les mostres s'analitzen en un citòmetre de flux *FAC Scan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA)*. Per l'adquisició i anàlisi de dades s'utilitza el programa Multiset.

c) Anàlisi dels SNP en les posicions -28, -109 i -403 al promotor del gen de la quimiocina

RANTES: Es tracta de tres SNP puntuals al promotor del gen. Les posicions indiquen el nucleòtid on es localitza la mutació a partir del inici de la transcripció. Els SNP són: posició -28: transversió C>G, posició -109: transició T>C i posició -403: transició G>A. Els tres SPN s'analitzen per seqüenciació automàtica. Degut a la seva proximitat els SNP de les posicions -28 i -109 s'analitzen conjuntament mitjançant la seqüenciació d'un únic fragment. El SNP -403 s'analitza independentment. Totes les amplificacions es realitzen en un termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700 (PE Applied Biosystems)* i les seqüenciacions en un seqüenciador *ABI PRIMS 310* utilitzant el programa *DNA sequencing analysis v3.3 (PE Applied Biosystems)* on a cada base nucleotídica se li assigna un color. Els individus heterozigots es detecten per la presència de dos pics, mentre que els homozigots presenten un sol pic.

- Anàlisi dels SNP -28C>G i -109T>C. Mitjançant la PCR s'amplifica un fragment de 196 parells de bases (pb) utilitzant *primers* específics següents: *primer* amb sentit: 5' TGA GAG AGC AGT GAG G 3' i *primer* antisentit: 5'GTC CAC GTG CTG TCT T 3'. En un gel d'agarosa al 2%, tenyit amb el colorant bromur d'etidi i amb el marcador de tamany molecular conegut *Marker VIII (Roche MolecularBiochemicals)* es comprovar la correcta amplificació del fragment desitjat. Els productes de PCR es purifiquen amb el *Kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)*. Un cop purificats, es realitza una PCR de seqüenciació amb el *primer* amb sentit i utilitzant el Kit de seqüenciació *BigDye Terminator sequencing kit, v3.0, Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems)*, seguint les instruccions del fabricant. Si es necessari, els productes de seqüenciació es purifiquen amb el *Kit DyeEx Spin kit (Qiagen)*. Després d'una desnaturalització a 95°C durant 3 minuts, les mostres s'analitzen al seqüenciador.

- Anàlisi del SNP -403G>A: S'analitza seguint la mateixa metodologia descrita per les mutacions anteriors. Per la PCR s'utilitzen els *primers*: *primer* amb sentit: 5' AGT GTG CTC ACC TCC TTT 3' i *primer* antisentit: 5' GAT CAG AAG TCA CTG AGT 3' que generen un fragment de 174 pb. Per la PCR de seqüenciació s'utilitza el *primer* amb sentit. El número d'accés del Genbank per als 3 polimorfismes del RANTES és S64885.

- d) Anàlisi del SNP a la posició 801 de la regió 3' no traduïda (3'UTR) del gen del factor 1 β derivat de la cèl·lula estromal (SDF-1 β): Es tracta d'una transició G>A en la posició 801 de la regió 3' no traduïda del gen. S'analitza mitjançant la tècnica de fragments de restricció de longitud polimòrfica (RFLP), seguint la metodologia següent: Es realitza una PCR amb els *primer* amb sentit 5' CAGTCAACCTGGGGCAAAGCC 3' i l'antisentit 5' AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC 3' (número d'accés Genbank L36033). L'amplificació del fragment desitjat es comprova en un gel d'agarosa (*Gibco BRL*) al 2,5% tenyit amb bromur d'etidi i amb el marcador de tamany molecular conegut *Marker VIII (Roche)*. Els productes d'amplificació es digereixen a 37°C i durant 4 hores amb l'enzim de restricció *Msp I* que reconeix la seqüència de l'al·lel salvatge (G). Els fragments de digestió es visualitzen en un gel d'agarosa d'alta resolució (*Gibco BRL*) amb el marcador de mida conegut *Marker VIII (Roche)*.
- e) Determinació del SNP CCR5 Δ 32:
Delecció de 32pb: Consisteix en una delecció de 32 pb i es determina per PCR i gel d'agarosa. La PCR utilitza els *primers* amb sentit 5' CGT CTC TCC CAG GAA TCA TC 3' i primer antisentit 5' TTC CCG AGT AGC AGA TGA CC 3'. El número d'accés del Genbank és AF031237.1. Els productes de la PCR són visualitzats en un gel d'agarosa al 2.5%. La mida dels fragments amplificats es comprova amb un marcador de tamany molecular conegut i hauràn de ser: 174 pb l'al·lel salvatge (no delecció) i 142 pb l'al·lel mutat (delecció).
- f) Determinació de SNP del CXCR4. Seqüenciació de la regió codificant del domini C terminal de la proteïna CXCR4. *Primers* utilitzats per la PCR: Sentit 5' AGGCCCTAGCTTTCTTCCAC 3' i antisentit 5' CAAGACAAAAATCCAACAAGCA 3', generant una seqüència de 318 pb. Els fragments d'ADN són comprovats en un gel d'agarosa al 2%. Es purifiquen amb el *Kit QiAquick PCR purification Kit*. Finalment, es realitza una PCR de seqüenciació amb ambdós *primers*, el *kit BigDye Terminator sequencing Kit, ver3.0, Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems)*, seguint les instruccions del fabricant. Si es necessari, els productes de seqüenciació es purifiquen amb el *Kit DyeEx Spin kit (Qiagen)*. Després d'una desnaturalització a 95°C durant 3 minuts, les mostres s'analitzen al seqüenciador.

Estudi immunopatogènic.

- a) Càrrega viral (descriu anteriorment, pàgina 79)
- b) Determinació de limfòcits CD4+ (descriu anteriorment, pàgina 79)
- c) Contingut d'ADNmt en CMSP: Una alíquota de CMSP s'utilitza per l'extracció de l'ADN pel procediment estandard fenol-cloroform. La quantificació de l'ADNmt es realitza mitjançant PCR a temps real (*LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Molecular Biochemicals®, Germany*), quantificant el gen mitocondrial ND2 i el gen 18S ARNr nuclear com a control endogen.
- d) Activitat d'enzims mitocondrials: Amb una altra alíquota de CMSP es realitzen els anàlisis espectrofotomètrics. Es determina l'activitat dels enzims del complex II (codificats exclusivament pe l'ADN nuclear), III i IV (ambdós parcialment codificats per l'ADNmt). Per a corregir les activitats enzimàtiques per eventual diferències en el contingut mitocondrial de les cèl·lules, les activitats absolutes es corregeixen per l'activitat citrat sintetasa la qual és considerada un bon marcador de contingut mitocondrial.
- e) Paràmetres d'apoptosi en CMSP: Es determina l'activitat de la caspasa-3 mitjançant *fluorimetric CasPACE Assay System (Promega, USA)*. També analitzem l'activació apoptòtica determinant la caspasa-9 amb un assaig d'*immunoblot*. Anàlisis quantitativs densitomètrics de l'activitat de la caspasa-9, β -actin i de la Bcl-2 es realitzen per senyals d'*immunoblotting (Phoretics 1D Softward, Phoretic International Ltd, Newcastle, UK)*. També es determina la ràtio caspasa-9 (marcador apoptòtic)/Bcl-2 (marcador antiapoptòtic) com a índex apoptòtic.

5.6 Recollida de dades.

Les variables clíniques i analítiques es recullen en un qüestionari estandarditzat i s'ha creat una base de dades amb el sistema informàtic SPSS/PC+ (*ver12.0 for Windows; SPSS, Chicago, IL*).

5.7 Anàlisi estadística.

Estudis immunogenètics (estudi 1 i 2)

Les dades descriptives són expressades com a mitjana \pm SD o mediana (rang) per a les distribucions no paramètriques. Diferències en nivells entre grups són comparades utilitzant Student *t* test, Mann-Whitney *U* test, o ANOVA segons es necessiti. L'equilibri Hardy-Weinberg es va comprovar per χ^2 goodness-of-fit test. Les freqüències al·lèliques i genotípiques en els diferents grups es varen comparar pel test de χ^2 o test exacte de Fisher quan fou necessari. Un valor de *P* de menys de 0.05 es va considerar significatiu.

Estudi Immunopatogènic (estudi 4)

En tots els anàlisis, les dades dels PT i LTNP es presenten com a valors relatius respecte als dels controls sans, als quals s'ha assignat arbitràriament el valor de 100%. Les dades descriptives en els pacients VIH-1 i en els controls s'expressen com mitjana \pm EES (error estàndard de la mitjana) i els resultats es comparen utilitzant Student *t* test, ANOVA per dades distribuïdes normalment, i els test de Kruskal-Walis quan són necessaris tests no paramètrics. També s'ha realitzat una regressió lineal amb la finalitat de relacionar variables quantitatives. En tots el casos un valor de *P* de menys de 0.05 es va considerar significatiu.

6. Estudis

6.1 Estudi 1.

“La falta d’associació de la variant al·lèlica SDF-1 3’A amb infecció pel VIH-1 no progressiva s’estén més enllà de 16 anys”.

Lack of Association of SDF-1 3’A Variant Allele With Long-Term Nonprogressive HIV-1 Infection Is Extended Beyond 16 Years.

Francesc Vidal, MD, PhD, Joaquim Peraire, MD, Pere Domingo, MD, PhD, Montserrat Broch, PhD, Hernando Knobel, MD, PhD, Enric Pedrol, MD, PhD, David Dalmau, MD, PhD, Consuelo Viladés, MD, M^a Antònia Sambeat, MD, Cristina Gutiérrez, PhD, and Cristóbal Richart, MD, PhD on Behalf of the Chemokines and Long-Term Nonprogressor Study Group.

J Acquir Immune Defic Syndr 2005;40:276–279.

Factor impacte (2005) : 4.1 ; (2007) : 4.4

Aquest estudi ha estat finançat per La Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834), la *Red Española de Investigación en SIDA* (RIS G03/173) i el *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 02/1282).

Lack of Association of SDF-1 3'A Variant Allele With Long-Term Nonprogressive HIV-1 Infection Is Extended Beyond 16 Years

Francesc Vidal, MD, PhD,* Joaquín Peraire, MD,* Pere Domingo, MD, PhD,†
Montserrat Broch, PhD,* Hernando Knobel, MD, PhD,‡ Enric Pedrol, MD, PhD,§
David Dalmau, MD, PhD,|| Consuelo Viladés, MD,* M^a Antònia Sambeat, MD,†
Cristina Gutiérrez, PhD,* and Cristóbal Richart, MD, PhD* on Behalf of the
Chemokines and Long-Term Nonprogressor Study Group

Summary: We studied the frequency of the SDF-1 3'A allelic variant (801G→A) in a cohort of white Spaniards made up of (1) HIV-1 infected long-term nonprogressors (LTNPs) older than 16 years of age (n = 57), (2) HIV-1 infected usual progressors (UPs; n = 107), and (3) a group of healthy controls (n = 100). The mutant SDF-1 3'A allele was observed in 28% of LTNPs, 19% of UPs, and 26% of healthy controls (P = not significant). Homozygosity for the 3'A mutation was detected in 7%, 4%, and 3% of LTNPs, UPs, and healthy controls, respectively (P = not significant). Polymorphism at the SDF-1 locus is not associated with LTNP disease of longer than 16 years in Spanish HIV-1 infected patients. This effect is independent of the CCR5Δ32 allele.

Key Words: SDF-1 3'A, CCR5Δ32, genetic polymorphism, HIV-1 infection, long-term nonprogressors

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:276-279)

The chemokine receptor CXCR4 is the main coreceptor used by HIV-1 in advanced stages of the disease, when T-tropic (X4) strains predominate.¹ The chemokine SDF-1 is its unique natural ligand and has been shown to be a blocking factor for HIV-1 infection.² SDF-1 exhibits genetic polymorphism. The most often found mutation is a G-to-A transition at position 801.³ This is called the SDF-1 3'A variant allele and involves an untranslated region of the gene. Although not

specifically located in a coding region of the gene, this mutation may upregulate the synthesis of the chemokine, thus allowing competitive inhibition of the T-tropic strains of HIV-1 for binding to CD4⁺ cells.⁴ Initial information about the effects of this single nucleotide polymorphism (SNP) on the progression of HIV-1 disease suggested that the 3'A homozygosity was associated with delayed progression toward AIDS.³ This finding was not confirmed by others studies, however.⁵⁻⁹ A subset of HIV-1-infected patients are long-term nonprogressors (LTNPs). These are untreated individuals who remain clinically, virologically, and immunologically stabilized for up to 10 years after HIV-1 infection.¹⁰ Available data on the role of the SDF-1 3'A variant allele in the LTNP status in adults are scarce and inconclusive.¹¹⁻¹³ We therefore aimed to evaluate whether the SDF-1 genetic variant is involved in the LTNP status in a cohort of HIV-1-infected white Spanish patients who satisfied criteria for LTNPs and had been infected with HIV-1 for longer than 16 years.

PATIENTS AND METHODS

Population

Two subsets of HIV-1-infected patients were studied: LTNPs and usual progressors (UPs). Criteria for LTNP were the following: (1) asymptomatic HIV-1 infection of more than 16 years' duration; (2) in the absence of any antiretroviral treatment, a stable CD4⁺ cell count persistently greater than 500 cells/μL; and (3) a plasma HIV viral load repeatedly less than 5000 copies/mL.² Patients were considered to be UPs if HIV-1 infection had progressed to advanced disease—namely, the appearance of class C HIV-1 disease—according to the 1993 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) criteria¹⁴ and had a plasma HIV-1 viral load of greater than 35,000 copies/mL and a progressively declining CD4⁺ cell count over time that was lower than 350 cells/μL at least once during the first 10 years of infection. For a few patients whose date of infection was not available, this was assumed to be the midpoint between the first positive HIV-1 blood test and the last negative HIV-1 blood test.¹⁵ As a control group, we also studied a sample of healthy subjects recruited from blood donors. All subjects in our study were white Spaniards.

Received for publication April 7, 2005; accepted June 22, 2005.

From the *Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Catalonia, Spain; †Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Hospital del Mar de Barcelona, Barcelona, Spain; §Hospital General de Granollers, Granollers, Spain; and ||Hospital Mútua de Terrasa, Terrasa, Spain.

Supported by grants from Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834) and the Spanish AIDS Research Network (RIS G03/173) and (FIS 02/1282).

Reprints: Francesc Vidal, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII Universitat Rovira i Virgili Mallafre Guasch, 4 43007 Tarragona, Catalonia, Spain (e-mail: fvidal@comt.es).

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

Immigrants from other countries, including those from other European countries and their descendants, were excluded. Informed consent was obtained from each participant. The project was approved by all the local ethical research committees.

Samples

Blood, DNA, and Plasma

After 12 hours of fasting, blood samples with ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) were obtained from an antecubital vein. Five milliliters of whole blood was used to determine the CD4⁺ lymphocyte cell count, and 500 µL was used for DNA isolation by a MagNa Pure LC Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma for determining HIV viral load was obtained by centrifugation at 3500 g for 15 minutes at 4°C.

Laboratory Methods

HIV-1 Infection

This was diagnosed by means of a positive enzyme immunoanalysis and confirmed by a positive Western blot test.

Plasma HIV-1 Viral Load

This was determined by the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test, version 1.5, using the COBAS AMPLICOR system (Roche Diagnostics). The cutoff for an undetectable viral load was 50 copies/µL.

Assessment of Blood CD4⁺ Lymphocyte Cell Count

Samples were analyzed using a flow cytometer FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Data acquired were analyzed using the Multiset program.

SDF-1 Genotype

The SDF1 3' A variation was detected by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *MspI* restriction endonuclease (New England Biolabs), which recognizes the G allele. A 301-base pair (bp) was amplified with primers 5' CAGTCAACCTGGGCAAAGCC3' and 5' AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC3' (from Genbank accession

number L36033). Digestion and analysis by a 2.5% agarose gel and ethidium bromide staining revealed 2 fragments of 201 and 100 bp for the G allele and 1 fragment of 301 bp for the A allele.

CCR5Δ32 Mutation

PCR primers were 5' CGTCTCTCCCAGGAATCATC3' and antisense 5' TTCCCGAGTAGCAGATGACC3' (annealed at 60°C, Genbank accession number AF031237.1). The PCR products were visualized on a 2.5% agarose gel. The wild-type CCR5 gene results in a 174-bp fragment, and the Δ32 mutant results in a 142-bp fragment.

Statistical Analysis

This was performed using the SPSS/PC⁺ statistical package (version 12.0 for Windows; SPSS, Chicago, IL). Descriptive data are expressed as mean ± SD or median (range) for nonparametric distributions. Differences in levels between groups were compared using a Student *t* test, Mann-Whitney *U* test, or ANOVA when necessary. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the χ² goodness-of-fit test. Genotype and allele frequencies in the different groups were compared by the χ² test or Fisher exact test when necessary. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Two hundred sixty-four individuals were studied: 164 HIV-1-infected patients and 100 healthy controls. All subjects were white Spaniards. Of these patients, 107 were UPs and 57 were LTNPs. Age, gender, and risk factors of UPs and LTNPs for acquiring HIV-1 were similar. Most UPs (>90%) were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). Table 1 shows the characteristics and main data of the population studied.

Table 2 shows the genotype distribution and allele frequencies in the SDF-1 3' A mutant allele for the control group, UPs, and LTNPs. The genotype distribution in the population studied fits the expected Hardy-Weinberg equilibrium. The SDF-1 3' A allele tended to be lower in the UP subset, although

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of the Population Analyzed

Variable	HIV-LTNPs (n = 57)	HIV-UPs (n = 107)	Controls (n = 100)	<i>P</i>
Male (%)	37 (62%)	78 (71.5%)	73 (73%)	NS
Age (y), mean ± SD	40.3 ± 7.4	41.8 ± 8.9	44.6 ± 10.1	0.04
Duration of HIV infection, mean ± SD	17.9 ± 1.5	6.7 ± 2.7	—	<0.0001
Years from first documented HIV infection to treatment, mean ± SD	—	4.8 ± 1.3	—	
Plasma HIV RNA load (copies/mL), mean and range	931 (<50–4800*)	11,808 (<50–>750,000*)	—	<0.0001
CD4 ⁺ cell count (cells/µL), mean and range	745 (503–2080)	478 (6–1404)	—	<0.0001
Risk factors for HIV				
Injection drug user	41 (70.7%)	74 (67.9%)	—	NS
Homosexual	5 (8.3%)	9 (8.3%)	—	NS
Heterosexual	10 (16.7%)	19 (17.4%)	—	NS
Other	4 (6.9%)	7 (6.4%)	—	NS

*<50 was arbitrarily counted as 49.
 NS indicates not significant.

TABLE 2. SDF-1' Genotype and Allele Frequencies in the Groups Analyzed

Genotype and Allele Frequencies	All			HIV-1- Infected Patients		
	Controls (n = 100)	HIV-1-Infected (n = 164)	P	UPs (n = 107)	LTNPs (n = 57)	P
SDF-1' 801 (G→A)						
GG	50 (50%)	100 (61%)		71 (66%)	29 (51%)	
GA	47 (47%)	56 (34%)	NS	32 (30%)	24 (42%)	NS
AA	3 (3%)	8 (5%)		4 (4%)	4 (7%)	
Mutated allele A	53 (26.5%)	72 (22%)	NS	40 (19%)	32 (28%)	0.08

The observed genotypic frequencies in the studied population (GG 57%, GA 39%, and AA 4%) did not differ from the expected frequencies according to Hardy-Weinberg equilibrium (GG 58%, GA 36%, and AA 6%) (*P* NS).
 NS indicates not significant.

the difference was nonsignificant (*P* = 0.08 compared with LTNPs). The results and analysis were the same when the individuals who carried the CCR5Δ32 allele were excluded.

In the LTNP subset, individuals homozygous for the mutant A allele (A/A) had a plasma HIV-1 viral load and a CD4⁺ cell count lower than that of heterozygous (G/A) and wild-type homozygous (G/G) individuals, although the differences were not significant (Table 3).

With respect to the CCR5Δ32 allele, no homozygous mutants were detected. The allele frequency of this mutation was 7% for controls and was equally represented in the LTNP and UP subsets (10% each).

DISCUSSION

This study shows that carriage of the mutant SDF-1 3' A allele is not associated with the LTNP state in HIV-1-infected white Spaniards and does not influence the risk of infection. This is independent of the presence of the CCR5Δ32 allele. Also, in LTNPs, the mutant allele does not modulate the HIV-1 viral load or the CD4⁺ cell count.

To date, 6 studies have focused on the role of SDF-1 mutations in the HIV-1 LTNP status.^{11 13,16 18} Five of these studies involved adults,^{11 13,16} and 1 involved children.¹⁷ Three of these studies lacked a control group,^{11 13} so it is difficult to evaluate their data. One of these 3 studies showed a positive relation with the 3' A mutant allele and LTNP,¹¹ and 1 found no relation.¹² The other reported that carriage of the variant allele was associated with rapid progression. The difficulty of interpreting these results in the absence of baseline data from a

control group is clearly highlighted by our findings. If we look only at our 2 subsets of HIV-1-infected patients, our data show that the 3' A mutant allele tended to be lower in UPs than in LTNPs, although the difference was not significant (*P* = 0.08). This would suggest that carriage of the variant A allele implies a tendency to be associated with LTNP. When we compared these subsets with the control group, however, we found that the prevalence of the mutant 3' A allele in LTNPs and healthy controls was similar but that it was markedly lower in the UPs. This suggests that patients carrying the SDF-1 wild-type allele are more likely to progress toward advanced stages of the disease than patients carrying the mutant 3' A allele. Because these differences were not significant, our final analysis is that mutations at the SDF-1 locus are not associated with LTNP status. We acknowledge, however, that the cross-sectional nature of the present study does not allow the dissection of time-dependent genetic effects, such as has been demonstrated for other gene variants.¹⁹ The other 3 studies on the role of SDF-1 mutations in HIV-1 LTNP status that analyzed a control group^{16 18} also offered discordant data. In a single report in children, Tresoldi et al¹⁷ found that the 3' A allele carried accelerated progression, but the other 2 studies found no relation.^{16,18} Mazzuchelli et al¹⁶ reported that the SDF-1 mutant allele did not affect the progression of the disease but that patients carrying the mutation had a greater HIV-1 viral burden, a finding that we were not able to reproduce.

A question arises as to what are the reasons for the lack of replication of the initially proposed association of 3' A homozygosity with disease progression.³ Noteworthy is that this first study suggested a stronger genetic effect than has been found in subsequent studies.^{3,16 18} As has been pointed out adequately elsewhere, selection bias as well as genuine racial or population diversity is a plausible explanation for why early genetic population association studies tended to overestimate the effect conferred by a genetic polymorphism, an effect that further studies have often proved is more modest or even nonexistent.²⁰ Additionally, some of these studies offer inconsistent data because they are underpowered, and this may also contribute to the lack of replication.²¹

Finally, we found no association between CCR5Δ32 heterozygosity and LTNP, because this allele was equally represented in LTNPs and UPs. We have therefore not been able to reproduce the protective effect of CCR5Δ32 heterozygosity on disease progression that other reports have shown.⁹

TABLE 3. HIV-1 Plasma Viral Load and CD4⁺ Cell Count in the LTNP Group According to SDF-1 Genotype

SDF-1 Genotype	Plasma HIV-1 Viral Load (copies/mL), Mean ± SD (range)*	CD4 ⁺ Cell Count (cells/μL), Mean ± SD (range)*
GG	936 ± 1254 (<50–3900†)	743 ± 255 (503–1426)
GA	948 ± 1399 (<50–4800†)	762 ± 361 (526–2080)
AA	700 ± 919 (<50–1350†)	660 ± 283 (567–984)
GA + AA	913 ± 1330 (<50–4800†)	747 ± 350 (526–2080)

**P* not significant for all comparisons.
 †<50 was arbitrarily counted as 49.

Conversely, our data are consistent with those of 2 studies that found a lack of association between CCR5 Δ 32 and delayed progression toward low CD4⁺ cell counts and AIDS in cohorts of HIV-1-infected injection drug users.^{22,23} Noteworthy is that more than two thirds of our HIV-1-infected patients acquired HIV-1 infection through injecting illicit drugs.

We conclude that the SDF-1 3'A polymorphism is not a determinant of LTNP in HIV-1-infected Spanish patients. This lack of influence on HIV-1 disease progression extends beyond 16 years.

REFERENCES

1. Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, et al. The CCR5 and CXCR4 coreceptors—central understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20:111–126.
2. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996;382:833–835.
3. Winkler C, Modi W, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science*. 1998;279:389–393.
4. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*. 1995;28:495–500.
5. van Rij RP, Broersen S, Goudsmith J, et al. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*. 1998;12(Suppl):F85–F90 (erratum: *AIDS*. 2002;16:2239).
6. Mummidis S, Ahuja SS, González E, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med*. 1998;4:786–793.
7. Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, et al. CC-chemokine receptor variants, SDF-1 polymorphism, and disease progression in 720 HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1999;13:624–626.
8. Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, et al. Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2003;188:1461–1472.
9. Ioannidis JPA, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. Effects of CCR5, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles of HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med*. 2001;135:782–795.
10. Mikhail M, Wang B, Saksena NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev*. 2003;5:230–244.
11. Hendel H, Henon N, Lebaunec H, et al. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1998;19:381–386.
12. Balotta C, Bagnarelli P, Corvasce S, et al. Identification of two distinct subsets of long-term non-progressors with divergent viral activity by stromal-derived factor 1 chemokine gene polymorphism analysis. *J Infect Dis*. 1999;180:285–289.
13. Magierowska M, Theodorou I, Debré P, et al. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood*. 1999;93:936–941.
14. Castro KG, Ward JW, Slutsker L, et al. CDC 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR*. 1992;41:961–962.
15. McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeburger CA, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000;14:821–826.
16. Mazzuchelli R, Corvasce S, Violin M, et al. Role of CCR5, CCR2 and SDF-1 gene polymorphisms in a population of HIV-1 infected individuals. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001;15:265–271.
17. Tresoldi E, Romiti ML, Boniotto M, et al. Prognostic value of the stromal cell-derived factor 1 3'A mutation in pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 2002;185:696–700.
18. Soriano A, Martínez C, García F, et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis*. 2002;186:922–931.
19. Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JPA, et al. Effects of CCR5- Δ 32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *AIDS*. 2003;17:377–387.
20. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*. 2001;29:306–309.
21. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common diseases. *Nat Genet*. 2003;33:177–182.
22. Barber Y, Rubio C, Fernández E, et al. Host genetic background at CCR5 chemokine receptor and vitamin D receptor loci and human immunodeficiency virus (HIV) type I disease progression among HIV-seropositive injection drug users. *J Infect Dis*. 2001;184:1279–1288.
23. Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, et al. No evidence for an effect of the CCR5 Δ 32/+ and CCR2b64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injection drug users. *J Infect Dis*. 1999;179:825–831.

APPENDIX

The members of the Chemokines and Long-Term Non-progressor Study Group and coauthors of this report are as follows: Francesc Vidal, Joaquim Peraire, Consuelo Viladés, Montserrat Broch, Cristina Gutiérrez, Miguel López, and Cristóbal Richart (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili); Pere Domingo, M^a Antonia Sambeat, and Àngels Fontanet (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona); Hernando Knobel and Milagros Montero (Hospital del Mar de Barcelona); Enric Pedrol and Elisabet Deig (Unitat d'Infeccions-VIH, Hospital General de Granollers, Observatori de la Salut Dr. Carles Vallbona); David Dalmau and Mireia Cairó (Hospital Mútua de Terrassa); and Judit González (Pius Hospital de Valls).

6.2 Estudi 2.

“Els polimorfismes en el promotor del gen de la quimiocina RANTES no s’associen a infecció pel VIH-1 no progressiva de més de 16 anys d’evolució”.

Polymorphism of RANTES Chemokine Gene Promoter Is Not Associated With Long-Term Nonprogressive HIV-1 Infection of More Than 16 Years.

Francesc Vidal, MD, PhD, Joaquim Peraire, MD, Pere Domingo, MD, PhD, Montserrat Broch, PhD, Mireia Cairó, MD, Enric Pedrol, MD, PhD, Milagros Montero, MD, Consuelo Viladés, MD, Cristina Gutiérrez, PhD, M^a Antònia Sambeat, MD, PhD, Àngels Fontanet, David Dalmau, MD, PhD, Elisabeth Deig, MD, Hernando Knobel, MD, PhD, Joan Josep Sirvent, MD, PhD, and Cristóbal Richart, MD, PhD on Behalf of the Chemokines and Long-Term Nonprogressive HIV-1 Infection Study Group.

J Acquir Immune Defic Syndr 2006;41:17–22.

Factor impacte (2006) : 3.9 ; (2007) : 4.4

Aquest estudi ha estat finançat per La Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834), la *Red Española de Investigación en SIDA* (TIS G03/173) i el *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 02/1282).

Polymorphism of *RANTES* Chemokine Gene Promoter Is Not Associated With Long-Term Nonprogressive HIV-1 Infection of More Than 16 Years

Francesc Vidal, MD, PhD,* Joaquim Peraire, MD,* Pere Domingo, MD, PhD,†
Montserrat Broch, PhD,* Mireia Cairó, MD,‡ Enric Pedrol, MD, PhD,§ Milagros Montero, MD,||
Consuelo Viladés, MD,* Cristina Gutiérrez, PhD,* M^a Antònia Sambeat, MD, PhD,†
Àngels Fontanet,† David Dalmau, MD, PhD,‡ Elisabeth Deig, MD,§ Hernando Knobel, MD, PhD,||
Joan Josep Sirvent, MD, PhD,* and Cristóbal Richart, MD, PhD* on Behalf of the Chemokines
and Long-Term Nonprogressive HIV01 Infection Study Group

Summary: To examine whether polymorphisms of the *RANTES* chemokine gene promoter are associated with long-term nonprogressive HIV-1 infection in white Spanish subjects, we performed a cross-sectional genetic association case-control study. Two-hundred sixty-seven white Spaniards were studied: 58 were HIV-1 infected long-term nonprogressors (LTNPs) of more than 16 years, 109 were HIV-1 infected usual progressors (UPs), and 100 were control subjects. Three *RANTES* single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions -28C>G, -109T>C, and -403G>A were assessed. The prevalence of the *CCR5Δ32* allele was also examined. Genotyping was performed using polymerase chain reaction and automatic sequencing analysis methods. Genotype and allele frequencies between the 3 groups were compared by the χ^2 test and the Fisher exact test. The distribution of allelic variants of *RANTES* in controls, UPs, and LTNPs, respectively, was 3%, 2%, and 5% for -28G; 4%, 2%, and 2% for -109C; and 18%, 18%, and 18% for -403A ($P =$ not significant). The differences were still nonsignificant when we exclusively analyzed individuals not carrying the *CCR5Δ32* allele. We conclude that LTNP of more than 16 years is not associated with SNPs in the *RANTES* gene promoter in white Spanish HIV-1 infected subjects.

Key Words: HIV-1 infection, AIDS, long-term nonprogressors, *RANTES*, *CCR5*, polymorphism

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:17-22)

Received for publication August 4, 2005; accepted September 14, 2005.

From the *Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; †Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Unitat VIH. Servei de Malalties Infeccioses. Fundació per a la Recerca. Hospital Mútua de Terrassa. Universitat de Barcelona, Terrassa, Spain; §Hospital General de Granollers, Granollers, Spain; and ||Hospital del Mar de Barcelona, Barcelona, Spain.

Partially financed by grants from the Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, and 02/1834) and the Spanish AIDS Research Network Red Temática Cooperativa de Investigaciónde Sida G03/173 and Fondo de Investigación Sanitaria 02/1282.

Reprints: Francesc Vidal, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Mallafre Guasch, 4, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain (e-mail: fvidal@comt.es).

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

Long-term nonprogressive HIV-1-infected subjects (LTNPs) are patients who remain clinically, virologically, and immunologically stabilized for 10 to 15 years after infection with HIV-1 without the intervention of any antiretroviral drug.^{1,2} They represent 1% to 5% of HIV-1-infected patients.² The existence of this subset of patients suggests that some individuals have the ability to contain HIV-1 multiplication, thus limiting expansion of the viral burden. The factors that lead to the LTNP state are not known, but it is believed that there is a complex interaction between the viral and host factors that determines the clinical evolution of the infection.²

Among host-dependent factors, attention has recently been paid to the genetic polymorphism of the cellular receptors used by HIV-1³ and their ligands, the chemokines,⁴⁻¹⁰ given their critical role in the process by which HIV-1 enters the cell. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the chemokine receptors and chemokine gene promoters have been shown to alter the transcriptional activity of the gene and may significantly influence the pathogenesis and progression of the disease. This is well established for the genetic variants of *CCR5*—the main coreceptor that HIV-1 uses in the early phases of infection—particularly for the *CCR5Δ32* allele.⁵⁻¹⁰ *RANTES*, which is the main natural ligand that binds to *CCR5*,¹¹ is one of the candidate chemokines to be investigated in this respect, but data reported to date are scarce and often controversial.¹²⁻²⁰ Moreover, *RANTES* genetic variants in individuals who show a true LTNP evolution have not been assessed. We therefore carried out a study to evaluate the role of allelic variants in the gene promoter of the chemokine *RANTES* on the natural history of HIV-1 disease, particularly in the state of long-term nonprogression, in a cohort of white Spanish patients and controls. We also assessed the distribution of the *CCR5Δ32* allele.

PATIENTS AND METHODS

Population Studied

We performed a cross-sectional multicenter genetic association case-control study. We recruited patients at the HIV outpatient clinics of the 5 hospitals participating in the

project. Many of the HIV-1-infected subjects we care for at these clinics are injecting drug users. Two subsets of HIV-1-infected patients were studied: LTNPs and usual progressors (UPs). The criteria for LTNPs were (1) asymptomatic HIV-1 infection of more than 16 years' duration; (2) in the absence of antiretroviral treatment, a CD4⁺ cell count that was stable and persistently greater than 500 cells/ μ L; and (3) a plasma HIV-1 viral load value that was repeatedly less than 5000 copies/mL.² Patients were considered to be UPs if HIV-1 infection had progressed to advanced disease, namely, the appearance of class C HIV-1 disease according to the 1993 criteria of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC),²¹ and had a plasma viral load of greater than 35,000 copies/mL and a progressively declining CD4⁺ cell count over time that was lower than 350 cells/ μ L at least once during the first 10 years of infection. For a few patients whose date of infection was unknown, we assumed this to be the midpoint between the date of the last negative and first positive HIV-1 blood tests.¹³ As a control group, we also studied a sample of healthy subjects recruited from blood donors. All subjects studied were white Spaniards. Immigrants from other countries, including those from other European countries, and their descendants were excluded. Informed consent was obtained from each participant. The project was approved by the local ethical research committees.

Samples

Blood, DNA, and Plasma

After 12 hours of fasting, blood samples with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were obtained from an antecubital vein. Five milliliters of whole blood was sent to determine CD4⁺ lymphocyte cell count, and 500 μ L was sent for DNA isolation using a MagNa Pure LC Instrument (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland). Plasma for determining HIV-1 viral load was obtained by centrifugation at 3500 g for 15 minutes at 4°C.

Laboratory Methods

HIV-1 Infection

HIV-1 infection was diagnosed by means of a positive enzyme immunoassay and was confirmed by a positive Western blot test.

Plasma HIV-1 Viral Load

Plasma HIV-1 viral load was determined by the COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Test, version 1.5 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The cutoff for undetectable viral load was 50 copies/ μ L.

Assessment of Blood CD4⁺ Lymphocyte Cell Count

Samples were analyzed by flow cytometer FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA). Data acquired were analyzed using the Multiset program.

RANTES -28 C>G, -109 T>C, and -403 G>A Single Nucleotide Polymorphisms

To date, 3 SNPs have been reported in the *RANTES* gene promoter.²²⁻²⁴ The positions indicate the nucleotide where the mutation is located at the beginning of the transcription. The SNPs are as follows: position -28, transversion C>G; position -109, transition T>C; and position -403, transition G>A. These were analyzed by a polymerase chain reaction (PCR) assay and automatic sequencing in an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Because of their proximity, SNPs at positions -28 and -109 were assessed together by sequencing a unique fragment. The mutation -403 was analyzed separately.

Analysis of the Single Nucleotide Polymorphisms -28C>G and -109T>C

By means of a PCR assay, a fragment of 196 base pairs (bp) was amplified using the following specific primers: a primer with sense 5' TGA GAG AGC AGT GAG G 3' and a primer with antisense 5' GTC CAC GTG CTG TCT T 3'. The correct amplification of the desired fragment was evaluated in 2% agarose gel tinged with ethidium bromure and Marker VIII (Roche Molecular Biochemicals), a marker of known molecular size. The PCR products were subsequently purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). After purification, a sequencing PCR assay was performed with the primer with sense using the BigDye Terminator sequencing kit, version 3.0, Cycle Sequencing Ready reaction (PE Applied Biosystems) in accordance with the manufacturer's instructions. If needed, the sequencing products were purified with the DyeEx Spin kit (Qiagen). After denaturalization at 95°C for 3 minutes, the samples were analyzed in an ABI PRISM 310 sequencer using the DNA sequencing analysis program, version 3.3 (PE Applied Biosystems), which assigns a specific color to each nucleotide base. Heterozygote individuals were detected by the presence of 2 peaks, whereas homozygote individuals have only 1 peak.

Analysis of the SNP -403G>A

Analysis of the SNP -403G>A was assessed using the previously described method. The following primers were used for the PCR assay: a primer with sense 5' AGT GTG CTC ACC TCC TTT 3' and a primer with antisense 5' GAT CAG AAG TCA CTG AGT 3', which generates a 174-bp fragment. For the PCR sequencing, we used the primer with sense. The Genbank accession number for the 3 *RANTES* SNPs was S64885.

CCR5 Δ 32 Mutation

The PCR primers were as follows: 5' CGT CTC TCC CAG GAA TCA TC 3' and antisense 5' TTC CCG AGT AGC AGA TGA CC 3', with annealing 60°C. The Genbank accession number was AF031237.1. The PCR products were visualized on 2.5% agarose gel. The wild-type *CCR5* gene led to a 174-bp fragment, whereas the *CCR5 Δ 32* mutant allele led to a 142-bp fragment.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS/PC+ statistical package (version 12.0 for Windows; SPSS, Chicago, IL). Descriptive data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or median (range) for nonparametric distributions. Differences in levels between groups were compared using the Student *t* test, or Mann-Whitney *U* test when necessary. Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the χ^2 goodness-of-fit test. Genotype and allele frequencies in the different groups were compared by the χ^2 test, and the Fisher exact test was used when necessary. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Two hundred sixty-seven white Spaniards were included in the study (167 HIV-1-infected patients and 100 healthy controls). Of these patients, 109 were UPs and 58 were LTNPs. The age, gender, and risk factors for acquiring HIV-1 were comparable for the UP and LTNP groups. As expected and because of the epidemiologic pattern of HIV-1 infection in our geographic area, more than two thirds of the HIV-1-infected patients studied were injecting drug users. Most UPs (>90%) were receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). The characteristics and main data of the populations analyzed are shown in Table 1.

RANTES Gene Promoter Polymorphisms

Table 2 shows the genotype distribution and allele frequencies in the *RANTES* gene promoter region at the positions -28, -109, and -403, for the control group, UP group, and LTNP group. The genotype distribution in the population studied fits the expected Hardy-Weinberg equilibrium. No significant differences were detected in the allelic distribution of the variants analyzed for the 3 groups. Also,

the distribution of genotypes was similar between groups. Homozygous mutants were observed only at position -403, but the frequency was low. Taking this into account, we split the groups into 2 subsets according to the presence or absence of the mutant allele. Further analyses of *RANTES* genotype and allele frequencies performed after the 45 individuals who carried the *CCR5* Δ 32 allele had been excluded also showed no differences between the groups. We studied the distribution of the 3 most common *RANTES* -28 and -403 haplotypes: I (-28C and -403 G), II (-28C and -403A), and III (-28G and -403 A). The distributions of haplotypes I, II, and III for UPs were 81.8%, 17.2%, and 1%; for LTNPs, they were 82.7%, 14.6%, and 2.7%, respectively (*P* = not significant [NS]). With regard to the genotypes of the *RANTES* gene promoter region at the positions -28, -109, and -403, there was no relation between viral load and CD4⁺ cell count in the LTNP group.

CCR5 Δ 32

There were no significant differences for *CCR5* genotype or allele distributions among the different groups (see Table 2). Homozygosity was not observed for the *CCR5* Δ 32 allele.

DISCUSSION

This study shows that there is no relation between the SNPs -28C>G, -109T>C, and -403G>A of the chemokine *RANTES* gene promoter and long-term nonprogressive HIV-1 infection in a cohort of white Spaniards who acquired HIV-1 mainly by injecting illicit drugs. Also, there are no differences in genotype or allelic distribution between HIV-1-infected subjects and uninfected subjects, and no particular genotype or haplotype was found to protect or predispose to

TABLE 1. Demographic and Clinical Characteristics of the Population Analyzed

Variable	HIV-1 LTNP (n = 58)	HIV-1 UP (n = 109)	Controls (n = 100)	<i>P</i>
Male (%)	37 (64%)	78 (72%)	73 (73%)	NS
Age (y)*	40.8 \pm 7.5	41.8 \pm 8.9	44.6 \pm 10.1	0.04
Duration of HIV-1 infection (y)*	17.9 \pm 1.5	6.7 \pm 2.7	—	<0.0001
Years from first time documented HIV-1 infection to treatment*	—	4.8 \pm 1.3	—	
Plasma HIV-1 RNA (copies/mL)†	931 (<50–4800)	11808 (<50‡ to >750,000)	—	<0.0001
CD4 ⁺ cells/mm ³ †	745 (503–2080)	478 (6–1404)	—	<0.0001
Risk factors for HIV-1				
Injection drug use	41 (70%)	74 (68%)	—	NS
Homosexual	4 (7%)	9 (8%)	—	NS
Heterosexual	9 (16%)	19 (18%)	—	NS
Other	4 (7%)	7 (6%)	—	NS

*Mean \pm SD.

†Mean (range).

‡<50 was arbitrarily counted as 49.

TABLE 2. Genotype and Allele Frequencies in the Groups Analyzed

Genotype and Allele Frequencies	All			HIV-1-Infected Patients		
	Control Group (n = 100)	HIV-1-Infected (n = 167)	P	UPs (n = 109)	LTNPs (n = 58)	P
<i>RANTES</i> -28*						
C/C	90 (95%)	147 (95%)		96 (97%)	51 (91%)	
C/G	5 (5%)	8 (5%)	NS	3 (3%)	5 (9%)	NS
Variant allele G	3%	3%		2%	5%	
<i>RANTES</i> -109*						
T/T	84 (91%)	149 (97%)		95 (97%)	54 (96%)	
T/C	8 (9%)	5 (3%)	NS	3 (3%)	2 (4%)	NS
Variant allele C	4%	2%		2%	2%	
<i>RANTES</i> -403*						
G/G	65 (66%)	105 (66%)		67 (65%)	38 (67.9%)	
G/A	30 (31%)	51 (32%)	NS	35 (34%)	16 (28.6%)	NS
A/A	3 (3%)	3 (2%)		1 (1%)	2 (3.6%)	
Variant allele A	18%	18%		18%	18%	
<i>CCR5Δ32</i>						
wt/wt	87 (87%)	135 (81%)		88 (81%)	47 (81%)	
w/Δ32	13 (13%)	32 (19%)	NS	21 (18%)	11 (19%)	NS
Δ32 allele	7%	10%		10%	9%	

*DNA for *RANTES* genotyping could not be amplified in some individuals (17 for -28, 21 for -109, and 10 for -403). wt indicates wild-type allele; Δ32, 32-bp deletion.

HIV-1 infection. This is independent of the presence of the *CCR5Δ32* allele.

Three polymorphic sites have been described to date in the *RANTES* gene promoter.²²⁻²⁴ An increase in promoter activity and *RANTES* messenger RNA (mRNA) expression and transcription has been shown in 2 of these sites (-28 C>G and -403 G>A),^{12,13} but no information is yet available regarding the SNP -109 T>C. Two other polymorphic sites have also been detected in other regions of the gene: in 1.1C in the first intron and 3'222C in the 3' untranslated region.¹⁴

Previous reports have studied the influence of *RANTES* gene promoter SNPs on the epidemiology and natural history of HIV-1 infection.¹²⁻²⁰ None of these reports has specifically evaluated true long-term nonprogression, however, and the results strongly depend on the population analyzed. Carriage of the rare mutant -403A allele increases susceptibility to HIV-1 infection in white Americans^{13,14} and Han Chinese¹⁵ but not in Japanese,¹² Spaniards (present report),¹⁶ or other cohorts.^{17,20} Other authors have even found that the wild-type -403G allele is associated with increased susceptibility to infection in Chinese subjects.¹⁹ These findings should be interpreted with great caution, however, because in some of the studies reported as well as in the present study, individuals from the control group were blood donors with no known risk practices for acquiring HIV-1 infection. It is therefore plausible that among subjects infected with HIV-1, risk practices for acquiring HIV-1 infection overshadow the possible protective effect of any particular *RANTES* genotype or haplotype. Interestingly, however, a recent report in white subjects found no differences in *RANTES* genotype between HIV-1-infected

patients and repeatedly exposed but uninfected subjects.¹⁷ This strongly suggests that carriage of allelic variants of *RANTES* has no predisposing or protective role with regard to HIV-1 infection.

Among infected subjects, and in relation to disease progression, the rare -403A allele has been associated with a slower slope of CD4⁺ lymphocytes and a slow progression toward AIDS in some multiethnic cohorts.^{13,14} Information on Japanese subjects is discordant, because some studies found no effect¹² and others found slow progression.¹⁹ Duggal et al²⁵ found that individuals homozygous for a *RANTES* haplotype containing the -403G wild-type allele had a lower early plasma HIV-1 viral load compared with other haplotypes in African Americans, thus anticipating slow progression. The influence of the -28G mutant allele on disease progression also depends on ethnicity, ranging from no effect in a multiethnic cohort,¹³ to slow progression in Japanese,^{12,19} to rapid progression toward AIDS in Chinese.¹⁸ None of the reports analyzed has addressed this issue regarding true long-term nonprogression, and the results presented here indicate that *RANTES* allelic variants do not modulate this particular subset of HIV-1-infected patients. Although the -28G mutant allele was more frequent in LTNPs than in UPs (5% vs. 2%, respectively), statistical analysis showed that this difference was not significant; hence, our conclusion. Nevertheless, we recognize that the small numbers studied here may render the statistical analysis underpowered, because the power of the comparison was lower than 40%.

When we compared our data with those reported in the literature, we found that the influence of the allelic variants of *RANTES* gene promoter on the risk of HIV-1 infection and

disease progression varied widely and depended on the origin of the subjects analyzed. In fact, the distribution of *RANTES* haplotypes in our patients was closely related to data on white subjects¹³ but was markedly different from those on Asian subjects.¹² This makes the hypothesis that the influence of the *RANTES* genotype might be variable in different ethnic groups plausible.²⁶

Finally, we found no association between the *CCR5Δ32* heterozygosity and long-term nonprogression, because the frequency of this allele did not increase in this subset of patients. We have therefore not been able to reproduce the protective effect of *CCR5Δ32* on disease progression that has been reported by several authors.^{5,7,9,10} Conversely, our results agree with those of other studies that reported no association between *CCR5Δ32* heterozygosity and delayed immunologic slope in 2 cohorts of HIV-1-infected injection drug users.^{27,28} Note that most of our patients acquired HIV-1 through the injection of illicit drugs. Because the transmission route is a major determinant of the immune response to HIV-1²⁹ and outcome, it is plausible that the influence of host genetic background on disease progression depends on the transmission route.

In conclusion, our results show that, at least in the Spanish white population, SNPs at the *RANTES* gene promoter and *CCR5Δ32* allele are not associated with long-term nonprogressive HIV-1 disease, and thus do not modulate this particular clinical evolution.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank M. Olona for her help in epidemiologic and statistical assessment.

REFERENCES

1. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term-nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995;332:209–216.
2. Mikhail M, Wang B, Saksena NK. Mechanisms involved in nonprogressive HIV disease. *AIDS Rev*. 2003;5:230–244.
3. Deng H, Liu R, Ellmeir W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661–666.
4. Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the *CCR-5* receptor gene. *Nature*. 1996;382:722–725.
5. Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science*. 1996;273:1856–1862.
6. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, et al. The role of *CCR5* and *CCR2* polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*. 1997;3:1160–1162.
7. Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, et al. A chemokine receptor *CCR2* allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a *CCR5* promoter mutation. *Nat Med*. 1998;4:350–353.
8. Quillent C, Oberlin E, Braun J, et al. HIV-1 resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of *CCR5* gene. *Lancet*. 1998;351:14–18.
9. Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, et al. *CXCR4* and *CCR5* genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than *CCR5-Δ32*. *J Virol*. 1998;72:6215–6217.
10. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. International meta-analysis of HIV host genetics: effects of *CCR5*, *CCR2-64I*, and *SDF-1 3'A* alleles of HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med*. 2001;135:782–795.
11. Koning FA, Kwa D, Boeser-Nunnick B, et al. Decreasing sensitivity to *RANTES* neutralization of CC chemokine receptor-5 using non-syncytium-inducing virus variants in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 2003;188:864–872.
12. Liu H, Chao D, Nakayama EE, et al. Polymorphism in *RANTES* chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:4581–4585.
13. McDermott D, Beecroft MJ, Kleeberger CA, et al. Chemokine *RANTES* promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2000;14:821–826.
14. An P, Nelson GW, Wang L, et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting *RANTES* gene variants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:10002–10007.
15. Liu XL, Wang FS, Jin L, et al. Preliminary study on the association of chemokine *RANTES* gene polymorphism with HIV-1 infection in Chinese Han population. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2003;24:971–975.
16. Fernandez RM, Borrego S, Marcos I, et al. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the *RANTES* polymorphisms –403 C> and –28 G>C: evaluation of both variants as susceptibility factors for HIV type 1 infection in the Spanish population. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19:349–352.
17. Liu H, Hwangwo Y, Holte S, et al. Analysis of genetic polymorphisms in *CCR5*, *CCR2*, stromal cell-derived factor-1, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis*. 2004;190:1055–1058.
18. Zhao XY, Lee SS, Wong KH, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in the *RANTES* promoter region in healthy and HIV-infected indigenous Chinese. *Eur J Immunogenet*. 2004;31:179–183.
19. Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, et al. Global survey of genetic variation in *CCR5*, *RANTES*, and *MIP-1α*: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:5199–5204.
20. Wang C, Song W, Lobashevsky E, et al. Cytokine and chemokine gene polymorphisms among ethnically diverse North Americans with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;35:446–454.
21. Castro KG, Ward JW, Slutsker L, et al. CDC 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1992;41(RR-17):1–20.
22. Al-Sharif F, Ollier WER, Hajeer AH. A rare polymorphism at position –28 in the human *RANTES* promoter. *Eur J Immunogenet*. 1999;26:373–374.
23. Azzawi M, Pravica V, Hasleton PS, et al. A single nucleotide polymorphism at position –109 of the *RANTES* proximal promoter. *Eur J Immunogenet*. 2001;28:95–96.
24. Hajeer AH, Al-Sharif F, Ollier WER. A polymorphism at position –403 in the human *RANTES* promoter. *Eur J Immunogenet*. 1999;26:375–376.
25. Duggal P, Winkler CA, An P, et al. The effect of *RANTES* chemokine genetic variants on early HIV-1 plasma RNA among African-American injection drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;38:584–589.
26. Liu H, Shioda T, Nagai Y, et al. Distribution of HIV-1 disease modifying regulated on activation normal T cell expressed and secreted haplotypes in Asian, African and Caucasian individuals. *AIDS*. 1999;13:2602–2603.
27. Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, et al. No evidence for an effect of the *CCR5Δ 32/+* and *CCR2 2b64I/+* mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *J Infect Dis*. 1999;179:825–831.
28. Barber Y, Rubio C, Fernández E, et al. Host genetic background at *CCR5* chemokine receptor and vitamin D receptor loci and human immunodeficiency virus (HIV) type 1 disease progression among HIV-seropositive injection drug users. *J Infect Dis*. 2001;184:1279–1288.
29. Nair MPN, Mahajan S, Hewitt R, et al. Association of drug abuse with inhibition of HIV-1 immune responses: studies with long-term HIV-1 nonprogressors. *J Neuroimmunol*. 2004;147:21–25.

APPENDIX

The members of the Chemokine and Long-Term Nonprogressive Study Group and coauthors of this paper are as follows: Francesc Vidal, Joaquim Peraire, Consuelo Viladés, Montserrat Broch, Cristina Gutiérrez, Sergi Veloso, Maria Saumoy, Miguel López-Dupla, Montserrat Olona, Joan Josep Sirvent, and Cristóbal Richart (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili); Pere Domingo, M^a Antonia Sambeat, Àngels Fontanet, Josep

Cadafalch, and Montserrat Fuster (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona); Mireia Cairó, David Dalmau, and Anna Ochoa (Hospital Mútua de Terrassa); Enric Pedrol, Elisabeth Deig, and Anna Soler (Unitat de Malalties Infeccioses-VIH, Observatori de Salut Carles Vallbona, Hospital General de Granollers); Hernando Knobel, Milagros Montero, and Ana Guelar (Hospital del Mar de Barcelona); and Judit González (Pius Hospital de Valls).

6.3 Estudi 3.

“Absència de polimorfismes de la regió C-terminal de CXCR4 en espanyols infectats pel VIH-1 i en no infectats”.

Absence of CXCR4 C-Terminal Polymorphisms in HIV-1 Infected and Uninfected Spaniards.

Joaquim Peraire, MD, Montserrat Broch, PhD, Pere Domingo, MD, PhD, Enric Pedrol, MD, PhD, David Dalmau, MD, PhD, Hernando Knobel, MD, PhD, Consuelo Viladés, MD, Maria Antònia Sambeat, MD, PhD, Cristóbal Richart, MD, PhD, Francesc Vidal, MD, PhD.

J Acquir Immune Defic Syndr 2006;42:382-383.

Factor impacte (2006) : 3.9 ; (2007) : 4.4

Aquest estudi ha estat finançat per La Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834), la *Red Española de Investigación en SIDA* (TIS G03/173) i el *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 02/1282, 05/1501, 05/1591).

LETTER TO THE EDITOR

Absence of CXCR4 C-Terminal Polymorphisms in HIV-1-Infected and Uninfected Spaniards

To the Editor:

CC chemokine receptor 5 (CCR5) and CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) are the 2 main coreceptors used by HIV-1 to infect cells. Many studies suggest that some allelic variants of CCR5 modulate the risk of HIV-1 infection and the progression of the disease.¹ However, few data are available on the genetic variants of CXCR4, which is the chemokine receptor used by T-tropic (X4) HIV-1 strains.² We therefore read with great interest the excellent paper by Petersen et al³ that deals with polymorphisms at the SDF-1 and CXCR4 axis and HIV-1 infection and was published in the December 15, 2005 issue of your journal. The authors examined whether the risk of HIV-1 infection was associated with mutations in this chemokine and its cellular receptor. The study, which was performed in a homogenous sub-Saharan African population, found that CXCR4 was highly conserved in the population analyzed.

Our group also recently reported in your journal some studies on the influence of the allelic variants of some chemokines and chemokine receptors on the risk of HIV-1 infection and disease progression.⁴⁻⁶ In some patients from our cohort, we sequenced the C-terminal intracellular domain of the CXCR4 receptor gene. This domain has been shown to exert a critical role in cell chemotaxis and receptor internalization, a process that is necessary for appropriate SDF-1-mediated signal and HIV-1 coreceptor binding.^{7,8} We therefore investigated whether there are mutations in this encoding part of the C-terminal domain in Spaniards and, if detected, whether they are associated with the risk of HIV-1 infection and disease progression.

The coding region of the C-terminal domain was sequenced in 168 Spanish individuals of white ancestry from our study cohort. There were 70

healthy uninfected controls and 98 HIV-1-infected patients. The patient group was made up of 47 usual progressors and 51 long-term nonprogressors of more than 16 years (see references⁴⁻⁶ for cohort details and criteria for categorization). Informed consent was obtained from each participant. The primers used for the polymerase chain reaction were the following: forward: 5'-AGGCCCTAGCTTTCTCCAC-3' and reverse: 5'-CAAGACAAAAATCCAA CAAGCA-3', flanking a sequence of 318 base pairs. Polymerase chain reaction contained 100 ng of DNA, 0.2 μmol/L of each primer, 0.2 mmol/L of deoxyribonucleotide triphosphates, 2 mmol/L MgCl₂, and 1 U of Taq polymerase. The annealing temperature was 55.4°C. DNA fragments were purified and sequenced with forward and reverse primers using a Taq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit in an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Our results indicated that there were no mutations in the C terminus domain of CXCR4 intracellular region in either the HIV-1-infected patients or the control subjects.

Available information on the role of CXCR4 mutations on the natural history of HIV-1 infection is scarce. In whites, only 1 report found 2 mutations, but they did not modulate disease progression.⁹ Further studies also performed in the white population did not detect allelic variants in different coding regions of the gene, so population associations could not be assessed.^{10,11} This is consistent with the findings we present here, which also involved the white population. In another study, Liu et al¹² screened CXCR4 for mutations and found an up to 7 single nucleotide polymorphisms in Chinese Han people, although their functional significance and associations were not assessed. The most recent data, provided by Petersen et al,³ detected no significant mutations in South Africans of Xhosa descent. This suggests that the distribution of CXCR4 allelic variants may differ according to ethnicity; at present, no known mutations of the CXCR4 gene alter the risk of HIV-1 infection or influence disease progression, at least in several populations of white eth-

nicity and in South Africans of Xhosa descent. This is opposite to what occurs with CCR5, the other major HIV-1 coreceptor, whose allelic variants strongly determine both the risk of HIV-1 infection and disease progression.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by La Marató de TV3 (02/1830, 02/1831, 02/1832, 02/1833, 02/1834), the Spanish AIDS Research Network (RIS G03/173), and the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/1282, 05/1501, 05/1591).

APPENDIX A

The members of the Chemokines and Long-Term Nonprogressors Study Group and coauthors of the paper are the following: Francesc Vidal, Consuelo Viladés, Joaquim Peraire, Montserrat Broch, Cristina Gutiérrez, Miguel López-Dupla, Sergi Veloso, Maria Saumoy, Montserrat Olona, Cristóbal Richart (Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII and Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain); Pere Domingo, Maria Antonia Sambeat, Àngels Fontanet, Josep Cadafalch, Montserrat Fuster (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain); Enric Pedrol, Elisabeth Deig, Carme Villá (Unitat d'Infeccions-VIH, Hospital General de Granollers, Observatori de Salut Carles Vallbona, Granollers, Spain); David Dalmau, Anna Ochoa, Mireia Cairó (Fundació per a la Recerca, Hospital Mútua de Terrassa, Universitat de Barcelona, Terrassa, Spain); Hernando Knobel, Milagros Montero, Ana Guelar (Hospital del Mar, Barcelona, Spain); Judit González (Pius Hospital, Valls, Spain).

Joaquim Peraire, MD*
Montserrat Broch, PhD*
Pere Domingo, MD, PhD†
Enric Pedrol, MD, PhD‡
David Dalmau, MD, PhD§
Hernando Knobel, MD, PhD¶
Consuelo Viladés, MD*
Maria Antònia Sambeat, MD, PhD†
Cristóbal Richart, MD, PhD*
Francesc Vidal, MD, PhD*

*Hospital Universitari de Tarragona
Joan XXIII
Universitat Rovira i Virgili
Tarragona, Spain
†Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Universitat Autònoma de Barcelona
Barcelona, Spain
‡Hospital General de Granollers
Observatori de Salut Carles Vallbona
Granollers, Spain
§Hospital Mútua de Terrassa
Terrassa, Spain
¶Hospital del Mar, Barcelona, Spain

REFERENCES

1. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. International Meta-Analysis of HIV Host Genetics: effects of CCR5, CCR2-64I, and SDF-1 3A alleles of HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med.* 2001;135:782-795.
2. Lin YL, Portales P, Segondy M, et al. CXCR4 overexpression during the course of HIV-1 infection correlates with the emergence of X4 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39:530-536.
3. Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40:521-526.
4. Vidal F, Peraire J, Domingo P, et al. Lack of influence of SDF-1 3A variant allele on HIV-1 disease progression is extended beyond 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40:276-279.
5. Vidal F, Viladés C, Domingo P, et al. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the CX3CR1249I variant allele. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;40:527-531.
6. Vidal F, Peraire J, Domingo P, et al. Polymorphism of RANTES chemokine gene promoter is not associated with long-term non progressive HIV-1 infection of more than 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;41:17-22.
7. Orsini MJ, Parent JL, Mundell SJ, Benovic JL. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. *J Biol Chem.* 1999;274:31076-31086.
8. Roland J, Murphy BJ, Ahr B, et al. Role of intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood.* 2003;101:399-406.
9. Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, et al. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long term non progressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Delta32. *J Virol.* 1998;72:6215-6217.
10. Martin MP, Carrington M, Dean M, et al. CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1998;19:430.
11. Alvarez V, López-Larrea C, Coto E. Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum Genet.* 1998;102:483-486.
12. Liu MX, Wang FS, Hong WG, et al. Polymorphism of CXCR4 coding region of human immunodeficiency virus-1 in Chinese Han people. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2003;17:162-164.

6.4 Estudi 4.

"Els pacients infectats pel VIH-1 no progressadors (LTNP) tenen un dany mitocondrial mes lleu i una menor apoptosi aconduïda pel mitocondri en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica que els progresadors típics"

HIV-1-Infected Long-Term Non-Progressors have Milder Mitochondrial Impairment and Lower Mitochondrially-Driven Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells than Typical Progressors.

Joaquim Peraire, Òscar Miró, Maria Saumoy, Pere Domingo, Enric Pedrol, Francesc Villarroya, Esteban Martínez, Miguel López-Dupla, Glòria Garrabou, M^a Antònia Sambeat, Elisabet Deig, Joan Villarroya, Matilde Rodriguez-Chacón, Sònia López, Àngels Fontanet, Maija Holmstrom, Marta Giralt, Josep M^a Gatell and Francesc Vidal.

Current HIV Research 2007, 5, 467-473

Factor impacte (2007) : 2.6

Presentat en part en la 45th *annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washinton 2005 (abstract nº ICAAC05-A-1582-ASM), i en el 7th *International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV*, Dublin 2005 (Abstract nº 71)

Aquest estudi ha estat finançat per la *Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España* (FIPSE 310/00, 3161/00, 3661/06); *Fundación La Marató de TV3* (02/1830, 02/0210); *Red de Investigación de Mitocondrias* (V2003-REDC06E-0); *Ministerio de Sanidad y Consumo Instituto de Salud Carlos III, Red de Sida; Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 02/1282, 051501, 05/1591 and 07/0976) i el Suport de Grups de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2005/SGR/0300).

La Fundació Doctor Ferran ha premiat aquest estudi amb el **Premi Dr. Ferran i Clua** al millor treball d'investigació, convocatòria 2007.Tortosa.

HIV-1-Infected Long-Term Non-Progressors have Milder Mitochondrial Impairment and Lower Mitochondrially-Driven Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells than Typical Progressors[§]

Joaquim Peraire¹, Òscar Miró², Maria Saumoy¹, Pere Domingo³, Enric Pedrol⁴, Francesc Villarroya⁵, Esteban Martínez², Miguel López-Dupla¹, Glòria Garrabou², M^a Antònia Sambeat³, Elisabet Deig⁴, Joan Villarroya⁵, Matilde Rodríguez-Chacón¹, Sònia López², Àngels Fontanet³, Maija Holmstrom⁵, Marta Giralt⁵, Josep M^a Gatell² and Francesc Vidal^{*1}

¹Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; ²Hospital Clínic, IDI-BAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Hospital General de Granollers, Observatori de Salut Carles Vallbona, Granollers, Spain; ⁵Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona, CIBER Fisiopatologia Obesidad y Nutrición, Spain

Abstract: *Background:* Mitochondrial parameters in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and their relationship with mitochondrially-driven PBMC apoptosis were investigated in a group of HIV-1-infected long-term nonprogressors (LTNP) and compared with untreated asymptomatic HIV-1 infected typical progressors (TP) and uninfected healthy controls (HC).

Material and methods: Twenty-six LTNP, 27 TP and 31 HC were evaluated. Studies were performed in PBMCs. Mitochondrial DNA content (mtDNA) was assessed by quantitative real-time PCR. Activities of mitochondrial respiratory chain complexes (MRC) II, III and IV were determined by spectrophotometry. Caspase-3 activity was assessed by fluorimetry, and caspase-9 activation and Bcl-2 levels were assessed by immunoblotting.

Results: mtDNA abundance ($p < 0.05$), MRC complex II ($p < 0.001$), complex III ($p < 0.01$) and complex IV ($p = 0.01$) were lower in the TP group than in the HC group. In the LTNP group these parameters were similar to those of the HC group except for complex II, which was decreased ($p < 0.01$). The PBMC of TP showed the highest overall apoptotic activation, since their caspase-3 activity was greater than that of HC ($p < 0.05$) and LTNP. In the case of LTNP, however, the difference was non-significant. Caspase-9 and the caspase-9/Bcl-2 ratio were both over-expressed in TP compared to HC ($p < 0.01$) and LTNP ($p < 0.05$). Both of these measurements indicate that mitochondrially-driven apoptosis in TP is greater than in LTNP and HC. A relationship between mitochondrial damage and apoptotic activation was found in TP.

Conclusions: Mitochondrial damage is associated with increased PBMC apoptosis in patients with active HIV-1 replication (TP). These abnormalities are slight or not present in LTNP.

Keywords: HIV-1 infection, mitochondrial DNA, caspases, apoptosis, long-term nonprogressors, peripheral blood mononuclear cells.

INTRODUCTION

HIV-1 infection can induce mitochondrial derangement in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). A seminal study by Côté *et al.* found that the mitochondrial DNA (mtDNA) content in PBMC was lower in asymptomatic HIV-1-infected patients naive for antiretroviral therapy than in healthy controls [10]. This finding has been confirmed in further studies [6,9,24,26]. Some of our group have also

reported that the decrease in PBMCs mtDNA content is accompanied by an extensive mitochondrial dysfunction, involving both mitochondrial respiratory chain (MRC)-related and unrelated enzymes [24]. The fact that HIV-1 reduces PBMC mtDNA content and its bioenergetic function has therefore been convincingly demonstrated [6,9,10,24,26].

Whether this mitochondrial impairment has any consequence on the integrity of PBMCs *in vivo* is, however, unknown. Given the pivotal role of mitochondria as a key regulator of cell apoptosis, it is of paramount importance to investigate the possible relationship between HIV-1-induced mitochondrial derangement and apoptosis of PBMCs. We hypothesized that increased PBMC apoptosis induced by HIV may be linked with diffuse mitochondrial dysfunction. To test this hypothesis, in this study we have measured several mitochondrial and apoptosis parameters in HIV-1-infected patients and attempted to correlate the findings. We have selected two groups of HIV-1-infected patients who

*Address correspondence to this author at the Infectious Diseases and AIDS Section, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Mallafre Guasch, 4, 43007 Tarragona, Spain; Tel: 0034977295833; Fax: 0034977224011; E-mail: fvidal@comt.es

[§]Presented in part at the 45th annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington 2005 (abstract n° ICAAC05-A-1582-ASM) and at the 7th International Workshop on Adverse Drug Reactions and Lipodystrophy in HIV, Dublin 2005 (Abstract n° 71).

clearly differ in the extent of apoptosis activation. On the one hand, we studied untreated asymptomatic typical progressors (TP) who have already progressed and who show immunological decline and a high HIV-1 viremia. In this group, apoptotic-mediated cell death (even without direct viral infection) is responsible, at least in part, for the CD4+ T-cell decline over time [31,46]. On the other hand, we studied HIV-1-infected patients who were long-term non-progressors (LTNP). These patients have self-control of the infection and a low HIV-1 viral burden and it is widely accepted that resistance to HIV-1-induced apoptosis is one of the mechanisms behind the maintenance of high CD4+ T-cell counts [15].

PARTICIPANTS AND METHODS

Design, criteria and participants: We performed a cross-sectional study which involved three categories of participants: healthy controls (HC), HIV-1-infected LTNP and HIV-1-infected TP. All categories were matched by age (± 5 years). Patients were recruited from a prospectively collected cohort of almost 5000 HIV-1-infected patients followed-up at the HIV outpatient clinic of the four participating hospitals. Criteria for LTNP were: asymptomatic HIV-1 infection with a known duration of over 15 years, a stable CD4+ T-cell count persistently over 500 cells/ μ l and plasma HIV-1 viral load repeatedly under 5,000 copies/ml, in the absence of any antiretroviral treatment [18]. Untreated TP were individuals whose HIV-1 infection had progressed (i.e. if they had an HIV-1 viral load of over 35,000 copies/ml and a progressively declining CD4+ T-cell count over time that had gone below 350 cells/ μ l at least twice during the first eight years of infection) and who had not previously received or were not currently receiving antiretroviral drugs, were free of symptoms and had not suffered opportunistic infections until recruitment. For a few patients whose date of infection was unavailable, this was assumed to be the midpoint between the first positive and the last negative HIV-1 blood test [19]. We carefully checked that both HIV-1-infected patients and healthy controls had no conditions known to damage mitochondria, such as smoking, alcohol abuse or liver disease, and also that they were not taking drugs known to cause mitochondrial derangement [7]. Informed consent was obtained from each participant. The project was approved by the local ethical research committees.

We have already reported studies on the host genetic determinants of the LTNP state [40-43]. Our cohort is currently made up of 76 carefully chosen individuals who fulfill the criteria for LTNP mentioned above. Of these, 26 also satisfied the requirements for mitochondrial studies and agreed to participate. With respect to previously untreated TP, we randomly selected 27 patients who satisfied our predefined criteria for TP and the requirements for mitochondrial studies and who agreed to participate in the present study. As a control group we studied a sample of 31 healthy subjects recruited from voluntary blood donors.

Collection of blood samples: After an overnight fast, 20 mL of blood obtained from a peripheral vein was collected in Vacutainer™ EDTA tubes. PBMCs were isolated by means of Ficoll density gradient centrifugation (Histopaque®-1077, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). After isolation, PBMC were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and

stored frozen at -80°C until used in biochemical and genetic determinations. In our experience, less than 30 platelets per cell are present in the final suspension. Protein content was measured according to Bradford's method [5].

HIV-1 infection: This was diagnosed by a positive enzyme immunoanalysis and confirmed by a positive Western-Blot test.

Plasma HIV-1 viral load: This was determined by the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test v 1.5 using the COBAS AMPLICOR system (Roche Diagnostics®, Basel, Switzerland).

Assessment of blood CD4+ T-cell count: Samples were analyzed in a flow cytometer FAC Scan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®, San Jose, CA, USA). The data acquired were analyzed using the Multiset program.

PBMC mtDNA content: An aliquot of PBMC was used for extracting total DNA by a standard phenol-chloroform procedure. For mtDNA quantification, the nuclear house-keeping 18S rRNA gene and the highly conserved mitochondrial ND2 gene were amplified separately by quantitative real-time PCR (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Molecular Biochemicals®, Germany). The complete methodology use in our laboratory has been reported elsewhere [17].

Mitochondrial enzyme activities: Another aliquot of PBMC was used for the spectrophotometric analyses. Currently, isolated MRC complex I and complex V activities cannot be assessed in whole cells, because the former is not activated with decylubiquinone and because of the strong oligomycin-insensitive ATPase activity of the latter [17]. Hence, we only determined the enzyme activities of complexes II (exclusively encoded by nuclear DNA), III and IV (both partially encoded by mtDNA) following standard procedures proposed by Ruslin *et al.* [34] slightly modified for complex IV assessment [21]. In order to correct the enzyme activities for any eventual difference in cellular mitochondrial content, absolute activities were corrected by citrate synthase activity, which is considered to be a good marker of the mitochondrial content [4,17,24,30].

Studies of apoptotic parameters in PBMC: To assess overall (mitochondrial and extramitochondrial-dependent) PBMC apoptotic activation, caspase-3 activity was measured using the fluorimetric CaspACE Assay System (Promega, USA). This was based on the fluorimetric detection of amino-4-trifluoromethyl coumarin following proteolytic cleavage of the synthetic substrate DEVD-amino-4-trifluoromethyl coumarin [16]. PBMC were homogenized by 15 strokes of a 22G syringe in cell "lysis buffer" (25 mM Hepes, 5 mM MgCl₂, 5mM EDTA, 5 mM DTT, 2mM PMSF, 10 μ g/ml pepstatin A and 10 μ g/ml leupeptin) followed by 3 cycles of freezing/thawing. The cytosolic extracts to be assayed were then collected after 10,000 x g centrifugation for 20 min. Four hundred μ g protein, as determined by the Bradford Assay Kit (Bio-Rad), was used for the assays, which were performed according to the supplier. Assay specificity was assessed using 50 μ M M Z-VAD-FMK, a fluoromethyl ketone-derivatized peptide inhibiting caspase-3 (Promega, USA), which in all the assays led to a residual activity of less than 5% of the total activity detected. Results were expressed as fluorescence relative units/mg

Mitochondria and PBMC Apoptosis in HIV-1-LTNP

Current HIV Research, 2007, Vol. 5, No. 5 469

protein. We also analysed apoptotic activation through mitochondrial pathways by measuring the cleaved, active form of caspase-9 with a specific immunoblot assay [37]. Crude protein extracts containing 20 µg protein were mixed with 1/5 vol of a solution containing 50% glycerol, 10% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0.5% bromophenol blue and 0.5 M Tris (pH 6.8), incubated at 90°C for 5 min and electrophoresed on 0.1% SDS/13% polyacrylamide gels. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, USA). Blots were probed with a rabbit polyclonal antibody specific for the 35 kDa cleaved, active form, of human caspase-9 (Cell Signaling Technology 9505, Beverly, MA, USA)(1:1000) and further probed with mouse polyclonal antibodies for human Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology sc-599, Santa Cruz, CA, USA)(1:500) and for β-actin (Sigma A5441, St Louis, MI, USA) (1:10.000). Quantitative densitometric analysis of the active caspase-9 (35kDa), β-actin (47 kDa) and Bcl-2 (26 kDa) immunoblot signals was performed (Phoretics 1D Softward, Phoretic International Ltd, Newcastle, UK). Active caspase-9 immunoreactive signals were expressed either by β-actin to normalize for equal cell protein loading or by Bcl-2 to quantify the extent of activation of PBMC mitochondrially-driven apoptosis for a given amount of Bcl-2. This constitutes a kind of apoptotic index because it is expressed as a ratio between an apoptotic marker (caspase 9) and an antiapoptotic one (Bcl-2) as has already been reported [25].

Statistical analysis: In all experiments, TP and LTNP data were presented as relative values with respect to those of HC, which were arbitrarily assigned a value of 100%. The results in HIV-1-infected patients and controls were expressed as mean±SEM and compared using the unpaired Student's T test, the one-way analysis of variance (ANOVA) test for normally distributed data, and the Kruskal-Wallis test when non-parametric tests were necessary. A linear regression was also performed to find relationships between the quantitative variables. In all cases, a P value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Characteristics of the Participants

We studied 84 individuals, of whom 53 were HIV-1-infected (26 LTNP and 27 TP) and 31 HC. None had a personal or family history suggesting neuromuscular or mitochondrial disorders or were taking drugs known to provoke

mitochondrial derangement. All subjects had normal acid-base equilibrium. The main demographic and clinical characteristics of the groups are shown in Table 1. Men predominated in the HC and TP groups, while in the LTNP group the gender distribution was balanced. This was of low significance because the mtDNA content and MRC complexes for male and female patients were similar in the three groups defined (data not shown). As expected by the case definition of LTNP and TP, these groups differed in duration of infection, CD4+ cell count and plasma HIV-1 viral load.

mtDNA content and mitochondrial enzyme activities: With respect to HC, the mtDNA content of TP decreased (p<0.05), while that of LTNP remained unchanged (Fig. 1). TP exhibited a decrease in MRC enzyme activities with respect to healthy controls. This was statistically significant for complex II (p<0.001) and complex III (p<0.01) (Fig. 1). In contrast, the MRC enzyme activities of LTNP were not significantly different from those of HC, with the exception of complex II, which was 75% of that found in HC (p<0.01) (Fig. 1).

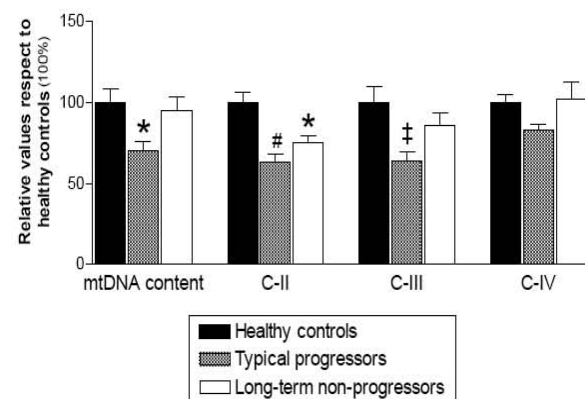


Fig. (1). Mitochondrial parameters evaluated in present study. Results are expressed in mean ± SEM. mtDNA: mitochondrial DNA content; C-II: complex II activity, C-III: complex III activity; C-IV: Complex IV activity. *: p<0.05 respect to healthy controls (HC); †: p<0.01 respect to HC; #: p<0.001 respect to HC.

PBMC apoptotic studies: A sample of PBMC useful for performing studies of apoptotic parameters, was available for 40 of the 53 HIV-1-infected patients (19 LTNP and 21 TP), and for 20 HC. The main characteristics of these patients did

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of the Participants

	Healthy controls	TP	LTNP
Number of patients	31	27	26
Age in years (mean ± SD)	41 ± 11	38 ± 12	42 ± 9
Males : Females (n°)	22:9	21:6	13:13
Duration of infection in years (mean ± SD)		5.7±1.7 ^a	16.9 ± 1.3 ^a
CD4+T cell count/mm3 (mean ± SD)		267 ± 92 ^a	763 ± 176 ^a
log ₁₀ HIV RNA copies/mL (mean ± SD)		4 ± 0.9 ^a	2.5 ± 0.8 ^a

TP: HIV-1-infected patients usual progressors.
 LTNP: HIV-1-infected patients long-term non-progressors.
^ap < 0.0001.

not differ from those of the group as a whole. We detected a marked increase in caspase-3 activity in TP, which indicated increased overall apoptosis activation (Fig. 2). There was a similar increase in apoptotic activation involving mitochondrial pathways in TP because the cleaved, active form of caspase-9 (a major effector of mitochondrially driven apoptosis), was four times higher in TP than in HC ($p < 0.01$ with respect to HC and $p < 0.05$ with respect to LTNP, Fig. 2). Similar results were obtained when caspase-9 activity was corrected by a given amount of Bcl-2 levels. Conversely, although for LTNP the quotients of all apoptotic markers were higher than those of HC, they were located midway between HC and TP values and did not reach statistical significance (Fig. 2).

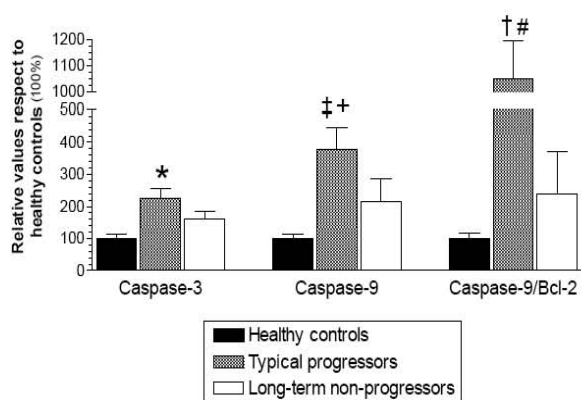


Fig. (2). PBMC apoptotic parameters evaluated in the present study. Results correspond to caspase-3 activity (absorbance units/mg protein) and to active caspase-9 (densitometric scanning of the 35 kDa immunoblot signal for the cleaved caspase-9 referred to the 47 kDa β -actin signal or to the 26 kDa Bcl-2 signal). Data are expressed as percentages of control values and are mean \pm SEM. *: $p < 0.05$ with respect to healthy controls (HC); †: $p < 0.01$ with respect to HC; ††: $p < 0.001$ with respect to HC; +: $p < 0.05$ with respect to long-term non-progressors (LTNP); #: $p < 0.01$ with respect to LTNP.

In correlation analysis involving all HIV-1-infected patients, we found a relationship between markers of mitochondrial damage and markers of apoptosis, which was more manifest in the TP subgroup of patients than in LTNP subgroup of patients. Fig. 3 illustrates one of these studies, and shows an inverse relationship between mtDNA content and caspase-9. Likewise, we found a mild correlation between HIV-1 replication (measured as plasma viral load) and the increase in mitochondrial damage (measured as both mtDNA content and complex III activity) and apoptosis activation (Fig. 4).

DISCUSSION

This study confirms that PBMC from HIV-1 infected patients with uncontrolled infection (typical progressors) have diffuse mitochondrial damage and show increased apoptosis which at least involves the mitochondrial-dependent pathway of apoptosis. It also shows that PBMC from LTNP have more preserved mitochondria and lower apoptotic activation than untreated TP despite the much longer duration of their HIV-1 infection. Our data also indi-

cate that, in HIV-1 infected patients, PBMC apoptosis mediated by mitochondria correlates positively with mitochondrial damage and with the HIV-1 viral burden. Altogether, our results suggest that there is a relationship between PBMC mitochondrial damage and apoptotic activation, and offer indirect evidence that such disturbances could be influenced by the amount of viral burden. We recognize, however, some limitations to our study. First, it is a cross-sectional design, so we are unable to determine cause-effect relationships and, second, our findings in PBMC as a whole may not necessarily reflect what occurs in CD4+ T-cells. Moreover, we have chosen a set of experiments that closely represent what happens in mitochondrial function, and take into account the previously demonstrated effects of HIV-1 on such organelles, i.e. mtDNA depletion and decreased MRC activities irrespective of whether they are or are not encoded by mitochondrial DNA [22]. We acknowledge, however, that a complete evaluation of mitochondrial functions was not carried out, since we did not assess substrate oxidation, mitochondrial membrane potential or ATP production. Finally, the apoptosis analysis relied on caspase measurements rather than apoptosis itself, but this enabled us to distinguish between overall apoptotic activation (shown by caspase-3 activity) and mitochondria-dependent activation of apoptosis (shown by caspase-9 activation).

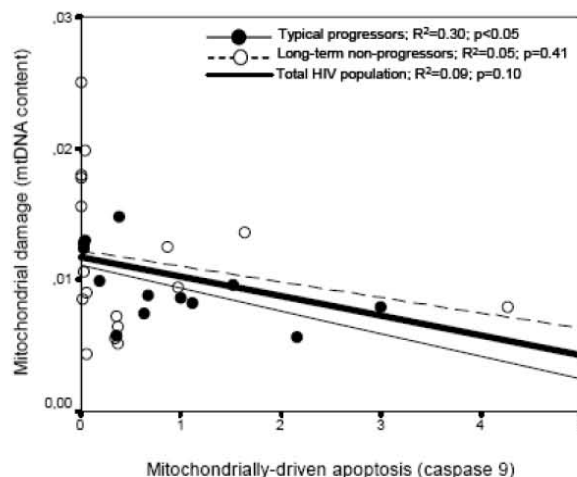


Fig. (3). Dots diagram and regression lines assessing the relationship between caspase-9, as a surrogate marker of mitochondrially-driven apoptosis, and mtDNA content, as a surrogate marker of HIV-1-mitochondrial damage. Data show a relationship between greater caspase-9 activity and lower mtDNA content. This relationship is only statistically significant for typical progressors.

At present, there is a great deal of evidence to suggest that HIV-1 facilitates the apoptosis of affected cells, leading to various sorts of organ damage [3,8,14,33,38]. It has also been proven that HIV-1-related mtDNA depletion and mitochondrial impairment are present even in PBMC of untreated asymptomatic patients who already have a decreased CD4+ T-cell count [10,24]. Many HIV-1 proteins have been proposed as being responsible for this. Among them, gp120, Tat, Nef and Vpr have been shown to cause dysregulation of the Bcl-2 family members expression, increase in mitochondrial-membrane permeabilization, cytochrome *c* release, and loss of mitochondrial transmembrane potential, all of which

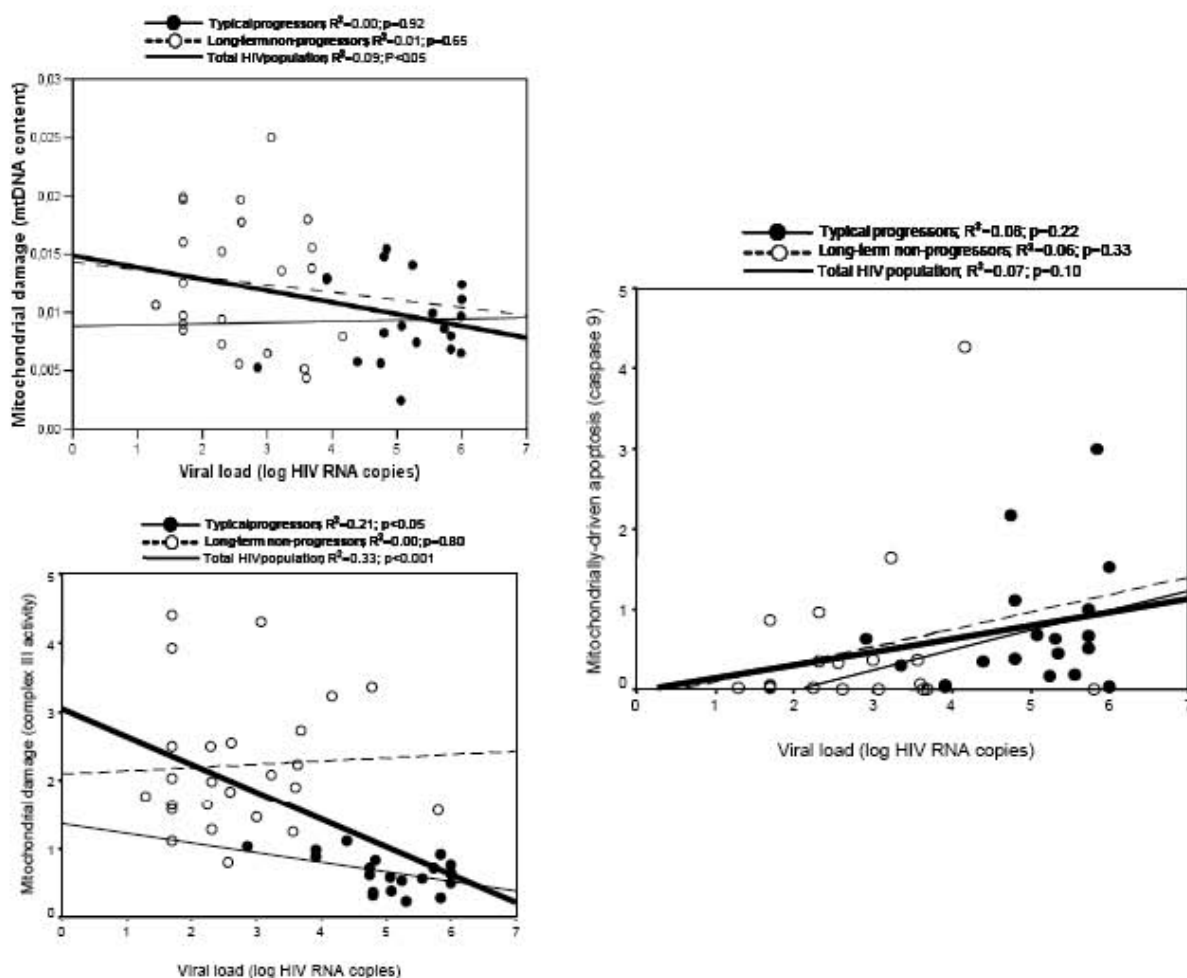


Fig. (4). Dots diagram and regression lines assessing the relationship between plasma viral load, as a surrogate marker of viral replicative activity, and mtDNA content (top left) and complex III (bottom left), both as surrogate markers of mitochondrial damage, and caspase-9 activation, as a surrogate marker of mitochondrially-driven apoptosis (right). Data show a relationship between greater viral load, lower mtDNA content and complex III activity, and greater caspase-9 activity. This relationship is only statistically significant for mitochondrial damage when the HIV-1-infected population is considered as a whole.

lead to cell apoptosis [1-3,13,30,33,39]. It is reasonable to assume that there is a relationship between both processes and the negative relationship between apoptotic activity and mtDNA content agrees with this hypothesis. Additionally, the negative correlation between mtDNA content and apoptosis is greater for TP than for LTNP (Fig. 3), which also suggests that apoptosis has a role in the development of mitochondrial damage. It should also be noted that an emerging body of literature suggests a link between LTNP and apoptosis dysregulation, and mutations within Vpr impact on the mitochondriotoxic effects of this HIV-1-related protein [18,33] and can confer LTNP status.

With respect to caspase-9 activity, it has previously been shown that the HIV-1 protein Vpr induces apoptosis of PBMC through down-regulation of Bcl-2 and over-induction of caspase [28]. The Bcl-2 amount in mitochondria is more indicative of the sensitivity of cells to activate apoptosis in response to insults through pathways involving mitochondria

rather than the mitochondrially-driven apoptotic activity per se, which is more clearly evidenced by other parameters such as caspase-9 activity. Our results agree with this scenario since we found that activation of caspase-9 was higher in TP than in LTNP (the viral replication and mass of the former are greater) and that in our patients there was a trend towards a relationship between mitochondrially-driven apoptosis and viral load.

Our results may also eventually explain the different immunologic slope of TP and LTNP over time. LTNP are a subset of patients that show self-control of the disease, a low HIV-1 viral burden and persistently elevated CD4+ T-cell counts over many years [20]. The LTNP group presented here were patients who had been living with HIV-1 for up to 15 years or even more, and had therefore been exposed to HIV-1 products for a long time, though at low levels of intensity. It should be noted that we provide evidence that the HIV-1 viral mass probably determines mitochondrial dam-

age since low-invasive HIV-1 infection, which is what is found in the LTNP, produces less mitochondrial derangement than that of TP (which have a markedly greater viral burden). Apart from primary mitochondrialopathies [11], most of the acquired toxic [12,23] and drug-induced [35,36,44] mitochondrial disorders are thought to be related to the amount of inoculum and the duration of exposure. In this respect, an earlier study of several mitochondrial functional data in LTNP found that superoxide generation in these patients was decreased, and that the mitochondrial transmembrane potential was preserved. These data were consistent with a well-preserved MRC function, which in turn was associated with a decreased rate of CD4+ and CD8+ T-cell apoptosis [27]. In this previous study, however, the comparator group was made of patients who had progressed to AIDS and were receiving zidovudine, so it can not be ruled out that this drugs had a cumulative deleterious (and therefore confusing) effect on mitochondrial parameters [45]. Despite this bias, our results are consistent with those of Moretti *et al.* [27].

It can be speculated that LTNP probably do not reach the threshold of cumulative insults required to produce significant PBMC mitochondrial damage. Irrespective of the final mechanisms involved in these changes, we can conclude that HIV-1-infected patients LTNP have lower PBMC mitochondrially-driven apoptosis and better preserved mitochondria than TP.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundación para la Investigación y la Prevención del Sida en España (FIPSE 3102/00, 3161/00 and 36610/06); Fundació La Marató de TV3 (02/1830 and 02/0210); Red de Investigación en Mitochondrias (V2003-REDC06E-0); Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Red de Sida; Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/1282, 051501, 05/1591 and 07/0976) and Suport a Grups de Recerca de la Generalitat de Catalunya (2005/SGR/0300). The comments and criticisms of the two anonymous reviewers are highly appreciated. John Bates kindly improved the English text.

REFERENCES

[1] Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. (2003). Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Journal of General Virology*, 84:1649-1661.

[2] Andersen JL, Planelles V. (2005). The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Current HIV Research* 3: 43-51.

[3] Badley A D, Roumier T, Lum JJ, Kroemer G. (2003). Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends in Pharmacological Sciences* 24:298-305.

[4] Barrientos A.(2002). *In vivo* and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26:307-316.

[5] Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72:248-254.

[6] Casula M, Bosboom-Dobbelaer I, Smolders K, Otto S, Bakker M, de Baar MP, Reiss P, de Ronde A. (2005). Infection with HIV-1 induces a decrease in mtDNA. *Journal of Infectious Diseases* 191:1468-1471.

[7] Chang K, Truong D, Shangari N, O'Brien PJ. (2005). Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 1:655-669.

[8] Chen W, Sulcove J, Frank I, Jaffer S, Ozdener H, Kolsson DL. (2002). Development of a human neuronal cell model for human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-induced neu-

rotoxicity: apoptosis induced by the HIV type 1 primary isolates and evidence for involvement of the Bcl-2/Bcl-xL-sensitive intrinsic apoptosis pathway. *Journal of Virology* 76:9407-9419.

[9] Chiappini F, Teicher E, Saffroy R, Pham P, Falissard D, Barrier A, Chevalier S, Debuire B, Vittecoq D, Lemoine A. (2004). Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA, as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients. *Laboratory Investigation* 84:908-914.

[10] Côté HCF, Brumme ZL, Craib KJ, Alexander CS, Wynhoven B, Ting L, Wong H, Harris M, Harrigan PR, O'Shaughnessy MV, Montaner J. (2002). Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *New England Journal of Medicine* 346:811-820.

[11] Di Mauro S, Schon EA. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal of Medicine* 348:2656-2668.

[12] Hoek GB, Cahill A, Pastorino JG. (2002). Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 122:2049-2063.

[13] Jacotot E, Ferri KF, El Hamel C, Brenner C, Druillenec S, Hoebeke J, Rustin P, Metivier D, Lenoir C, Geuskens N, Vieira HL, Loeffler M, Belzacq AS, Briand JP, Zamzami N, Edelman L, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G. (2001). Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *Journal of Experimental Medicine* 193:509-519.

[14] Keswani SC, Pardo CA, Chery CL, Hoke A, McArthur JC. (2002). HIV-associated sensory neuropathies. *AIDS* 16:2105-2117.

[15] Liegler TJ, Yonemoto W, Elbeik T, Vittinghoff E, Buchbinder SP, Greene WC. (1998). Diminished spontaneous apoptosis in lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected long-term non-progressors. *Journal of Infectious Diseases* 178:669-679.

[16] Liu X, Wang X. (2000) *In vitro* assays for caspase-3 activation and DNA fragmentation. *Methods Enzymology* 322:177-182.

[17] López S, Miró O, Martínez E, Pedrol E, Rodríguez-Santiago B, Milinkovic A, Soler A, Garcia-Viejo MA, Nunes V, Casademont J, Gatell JM, Cardellach F. (2004). Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients. *Antiviral Therapy* 9:47-55.

[18] Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, Weaver JG, Gomez TS, Yao XJ, Lynch D, Pilon AA, Hawley N, Kim JE, Chen Z, Montpetit M, Sanchez-Dardon J, Cohen EA, Badley AD. (2003). Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 111:1547-1554.

[19] McDermott D, Beecroft MJ, Kleeberger CA, Al-Sharif FM, Ollier WE, Zimmerman PA, Boatman BA, Leitman SF, Detels R, Hajeer AH, Murphy PM. (2000). Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 14:821-826.

[20] Mikhail M, Wang B, Saksena NK. (2003). Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Reviews* 5:230-244.

[21] Miró O, Cardellach F, Barrientos A, Casademont J, Rötig A, Rustin P. (1998). Cytochrome c oxidase assay in minute amounts of human skeletal muscle using single wavelength spectrophotometers. *Journal of Neurosciences Methods* 80:107-111.

[22] Miró O, López S, Pedrol E, Rodríguez-Santiago B, Martínez E, Soler A, Milinkovic A, Casademont J, Nunes V, Gatell JM, Cardellach F. (2003). Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are associated with lipodystrophy in HIV-infected patients on HAART. *Antiviral Therapy* 8:333-338.

[23] Miró O, López S, Martínez E, Rodríguez-Santiago B, Blanco JL, Milinkovic A, Miro JM, Nunes V, Casademont J, Gatell JM, Cardellach F. (2003). Reversible mitochondrial respiratory chain impairment during symptomatic hyperlactatemia associated with antiretroviral therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses* 19:1027-1032.

[24] Miró O, López S, Martínez E, Pedrol E, Milinkovic A, Deig E, Garrabou G, Casademont J, Gatell JM, Cardellach F. (2004). Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clinical Infectious Diseases* 39:710-716.

[25] Miró O, Villarroya J, Garrabou G, Lopez S, Rodriguez de la Concepcion M, Pedrol E, Martinez E, Giralt M, Gatell JM, Cardellach F, Casademont J, Villarroya F. (2005). In-vivo effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfi-

- navir on mitochondrial-driven apoptosis. *Antiviral Therapy* 10:945-951.
- [26] Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Twamoto A. (2003). Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *Journal of Medical Virology* 70:497-505.
- [27] Moretti S, Marcellini S, Boschini A, Famularo G, Santini G, Alesse E, Steinberg SM, Cifone MG, Kroemer G, De Simone C. (2000). Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. *Clinical and Experimental Immunology* 122:364-373.
- [28] Muthumani K, Hwang DS, Desai BM, Zhang D, Dayes N, Green DR, Weiner DB. (2002). HIV-1 Vpr induces apoptosis through Caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:37820-37831.
- [29] Pallotti F, Lenaz G. (2001). Isolation and Subfractionation of Mitochondria from Animal Cells and Tissue Culture Lines. In: Pon LA, Schon EA eds, *Methods in Cell Biology*. San Diego, Academic Press. pp 1-35.
- [30] Petit F, Arnoult D, Lelièvre JD, Moutouh-de-Parseval L, Hance AJ, Schneider P, Corbeil J, Ameisen JC, Estaquier J. (2002). Productive HIV-1 infection of primary CD4+ cells induces mitochondrial membrane permeabilization leading to caspase-independent cell death. *Journal of Biological Chemistry* 277:1477-1487.
- [31] Plymale DR, Ng Tang DS, Comardelle AM, Fermin CD, Lewis DE, Garry RF. (1999). Both necrosis and apoptosis contribute to HIV-1-induced killing of CD4 cells. *AIDS* 13:1827-1839.
- [32] Rajan D, Wildum S, Rucker E, Schindler M, Kirchhoff F. (2003). Effect of R77Q and R80A changes in Vpr on HIV-1 replication and CD4 T cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. *AIDS* 20:831-836.
- [33] Roshal M, Zhu Y, Planelles V. (2001). Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 6:103-116.
- [34] Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta* 228: 35-51.
- [35] Setzer B, Schelsier M, Walker UA. (2001). Effects of didanosine-related depletion of mtDNA in human T lymphocytes. *Journal of Infectious Diseases* 191:848-855.
- [36] Setzer B, Schlesier M, Thomas AK, Walker UA. (2005). Mitochondrial toxicity of nucleoside analogues in primary human lymphocytes. *Antiviral Therapy* 10:327-334.
- [37] Stennicke HR, Salvesen GS. (2000). Caspase assays. *Methods Enzymology* 322:91-100.
- [38] Twu C, Liu NQ, Popik W, Bukrinsky M, Sayre J, Roberts J, Rania S, Bramhandam V, Roos KP, MacLellan WR, Fiala M. (2002). Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion- and death receptors-controlled pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:14386-14391.
- [39] Varvanov M, Espert L, Biard-Piechazick M. (2006). Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by the HIV-1 viral proteins. *AIDS Reviews* 8:221-236.
- [40] Viladés C, Broch M, Plana M, Domingo P, Alonso-Villaverde C, Pedrol E, Montero M, Dalmau D, Peraire J, Gutiérrez C, López A, Sambeat MA, Olona M, Garcia F, Richart C, Gatell JM, Vidal F. (2007). Effect of genetic variants of *CCR2* and *CCL2* on the natural history of HIV-1 infection: *CCL2-2518G/G* is over-represented in a cohort of Spanish HIV-1-infected subjects. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 44:132-138.
- [41] Vidal F, Peraire J, Domingo P, Broch M, Knobel H, Pedrol E, Dalmau D, Viladés C, Sambeat MA, Gutiérrez C, Richart C. (2005). Lack of association of SDF-1 3' variant allele with long-term nonprogressive HIV-1 infection is extended beyond 16 years. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 40:276-279.
- [42] Vidal F, Viladés C, Domingo P, *et al.* (2005) Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the *CX3CR1* 249I variant allele. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 40:527-531.
- [43] Vidal F, Peraire J, Domingo P, Broch M, Cairó M, Pedrol E, Montero M, Viladés C, Gutierrez C, Sambeat MA, Fontanet A, Dalmau D, Deig E, Knobel H, Sirvent JJ, Richart C. (2006). Polymorphism of RANTES chemokine gene promoter is not associated with long-term nonprogressive HIV-1 infection of more than 16 years. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 41:17-22.
- [44] Walker UA, Bauerle J, Laguno M, Murillas J, Mauss S, Schmutz G, Setzer B, Miquel R, Gatell JM, Mallolas J. (2004). Depletion of mitochondrial DNA in liver under antiretroviral therapy with didanosine, stavudine, or zalcitabine. *Hepatology* 39:311-317.
- [45] Yamaguchi T, Katoh I, Kurata S. (2002). Azydothymidine causes functional and structural destruction of mitochondria, glutathione deficiency and HIV-1 promoter sensitization. *European Journal of Biochemistry* 269:2782-2788.
- [46] Yue FY, Kovacs CM, Dimayuga RC, Gu XX, Parks P, Kaul R, Ostrowski MA. (2005). Preferential apoptosis of HIV-1-specific CD4+ T cells. *Journal of Immunology* 174:2196-2204.

Received: March 1, 2007

Revised: May 22, 2007

Accepted: May 27, 2007

7. Discussió

Com hem descrit detalladament en la introducció d'aquesta tesi, la història natural de la infecció pel VIH-1 varia àmpliament entre els infectats. Des de fa alguns anys, un dels grups de pacients infectats pel VIH-1 més atractius per l'estudi, degut a les seves peculiars característiques, han estat els LTNP.^{93,94} L'existència d'aquest grup de pacients suggereix que alguns individus són capaços de contenir la multiplicació del VIH-1, i per tant controlar la infecció de manera natural. Els factors que condicionen aquesta peculiar manera d'evolució no són ben coneguts.

Per aquesta raó, la nostra Unitat de Malalties Infeccioses i VIH/SIDA va encetar una línia de recerca per estudiar els factors genètics de l'hoste que poden influir en la història natural de la infecció. Entre aquest factors, el nostre grup ha dedicat els esforços a l'estudi dels SNP genètics dels coreceptors cel·lulars utilitzats pel VIH-1 i dels seus lligands les quimiocines, particularment en el subgrup de pacients LTNP, de la població espanyola de raça blanca. Tres estudis d'aquesta tesi s'inclouen dins d'aquesta línia de recerca immunogenètica.

D'altra banda, la constatació en els darrers anys de que el VIH-1 pot induir dany mitocondrial en les CMSP,¹³⁹⁻¹⁴² que la disminució de l'ADNmt s'associa a una disfunció mitocondrial generalitzada¹⁴³ i que el mitocondri té un paper fonamental en la regulació de l'apoptosi,¹³⁷ ha motivat que la nostra unitat, juntament amb els altres centres participants, investigués la possible relació entre els danys mitocondrials induïts pel VIH-1 i l'apoptosi en les CMSP, avaluant-ne la seva influència en l'estat de LTNP. El quart estudi d'aquesta tesi està emmarcat dins d'aquesta línia d'immunopatogènia.

Estudis immunogenètics.

Variant al·lèlica SDF-1 3'A i influència sobre el risc d'infecció i la progressió de la infecció pel VIH-1.

El primer estudi d'aquesta tesi demostra que ser portador de la variant al·lèlica SDF-1 3'A no s'associa amb l'estat de LTNP en pacients espanyols blancs infectats pel VIH-1, i que tampoc influeix en el risc d'infecció. Aquestes troballes són independents de la presència de l'al·lel CCR5Δ32. Tampoc s'ha observat cap relació entre l'al·lel mutat, la càrrega viral i el recompte de limfòcits CD4+ en els LTNP. Igualment, quan s'analitza el subgrup de *controladors d'elit*, tampoc s'observa una associació a aquesta variant al·lèlica (dades no mostrades a la publicació).

Sis estudis han avaluat el paper de les mutacions de SDF-1 en el subgrup de pacients LTNP amb resultat contradictoris.⁴⁶⁻⁵¹ Tres d'aquests estudis no tenien grup control,⁴⁶⁻⁴⁸ la qual cosa dificulta molt l'avaluació de les seves dades. Només un d'aquests tres va demostrar una relació de la variant al·lèlica SDF-1 3'A i LTNP.⁴⁶ La dificultat d'interpretació dels resultats deguda a l'absència de grup control, és posada en evidència per les troballes del nostre estudi. Si ens fixem només en els nostres dos subgrups de pacients infectat pel VIH-1, les nostres dades demostren que l'al·lel mutat 3'A tendeix a estar menys present en els PT que en els LTNP, encara que les diferències no són estadísticament significatives ($p=0.08$). Això, suggereix una tendència a l'associació de la variant al·lèlica 3'A amb LTNP. Amb tot, quan comparem aquests subgrups d'infectats amb el grup de controls sans, trobem que la prevalença de l'al·lel mutat 3'A en els LTNP i controls sans és similar (28%, 26,5% respectivament), però és marcadament inferior en els PT (19%). Com aquestes diferències no són significatives, el nostre anàlisi final conclou que les mutacions en el locus SDF-1 no s'associen amb l'estat de LTNP. D'altra banda, els altres 3 estudis que analitzaven grup control,⁴⁹⁻⁵¹ també ofereixen dades discordants, i cap dels tres va trobar associació entre la variant al·lèlica 3'A i LTNP.

Així doncs, una pregunta a plantejar-se és per quina raó no s'ha pogut reproduir la informació inicial de l'associació del genotip homozigot 3'A amb progressió de la infecció.⁴¹ Cal destacar, que aquest primer estudi suggeria un més fort efecte genètic sobre la progressió, que el que va ser trobat en els estudis següents.^{41, 49-51} Com s'ha apuntat en altres llocs, el biaix en la selecció, així com la diversitat de població o raça en els estudis, són una explicació plausible del perquè els primers estudis d'associació genètica tendeixen a sobreestimar l'efecte que confereixen els SNP genètics, un efecte que posteriors estudis han demostrat que es mes modest o inexistent.¹⁴⁵ A més a més, la baixa potencia estadística d'alguns d'aquest estudis motiva que ofereixin unes dades inconsistentes, contribuint a la falta de reproductibilitat.¹⁴⁶

Finalment, no hi ha homocigots CCR5Δ32 a la població analitzada i no hem trobat associació entre heterozigot CCR5Δ32 i LTNP, ja que la freqüència d'aquest al·lel està igual representada en els LTNP i PT. Així doncs, no hem pogut reproduir el efecte protector de CCR5Δ32 sobre la progressió de la infecció que han trobat altres autors.²⁴⁻²⁷ Tanmateix, els nostres resultats estan d'acord amb aquells dos estudis que no troben una associació entre heterozigot CCR5Δ32 i retard en el deteriorament immunològic, en pacients infectats pel VIH-1 usuaris de drogues per via parenteral.^{147,148} Cal destacar, que la majoria dels nostres pacients van adquirir la infecció pel VIH-1 a través de l'ús compartit d'agulles o xeringues, i que la via de transmissió és un dels determinants majors de la resposta immune vers el VIH-1¹⁴⁹ i la evolució de la infecció, de manera que és plausible que la influència dels factors genètics sobre la progressió depengui de la via de transmissió. Com s'ha explicat a la introducció d'aquesta tesi (secció 1.3.2; pàgina 29), en la transmissió sexual el virus utilitza, per entrar a les cèl·lules que infecta, principalment el coreceptor CCR5, degut a la síntesis incrementada de SDF-1 per part de les cèl·lules presentadores i de l'epiteli vagina i intestinal, induint un bloqueig del coreceptor CXCR4, mentre que en la transmissió per via parenteral el VIH-1 pot utilitzar més fàcilment qualsevol dels dos coreceptors.

Polimorfismes en el promotor del gen de la quimiocina RANTES , risc d'infecció pel VIH-1 i LTNP.

En el segon dels estudis d'aquesta tesi es demostra l'absència de relació entre els SNP -28C>G, -109T>C, i -403G>A en el promotor del gen de la quimiocina RANTES i els pacients no progressadors o progressadors lents, en una cohort d'espanyols blancs que van adquirir la infecció pel VIH-1, majoritàriament , a través de l'ús compartit de agulles o xeringues (ús de drogues per via parenteral). Aquesta falta d'associació es manté quan analitzem el subgrup de pacients *controladors d'elit* (dades no mostrades a la publicació). Tampoc es troba diferències en el genotip i la distribució al·lèlica entre el grup d'infectats pel VIH-1 i els controls sans, no evidenciant cap genotip o haplotip que predisposi o protegeixi de la infecció pel VIH-1. Aquestes troballes són independents de la presència de l'al·lel CCR5 Δ 32.

Treballs previs han estudiat la influència dels SNP en la regió promotora de RANTES sobre la epidemiologia i la història de la infecció pel VIH-1,^{52-59,150} però a diferència del nostre estudi, cap s'ha realitzat en pacients LTNP. Els resultats d'aquests estudis son contradictoris i depenen de la població analitzada. Així doncs, s'ha vist que la presència de l'al·lel mutat -403A incrementa la susceptibilitat a la infecció pel VIH-1 en americans de raça blanca⁵³⁻⁵⁴ i xinesos Han,⁵⁵ però no en japonesos⁵², espanyols (com al nostre estudi),⁵⁶ o en altre cohorts estudiades.⁵⁷⁻⁵⁹ Altres autors han trobat que l'al·lel salvatge -403G s'associa a un increment de la susceptibilitat de la infecció en individus xinesos.¹⁵⁰ Si més no, els resultats d'aquests treballs s'han d'interpretar amb molta cura, ja que alguns d'ells, com passa en el nostre treball, no comptaven amb un grup control de persones repetidament exposades no infectades (ENIs), formant part del grup control donants de sang amb desconegudes pràctiques de risc per adquirir el VIH-1, la qual cosa suposa una limitació per a poder avaluar la verdadera influència d'aquestes variants genètiques en la modulació del risc d'infecció. Així doncs, es molt probable que en les persones infectades pel VIH-1, les pràctiques de risc eclipsen el possible efecte protector d'algun particular genotip o haplotip de RANTES. En aquest sentit, un estudi recent en persones de raça blanca, no trobà diferències en el genotip de

RANTES entre persones infectades pel VIH-1 i ENIs,⁵⁷ suggerint que les variants al·lèliques de RANTES no tenen un paper predisposant o protector vers la infecció VIH-1.

Entre les persones infectades, i en relació a la progressió de la infecció, l'al·lel mutat -403A s'ha associat amb una descens més lent de limfòcits CD4+ i una progressió més lenta a SIDA en algunes cohorts multiètniques^{53,54}. La informació sobre la població japonesa es discordant, per què alguns estudis no troben cap efecte⁵² i altres troben alentiment de la progressió.⁵⁸ Altres estudis en subjectes americans d'origen africà troben que homozigots per haplotips de RANTES que contenen l'al·lel salvatge -403G presenten una càrrega viral baixa en fases inicials de la infecció comparades amb la que presenten altres haplotips, anticipant una més lenta progressió de la infecció.¹⁵¹ D'altra banda, la influència de l'al·lel mutat -28G sobre la progressió de la infecció, també depèn de les ètnies, amb estudis que van des de cap efecte en una cohort multiètnica,⁵³ a progressió lenta en japonesos,^{52,58} i ràpida progressió a SIDA en xinesos.¹⁵⁰ Aquí tampoc cap dels estudis analitzats, s'han adreçat a LTNP com en el nostre estudi. El resultat del nostre treball indiquen que les variants al·lèliques de RANTES no modulen la evolució d'aquest particular subgrup de pacients infectats pel VIH-1. Encara que l'al·lel mutat -28G va ser més freqüent en els LTNP que en els progressadors típics (5% vs. 2%), la diferència va ser estadísticament no significativa. No obstant això, reconeixem que degut al nombre petit de pacients estudiats, l'anàlisi estadístic té poca potència, ja que la potència de la comparació va ser menor del 40%.

Quan comparem les dades obtingudes en aquest treball amb les de la literatura, trobem que la influència de les variants al·lèliques del promotor del gen RANTES sobre el risc de infecció pel VIH-1 i la progressió de la infecció varia àmpliament i depèn de l'origen dels subjectes estudiats. De fet, les dades de la distribució dels haplotips de RANTES en els nostres pacients, estan estretament relacionades amb les dades de cohorts de persones de raça blanca,⁵³ però són molt diferents de les dels asiàtics.⁵² Això fa plausible la hipòtesi que la influència del genotip RANTES pot ser variable en els diferents grups ètnics.

Finalment, no hem trobat associació entre heterozigot CCR5Δ32 i LTNP, ja que la freqüència d'aquest al·lel no està incrementada en aquest subgrup de pacients, com ja hem comentat en el nostre primer estudi.

Polimorfismes de la regió que codifica pel domini C-terminal CXCR4 en espanyols blancs.

Els resultats del tercer estudi d'aquesta tesi, demostren una absència de mutacions en la regió que codifica pel domini intracel·lular C-terminal del coreceptor CXCR4 en una cohort d'espanyols blancs infectats pel VIH-1 i no infectats.

La informació disponible actualment sobre el paper dels SNP de CXCR4 sobre la història natural de la infecció pel VIH-1 és escassa. En la població blanca, només un estudi va trobar 2 mutacions, les quals no modulaven el risc d'infecció.²⁶ Estudis posteriors també realitzats en la població blanca, no van detectar variants al·lèliques en diferents regions codificants del gen.^{37,38} Això es consistent amb les troballes del nostre estudi, també realitzat en població blanca. Tanmateix, Liu i col·laboradors,³⁹ van trobar fins a set SNP en un rastreig de CXCR4 en la població Xinesa Han, encara que el seu significat funcional i associacions no van ser avaluats. Les dades més recents, proporcionades per Petersen i col·laboradors,⁴⁰ detecten mutacions no significants en sud-africans de descendència Xhosa.

Tot plegat, suggereix que la distribució de les variants al·lèliques de CXCR4 poden diferir segons l'ètnia. Així doncs, fins a l'actualitat, no es coneixen mutacions en el gen CXCR4 que alteri el risc d'infecció pel VIH-1 o modulen la progressió de la infecció, almenys en diverses poblacions blanques i en sud-africans de descendència Xhosa.

Estudi immunoatogènic.

Danys mitocondrial i apoptosi en CMSP.

L'últim estudi d'aquesta tesi confirma que les CMSP dels pacients infectats pel VIH-1 amb una infecció no controlada (progressadors típics) presenten un dany mitocondrial difús, i demostra un increment de l'apoptosi que, almenys, implica a la via mitocondrial de la mateixa. També demostra que les CMSP dels LTNP tenen els mitocondris més preservats, i presenten una menor activació apoptòtica que els PT no tractats, malgrat el més llarg temps de la seva infecció pel VIH-1. Les nostres dades també indiquen que, en les CMSP dels pacients infectat pel VIH-1, l'apoptosi mediada pel mitocondri es correlaciona positivament amb el dany mitocondrial i amb la càrrega viral del VIH-1.

Malgrat tot, hem de reconèixer que el nostre estudi presenta una sèrie de limitacions. En primer lloc, es tracta d'un estudi transversal, la qual cosa no permet establir una relació causa-efecte. En segon lloc, les troballes en les CMSP no han de reflectir necessàriament el que passa en el limfòcits CD4+. No obstant això, nosaltres hem elegit una bateria d'experiments que representen estretament el que succeeix en la funció mitocondrial, i hem tingut en consideració els efectes demostrats prèviament del VIH-1 sobre aquests orgànuls, com per exemple, la depleció de l'ADNmt i la disminució de l'activitat de la CRM, codificada o no per l'ADNmt.¹⁴⁴ Tanmateix, nosaltres reconeixem que no hem realitzar l'avaluació completa de la funció mitocondrial, ja que no es van determinar els substrats d'oxidació, el potencial de la membrana mitocondrial o la producció d'ATP. Finalment, l'anàlisi de l'apoptosi s'ha realitzat mesurant les caspases més que l'apoptosi *per se*, la qual cosa ens permet distingir entre l'activació apoptòtica global (demostrada per l'activitat de la caspasa-3) i l'activació de l'apoptosi dependent del mitocondri (demostrada per l'activació de la caspasa-9).

Actualment, hi han moltes evidències que suggereixen que el VIH-1 facilita l'apoptosi de les cèl·lules que infecta, produint danys a diferents òrgans.¹⁵²⁻¹⁵⁶ D'altra banda, s'ha demostrat l'existència d'una correlació entre el VIH-1, depleció d'ADNmt i disfunció mitocondrial en CMSP de pacients asimptomàtic no tractats, els quals han presentat una disminució de limfòcits CD4+.^{139,143} Com hem comentat anteriorment (secció 1.3.4; pàgina 33), diverses proteïnes del VIH-1 en són les responsables. Així doncs, és raonable assumir que existeix una relació entre tots dos processos i una correlació negativa entre l'activitat apoptòtica i el contingut de ADNmt, d'acord amb aquesta hipòtesi. Addicionalment, nosaltres hem trobat que aquesta negativa correlació entre el contingut d'ADNmt i l'apoptosi és més gran pels PT que per als LTNP, la qual cosa suggereix que l'apoptosi té un paper en el desenvolupament de toxicitat mitocondrial. Cal destacar, que estudis publicats suggereixen una relació entre LTNP i disregulació en l'apoptosi, de manera que mutacions dins Vpr tenen un impacte sobre els efectes tòxics mitocondrials d'aquestes proteïnes relacionades amb el VIH-1,^{155,157} poden conferir l'estat de LTNP.

Respecte a la caspasa-9, ha estat prèviament demostrat que la proteïna Vpr del VIH-1, indueix apoptosi de CMSP mitjançant una baixa regulació de Bcl-2 i una excessiva inducció de les caspases.¹⁵⁸ S'ha de considerar que, la quantitat de Bcl-2 en el mitocondri és més indicatiu de la sensibilitat de les cèl·lules a l'activació de l'apoptosi a través del mitocondri en resposta a una injúria, que de l'activitat apoptòtica mitocondrial per se, la qual es més clarament evidenciada per altres paràmetres, com es l'activitat de la caspasa-9. El nostres resultats estan d'acord amb aquest escenari, ja que l'activació de la caspasa-9 va ser més elevada en els PT que en els LTNP, amb una tendència cap a una relació entre l'apoptosi per via mitocondrial i la càrrega viral.

Les nostres dades poden eventualment explicar parcialment la diferent evolució immunològica entre els PT i els LTNP al llarg del temps. Els LTNP han estat exposats als productes del VIH-1 durant molt temps, a una intensitat baixa. Cal destacar, que nosaltres proporcionem evidència que la massa viral del VIH-1 probablement determina el dany mitocondrial, ja que una infecció pel VIH-1 menys invasiva, com passa en els LTNP, produeix dany mitocondrial més lleu que la infecció dels PT (els qual tenen una massa viral més elevada). La majoria de les alteracions

mitocondrials adquirides per tòxics^{159,160} o induïts per drogues,¹⁶¹⁻¹⁶³ es creu que estan relacionats amb la quantitat del inòcul i la duració de la exposició. En aquest sentit, un estudi inicial de diverses dades de funció mitocondrial en LTNP, va trobar una disminució de la generació de superòxid i un potencial transmembrana preservat. Aquestes dades van ser consistents amb una funció de la CRM preservada, la qual cosa es va associar amb una disminució de la ràtio d'apoptosi CD4+ i CD8+.¹⁶⁴ En aquest estudi, els pacients del grup comparador havien progressat a SIDA i havien rebut zidovudina, per la qual cosa no es pot excloure, que aquesta droga no tingui un efecte acumulatiu negatiu sobre els paràmetres mitocondrials.¹⁶⁵ No obstant aquest biaix, els nostres resultats són consistents amb els de Moretti i col.laboradors.¹⁶⁴

Així doncs, es pot especular que probablement els LTNP no arribin al llindar acumulatiu que requereixen els insults per a produir un significatiu danys mitocondrial. Sense considerar els mecanismes finals implicats en aquest canvis, nosaltres podem concloure que els pacients infectats pel VIH-1 LTNP tenen una més baixa apoptosi per via mitocondrial i més preservat el mitocondri que els TP.

8. Conclusions

Les conclusions dels treballs d'aquesta tesi s'enumeren tot seguit.

Estudi 1: "La falta d'associació de la variant al·lèlica SDF-1 3'A amb infecció pel VIH-1 no progressiva s'estén més enllà de 16 anys".

1. El polimorfisme SDF-1 3'A no és un determinant d'infecció pel VIH-1 no progressiva en pacients espanyols blancs. La falta d'influència sobre la progressió de la infecció pel VIH-1 s'estén més enllà de 16 anys.
2. La variant al·lèlica SDF-1 3'A no modula en el risc d'infecció pel VIH-1 en pacients blancs espanyols.
3. No existeix cap relació entre el polimorfisme SDF-1 3'A, la càrrega viral i el recompte de limfòcits CD4 en els LTNP.
4. En la població espanyola caucàsica en la que el factor de risc d'adquisició pel VIH-1 majoritari és l'ús de drogues per via parenteral, l'al·lel CCR5Δ32 no modula el risc d'infecció ni la progressió de la malaltia.

Estudi 2: "Els polimorfismes en el promotor del gen de la quimiocina RANTES no s'associen a infecció pel VIH-1 no progressiva de més de 16 anys d'evolució".

- 1 En la població espanyola de raça blanca, els polimorfismes en el gen promotor de la quimiocina RANTES -28C>G, -109T>C, i -403G>A no s'associen amb infecció per VIH-1 no progressiva i per aquest motiu no modulen aquesta particular manera d'evolució.

- 2 Les variants al·lèliques de RANTES no tenen un paper predisposant o protector vers la infecció VIH-1 en la nostra població, encara que falta un grup control de ENIS.
- 3 No existeix cap relació entre els polimorfismes -28C>G, -109T>C, i -403G>A en el promotor del gen de la quimiocina RANTES, la càrrega viral i el recompte de limfòcits CD4 en els LTNP.

Estudi 3. "Absència de polimorfismes de la regió C-terminal de CXCR4 en espanyols infectats pel VIH-1 i en no infectats".

1. No existeixen mutacions en la regió que codifica pel domini intracel·lular C-terminal del coreceptor CXCR4 en una cohort d'espanyols de raça blanca infectats pel VIH-1 i no infectats, que alteri el risc d'infecció pel VIH-1 o modulen la progressió de la infecció.

Estudi 4. "Els pacients infectats pel VIH-1 no progressadors (LTNP) tenen un dany mitocondrial més lleu i una menor apoptosi aconduïda pel mitocondri en les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica que els progressadors típics".

1. Els pacients infectats pel VIH-1 LTNP tenen un dany mitocondrial més lleu en les CMSP que els TP no tractats, malgrat el temps més llarg d'infecció pel VIH-1.
2. Els pacients infectats pel VIH-1 PT tenen una activació de la apoptosi més gran en les CMSP que els LTNP i controls sans.
3. En les CMSP dels pacients infectats pel VIH-1 PT, el dany mitocondrial es correlaciona positivament amb l'apoptosi mediada pel mitocondri i amb la càrrega viral del VIH-1. Aquesta correlació és lleu o no està present en els LTNP.

9. Bibliografia

1. CDC. Pneumocystis pneumonia. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981;30:250-252.
2. Gottlier MS, Schroff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981;305:1425-1431.
3. [http// www.unaids.com](http://www.unaids.com).
4. Wei X, Decker JM, Wang S, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307-312.
5. Grenne WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 2002;8:673-680.
6. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ et al. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004;427:848-853.
7. Pierson TC, Zhou Y, Kiefler T, et al. Molecular characterization of preintegration latency in HIV infection. *J Virol* 2002;76:8518-8531.
8. Alcamí J, Laín T, Folgueira L, et al. Absolute dependence on kB responsive elements for initiation and tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* 1995;14:1552-1560.
9. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyori A, et al. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* 2003;426:853-857.
10. Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, et al. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 2005;435:108-114.

11. Von Schwedler UK, Stuchell M, Muller B et al. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003;114:701-713.
12. Garred P. Chemokine-receptor polymorphisms: clarity or confusion for HIV-1 prognosis?. *Lancet* 1998;351:2-3.
13. Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:152-176.
14. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001;250:91-104.
15. Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, et al. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:279-287.
16. Hanckok W, Gao W, Faia KL, et al. Chemokines and their receptors in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 2000;12:511-516.
17. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000;95:3032-3043.
18. DeRoda Husman AM, Schuitemaker H. Chemokine receptors and the clinical course of HIV-1 infection. *Trends Microbiol* 1998;6:244-249.
19. Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-377.
20. Galli M. HIV-1 Long-Term non-progression: More open questions than answers. *AIDS Rev* 1999;1:74-79.

21. Quillent C, Oberlin E, Braun J, et. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998;351:14-18.
22. Koning FA, Kwa D, Booser-Nunnick B, et al. Decreasing sensitivity to RANTES neutralization of CC chemokine receptor-5 using non syncytium-inducing virus variants in the course of human immunodeficiency virus type I infection. *J Infect Dis* 2003;188:864-872.
23. Agage WW, Amara A, Roberts AI, et al. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 2000;10:325-328.
24. Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion allele of the CCR5 structural gene. *Nature* 1996;382:722-725.
25. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, et al. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* 1997;11:1833-1838.
26. Cohen OJ, Paolucci S, Bende SM, et al. CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Delta32. *J Virol* 1998;72:6215-6217.
27. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, et al. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med* 2001;135:782-95.
28. Martin MP, Dean M, Smith MW, et al. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 1998;282:1907-1911.

29. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, et al. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 1998;4:786-793.
30. Clegg AO, Ashton LJ, Biti RA, et al. CCR5 promoter polymorphisms, CCR5 59029A and CCR5 59353C, are under represented in HIV-1-infected long-term non-progressors. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* 2000;14:103-108.
31. Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, et al. Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *AIDS* 2003;17:377-387.
32. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 2000;287:2274-2277.
33. McDermott DH, Colla JS, Kleeberger CA, et al. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. *Science* 2000;290:2031.
34. Kwa D, Boese-Nunnink B, Schuitemaker H. Lack of evidence for an association between a polymorphism in CX3CR1 and the clinical course of HIV infection or virus phenotype evolution. *AIDS* 2003;17:759-761.
35. Vidal F, Viladés C, Domingo P, et al. Spanish HIV-1-infected long-term nonprogressors of more than 15 years have an increased frequency of the CX3CR1 249I variant allele. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:527-531.
36. Chabot DJ, Broder CC. Substitutions in a homologous region of extracellular loop 2 of CXCR4 and CCR5 alter coreceptor activities for HIV-1 membrane fusion and virus entry. *J Biol Chem* 2000;275: 23774-23782.

37. Martin MP, Carrington M, Dean M, et al. CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1998;19:430.
38. Alvarez V, López-Larrea C, Coto E. Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users. *Hum Genet* 1998;102:483-486.
39. Liu MX, Wang FS, Hong WG, et al. Polymorphism of CXCR4 coding region of human immunodeficiency virus-1 in Chinese Han people. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2003;17:162-164.
40. Petersen DC, Glashoff RH, Shrestha S, et al. Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF1) polymorphism and CXCR4 variation in an African population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:521-526.
41. Winkler C, Modi W, Smith MW, et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science* 1998;279:389-393.
42. van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, et al. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 1998;12(Suppl):F85-F90. (erratum: *AIDS* 2002;16:2239).
43. Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, et al. CC-chemokine receptor variants, SDF-1 polymorphism, and disease progression in 720 HIV-infected patients. *AIDS* 1999;13:624-626.
44. Shingh KK, Barroga CF, Hughes MD, et al. Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2003;188:1461-1472.

45. Daar ES, Lynn HS, Donfield SM, et al. Stromal cell-derived factor-1 genotype, coreceptor tropism, and HIV type 1 disease progression. *J Infect Dis* 2005;192:1597-1605.
46. Hendel H, Hénon N, Lebuane H, et al. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviro* 1998;19:381-386.
47. Balotta C, Bagnarelli P, Corvasce S, et al. Identification of two distinct subsets of long-term nonprogressors with divergent viral activity by stromal-derived factor 1 chemokine gene polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1999;180:285-289.
48. Magierowska M, Theodorou I, Debré P, et al. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999;93:936-941.
49. Mazzuchelli R, Corvasce S, Violin M, et al. Role of CCR5, CCR2 and SDF-1 gene polymorphisms in a population of HIV-1 infected individuals. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:265-271.
50. Tresoldi E, Romiti ML, Boniotto M, et al. Prognostic value of the stromal cell-derived factor 1 3'A mutation in pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2002;185:696-700.
51. Soriano A, Martinez C, Garcia F, et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis* 2002;186:922-931.
52. Liu H, Chao D, Nakayama EE, et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4581-4585.

53. McDermott D, Beecroft MJ, Kleeberger CA, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 2000;14:2671-2678.
54. An P, Nelson GW, Wang L, et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proct Natl Acad Sci USA* 2002;99:10002-10007.
55. Liu XL, Wang FS, Jin L, et al. Preliminary study on the association of chemokine RANTES gene polymorphisms with HIV-1 infection in Chinese Han population. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2003;24:971-975.
56. Fernandez RM, Borrego S, Marcos I, et al. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the RANTES polymorphisms -403 G> A and -28 G>C: evaluation of both variants as susceptibility factors to HIV type 1 infection in the Spanish population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:349-352.
57. Liu H, Hwangwo Y, Holte S, et al. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis* 2004;190:1055-1058.
58. Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, et al. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1 α : impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5199-5204.
59. Wang C, Song W, Lobashevsky E, et al. Cytokine and chemokine gene polymorphisms among ethnically diverse North Americans with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:46-454.

60. Piguet V, Sattentau Q. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Inv* 2004;114 :605-610.
61. 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;100:587-597.
62. Finkel TH, Tudor-Wiliams G, Banda NK, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Med* 1995;1:129-134.
63. Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, et al. Cross-linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha secretion. *Blood* 1994;84:184-188.
64. Hashimoto F, Oyaizu N, Kalyanaraman VS, et al. Modulation of Bcl-2 protein by CD4 cross-linking: a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2. *Blood* 1997;90:745-753.
65. Cicala C, Arthos J, Rubbert A, et al. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:1178-1183.
66. Blanco J, Jacotot E, Cabrera C, et al. The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. *AIDS* 1999;13:909-917.
67. Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, et al. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* 2000;191:33-46.

68. Brenner C, Hoemer G. The mitochondriotoxic domain of Vpr determines HIV-1 virulence. *J Clin Invest* 2003;111:1455-7.
69. Kim TA, Avraham HK, Koh Yh, et al. HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J Immunol* 2003;170:2629-2637.
70. Haughey NJ, Mattson MP. Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31 (Suppl 2):S55-S61.
71. Yang Y, Dong B, Mittelstadt PR, et al. HIV Tat binds Egr proteins and enhances Egr-dependent transactivation of the Fas ligand promoter. *J Biol Chem* 2002;277:19482-19487.
72. Bartz SR, Emerman M. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *J Virol* 1999;73:1956-1963.
73. Chen D, Wang M, Zhou S, et al. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J* 2002;21:6801-6810.
74. Xu XN, Sreaton GR, Gotch FM, et al. Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J Exp Med* 1997;186:7-16.
75. Greenway AL, McPhee DA, Allen K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J virol* 2002;76:2692-2702.

76. Akari H, Bour S, Kao S, et al. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* 2001;194:1299-1311.
77. Casella CR, Rapaport EL, Finkel TH. Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing. *J Virol* 1999;73:92-100.
78. Torre D, Pugliese A. Pathogenic mechanisms of mitochondrial DNA depletion in patients with HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2005 ;40:905-906.
79. Schindler M, Munch J, Kutsch O, et al. Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 2006;125:1055-1067.
80. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001;410:974-979.
81. Wei X, Decker JM, Wang S, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003;422:307-312.
82. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 2001;410:980-987.
83. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75.
84. Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 2002;415:335-339.
85. Schacker T, Collier AC, Hughes J, et al. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;125:257-264.

86. Henrad DR, Daar E, Frazadegan H, et al. Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;9:305-310.
87. Piatak M, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993;259:1749-1754.
88. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol* 2004;78: 1160-1168.
89. Hecht FM, Busch MP, Rawal B, et al. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 2002;24:1119-1129.
90. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-126.
91. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272: 1167-1170.
92. Rutherford G, Lifson AR, Hessel NA, et al. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study. *BMJ* 1990;301:1183-1188.
93. Mikhail M, Wang B, Sasena NK. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* 2003;5:230-44.
94. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995;332:209-216.

95. Goudsmit J. Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia. *AIDS* 2002;16:791-793.
96. Rodes B, Toro C, Paxinos E, et al. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS* 2004;18:1109-16.
97. Saksena NK, Rodes B, Wang B, et al. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev* 2007;9:195-207.
98. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 2007;27:406-416.
99. Lambotte O, Boufassa F, Madec Y, et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication *Clin Infect Dis* 2005;41:1053-1056.
100. Phair J, Jacobson L, Detels R, et al. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5:490-496.
101. Ward JW, Bush TJ, Perkins HA, et al. The natural history of transfusion-associated infection with human immunodeficiency virus. Factors influencing the rate of progression to disease. *N Engl J Med* 1989;321:947-952.
102. Richman DD; Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994;169:968-974.

103. Learmont JC, Gezy AF, Mills J, et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 1999;340:1715-1722.
104. Churchill. MJ, Rhodes DI, Learmon JC, et al. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source. *J Virol* 2006;80:1047-1052.
105. Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, et al. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 2000;74:4361-4376.
106. Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, et al. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest* 2003;111:1455-1457.
107. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;3:212-217.
108. Blankson JN, Bailey JR, Thayil S, et al. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* 2007;81:2508-2518.
109. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2001;345:715-724.
110. Xiang J, George SL, Wünschmann S, et al. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet* 2004;363:2040-2046.

111. Pomerantz RJ, Nunnari G. HIV and GB virus C--can two viruses be better than one? *N Eng J Med* 2004;350:963-965.
112. Beilke MA, Theall KP, O'Brien M, et al. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis* 2004;39:256-263.
113. Turci M, Pilotti E, Ronzi P, et al. Coinfection with HIV-1 and human T-Cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:100-106.
114. Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, et al. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood* 2007;109:1850-1856.
115. Greub G, Ledegerber B, Battegay M, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 2000;356:1800-1805.
116. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:921-929.
117. Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, et al. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* 2006;203:1357-1369.
118. Migueles S, Sabbaghian MS, Shupert WL, et al. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2709-2714.

119. Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuane H, et al. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 1999;162: 6942-6946.
120. Klein MR, Van der Burg SH, Hovenkamp E, et al. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Gen Virol* 1998;79:2191-2201.
121. Keet IP, Tang J, Klein MR, et al. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1999;180:299-309.
122. Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 2004;4, 868-877.
123. Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, et al. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* 2004;305: 645.
124. Martin MP, Gao X, Lee JH, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002;31:429-434.
125. Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 2007;39:733-740.
126. Williams PL, Currier JS, Swindells S. Joint effects of HIV-1 RNA levels and CD4 lymphocyte cells on the risk of specific opportunistic infections. *AIDS* 1999;13:1035-1044.
127. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, et al. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 2002;3:1061-1068.

128. Betts MR, Nason MC, West SM, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006;107:4781-4789.
129. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:7239-7244.
130. Emu B, Sinclair E, Favre D, et al. Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol* 2005;79:14169-14178.
131. Boaz MJ, Waters A, Murad S, et al. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* 2002;169:6376-6385.
132. Lang BF, Gray MW, Burger G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 1999;33:351-397.
133. Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum Reprod* 2000;15 (Suppl2):11-17.
134. López S, Miró O, Martínez E, et al. Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients. *Antivir Ther* 2004;9:47-55.
135. Casademont J, Miro O, Cardellach F. Mitochondrial DNA and nucleoside toxicity. *N Engl Med* 2002;347:216-218.

136. Vittecoq D, Jardel C, Barthélémy C, et al. Mitochondrial damage associated with long-term antiretroviral treatment: associated alteration or causal disorder? *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;31:299-308.
137. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
138. Gross A, Yin XM, Wang K, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999;274:1156-1163.
139. Côté HC, Brumme ZL, Craib KJ, et al. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *N Eng J Med* 2002;346:811-820.
140. Casula M, Bosboom-Dobbelaer I, Smolders K, et al. Infection with HIV-1 induces a decrease in mtDNA. *J Infect Dis* 2005;191:1468-1471.
141. Chiappinni F, Teicher E, Saffroy R, et al. Prospective evaluation of blood concentration of mitochondrial DNA as a marker of toxicity in 157 consecutively recruited untreated or HAART-treated HIV-positive patients. *Lab Invest* 2004;84:908-914.
142. Miura T, Coto M, Hosoya N, et al. Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2003; 70: 497-505.
143. Miró O, López S, Martínez E, et al. Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clin Infect Dis* 2004;39:710-716.

144. Miró O, López S, Pedrol E. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003;8:333-338.
145. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001;29:306-309.
146. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 2003;33:177-182.
147. Schinlel J, Langendam MW, Coutinho RA, et al. No evidence for an effect of the CCR5 delta32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *J Infect Dis* 1999;179:825-831.
148. Barber Y, Rubio C, Fernandez E, et al. Host genetic background at CCR5 chemokine receptor and vitamin D receptor loci and human immunodeficiency virus (HIV) type 1 disease progression among HIV-seropositive injection drug users. *J Infect Dis* 2001; 184:1279-1288.
149. Nair MP, Mahajan S, Hewitt R, et al. Association of drug abuse with inhibition of HIV-1 immune responses: studies with long-term of HIV-1 non-progressors. *J Neuroimmunol* 2004;147:21-25.
150. Zhao XY, Lee SS, Wong KH, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in the RANTES promoter region in healthy and HIV-infected indigenous Chinese. *Eur J Immunogenet* 2004;31:179-183.

151. Duggal P, Winkler CA, An P, et al. The effect of RANTES chemokine genetic variants on early HIV-1 plasma RNA among African American injection drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38:584-589.
152. Badley AD, Roumier T, Lum JJ, et al. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:298-305.
153. Chen W, Sulcove J, Frank I, et al. Development of a human neuronal cell model for human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-induced neurotoxicity: apoptosis induced by the HIV type 1 primary isolates and evidence for involvement of the Bcl-2/Bcl-xL-sensitive intrinsic apoptosis pathway. *J Virol* 2002;76:9407-9419.
154. Keswani SC, Pardo CA, Cherry CL, et al. HIV-associated sensory neuropathies. *AIDS* 2002;16:2105-2117.
155. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001;6:103-116.
156. Twu C, Liu NQ, Popik W, Bukrinsky M, et al. Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion and death receptors controlled pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14386-14391.
157. Lum JJ, Cohen OJ, Nie Z, et al. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest* 2003;111:1547-1554.
158. Muthumani K, Hwang DS, Desai BM, et al. HIV-1 Vpr induces apoptosis through Caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 2002;277:37820-37831.
159. Hoek GB, Cahill A, Pastorino JG. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterology* 2002;122:2049-2063.

160. Miró O, López S, Martínez E, et al. Reversible mitochondrial respiratory chain impairment during symptomatic hyperlactatemia associated with antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:1027-1032.
161. Setzer B, Schelsier M, Walker UA. Effects of didanosine-related depletion of mtDNA in human T lymphocytes. *J Infect Dis* 2001;191:848-855.
162. Setzer B, Schlesier M, Thomas AK, et al. Mitochondrial toxicity of nucleoside analogues in primary human lymphocytes. *Antivir Ther* 2005;10:327-334.
163. Walker UA, Bauerle J, Laguno M, et al. Depletion of mitochondrial DNA in liver under antiretroviral therapy with didanosine, stavudine, or zalcitabine. *Hepatology* 2004;39:311-317.
164. Moretti S, Marcellini S, Boschini A, et al. Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. *Clin Exp Immunol* 2000;122:364-373.
165. Yamaguchi T, Katoh I, Kurata S. Azydothymidine causes functional and structural destruction of mitochondria, glutathione deficiency and HIV-1 promoter sensitization. *Eur J Biochem* 2002;269:2782-2788.