

## Un Nobel esperado: descubrimiento de los agentes causales del SIDA y cáncer cervical

**Mariano Esteban Rodríguez**

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Profesor de Investigación del CSIC y Jefe del grupo de Poxvirus y Vacunas del Centro Nacional de Biotecnología

Han tenido que transcurrir 25 años para que el mundo recibiera la noticia de la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina a los investigadores que descubrieron a los agentes causales del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y del cáncer cervical. La Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo anunció el día 6 de octubre de 2008 la concesión de tan alto galardón conjuntamente a los investigadores franceses Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi por el descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) como agente causal del SIDA y al científico alemán Harald zur Hausen por identificar el virus del papiloma como responsable del cáncer cervical. Como reconoció Montagnier cuando recibió la llamada telefónica de la concesión del Nóbel mientras se encontraba asistiendo a una reunión en la República de Costa de Marfil *“Agradezco que el Comité Nobel ha puesto en antena esta epidemia que no se ha acabado y mi mensaje es que debemos de continuar la investigación... completar los tratamientos en pacientes... y mientras tanto desarrollar vacunas... con la finalidad de que las personas infectadas no enfermen”*. Por su parte el mensaje de Barré-Sinoussi ha sido *“el éxito de haber descubierto el virus del SIDA ha sido trabajar con un equipo mundial con gran experiencia... es importante en el futuro, cuando se trabaja con enfermedades, el colaborar con un equipo de clínicos, virólogos y microbiólogos, en hospitales y en ciencias básicas. Esto fue realmente esencial para el descubrimiento del virus del SIDA”*. El investigador zur Hausen destacó lo siguiente *“pudimos demostrar que hay una pluralidad de tipos del virus del papiloma humano... pero nos concentramos en aislar el virus de verrugas genitales ya que supusimos que el virus era la causa del desarrollo del cáncer cervical... que finalmente demostramos*

*en 1983. Pienso que la vacunación es muy exitosa, pero la desventaja es su alto coste en los lugares del mundo mas necesitados”.*

La Asamblea Nobel en su resumen destacó el por qué de la concesión a los dos grupos de científicos:

Francoise Barré-Sinoussi y Luc Montagnier demostraron la existencia del VIH en linfocitos de pacientes con nódulos linfáticos inflamados a tiempos tempranos en la infección y también en la sangre de pacientes en los estadios tardíos de la infección (1). Los investigadores caracterizaron el retrovirus como el primer lentivirus humano basado en su morfología, y en propiedades bioquímicas e inmunológicas. Además, observaron que el VIH inactivaba el sistema inmune debido a una replicación masiva del virus con la consiguiente destrucción de los linfocitos. El descubrimiento del VIH fue un prerequisite para el posterior entendimiento de la biología de la enfermedad y el tratamiento con antirretrovirales.

Harald zur Hausen fue contra el dogma que predominaba en la década de 1970 y postuló que el virus del papiloma humano (VPH) con capacidad oncogénica causaba el cáncer cervical, el segundo mayor cáncer entre las mujeres. Demostró que el DNA del VPH podía existir en los tumores en un estadio no productivo y podía ser detectado con secuencias específicas de DNA. Observó que el VPH representaba a una familia heterogénea de virus y sólo algunos tipos causaban cáncer. Este descubrimiento permitió la caracterización de la historia natural de la infección por VPH y el entendimiento de los mecanismos de la inducción carcinogénica por VPH y el desarrollo de vacunas profilácticas contra la adquisición de VPH (2, 3).

El descubrimiento de los agentes causales de los virus VIH y VPH no se entendería sin hacer un breve resumen de la biografía de los científicos involucrados.

Luc Montagnier, tiene 76 años, obtuvo el doctorado en virología por la Universidad de París, y actualmente es Profesor Emérito y Director de la World Foundation for AIDS Research and Prevention en París. Durante muchos años el interés científico de Montagnier fue demostrar la relación entre virus y cáncer. Estos estudios los inició durante su estancia en el reino Unido, y a su regreso a Francia creó la Unidad de Virología del Cáncer. Consideró que los retrovirus podían tener re-

*Montagnier*

*Barré-Sinoussi*

*zur Hausen*



**Figura 1. Los descubridores de los agentes causales del Sida (Montagnier y Barré-Sinoussi) y del cáncer cervical (zur Hausen).**

lación directa con el cáncer y aunque estas investigaciones no dieron su fruto, sin embargo los conocimientos adquiridos sobre los interferones y cultivos celulares le sirvieron de referente para abordar el aislamiento del primer lentivirus humano cuando a principios de la década de 1980 aparece el SIDA y su laboratorio se lanza a la búsqueda del agente causal.

Francoise Barré-Sinoussi, de 61 años, obtuvo el doctorado en virología en el Instituto Pasteur de París. Es Profesor y Director de la Unidad de Regulación e Infecciones Retrovirales en dicho Instituto. Su colaboración con el grupo de Montagnier fue vital para el descubrimiento del VIH gracias a su experiencia sobre retrovirus.

Harald zur Hausen, tiene 72 años, obtuvo el título de doctor en Medicina por la Universidad de Düsseldorf en Alemania. Es Profesor Emérito y anterior Jefe del Departamento y Director Científico del German Cancer Research Centre en Heidelberg. En una época, ini-

cios de los años 1970, en la que la gran mayoría de los científicos creían que había una relación causa-efecto entre herpesvirus y cáncer cervical, zur Hausen aportó las primeras pruebas en contra del dogma. Su interés por el virus del papiloma humano le llevó a identificar varios tipos de virus y demostrar que había una relación directa entre el virus del papiloma y cáncer.

Indudablemente fue la mentalidad y determinación la que llevó a estos tres científicos a demostrar que el VIH y el VPH eran dos agentes infectivos con capacidad para producir alta tasas de mortandad, sobre todo en el caso del VIH y ciertos tipos de cáncer. Analicemos cómo estos investigadores llegaron a identificar a los agentes causales del SIDA y del cáncer cervical. Examinemos primero cómo se forjó el descubrimiento del VIH.

## 1. DESCUBRIMIENTO DEL VIH

Como anécdota mencionaré que en 1981 coincidiendo con mi estancia como Profesor del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina en la Universidad del Estado de Nueva York (SUNY) y colaborando con el Dr Joseph Sonnabend, un científico que además de Profesor de SUNY hacía asistencia clínica en el Lower East de Manhattan, nos llegó la noticia de que un grupo en los Ángeles había detectado una neumonía en pacientes homosexuales que estaban afectados con *Pneumocytis carinii* y que les producía una fuerte depleción de las células T de defensa inmunitaria (4). Como el Dr Sonnabend trataba pacientes homosexuales y su experiencia científica era en virología y en los interferones como agentes antivirales, consideraba que la causa probable de la infección era un herpesvirus como el citomegalovirus. Mi laboratorio trabajaba entonces sobre el mecanismo de acción de los interferones, por lo que no entré en la investigación sobre el VIH hasta finales de la década de 1980 con la búsqueda de una vacuna (5). Los estudios iniciales indicaban claramente que la enfermedad tenía una etiología infectiva, probablemente un virus, y que era transmitida por vía sexual y por la sangre. En esos tiempos, entre 1981/82 se hacían conjeturas, pero eran pocos los laboratorios que podían abordar la búsqueda del agente causal. Se necesitaba un gran equipo de profesionales en enfermedades infecciosas, científicos básicos, clínicos y epidemiólogos. En esos años se había descubierto por

el equipo del Dr Robert Gallo del NIH el primer retrovirus humano que infectaba células T (HTLV-I) así como también se conocía el virus que producía una inmunodeficiencia severa en los gatos (FeLV), por lo que parecía plausible que el agente causal de la inmunodeficiencia observada fuera un retrovirus. Fue en 1982 cuando el grupo francés en la Unidad de Oncología Viral del Instituto Pasteur, liderado por Luc Montagnier junto con el grupo de Jean-Claude Chermann en el que se encontraba la joven científica Françoise Barré-Sinoussi, que abordó la aventura de identificar el agente causal con la hipótesis de poder ser un retrovirus humano. La primera muestra biológica que el grupo recibió fue en enero de 1982 consistente en una biopsia procedente de un nódulo linfático de un individuo con linfadenopatía severa. El trabajo se repartió entre los miembros del equipo. La experiencia de Montagnier en cultivos celulares e interferones fue crucial para poner en cultivo células de nódulos linfáticos y poder seguir durante su crecimiento la presencia de retrovirus midiendo la actividad transcriptasa reversa (RT). Aquí fue clave la experiencia de Françoise Barré-Sinoussi que era experta en retrovirus, por lo que midiendo la actividad RT en los sobrenadantes de las células en cultivo pudo demostrar que efectivamente estaban infectadas con retrovirus. Como quiera que las células terminaban muriéndose, decidieron añadir células mononucleares de sangre periférica (PBLs) de individuos sanos y observar que la actividad RT se mantenía durante más tiempo en los cultivos a la vez que las células se morían. Al analizar estas células infectadas al microscopio electrónico observaron partículas virales saliendo de la membrana plasmática celular.

Recuerdo que estas imágenes que Luc Montagnier presentó en un meeting en Cold Spring Harbor fueron recibidas con escepticismo por considerar más una contaminación con retrovirus, aunque su morfología era claramente diferente a la de otros retrovirus humanos conocidos. Mediante microscopía de fluorescencia determinaron que el suero de pacientes infectados contenía anticuerpos específicos frente a las células de dichos pacientes. Sin embargo el suero de pacientes infectados con el retrovirus humano entonces conocido HTLV-I (presente en linfocitos T de pacientes con linfomas y leucemias) no era capaz de reaccionar con las células de los pacientes del grupo de Montagnier. La especificidad del suero de pacientes fue también demostrada en experimentos de inmunoprecipitación de extractos celulares y de par-

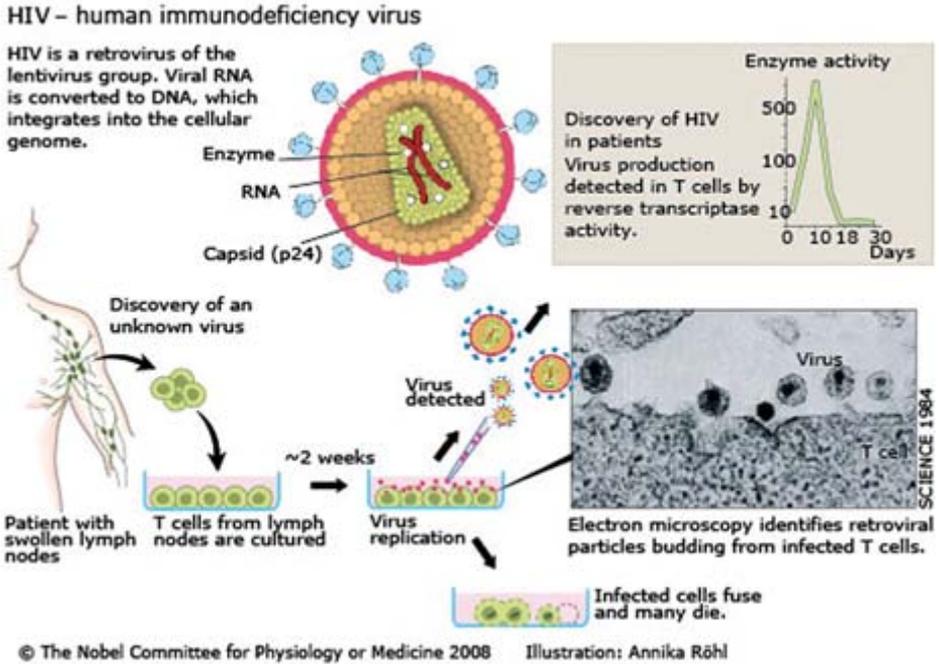


Figura 2. Esquema de la Academia sueca sobre el descubrimiento del VIH por el equipo francés galardonado con el Nobel.

tículas virales liberadas en los sobrenadantes. Los resultados obtenidos por el grupo francés, con la descripción inicial del virus causante de Sida y que bautizaron con el nombre de virus asociado a linfadenopatía (LAV) fueron publicados por la revista Science en mayo de 1983 (1). El virus fue posteriormente descubierto por el grupo de Gallo con el nombre de HTLV-III (6) y por el grupo de Levy con el nombre de AIDS-associated retrovirus (7). Años después y por consenso de la comunidad científica el virus causante del Sida recibiría el nombre de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (8).

Entre 1983-1985 se produce un aluvión de publicaciones sobre el tema, muchos trabajos fruto de colaboraciones entre científicos y clínicos, destacando la contribución del grupo de Gallo (6, 9), que refuerzan las conclusiones del grupo francés. Se demuestra que los individuos con riesgo de Sida y los que ya tienen la enfermedad

contienen anticuerpos específicos frente al retrovirus de la inmunodeficiencia humana, confirmando al virus como causante del Sida. También se confirma que el virus tiene tropismo específico por las células T CD4+ causando su muerte. Es en 1985 cuando se secuencian el genoma viral de unos 10.000 nucleótidos y se define al retrovirus como un lentivirus de alta complejidad genética (10).

## 2. LA POLÉMICA DEL DESCUBRIMIENTO CON EL INVESTIGADOR GALLO

Aunque en la comunicación oficial del Instituto Karolinska no se hace referencia al investigador americano Robert Gallo, en la información ampliada sobre los precedentes del hallazgo y su trascendencia se cita al virólogo estadounidense junto con “otros grupos de investigación” por sus trabajos clave sobre retrovirus. Durante años la paternidad del descubrimiento del VIH se consideró compartida entre Montagnier y Gallo, hasta que se demostró que el laboratorio americano, con o sin su consentimiento, había presentado como propio el patógeno aislado por el equipo francés. Barré-Sinoussi manifestó al recibir la comunicación de la noticia del Nobel que *“es un conflicto a olvidar. Además los equipos americanos fueron importantes en el descubrimiento del virus, y eso debe ser reconocido”*. Para los que han dado el galardón *“no había duda acerca de quien hizo el descubrimiento fundamental”* como lo expresó el miembro de la Asamblea Nobel, María Maucci. Por su parte el Director del NIAID del NIH, Anthony Fauci reconoció que hubiera sido justo el haber concedido el galardón a Gallo, pero que entendía que como el Nobel sólo se puede conceder a tres personas, la cuarta quedaba fuera y los franceses fueron los primeros en aislar el virus del Sida. Es indiscutible la contribución muy importante del grupo de Gallo en demostrar que el virus es causante del Sida, así como en el entendimiento de la genética y biología del VIH. En sus declaraciones a la prensa Gallo manifestó *“estar desilusionado con no haber sido incluido en el Nobel, pero que los tres científicos galardonados lo merecían”*.

Con anterioridad al descubrimiento del equipo francés, el grupo de Gallo había descubierto los primeros retrovirus humanos (HTLV-I y HTLV-II) asociados a cáncer y el factor de crecimiento de linfocitos

T, interleucina 2 (IL-2), que fue clave para el crecimiento de los cultivos celulares y aislamiento del virus del Sida por el equipo de Montagnier. Es en 1984 cuando el grupo de Gallo describe en una serie de publicaciones en la revista Science el aislamiento del virus del Sida y demuestra la relación causa-efecto (6, 9). El hecho de aislar el virus en muestras de distintos pacientes, su tropismo por células T CD4+ y el aislamiento de virus en simios que causa inmunodeficiencias parecidas al Sida determina que en 1984 se acepte por la comunidad científica al virus como responsable del Sida, lo que fue verificado posteriormente con el aislamiento del VIH-2 en pacientes con Sida en el oeste de África. La polémica de la disputa sobre el descubrimiento del virus del Sida alcanzó el máximo nivel cuando los Presidentes de Francia, Jacques Chirac y de EE.UU, Ronald Reagan firmaron en 1987 un acuerdo por el que se dividían los beneficios generados por el test de detección del virus VIH en sangre, acreditando a Montagnier y Gallo como co-descubridores del VIH. Sin embargo en 1990 el gobierno americano después de un examen exhaustivo por una comisión sobre cómo se aisló el VIH en el laboratorio de Gallo, que había recibido muestras procedentes del Pasteur y que este laboratorio aisló el mismo virus que los franceses pero que luego atribuyó el aislamiento a una contaminación de las muestras americanas con las francesas, reconoció que fue el grupo francés el primero en aislar el VIH (11), un año antes que el grupo de Gallo. Aunque Gallo y Montagnier han recibido numerosas distinciones y premios internacionales, entre ellos el Príncipe de Asturias, como co-descubridores del VIH (12), la polémica del descubrimiento ha sido finalmente resuelta por la Asamblea Nobel con el reconocimiento del descubrimiento del VIH por los dos investigadores franceses.

### **3. LA PANDEMIA VIH/SIDA**

Gracias al establecimiento de un test rápido para la detección del virus en sangre, los estudios epidemiológicos y clínicos pronto reconocieron que el VIH se estaba extendiendo rápidamente en la población y que su transmisión era por vía sexual, transfusiones, en hemofílicos, de madres a hijos y en toxicómanos por uso de jeringas contaminadas. Se observó que el curso de la enfermedad se podía dividir en tres estadios: primario o de infección aguda, crónico o asin-

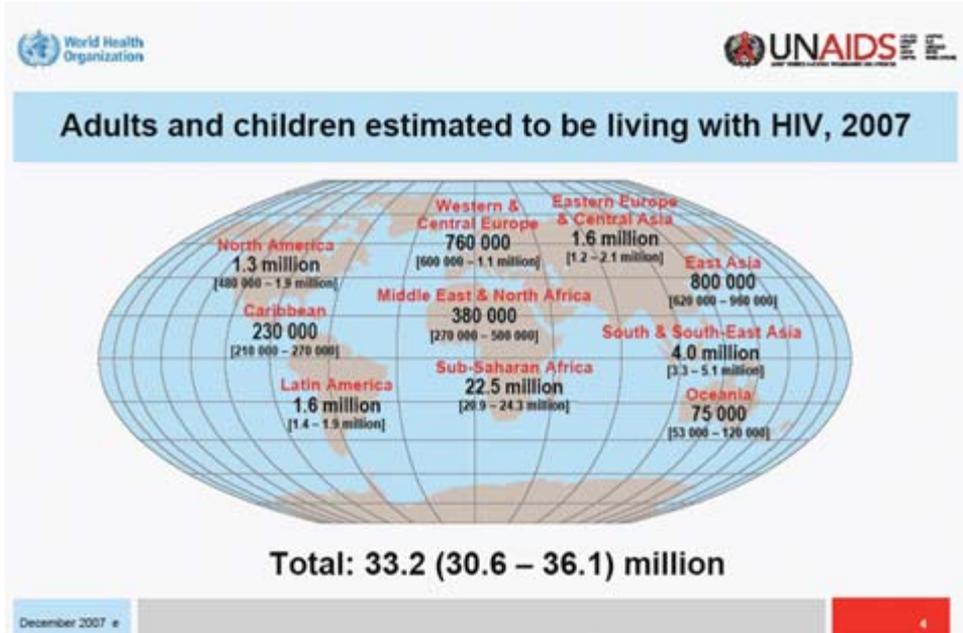
tomático, y avanzado o Sida. En 25 años que han transcurrido desde el descubrimiento del VIH, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que unos 45 millones de personas están infectados a nivel mundial, la pandemia ha producido unos 23 millones de defunciones, con una tasa de infección actual de unos 3 millones de personas por año.

#### 4. CARACTERÍSTICAS DEL VIH

Existen tres tipos de linajes virales, M, N y O, siendo el grupo M el más frecuente. Dentro del grupo M hay nueve subtipos de virus (A, B, C, D, F, G, H, J, K), que difieren entre si un 20-35%, por lo que la variabilidad genética del VIH en un individuo infectado es muy alta. La distribución de los distintos subtipos de virus globalmente es muy variada, siendo el subtipo B el más prevalente en Europa y América del Norte, mientras que el subtipo C es mas abundante en Asia y representa más del 50% de todas las infecciones mundiales. Debido a coinfecciones de distintos subtipos en un mismo individuo y la movilidad de las personas entre continentes, han resurgido virus híbridos, actualmente unas 15 formas recombinantes en circulación, como B/F en América del Sur, el B/C en China, el A/E en Tailandia, el A/C en el Oeste de África y otros.

Existe consenso de que el origen del VIH procede de una transmisión entre especies de monos al hombre, a partir del virus de la inmunodeficiencia del chimpancé (SIVcpz) por abrasiones o ingesta. Aunque existen más de 20 especies de monos africanos, ninguno ha sido relacionado con la transmisión del VIH y sólo el SIVcpz es el que tiene un genoma viral con secuencias semejantes al VIH. Estudios evolutivos indican que el SIVcpz pudo pasar a humanos a principios del siglo XX.

La organización genómica del VIH (9.7 kb) es mucho más compleja que la de los retrovirus que infectan animales, habiendo adquirido además de los genes estructurales comunes con otros retrovirus (Gag, Pol, Env) otros seis genes adicionales (Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev, Nef). El virus inicia su ciclo replicativo con la absorción de partículas virales a la molécula CD4 en la superficie de las células sensibles, así como su unión al co-receptor CC o CXCR4 de la familia de recepto-



**Figura 3. Distribución mundial de la infección por VIH según la OMS.** Aunque la pandemia afecta a todos los continentes, la región mas afectada es la Subsahariana en África, donde hay países con más de la mitad de la población infectada, mayoritariamente la gente joven. La OMS considera que con la extensión actual del Sida para el año 2015 la población infectada puede alcanzar los 60 millones. En China, con una población alrededor de 1.200 millones de personas, cuyos primeros casos de Sida aparecieron a mediados de la década de 1980, por importación del factor sanguíneo VIII, el virus se ha extendido en todo el país con datos estadísticos en octubre de 2007, aportados por el Ministerio de Sanidad Chino, de unas 700.000 personas infectadas (13), muchas de ellas por contagio heterosexual, y con predicciones de aumento anual de alrededor un 8%. La epidemia se sigue extendiendo por el Este de Europa y Sur de Asia que junto con China pueden superar en poco tiempo las cifras de infección africanas.

res de citocinas, siendo los dos co-receptores mas importantes CXCR4 y CCR5, por lo que se produce la fusión entre la membrana viral y la celular con entrada viral. El descubrimiento del co-receptor del VIH fue una empresa ardua, pues aunque se conocía la molécula CD4 como necesaria para la infección, no era suficiente para su fusión y entrada en los linfocitos. Tuvo que transcurrir mas de una década para descubrir el co-receptor. Recuerdo que estando en París en una reunión del grupo europeo de desarrollo de una vacuna contra el VIH y

asistiendo junto con un grupo de unos 10 científicos a una cena con el Profesor Montagnier en un restaurante parisino, en los postres nos manifestó que investigadores del Pasteur habían descubierto la molécula co-receptor del VIH. Ante el asombro de todos y la curiosidad por conocer cuál era dicha molécula, Montagnier nos comunicó que era el receptor CD26 y que su descubridor era el Dr. Ara Hovanessian, a quien conocía muy bien por sus excelentes estudios sobre interferones y con el que había colaborado en un trabajo de investigación sobre la proteína PKR. Al día siguiente, Montagnier nos presentó en la sesión científica de la mañana los datos sobre la identificación del co-receptor y nos comunicó que el trabajo se publicaría en Science. Cual no sería mi sorpresa cuando al llegar a Madrid por la tarde me encuentro con la noticia que dan las cadenas de televisión sobre el descubrimiento del co-receptor CD26 por el grupo del Pasteur (en dicha publicación no figuraba Montagnier). Desafortunadamente, este hallazgo no tuvo la solidez científica suficiente por la metodología empleada ya que al poco tiempo se demostró que el receptor CD26 no era necesario para la entrada del VIH. Fue en 1996 cuando varios grupos publicaron en Nature, Science y Cell el descubrimiento de los co-receptores principales del VIH como CXCR4 y CCR5, aunque otros receptores de quimiocinas pueden ser también utilizados por el VIH.

La unión del VIH con la membrana celular la efectúa la proteína Env viral a través de la molécula gp120 resultante del corte proteolítico inducido por proteasas tipo furina sobre el precursor gp160 dando lugar a las proteínas gp120 y gp41. Es la proteína gp120 la que interacciona con la molécula CD4, que tiene 55 kilodaltons y es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, así como con el co-receptor CXCR4 o CCR5 que es una proteína que atraviesa la membrana siete veces. Después de la entrada por fusión, la subpartícula viral se libera en el citoplasma e inicia la retro-transcripción del RNA genómico viral en DNA que es parcialmente bicatenario y que junto con las proteínas Gag y Pol virales y factores celulares es transportado al núcleo donde copias completas de doble cadena de DNA son integradas en el genoma celular de la célula infectada. Cuando los linfocitos son activados, las copias integradas del DNA sirven de molde a la RNA polimerasa II para producir RNA viral mediante el concierto de las proteínas Tat, el factor nuclear NF- $\kappa$ B y el factor transcripcional Sp1. Los RNAs producidos, sin procesar o procesados, son exportados del

núcleo al citoplasma utilizando un mecanismo de transporte único mediado por la proteína viral Rev. Se produce la proteína Env (gp160) en el retículo endoplásmico, mientras que Gag y Gag-Pol son sintetizadas, transportadas a la membrana plasmática y en asociación con dímeros de RNA forman una estructura viral inmadura a la que se asocia Env. Mediante procesamiento proteolítico de Gag y Pol, durante o inmediatamente después de la liberación de la partícula viral, se forman virus maduros con el nucleoide en forma de cono, que es la morfología característica del VIH visualizada por microscopía electrónica en comparación con la morfología de otros retrovirus con dimensiones entre 100-120  $\mu\text{m}$ .

## 5. IMPORTANCIA DEL DESCUBRIMIENTO DEL VIH

Tan pronto como se demostró que el VIH era responsable del SIDA y que se podía crecer y purificar a partir de cultivos celulares se inició una carrera meteórica para tratar de dilucidar las claves de la biología del virus, capacidad para infectar a las células del sistema inmune y destruirlas, estructura y función de cada uno de los genes virales, así como el desarrollo de fármacos y vacunas capaces de prevenir el proceso infeccioso. Se puede decir que nunca en la historia de la humanidad se ha avanzado tanto en el conocimiento del agente causal de una enfermedad. Ha sido y sigue siendo un ejemplo de colaboración entre científicos, clínicos, empresas del sector farmacéutico, grupos sociales, fundaciones y gobiernos. Es de destacar la presión que la sociedad ha ejercido para impulsar ayudas a la investigación de esta enfermedad, como el ejemplo que dio el actor Rock Hudson al presentarse en la televisión americana, junto con la actriz Liz Taylor, declarando que padecía SIDA y pidiendo ayuda para que se investigara la enfermedad, al que siguieron otros famosos del cine, deportes y de otras actividades. En poco tiempo el estigma social que representaba la enfermedad por no tener cura y por su contagio sexual y por fluidos corporales, fue superándose a medida que se conocía mejor la biología y epidemiología del virus, su transmisión y la aparición de los primeros fármacos antirretrovirales capaces de reducir la infección. El desarrollo del test de detección del VIH en sangre fue determinante para diagnosticar la presencia del virus en fases tempranas de contagio y evitar su extensión en la población.

Los procedimientos de clonaje del VIH a partir de muestras de sangre y de otros tejidos de pacientes y su secuenciación permitieron llevar a cabo estudios sobre el origen y evolución del VIH, así como definir la alta tasa mutacional del virus, particularmente de la proteína Env en la membrana viral lo que posibilita la evasión del virus a los anticuerpos que produce el organismo. Es probable que el virus pasara del chimpancé al humano a principios del siglo XX, pero lo que no está claro es el por qué la epidemia se extendió tan rápidamente en la población a partir de la década de 1970 en adelante.

Con la aparición en 1987 del primer antirretroviral, AZT, se inicia la carrera por la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos a bloquear distintos estadios del ciclo replicativo viral, lo que se sucedería en el tiempo, sobre todo a medida que se desentrañaba la biología molecular del virus. Aunque los primeros fármacos daban lugar a resistencias, no fue hasta 1995 cuando se instituye la llamada terapia HAART que utiliza varios fármacos administrados simultáneamente y en combinación. Se observó que la progresión de la enfermedad estaba directamente relacionada con la capacidad replicativa del VIH en el organismo y que la terapia HAART aumentaba la vida de los pacientes (14). Así, aquellos individuos con más de 100.000 copias del RNA viral en plasma sanguíneo a los seis meses de ser infectados, tienen 10 veces más probabilidad de desarrollar SIDA en 5 años que aquellos infectados con tasas más bajas de viremia. Como indicadores de la evolución de la infección al tratamiento con fármacos se mide en los pacientes la carga viral y número de linfocitos T CD4+ en sangre. Así pues, a medida que se conocían más los distintos aspectos del ciclo replicativo viral y la estructura de sus proteínas, se han ido desarrollando nuevos fármacos que bloquean, bien la entrada viral actuando sobre la proteína Env, los co-receptores, el proceso de fusión virus-célula, la actividad RT, la proteasa e integrasa, así como la acción de las proteínas no estructurales Nef, Rev, Tat, Vif y Vpr. También se están buscando fármacos dirigidos frente a co-factores celulares de la infección por VIH. Actualmente existen unos 30 fármacos antirretrovirales y se siguen buscando nuevos fármacos, debido a la alta tasa mutacional del VIH y la aparición de resistencias durante el tratamiento. Ello obliga a combinar las terapias y hacer un seguimiento de cada paciente. Esta combinación de fármacos y resistencias en los pacientes que reciben HAART hace muy difícil el tratamiento de la infección en los países pobres

donde la pandemia de SIDA sigue su curso mortal. Para ver información sobre resistencias del VIH a drogas consultar ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov); <http://hivdb.stanford.edu>; [www.iasusa.org](http://www.iasusa.org)).

Aunque los investigadores franceses pensaron que al descubrir el VIH se podría desarrollar una vacuna con los procedimientos tradicionales (virus inactivado, atenuado o a base de proteínas virales) que tanto éxito habían aportado contra otras infecciones virales (viruela, polio, sarampión, hepatitis B, ect.), sin embargo el tiempo ha demostrado que existen grandes dificultades para este logro. Ello se debe fundamentalmente a la alta tasa mutacional del virus y a la diversidad de subtipos en el mundo. Es precisamente la heterogeneidad que se produce en los aislados del VIH que dificulta la consecución de una vacuna (15). Los ensayos clínicos realizados hasta el momento no han demostrado ningún éxito de las vacunas que han sido ensayadas. Las mayores expectativas que se habían depositado en el ensayo clínico en fase IIb (3000 individuos con riesgo de infección por VIH) por la empresa Merck en colaboración con el NIH (estudio STEP) utilizando un recombinante de adenovirus expresando las proteínas Gag-Pol-Nef del VIH subtipo B ha sido un fracaso (ClinicalTrials.gov.numbers, NCT00095576 y NCT00413725; ensayos STEP y Phambili). Estos dos ensayos de eficacia tuvieron que terminarse antes de tiempo al observar en el ensayo STEP una mayor incidencia de infección en algunos vacunados y ninguna reducción de la carga viral en todos los vacunados, con o sin anticuerpos frente a adenovirus. La razón de una mayor infección no se conoce aunque estos individuos tenían altos niveles de anticuerpos contra adenovirus y la administración de la vacuna podía provocar una expansión de las células T CD4+ susceptibles de ser infectadas mejor por el VIH. Otra posibilidad es que los anticuerpos neutralizantes de adenovirus opsonizaran al vector vacunal lo que podría producir un cambio de tropismo y de respuesta inflamatoria. Actualmente se está a la espera de conocer la eficacia del único ensayo clínico en fase III que se ha realizado (Tailandia) entre una población de 16.000 individuos vacunados con una combinación de un vector de poxvirus (ALVAC) y la proteína gp120. Los datos se conocerán en 2009. Las vacunas basadas en poxvirus y en particular los vectores atenuados MVA y NYVAC han sido objeto de un estudio europeo (EuroVac) en los que participa mi grupo de investigación con

la finalidad de desarrollar una vacuna contra el VIH ([www.eurovacc.org](http://www.eurovacc.org)). En 1989 ya habíamos producido vectores atenuados del virus vaccinia con posibilidades de su uso vacunal (5), pero no ha sido hasta el año 2008 cuando en colaboración con EuroVacc hemos completado los estudios preclínicos y clínicos sobre la capacidad de inducir respuesta celular específica frente a los antígenos del VIH. Utilizando modelos de ratón (16) y macacos (17) demostramos que la vacunación con DNA y los vectores MVA o NYVAC expresando los antígenos Env/Gag-Pol-Nef inducían en los dos modelos animales una fuerte respuesta inmune celular de linfocitos T CD4+ y TCD8+ específicos que protegían a los macacos después del desafío con una cepa virulenta del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). Esta protección era duradera, más de un año.

Este mismo protocolo de vacunación fue ensayado en humanos con voluntarios sanos (fase I) demostrando que más del 90% de los voluntarios desarrollaban respuestas inmunes específicas frente a los distintos antígenos del VIH, aunque mayoritariamente dirigidos frente a Env. La respuesta inmune se mantuvo al menos durante 75 semanas después de la vacunación (18).

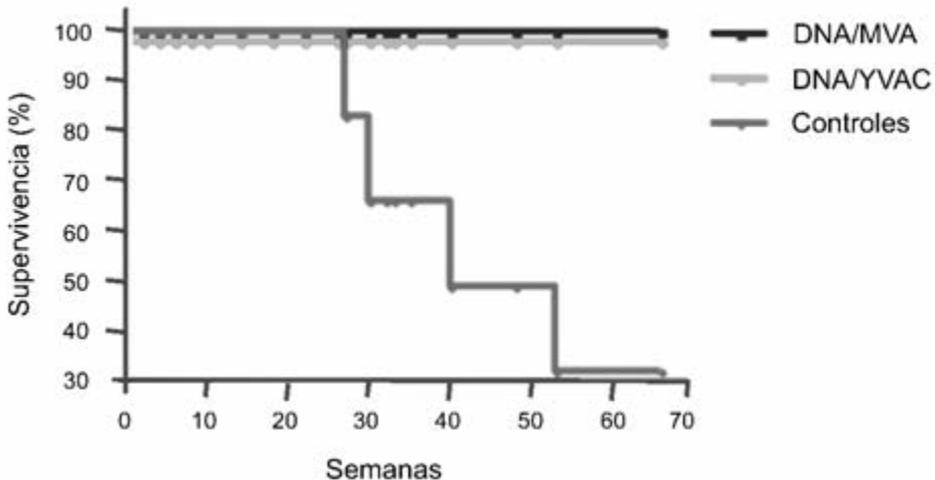
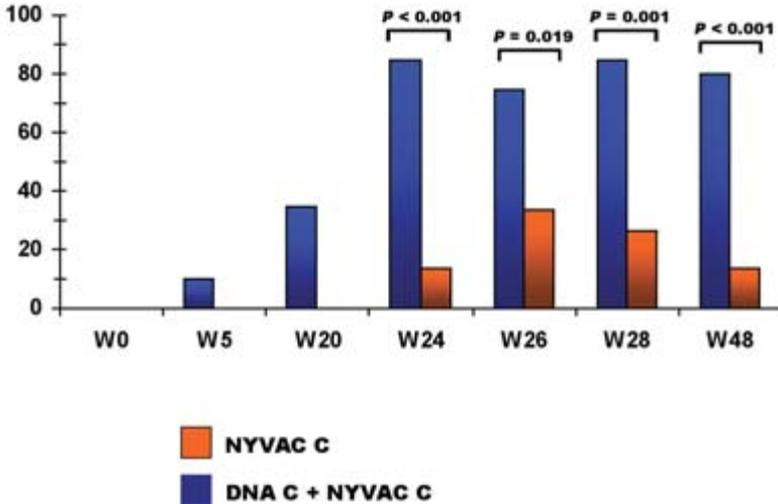


Figura 4. La vacunación con DNA/Poxvirus protege frente a la infección por SIV (17).



**Figura 5.** La vacunación con vectores de DNA y poxvirus (NYVAC) produce un alto porcentaje de personas que inducen respuestas inmunes específicas frente a los antígenos del VIH (18).

Está en marcha otro ensayo clínico en fase II con 140 individuos para valorar la dosis de DNA y del vector NYVAC y en España nos ha sido aprobado un ensayo clínico en fase I con el vector MVA-B que se iniciará a principios de 2009 en voluntarios sanos. Para facilitar el acceso de las vacunas a una mayor población, sobre todo en los países pobres, hemos demostrado en modelo de macaco que los vectores atenuados de poxvirus MVA y NYVAC pueden ser administrados por aerosol con la misma eficacia que cuando se administran por ruta parenteral (19). Es indudable que en la experimentación con vacunas frente al VIH se hace necesario demostrar en modelos de monos que dichas vacunas son eficaces frente al virus patógeno SIV para evitar fracasos clínicos (20, 21).

Aunque aún no hemos conseguido demostrar que las vacunas son eficaces frente al VIH, sin embargo los estudios con monos nos sugieren que se puede conseguir protección con los protocolos de combinación de vacunas con vectores como adeno, pox y DNA (21). Lo importante es que las vacunas activen tanto una respuesta humoral con anticuerpos neutralizantes frente a distintos subtipos y variantes

del VIH como una fuerte respuesta celular (CD4+ y CD8+) que sea polifuncional (capaz de provocar a las células activadas la secreción de varias citoquinas y quimiocinas, como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, MIP-1alfa y otras). Aunque es indudable que lo mejor para evitar la extensión de la pandemia por VIH y su control son las vacunas, y así lo ha reconocido la OMS, hace falta un mayor esfuerzo global para conseguir este gran objetivo tan necesario para evitar tantas muertes y sufrimiento en la población. Mientras que la terapia antirretroviral ha conseguido en los países desarrollados mantener la esperanza de vida a niveles casi semejante a las personas no infectadas, el virus sigue extendiéndose y la aplicación de la terapia antirretroviral es de difícil implementación en los países pobres y más afectados por la epidemia. Es predecible que sea la combinación de vacunas y fármacos administrados de forma profiláctica y terapéutica lo que consiga controlar y erradicar al VIH.

## **6. CÓMO SE DESCUBRIÓ EL VPH COMO CAUSANTE DEL CÁNCER CERVICAL**

Aunque en la década de los años 1970 se especulaba con que el cáncer cervical podía tener una etiología viral, y se asociaba a los herpesvirus, fue zur Hausen quien remando contra las olas, pues esa era la hipótesis prevalente en la época, propuso que el responsable del cáncer cervical era un virus papiloma humano (VPH). Si la hipótesis era correcta entonces las células tumorales de una paciente debían de contener integrado en su DNA el material genético viral. Fue esta hipótesis la que mantuvo contra viento y marea el trabajo de zur Hausen durante más de 10 años buscando tipos del VPH en el DNA celular. La dificultad radicaba en que sólo partes del genoma viral estaban integradas en el genoma celular. La búsqueda dio sus resultados encontrando nuevos tipos de VPH en biopsias de cáncer cervical y descubriendo en 1983 al VPH tipo 16 como altamente tumorigénico. Primero aisla HPV 16 en biopsias de cáncer cervical (3), seguido por la primera demostración de HPV16 en lesiones precursoras de cáncer genital (22) y posteriormente aisla VPH 18 en cáncer genital (23). Mediante el clonaje de los tipos VPH 16 y 18 en pacientes con cáncer cervical, encuentra que la frecuencia con la que aparece DNA de los tipos 16 y 18 en las biopsias de cáncer cervical a nivel mundial es de un 70% en tumores genitales. Así se

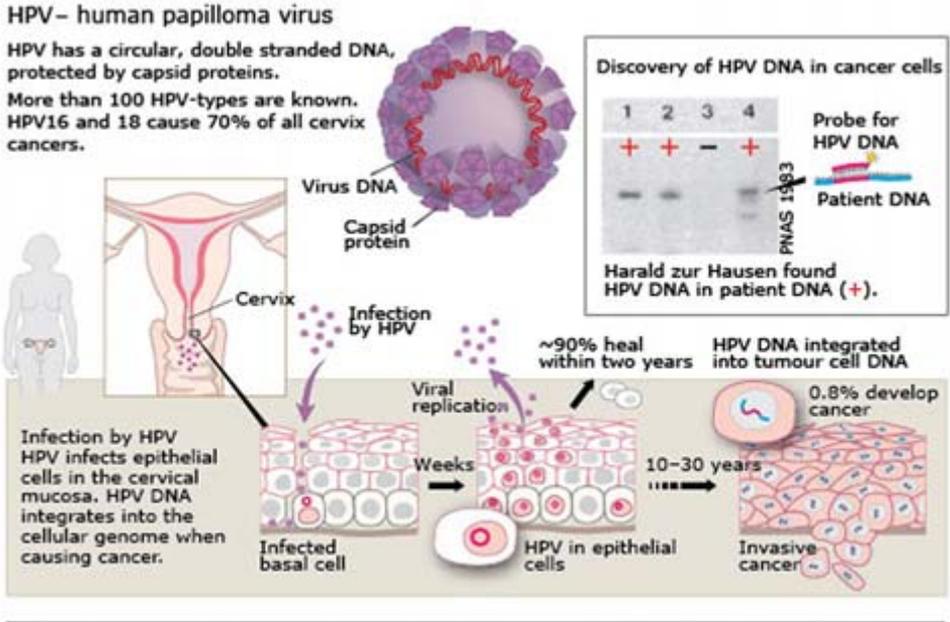


Figura 6. Esquema tomado de la Fundación Nobel sobre el descubrimiento del virus papiloma como agente causal del cáncer cervical.

demuestra que el VPH es un problema sanitario global. De hecho más del 5% de todos los cánceres humanos tienen una etiología viral con la persistencia de la infección por VPH. Estudios epidemiológicos demuestran que la infección por VPH es la mas común entre los agentes de transmisión sexual, afectando entre el 50-80% de la población. De los más de 100 tipos de VPH conocidos, cerca de 40 infectan el tracto genital y 15 de ellos pone en riesgo a las mujeres para contraer cáncer cervical. Además, el VPH se encuentra en la vulva, pene, cavidad bucal y asociado a otros cánceres. De que el cáncer cervical es producido por VPH lo acredita el hecho de que el virus está presente en el 99.7% de las mujeres con cáncer, afectando a más de 500.000 mujeres al año. La tasa de mortalidad en mujeres con cáncer cervical es del 50%, lo que da una idea del impacto social.

Las investigaciones de zur Hausen dieron lugar al conocimiento de los mecanismos que utiliza el VPH como carcinogénico y los factores que predisponen en la persistencia viral y transformación tumo-

ral (24). Generosamente puso a disposición de la comunidad científica los tipos 16 y 18 del VPH. Gracias a las investigaciones de zur Hausen se pudieron desarrollar vacunas que han demostrado su eficacia frente a la infección, confiriendo más del 95% de protección frente a los tipos 16 y 18 del VPH.

## **7. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

Los papilomavirus comprenden un grupo de virus icosaédricos que replican en el núcleo, sin envuelta y con un DNA circular de doble banda con 8000 pares de bases. La partícula viral contiene 72 capsómeros pentaméricos. El genoma tiene diez fases de lectura y codifica por las proteínas estructurales L1 y L2 que representan el 80% de la partícula viral y las proteínas reguladoras E1 a E8, siendo las proteínas E6 y E7 las que ejercen propiedades oncogénicas (2, 25). La proteína E6 actúa sobre el represor tumoral p53 e induce su degradación, mientras que E7 actúa sobre el represor tumoral pRb provocando su inactivación. El resultado final es la desregulación del ciclo celular y consiguiente proliferación celular. Tanto la proteína E6 como E7 se asocian a otras proteínas celulares durante el proceso de transformación tumoral.

La infección productiva del VPH se inicia en las células del epitelio basal a través de una herida. La infección comienza cuando las proteínas de la cápsida viral se unen a los receptores en la membrana celular. Después de la unión a la célula, el genoma viral se traslada al núcleo para comenzar el proceso de replicación y donde persiste mucho tiempo, transmitiéndose a las células hijas durante la mitosis. Durante la fase de expresión temprana se producen las proteínas codificadas por los genes con capacidad oncogénica, E6 y E7, y a tiempos tardíos se producen las proteínas estructurales L1 y L2 responsables de la formación de partículas virales al incorporar el DNA viral durante el proceso de ensamblaje. La producción final de viriones infectivos requiere la diferenciación terminal de las células infectadas en el epitelio. La liberación de viriones se produce al final de la vida de las células epiteliales por proceso normal de descamación. Como este es un proceso no lítico no se produce inflamación. La replicación viral durante la diferenciación celular puede dar lugar a cambios citopatológicos que se consideran benignos (denominados CIN 1). Es la persistencia viral la que determina el desarrollo de cáncer cervical.

Los estudios epidemiológicos indican que la edad media para tener cáncer cervical es varias décadas después de la infección inicial.

## **8. CONTROL DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO CON VACUNAS**

La demostración de que la proteína L1 de la cápsida del virus del papiloma daba lugar a la formación de pseudo-partículas (formas estructurales semejantes a las del virus infectivo pero sin tener genoma viral) y que una vez administradas por ruta intramuscular a voluntarios sanos reducía de forma significativa la infección por VPH, supuso un avance importante en la consecución de una vacuna frente a VPH. Fruto de estas investigaciones y en una serie de ensayos clínicos que la industria farmacéutica ha llevado a cabo durante años y con fuertes inversiones, son los dos tipos de vacunas actuales, conocidas con los nombres de Gardasil (empresa Merck) y Cervarix (empresa Glaxo-SKB). Ambas vacunas se diferencian en los componentes de L1 de distintos tipos de virus, así como en el adyuvante que se incorpora a la vacuna. Así, Cervarix ha sido diseñado para prevenir las infecciones causadas por VPH 16 y 18, que son los dos tipos de virus causantes del 70% de cánceres cervicales. Sin embargo Gardasil se dirige frente a los tipos VPH 6, 11, 16 y 18, responsables del 75-90% de lesiones genitales. Estas vacunas producen anticuerpos neutralizantes y en menor medida respuesta celular. Los ensayos clínicos profilácticos han demostrado la eficacia de la vacunación para prevenir en más del 95% la aparición de infecciones frente a virus del mismo serotipo y la aparición de precursores celulares de cáncer cervical (26, 27). Sin embargo ninguna de las dos vacunas ha demostrado eficacia terapéutica, lo que indica que no parece probable que la vacunas actuales sean capaces de inducir regresión cuando ya existen lesiones genitales externas. Por ello se están ensayando otras vacunas basadas en distintos vectores y conteniendo además de L1 otros antígenos virales como L2. El éxito de la vacunación profiláctica contra VPH ha estimulado la práctica de la vacunación en chicas jóvenes. En España, algunas Comunidades financian la vacunación a adolescentes entre los 13-15 años. Es probable la vacunación contra VPH se incluya entre los protocolos de inmunización habituales establecidos por las autoridades sanitarias de distintos países. El alto coste de las vacunas actuales limita su uso, lo que es especialmente relevante en los países pobres. En el

futuro conoceremos durante cuanto tiempo la vacunación previene de la aparición de cáncer cervical, niveles de anticuerpos neutralizantes y de respuesta celular, cuantas dosis de recuerdo son necesarias, y si hay efectos secundarios adversos durante el embarazo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868-71.
2. zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. 2: 342-50.
3. Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. & zur Hausen, H. (1983) A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 80: 3812-5.
4. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., et al. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305: 1425-31.
5. Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Rodriguez, J.F., Trauber, D. & Esteban, M. (1989) Highly attenuated vaccinia virus mutants for the generation of safe recombinant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 86: 1287-91.
6. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. & Gallo, R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224: 497-500.
7. Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M. & Oshiro, L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 225: 840-2.
8. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., et al. (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science*. 232: 697.
9. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224: 500-3.
10. Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. & Alizon, M. (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*. 40: 9-17.
11. Montagnier, L. (2002) Historical essay. A history of HIV discovery. *Science*. 298: 1727-8.
12. Gallo, R.C. & Montagnier, L. (2003) The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N. Engl. J. Med.* 349: 2283-5.
13. Lu, L., Jia, M., Ma, Y., Yang, L., Chen, Z., Ho, D.D., et al. (2008) The changing face of HIV in China. *Nature*. 455: 609-11.
14. Palella, F.J. Jr, Delaney, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer, J., Satten, G.A., et al. (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 338: 853-60.

15. Fauci, A.S., Johnston, M.I., Dieffenbach, C.W., Burton, D.R., Hammer, S.M., Hoxie, J.A., et al. (2008) HIV vaccine research: the way forward. *Science*. 321: 530-2.
16. Gomez, C.E., Najera, J.L., Jimenez, V., Bieler, K., Wild, J., Kostic, L., et al. (2007) Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine*. 25: 1969-92.
17. Mooij, P., Balla-Jhagjhoorsingh, S.S., Koopman, G., Beenhakker, N., van Haaften, P., Baak, I., et al. (2008) Differential CD4+ versus CD8+ T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J. Virol*. 82: 2975-88.
18. Harari, A., Bart, P.A., Stohr, W., Tapia, G., Garcia, M., Medjitna-Rais, E., et al. (2008) An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med.* 205: 63-77.
19. Corbett, M., Bogers, W.M., Heeney, J.L., Gerber, S., Genin, C., Didierlaurent, A., et al. (2008) Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105: 2046-51.
20. Watkins, D.I., Burton, D.R., Kallas, E.G., Moore, J.P. & Koff, W.C. (2008) Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat. Med.* 14:617-21.
21. Barouch, D.H. (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*. 455: 613-9.
22. Ikenberg, H., Gissmann, L., Gross, G., Grussendorf-Conen, E.I. & zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus type-16-related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. *Int. J. Cancer*. 32: 563-5.
23. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. & zur Hausen, H. (1984) A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J.* 3: 1151-7.
24. Woodman, C.B., Collins, S.I. & Young, L.S. (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer*. 7: 11-22.
25. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., et al. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 314: 111-4.
26. Koutsky, L.A. & Harper, D.M. (2006) Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine*. 24 Suppl 3: S3/114-21.
27. Schiller, J.T., Castellsague, X., Villa, L.L. & Hildesheim, A. (2008) An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 26 Suppl 10: K53-61.