



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL
SOBRE LA ACTIVIDAD ANTI-VIH NO CITOTÓXICA
DE CÉLULAS T CD8⁺ EN SANGRE PERIFÉRICA Y
GANGLIOS LINFÁTICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

D O C T O R A E N C I E N C I A S

P R E S E N T A :

Q. C. KLINTSY JULIETA TORRES HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUSTAVO REYES TERÁN

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Realicé este trabajo en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Secretaría de Salud, bajo la asesoría del Dr. Gustavo Reyes Terán, como becaria de CONACYT (153061) y con el apoyo de CONACYT (28732M), del programa UC-Mexus y de la Fundación Miguel Alemán.

Datos presentados parcialmente en XIV International AIDS Conference, Barcelona España, 2002. Abstract ThPeA7159 y la Reunión Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud. 2002, México. Artículo publicado en AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 2006; 22:144-152.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Al Dr. Gustavo Reyes Terán

Al Dr. Enrique Espinosa Arciniega

Al Dr. Ricardo S. Vega

A las Q.C. Verónica Quiroz y Edna Rodríguez

A los residentes del Departamento de Cirugía del INER

A los Drs. Jay A. Levy y Carl Mackewicz de la Universidad de California San Francisco (UCSF)

A Susan Ridha y a Fernanda Gutiérrez del Instituto Mexicano del Seguro Social

A los Dr. Julio Granados Arriola y al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

A los pacientes que participaron en el estudio.

A mis amigos Jorge, Edgar, Criselda, Daniel, Teresa, Elena, Humberto, Luis, Joel.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Investigación de Enfermedades Infecciosas

A mis padres, Abel[†] y María de Jesús, mis hermanos Edson y Vanessa, mi prima Daniela.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	12
<u>1. INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>14</u>
1.1. Datos epidemiológicos generales de la infección por VIH	14
1.2. Estructura de VIH	15
1.2.1. Genes y proteínas que conforman al VIH	17
1.3. Mecanismo de entrada de VIH a las células, tropismo celular y dinámica de replicación.....	22
1.3.1. Eventos de propagación de VIH en el individuo infectado	23
1.3.2. Replicación de VIH y el efecto sobre la función y estructura de los ganglios linfáticos.....	25
1.4. Historia natural de la infección por VIH.....	28
1.4.1. Características clínicas iniciales de la infección por VIH.....	28
1.4.2. Diagnóstico de la infección por VIH en las etapas tempranas	28
1.4.3. Etapas clínicas de la infección por VIH y diagnóstico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).....	29
1.4.4. Tiempo de evolución de la infección por VIH	30
1.5. Respuestas inmunológicas anti-VIH	34
1.5.1. Respuestas de anticuerpos anti-VIH	36
1.5.2. Funciones de las células T CD8 ⁺ citotóxicas.....	38
1.5.3. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺	40
1.5.4. Estructura y función normal del ganglio linfático	46
1.6. Tratamiento anti-VIH	50
1.6.1. Familias de fármacos antirretrovirales.....	51
1.6.2. Uso de fármacos antirretrovirales y su efecto en el sistema inmunológico. ...	53
<u>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	<u>58</u>
<u>3. HIPÓTESIS</u>	<u>60</u>
<u>4. OBJETIVOS.....</u>	<u>61</u>
<u>5. MATERIALES Y MÉTODOS:.....</u>	<u>62</u>
5.1. Población de estudio.	63

5.1.1. Selección de pacientes y diseño del estudio en sangre periférica.	63
5.1.2. Selección de pacientes y diseño del estudio en ganglios linfáticos.....	64
5.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	66
5.3. Obtención de células mononucleares de tejido linfoide	66
5.4. Determinación de carga viral y cuenta de células T CD4 ⁺ circulantes.....	67
5.5. Determinación de dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID ₅₀)	68
5.6. Determinación de respuesta no-citotóxica de células T CD8 ⁺ anti-VIH (ensayo agudo)	70
5.7. Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) para determinación de Antígeno p24 de VIH-1	72
5.8. Análisis estadístico.....	74
6. RESULTADOS:.....	75
6.1. La respuesta no-citotóxica de células T CD8 ⁺ anti-VIH inhibe la replicación de VIH in vitro dependiente de la dosis.	75
6.2. Población de pacientes	79
6.2.1. Características basales de los pacientes del estudio en sangre periférica	79
6.2.2. Características basales de los pacientes del estudio en ganglios linfáticos... ..	81
6.3. Resultados de estudio en sangre periférica.....	83
6.3.1. Correlación entre carga viral plasmática y cuenta de células T CD4 ⁺	83
6.3.2. Las células T CD8 ⁺ de sangre periférica de pacientes en etapa tardía muestran una menor respuesta anti-VIH no citotóxica.	84
6.3.3. Correlación basal entre la respuesta anti-VIH no citotóxica en células T CD8 ⁺ de sangre periférica y cuenta de células T CD4 ⁺	85
6.3.4. Correlación inversa entre la respuesta anti-VIH no citotóxica basal en células T CD8 ⁺ de sangre periférica y carga viral plasmática.....	86
6.3.5. El tratamiento antirretroviral disminuye la carga viral plasmática de pacientes en etapa intermedia y tardía.....	87
6.3.6. El tratamiento antirretroviral incrementa la cuenta de células T CD4 ⁺ en sangre de pacientes en etapa intermedia y tardía.....	90
6.3.7. El tratamiento antirretroviral incrementa la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ de pacientes en etapa tardía.....	93
6.4. Resultados del estado basal del estudio en tejidos linfoides.	95
6.4.1. Correlación entre la cuenta de células T CD4 ⁺ y carga viral plasmática.	95
6.4.2. Los niveles de carga viral plasmática y cuenta de células T CD4 ⁺ en pacientes con linfadenopatía son similares a los descritos.....	97

6.4.3. Las células T CD8+ de sangre periférica y tejido linfoide de pacientes de etapa tardía, presentan una menor respuesta anti-VIH no citotóxica.	99
6.4.4. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8+ de sangre periférica es similar a la respuesta de las células TCD8+ de tejido linfoide.	101
6.4.5. Correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8+ de tejido linfoide y la cuenta de células T CD4+ de sangre periférica.	102
6.4.6. Correlación inversa entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8+ de tejido linfoide y la carga viral plasmática.	104
6.4.7. Correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8+ de sangre periférica y la respuesta de las células TCD8+ de tejido linfoide.	105
<u>7. DISCUSIÓN.....</u>	<u>106</u>
<u>8. CONCLUSIONES.....</u>	<u>115</u>
<u>9. PERSPECTIVAS.....</u>	<u>116</u>
<u>10. ANEXOS</u>	<u>117</u>
ANEXO 1. Categorías clínicas de la infección por VIH.....	117
ANEXO 2. Medicamentos anti-VIH aprobados por Agencia Federal de Alimentos de E.U. (FDA) para su uso en humanos hasta 2007.	119
ANEXO 3. Artículo.....	126
ABREVIATURAS.....	135
<u>11. REFERENCIAS</u>	<u>136</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura del VIH.	16
Fig. 2. Estructura genómica de VIH.....	17
Fig. 3. Diagrama del curso de la infección por VIH.	32
Fig. 4. Estructura de ganglio linfático.....	47
Fig. 5. Eventos activados durante la migración celular.	49
Fig. 6. Esquema de muestras y estudios realizados a los pacientes en estudio de ganglios linfáticos.	65
Fig. 7. Diagrama de determinación de dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID ₅₀) para VIH _{SF33}	68
Fig. 8. Diagrama de separación con esferas inmunomagnéticas.....	70
Fig. 9. Determinación de pureza por citometría de flujo.....	75
Fig. 10. Determinación de dosis infecciosa mediante curva de titulación de VIH _{SF33}	76
Fig. 11. Curva de replicación de VIH _{SF33}	77
Fig. 12. Curva dosis respuesta de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8+.	78
Fig. 13. Correlación basal entre carga viral plasmática y cuenta de células T CD4 ⁺	83
Fig. 14. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ de sangre periférica en diferentes estadios de la enfermedad.....	84
Fig. 15. Correlación basal entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ y cuenta de células T CD4 ⁺	85
Fig. 16. Correlación inversa basal entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ y carga viral plasmática.	86
Fig. 17. Cinética de niveles de carga viral plasmática durante el tratamiento antirretroviral.....	89
Fig. 18. Cinética de niveles de células T CD4 ⁺ /μl en sangre periférica durante el tratamiento antirretroviral.....	92
Fig. 19. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ en sangre periférica de pacientes en las etapas temprana, intermedia y tardía de la infección por VIH.....	94
Fig. 20. Correlación basal entre carga viral plasmática y cuenta de células T CD4 ⁺	96
Fig. 21. Niveles de células T CD4 ⁺ y carga viral plasmática por estadio clínico.	98
Fig. 22. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ por etapa clínica y por tejido. .	100
Fig. 23. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ por tejido.	101
Fig. 24. Correlación basal entre cuenta de células T CD4 ⁺ y respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ por tejido.	103
Fig. 25. Correlación basal entre cuenta de carga viral plasmática y respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺	104
Fig. 26. Correlación basal entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ en sangre periférica y tejido linfoide.....	105
Fig. 27. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ depende de la función del sistema inmunológico.	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de características de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺	44
Tabla 2. Criterios para el ingreso de pacientes al estudio en sangre periférica.	63
Tabla 3. Criterios para el ingreso de pacientes al estudio en ganglios linfáticos.	64
Tabla 4. Características basales de los pacientes en estudio de sangre periférica.	80
Tabla 5. Pacientes evaluados para ingreso al estudio de ganglios linfáticos y que fueron excluidos o retirados del protocolo.	81
Tabla 6. Características basales de los pacientes del estudio en ganglios linfáticos	82
Tabla 7. Niveles carga viral plasmática por etapa de la enfermedad, con respecto al tiempo. .	88
Tabla 8. Niveles de células T CD4 ⁺ por etapa con respecto al tiempo, en estudio de sangre periférica.	91
Tabla 9. Niveles de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8 ⁺ (% de inhibición de la replicación) por etapa de la enfermedad, con respecto al tiempo.	93

RESUMEN

Las células T CD8⁺ son esenciales para el control de la replicación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), y su capacidad de respuesta a la infección por VIH se ha asociado a los niveles virales plasmáticos. La inhibición de la transcripción del VIH por factores solubles de las células T CD8⁺ de pacientes con infección por VIH es conocida como respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Conforme la infección por VIH va evolucionando a SIDA, la respuesta anti-VIH no citotóxica disminuye. El tratamiento antirretroviral altamente activo (HAART) disminuye la carga viral plasmática, la carga viral en tejidos linfoides e incrementa el número de células T CD4⁺ de los pacientes. El tratamiento antirretroviral mejora la respuesta a infecciones oportunistas, pero disminuye la frecuencia de células T CD8⁺ citotóxicas específicas de VIH, y se desconoce su efecto sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Debido a que los tejidos linfoides son los principales sitios de replicación y patogénesis de VIH, es de gran importancia determinar la posible relación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de las células T CD8⁺ de ganglios linfáticos y la respuesta de sangre periférica, así como el efecto del tratamiento antirretroviral sobre esta respuesta en sangre y ganglios linfáticos.

El trabajo se realizó en dos partes. En la primera parte se realizó el seguimiento prospectivo de 37 pacientes con infección por VIH en etapas temprana, intermedia y tardía de la enfermedad, sin evidencia de infecciones oportunistas. En la segunda parte se ingresaron 24 pacientes con infección por VIH en las diversas etapas de la enfermedad que presentaron linfadenopatía por VIH y sin evidencia de infecciones oportunistas. A los pacientes en etapa intermedia y tardía se les proporcionó tratamiento antirretroviral, y a los pacientes de etapa temprana se mantuvieron en el

estudio sin tratamiento antirretroviral debido a que no lo requirieron. A todos los pacientes se les tomaron muestras de sangre para la determinación de carga viral y cuenta de linfocitos T CD4⁺ y para la obtención de células T CD8⁺, y sólo a los pacientes con linfadenopatía se les obtuvo muestras de ganglio linfático. Las células T CD8⁺ de sangre periférica y ganglio linfático se utilizaron para el ensayo de actividad anti-VIH no citotóxica. A las biopsias de ganglios linfáticos se les realizaron estudios microbiológicos para descartar la presencia de infecciones oportunistas.

La edad o sexo de los pacientes no fue diferente entre los grupos. Los pacientes de ambos estudios mostraron correlación positiva entre los niveles de carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺ circulantes. El estudio histopatológico de los ganglios linfáticos mostró un 79% de hiperplasia folicular y 21% de disminución linfoide. Las células T CD8⁺ de pacientes en etapa tardía mostraron una menor respuesta anti-VIH no citotóxica en sangre periférica ($p < 0.0001$, ANOVA) y en tejido linfoide ($p < 0.01$, ANOVA). La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y tejidos linfoides correlaciona positivamente con los niveles de células T CD4⁺ circulantes y correlaciona negativamente con los niveles de carga viral plasmática. El tratamiento antirretroviral disminuye los niveles de carga viral plasmática ($p < 0.0001$) y favorece el incremento de los niveles de células T CD4⁺ circulantes ($p < 0.0001$). La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica de pacientes en etapas tardías se incrementó en las primeras 4 semanas posteriores al inicio de tratamiento antirretroviral ($p < 0.01$). Finalmente, se observa una correlación positiva entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de tejido linfoide y de células T CD8⁺ de sangre periférica ($r = 0.553$, $p < 0.01$).

La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y tejidos linfoides de pacientes con VIH está relacionado con la etapa clínica de la infección, así

como de los niveles de carga viral plasmática y número de células T CD4+ circulantes. Esta respuesta puede ser mejorada en las etapas tardías de la infección, mediante la administración de tratamiento antirretroviral. Existe la posibilidad de que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ esté relacionada con la mejoría de la respuesta inmunológica, que a su vez depende del control de la replicación de VIH. Es necesario determinar los mecanismos que inducen la generación y la pérdida de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ para el diseño de estrategias que permitan un mejor control de la replicación de VIH.

Palabras claves:

Virus de la inmunodeficiencia humana, VIH, SIDA, células T CD8, células T CD4, carga viral, ganglios linfáticos, tratamiento antirretroviral, anti-VIH,

ABSTRACT

CD8⁺ T cells are essential for the control of HIV (Human Immunodeficiency Virus) replication, and their ability to control replication has been associated to plasmatic viral load. Inhibition of HIV transcription by soluble factors from CD8⁺ T cells is known as CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response. CD8⁺ T cell ability to inhibit HIV replication is related to the clinical stage of patients. Highly active antiretroviral treatment (HAART) reduces viral load in plasma and lymph nodes, promoting an increase of circulating CD4⁺ T cell of patients. HAART improves the immune response to opportunistic infections, but a decreasing number of HIV specific CD8⁺ T cells, and is unknown its effect on CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response. As lymph nodes are important sites for HIV replication and immune response to HIV, it was relevant to determine whether any association existed between CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response in lymph nodes and peripheral blood, and the effect of HAART over this response.

This work was divided in two parts. Firstly, we made a prospective follow up of CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response along HIV infection in early, intermediate and late stages, in 37 patients without evidence of opportunistic infections. Secondly, we included 24 HIV positive patients with lymphadenopathy at different stages of disease and without opportunistic infections. Patients in intermediate and late stage initiated HAART, and patients in early stages remained without treatment. We took blood samples from all patients to determine HIV viral load, CD4⁺ T cell counts and CD8⁺ T cell non-cytotoxic activity. Surgeons took lymph nodes from patients with lymphadenopathy only. Microbiology studies were made to the biopsies to determine the presence of opportunistic infections.

There were no age or sex differences between groups. There was a negative correlation between plasma viral load and CD4⁺ T cell counts as expected. Lymph nodes showed 79% of follicular hyperplasia and 21% of lymphoid depletion. CD8⁺ T cell from late stage patients has lower CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response in peripheral blood ($p < 0.0001$, ANOVA) and lymph nodes ($p < 0.01$, ANOVA). Peripheral blood and lymph node CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response shows negative correlation with plasma viral load and positive correlation with CD4⁺ T cell counts. HAART allows viral load decrease and CD4⁺ T cell increase. CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response from blood of patients in late stage shows an increase 4 weeks after treatment initiation. Finally, there is positive correlation between CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response from lymph node and peripheral blood CD8⁺ T cells.

CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response from peripheral blood and lymph nodes are related to clinical stage, plasma viral levels and CD4⁺ T cell counts. HAART could improve CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response in the late stages of disease. It is possible that non-cytotoxic CD8⁺ T cell response is related to the immune reconstitution associated with viral load control. It is necessary to understand the mechanisms that allow generation and loss of CD8⁺ T cell anti-HIV non-cytotoxic response to develop strategies that improve HIV replication control.

Keywords:

Human immunodeficiency virus, HIV, AIDS, CD8 T cells, CD4 T cells, viral load, lymph node, lymphoid tissue, antiretroviral therapy,

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Datos epidemiológicos generales de la infección por VIH

Los primeros informes de la infección por VIH se presentaron en 1981¹. En este reporte se informó de la infección por un patógeno pulmonar oportunista, *Pneumocystis carinii* en 5 adultos jóvenes. A partir de ese momento se iniciaron estudios epidemiológicos para determinar las vías de transmisión de la enfermedad, con lo que se describió la infección por VIH en homosexuales jóvenes^{2,3}, personas transfundidas con sangre o derivados^{4,5}, en usuarios de drogas intravenosas, recién nacidos⁶, mujeres con parejas infectadas⁷ y prisioneros⁸. El agente etiológico fue descrito entre 1983 y 1984⁹⁻¹¹, el cual posteriormente fue denominado como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

A pesar de los grandes avances en investigación clínica y básica, la enfermedad se ha diseminado ampliamente en el mundo. El Programa Conjunto de las Naciones Unidas para sobre VIH/SIDA (UNAIDS) en su reporte sobre la situación de la epidemia de VIH/SIDA de Diciembre de 2007¹², menciona que existen en el mundo cerca de 33.2 millones de personas vivas infectadas por VIH, principalmente en el sur de África. Además, se estima que durante el 2007 ocurrieron 2.5 millones de nuevas infecciones¹². El último reporte de Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA (CONASIDA) expresa que en México han ocurrido 105,170 infecciones de 1983 a Junio de 2006. Los estados más afectados durante el 2006 fueron el Distrito Federal, Estado de México, Veracruz y Jalisco¹³.

1.2. Estructura de VIH

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) fue aislado por primera vez en 1983⁹. Este virus pertenece a la familia *Retroviridae*¹⁴, debido a que su material genético se encuentra formado por RNA de doble cadena. Durante el ciclo de replicación el VIH requiere de la enzima transcriptasa reversa, que es una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA¹⁵. El VIH pertenece a la subfamilia de *Lentivirus* debido a sus inusuales características morfológicas, entre las que se encuentra la presencia de un núcleo cilíndrico o cónico en la partícula viral madura (Fig. 1) y la presencia de los genes reguladores *tat* y *rev*. Los genes *tat* y *rev* no se encuentran presentes en otros genomas retrovirales. El genoma de VIH incluye genes que para la síntesis de proteínas estructurales, enzimáticas y reguladores, y el virus infecta células que expresan la molécula CD4 en su membrana (células T CD4⁺, monocitos, y células derivadas como los macrófagos, etc.)^{16 17}(Fig. 2).

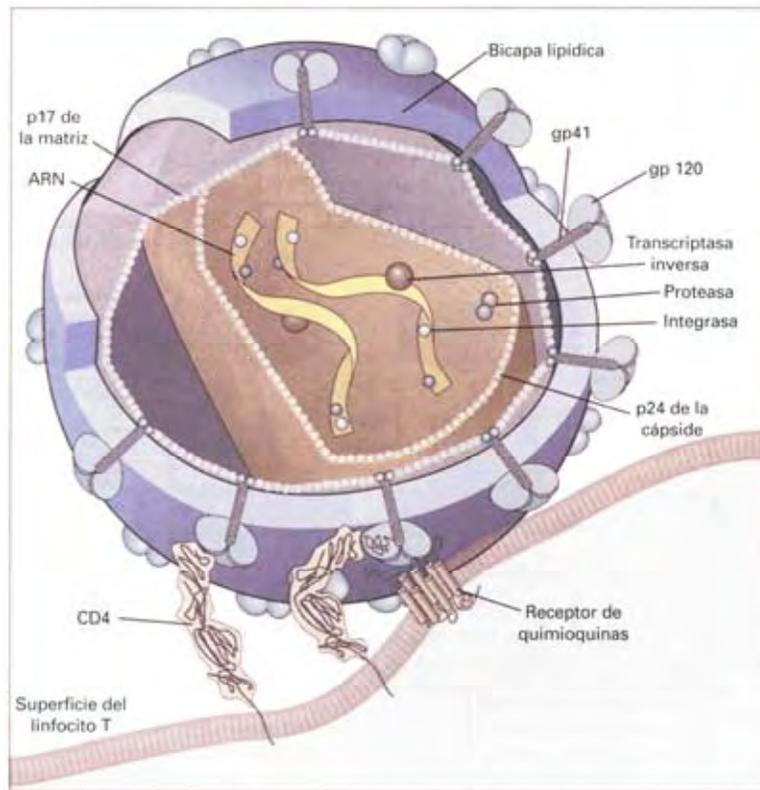


Fig. 1. Estructura del VIH.

Esquema donde se muestra la localización de cada una de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos virales, así como la interacción de la partícula viral a la superficie celular. Modificado de¹⁸.

1.2.1. Genes y proteínas que conforman al VIH

El genoma de VIH consta de dos copias idénticas de RNA de 9.8 Kilobases (Kb) de longitud por cada partícula viral, y que contiene genes que codifican para 15 proteínas¹⁹ (Fig. 2). Durante el ciclo de replicación de VIH, el RNA mediante un proceso de transcripción reversa produce una copia de DNA de doble cadena que se inserta en el DNA de la célula infectada. El DNA de VIH integrado en el genoma de la célula huésped es conocido como provirus o DNA proviral²⁰. En ambos extremos del DNA proviral se encuentran secuencias repetidas conocidas como terminaciones largas repetidas (LTR), que son los sitios de inicio de transcripción de genes tales como NF- κ B y AP-1²¹. Los genes de VIH están localizados en la región central del DNA proviral²² y codifican para proteínas de tres clases distintas: a) las proteínas estructurales, que codifican para proteínas que formarán las partículas virales, b) las proteínas reguladoras, que participan en los procesos tempranos de regulación de la transcripción y c) las proteínas accesorias, que incrementan la capacidad infectiva de VIH y favorecen procesos para la internalización del genoma, entre otras funciones²³.

- Proteínas estructurales, Gag, Pol y Env
- Proteínas reguladoras, Tat y Rev
- Proteínas accesorias, Vpu, Vpr, Vif y Nef

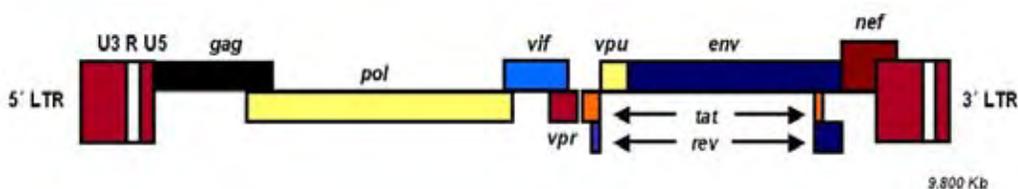


Fig. 2. Estructura genómica de VIH

En la figura se muestran los genes que codifican para proteínas estructurales, enzimáticas y reguladoras.

Gag

El gen *gag* codifica al polipéptido precursor Gag de 55 kilodaltones (kDa). Gag se asocia a la membrana celular y que tiene la capacidad de unir 2 copias del RNA de VIH. Cuando el virión sale de la célula, la enzima proteasa (p10, aspartil-proteasa, derivada del gen *pol* de VIH) corta el polipéptido en 4 segmentos: 1) proteína de matriz (p17), 2) proteína de cápside (CA, Antígeno p24 de VIH), 3) proteína de nucleocápside (NC, p9) y 4) p6. Cuando ha ocurrido el corte de Gag, los viriones maduros, podrán infectar a las células²⁴. Las proteínas de matriz permanecerán unidas a la cara interna de la membrana viral, estabilizando el virión, y posteriormente, facilitaran el transporte hacia el núcleo²⁵.

Pol

El gen *pol* codifica para un polipéptido que contiene a regiones con actividad de proteasa (p10), actividad de integrasa (p31), actividad de RNAsa H (p15) y actividad de transcriptasa reversa (p50)²⁶. Durante la maduración viral, la región con actividad proteasa corta el polipéptido Pol para separar las diferentes enzimas, y que puedan realizar su actividad durante los diferentes pasos durante el ciclo de replicación. La enzima transcriptasa reversa tiene actividad de polimerasa dependiente de RNA y polimerasa dependiente de DNA, es decir, durante el proceso de transcripción, la polimerasa agrega nucleótidos para producir una copia de DNA de doble cadena a partir de RNA genómico presente en el virión. El 50% de las moléculas de transcriptasa tienen unidas la enzima RNAsa H. Mientras transcriptasa produce una copia de DNA a partir del RNA genómico de VIH, RNAsa H remueve el RNA genómico original de la primera cadena y sintetiza la cadena complementaria de DNA; este proceso se completa en las primeras 6 horas de la entrada del virus a la célula²⁷.

Integrasa

La enzima integrasa (p31) permite la unión del DNA proviral de VIH con el DNA genómico de una célula, mediante tres actividades enzimáticas: a) la actividad de exonucleasa, permite la eliminación de dos nucleótidos terminales del extremo 3' del DNA viral; b) la actividad endonucleasa de doble cadena, permite el corte del DNA de la célula en el sitio donde será incorporado el DNA viral; c) la actividad de ligasa, permite la unión covalente de cada extremo del DNA proviral con el DNA de la célula. La reparación en el sitio de integración, donde fueron eliminados los dos nucleótidos en cada extremo, es mediada por enzimas celulares²⁸, esencialmente de la vía de reparación de unión terminal no homóloga (NHEJ), entre las que se incluyen protein-quinasas dependientes de DNA (DNA-PKcs), las cinasas relacionadas ATM y ATR así como el heterodímero de unión a DNA Ku70/Ku80²⁹.

Env

El producto del gen *env* es el polipéptido Env de 160 kDa (gp160) que es cortado por la proteasa celular furina en dos fragmentos gp41 y gp120³⁰. La glicoproteína gp41 contiene los dominios trans-membranales de *env*, y gp120 está localizada en la superficie de la membrana y se une por interacciones no covalentes a gp41. Las interacciones del virus con la molécula CD4 celular son mediadas por gp120³¹.

Tat

La proteína Tat está constituida por 72 ó 101 aminoácidos. Tat es esencial para la replicación de VIH, debido a que se une al RNA de VIH en la región del elemento de respuesta de trans-activación (TAR). La región del elemento de respuesta de trans-activación (TAR) se encuentra localizada en la región 5' terminal del genoma de VIH y es conocido como el elemento de respuesta de transactivación. La unión de Tat a del

elemento de respuesta de trans-activación (TAR), activa e incrementa 1000 veces la transcripción del LTR de VIH³².

Rev

Es una proteína de 13 kDa, que induce la transición de la fase temprana a la fase tardía de la expresión de genes de VIH³³. Rev se acumula en el núcleo y nucléolo de la células infectadas y se une a la zona del elemento de respuesta a Rev (RRE) o elemento de respuesta a Rev, que es una región de la estructura secundaria del RNA de VIH³³. La unión de Rev al elemento de respuesta a Rev (RRE) facilita la exportación de RNA no procesado o parcialmente procesado del núcleo al citoplasma.

Nef

Nef es una proteína miristoilada de 27 kDa. Nef es la primera proteína viral que se acumula a niveles detectables después de la infección de la célula. Nef estimula la infectividad de los viriones y disminuye la expresión de CD4 en la membrana celular. Nef induce la disminución de la expresión de CD4 mediante el incremento de la endocitosis y la degradación lisosomal de CD4³⁴.

Vpr

Es una proteína de 14 kDa que se encuentra constituida de 96 aminoácidos. Vpr es incorporada en las partículas virales, aproximadamente 100 copias de Vpr en cada virión. Vpr facilita la localización nuclear del complejo preintegración³⁵.

Vpu

Vpu es un polipéptido transmembranal de 16 kDa. Vpu se expresa a partir del RNA mensajero que también codifica a Env pero que es traducido a niveles menores que

Env. Las funciones de Vpu incluyen el incremento de la liberación de viriones, y la disminución de expresión de CD4³⁶.

Vif

Vif es un polipéptido de 23 kDa. Vif es esencial para la replicación de VIH en linfocitos, macrófagos y ciertas líneas celulares. Existen líneas celulares en las que no se requiere a Vif para la replicación de VIH, sugiriendo que estas células pueden expresar una proteína que puede complementar su actividad³⁷.

1.3. Mecanismo de entrada de VIH a las células, tropismo celular y dinámica de replicación.

El VIH entra en una célula cuando se fusionan la envoltura con la membrana de la célula blanco. La reacción de fusión es mediada por la glicoproteína de envoltura gp120, que tiene alta afinidad por la molécula CD4. CD4 es el receptor primario de VIH en la superficie celular y se encuentra presente en linfocitos, monocitos y macrófagos. Las células infectadas que expresan Env pueden fusionarse con células T CD4⁺, por un mecanismo similar a la fusión virus-célula, permitiendo la formación de células gigantes (sincicia)³⁸.

Existe la aceptación general de que el tropismo de un aislado de VIH depende de la capacidad de infectar uno de los dos principales grupos celulares permisivos, linfocitos T CD4⁺ o monocitos/ macrófagos. De esta forma, se han identificado tres tropismos celulares o fenotipos biológicos: a) linfotrópicos; b) macrofagotrópicos y c) duales. En general, los aislados linfotrópicos tienen la capacidad de infectar células T CD4⁺ y de inducir sincicia, pero tienen pobre capacidad de infectar macrófagos. Los aislados de VIH macrofagotrópicos infectan eficientemente a monocitos y macrófagos, pero tienen pobre capacidad de infectar células T. Los aislados de VIH duales tienen la capacidad de infectar eficientemente ambos grupos celulares³⁸.

El tropismo de VIH se explica tomando en cuenta dos consideraciones: a) la capacidad de unirse a alguna de las dos moléculas co-receptoras de la familia de los receptores de quimiocinas, CXCR4 y CCR5; y b) los patrones de expresión de estos co-receptores. La molécula CXCR4 se expresa principalmente en células T CD4⁺. La molécula CCR5 se expresa en monocitos y macrófagos. Los aislados de VIH con fenotipo dual pueden infectar a células que expresen cualquiera de los dos co-receptores³⁸. Sin embargo, este modelo no explica todos los tropismos observados.

Por ejemplo, se ha observado que las células T CD4⁺ pueden expresar ambos receptores (CXCR4 y CCR5), y que los individuos infectados por VIH sufren de una disminución de la población de células T CD4⁺ CCR5⁺³⁹. Además, existen otros receptores de quimiocinas que pueden ser utilizados de forma alternativa por VIH entre los que se encuentran CCR2B, CCR3, CCR8, CCR9 y CX₃CR1³⁸. La distribución de estos receptores es muy amplia y van desde monocitos, macrófagos, células T, células NK, células dendríticas, basófilos, eosinófilos, precursores hematopoiéticos, células de la microglia, neuronas y otros⁴⁰. Aunque es posible que estas células puedan ser infectadas, no todas estas infecciones son productivas.

En etapas primarias de la infección existe un predominio de cepas macrófago-trópicas. La aparición de cepas con tropismo por linfocitos en las etapas tardías de la infección se ha asociado a evolución de la enfermedad y aparición de síntomas relacionados a SIDA. Las células T CD4⁺ de memoria CCR5⁺ presentes en tejidos linfoides pueden ser infectados por cepas de VIH CCR5 y son causantes de la disminución de esta población al inicio de la infección⁴¹.

1.3.1. Eventos de propagación de VIH en el individuo infectado

Durante la transmisión sexual del Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV), el cruce de monocitos y macrófagos infectados a través de la mucosa vaginal permite la llegada del virus a los ganglios linfáticos^{42,43}. En los estadios temprano e intermedio de la infección por VIH, se ha observado que la replicación ocurre predominantemente en células T CD4⁺ en el sitio de entrada y en los tejidos linfoides^{44,44}. Una a dos semanas después de la infección comienza una producción masiva de viriones y en biopsias de tejidos linfoides y el tejido linfoide asociado a

intestino el 90% de las células infectadas son células T CD4⁺. En los estadios tardíos hay 10 a 100 veces menos células dendríticas que células T CD4⁺ infectadas.

En la etapa de infección primaria, el VIH infecta células de Langerhans de mucosas y células dendríticas tisulares presentes en lámina propia subyacente a epitelio. VIH cruza las superficies mucosas y se disemina utilizando el sistema linfático⁴³⁽⁵⁷⁵⁾. Posteriormente, el VIH infecta células T CD4⁺ de ganglios linfáticos adyacentes mediante la transferencia de virus de células dendríticas que están en contacto con células T CD4⁺⁴⁴. En esta etapa, aproximadamente del 30-40% de las células T CD4⁺ totales se encuentran infectadas, y una vez infectadas, son eliminadas en los siguientes 4 días, acompañado de una evidente disminución de células T CD4⁺ de memoria⁴⁵. Esto se ha descrito tanto en la infección aguda por el virus de la inmunodeficiencia del simio como en la infección por VIH. Se cree que la pérdida de las células T CD4⁺ de memoria pueda deberse a su infección masiva en mucosas⁴⁵.

Dentro de los primeros 4-11 días posteriores a la infección es posible detectar VIH al virus en plasma⁴⁶ y aparecen los síntomas del síndrome retroviral agudo, con características muy similares a la infección por mononucleosis infecciosa⁴⁷. Durante esta etapa primaria, los síntomas se resuelven y la carga viral tiende a disminuir como consecuencia del desarrollo de una respuesta inmunológica anti-VIH. Después de la infección, existe un rápido incremento en la viremia plasmática, con amplia diseminación del virus a los órganos linfoides y las partículas virales son atrapadas por las células dendríticas foliculares mediante complejos inmunológicos mediados por anticuerpos⁴⁸.

1.3.2. Replicación de VIH y el efecto sobre la función y estructura de los ganglios linfáticos.

Los ganglios linfáticos son sitios importantes de la replicación de VIH y de la respuesta inmunológica anti-VIH. En los ganglios linfáticos ocurre la producción, almacenaje y persistencia de VIH, donde se observa un alto número de células T CD4⁺ infectadas y altos niveles de carga viral desde etapas tempranas de la infección⁴⁹. Los linfocitos en sangre periférica, constituyen sólo el 2% de los linfocitos totales, el 98% restante se encuentran distribuidos en el resto de cuerpo, la mayor parte de los cuales se encuentran en los tejidos linfoides⁵⁰. En los ganglios linfáticos, las células T CD4⁺ son parcialmente susceptibles a la infección por VIH. Una porción de las células T CD4⁺ (30-55%) de los centros germinales expresan el antígeno de diferenciación CD57. En las etapas tempranas de la infección por VIH, CD57 se expresa casi exclusivamente en células CD4⁺ localizadas en las áreas foliculares, lo cual podría representar sitios importantes de replicación *in vivo*⁵¹.

Después de su llegada a los ganglios linfáticos, los virus extracelulares son atrapados en la superficie de las células dendríticas foliculares mediante la formación de complejos antígeno-anticuerpo, dentro de los centros germinales de los ganglios linfáticos. Los centros germinales son sitios de recirculación de células T CD4⁺, y durante la infección por VIH, las poblaciones de células T CD4⁺ se exponen a los virus infecciosos extracelulares. Las células T CD4⁺ presentes en los ganglios linfáticos son infectadas y comienza a producir partículas virales, como se ha mostrado en el hecho de que la mayoría de las células VIH-RNA positivas se encuentran en los centros germinales⁵¹. El DNA de VIH integrado (células infectadas productivas), se encuentra en las células T CD4⁺ del manto folicular y la paracorteza⁵². Las células productivamente infectadas *in vivo* contienen entre 50 y 100

copias de RNA de VIH por célula mientras que las infecciones *in vitro* contienen 1,100 copias por célula. Los máximos *in vivo* son de ~200 copias de RNA de VIH por células, mientras que los máximos *in vitro* son de ~4000 copias de RNA de VIH por célula⁴², lo que indica que los modelos experimentales difieren de lo que ocurre *in vivo*.

Los constantes ciclos de replicación viral y activación crónica parecen ser la causa de los cambios patológicos en la arquitectura de los ganglios linfáticos. Conforme la infección progresa, la población de células T CD4⁺ de ganglios linfáticos disminuye, con eventual pérdida de todas las estructuras anatómicas reconocibles⁵². Estos órganos deberán preservar su integridad estructural para asegurar una apropiada función de los mecanismos homeostáticos que mantienen el *pool* de células T CD4⁺ vírgenes, las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígeno, y las señales de citocinas deberán alcanzar sus células blanco tanto es su microambiente como en otros microambientes dentro de los ganglios linfáticos. En muchos estudios se ha mostrado que la homeostasis de células T CD4⁺ es aún más dependiente de la preservación de la estructura de los ganglios linfáticos, que de la presencia de células T CD8⁺⁴¹. En las etapas tardías de la infección se observan mayores áreas de depósito de colágeno formando grandes áreas de fibrosis, que correlaciona inversamente con los niveles de células T CD4⁺ vírgenes⁵³.

Muchas de las células T en los ganglios linfáticos inflamados son células T CD8⁺ citotóxicas que se destruyen las células que expresan proteínas de VIH. Las células T CD8⁺ han mostrado sus efectos benéficos y son consideradas el mayor mecanismo de control de la replicación por VIH. Existe una relación temporal entre la aparición de células T CD8⁺ específicas de VIH y la reducción primaria de la carga viral, por lo que se ha sugerido un rol protector debido a la actividad y persistencia de células T CD8⁺ específicas de VIH en individuos no progresores a largo plazo⁴¹.

Existe una alta presencia de células T CD8⁺ en ganglios linfáticos, y la mayor parte de ellos son células de memoria activadas CD45RO⁺, apoyando la hipótesis de que grandes cantidades de células T CD8⁺ citotóxicas pueden contribuir a la linfadenopatía. Espersen et al.⁵⁴ han mostrado que grandes cantidades de células T CD8⁺ expresan Ki-67 y granzima B en los nódulos linfoides podrían ser el centro de la respuesta anti-VIH mediada por células T CD8⁺. Sin embargo, la tendencia a mantener altas respuestas de células T CD8⁺ citotóxicas conforme progresa la enfermedad no parece apoyar esta teoría, pero con bajas cantidades de células T CD8⁺ expresando Ki67 y granzima B.

La activación inicial de células CD8 vírgenes ocurre en la zona de células T de los ganglios linfáticos donde encuentran a las células dendríticas que expresan péptidos antigénicos que se ajustan a su receptor de antígenos⁵⁵. Las células T CD8⁺ están equipadas con moléculas de adhesión como L-selectina y CCR7. Sin embargo la activación disminuye la expresión de L-selectina e incrementa la expresión de moléculas de adhesión como β 1 y β 2 integrinas, requeridas para la permanencia en los tejidos periféricos. Por esto, los marcadores de migración de ganglios linfáticos a tejidos periféricos son una característica de células T activadas.

1.4. Historia natural de la infección por VIH

1.4.1. Características clínicas iniciales de la infección por VIH

Dentro de los primeros 4-11 días posteriores a la infección es posible detectar VIH al virus en plasma⁴⁶ y aparecen los síntomas del síndrome retroviral agudo, que tiene características clínicas muy similares a la infección por mononucleosis infecciosa⁴⁷. Durante esta etapa primaria, los síntomas se resuelven sin necesidad de intervención con medicamentos y la carga viral de VIH tiende a disminuir. El periodo de ventana es conocido como el tiempo que ocurre entre la infección inicial y la aparición de anticuerpos detectables métodos de laboratorio estándar. El síndrome retroviral agudo, se presenta entre los primeros días y semanas posteriores a la infección por VIH^{43,47}. Los síntomas comunes son fiebre, fatiga, linfadenopatía, dolor de cabeza y erupciones, pero se han descrito sudoraciones nocturnas, dolor articular y *Candida* en mucosas^{47,56}. La disminución tanto del número, como en la función de las células T CD4⁺ durante la infección primaria, permite el desarrollo de infecciones oportunistas⁵⁷.

1.4.2. Diagnóstico de la infección por VIH en las etapas tempranas

El diagnóstico de la infección por VIH durante la infección aguda debe basarse en la alta sospecha clínica y en pruebas de laboratorio con alta sensibilidad y alta especificidad, debido a que la determinación de anticuerpos anti-VIH séricos puede ser negativo durante varias semanas⁵⁸. Durante el periodo de infección aguda existe una replicación viral activa que puede ser detectada por métodos de biología molecular, con los cuales se detectan los millones de viriones (copias de RNA-VIH/mL) presentes en el plasma⁵⁹. Sin embargo, los altos niveles de carga viral no

son permanentes, sino que disminuyen hasta niveles indetectables, como resultado del desarrollo de la respuesta inmunológica contra el virus^{46,60,61}. Las pruebas inmunoenzimáticas de tercera generación (ELISA), son capaces de detectar anticuerpos entre 3 y 4 semanas después de la infección⁶².

De acuerdo a los criterios del CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, EU), y la OMS (Organización Mundial de la Salud), el diagnóstico de SIDA puede basarse en alguna de las siguientes 2 condiciones: a) el diagnóstico de una de las condiciones clínicas que definen al SIDA en un individuo con infección por VIH (Categoría C); o b) cuenta de células T CD4⁺ menores a 200 células/ μ L^{63,64}. Las categorías clínicas de la infección por VIH del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) están basadas en la cuenta de células T CD4⁺ más baja y exacta, que no necesariamente es la más reciente (Anexo 1)⁶³: a) Categoría 1: \geq 500 céls/ μ L; b) Categoría 2: 200-499 céls/ μ L; y c) Categoría 3 (SIDA): < 200 céls/ μ L.

1.4.3. Etapas clínicas de la infección por VIH y diagnóstico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)

La infección por VIH es crónica y progresiva. El daño que el VIH ejerce sobre el sistema inmunológico permite que una persona infectada sea vulnerable a una variedad de infecciones oportunistas y condiciones clínicas que pueden ocasionar la muerte de la persona. El grado de daño ejercido por VIH sobre el sistema inmunológico, puede ser observado mediante la medición de células T CD4⁺ circulantes. Si la cuenta absoluta de células T CD4⁺ circulantes (células/ μ L) es menor a los valores normales, habla de un deterioro del sistema inmunológico, así como del

incremento de la probabilidad de adquirir infecciones oportunistas. La distinción entre “infección por VIH” y “SIDA” es importante porque tiene implicaciones clínicas y pronósticas.

En etapas avanzadas de la infección por VIH se presentan manifestaciones clínicas que definen al SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida)^{1,65}. El tiempo de supervivencia de individuo infectado por VIH depende de los eventos asociados al desarrollo de SIDA. Tenemos que considerar que el tiempo supervivencia después del desarrollo de SIDA varía con respecto a la edad del individuo, el número de células T CD4⁺ circulantes y la enfermedad desarrollada. Un estudio muestra que si un individuo desarrolla sólo una condición que define al SIDA (Anexo 1, categoría C), el tiempo de supervivencia es de 3 a 51 meses, mientras que si se desarrollan 2 condiciones, la supervivencia disminuye a la mitad⁶⁶. El tiempo de supervivencia de los pacientes con SIDA y afectaciones neurológicas son cortos, entre 3 y 9 meses⁶⁶. La media de supervivencia después del diagnóstico de SIDA en Estados Unidos, hasta antes del inicio de antirretrovirales era de 10 a 12 meses. Con el inicio del uso de medicamentos antirretrovirales en los pacientes con VIH/SIDA se ha observado una disminución significativa de la mortalidad y morbilidad⁶⁷ como consecuencia de una mejoría del sistema inmunológica y una disminución de la presencia de infecciones oportunistas⁶⁸.

1.4.4. Tiempo de evolución de la infección por VIH

La evolución de la la infección por VIH se inicia con el contacto del virus o células infectadas con células del individuo susceptible. VIH entra en la célula y comienza su ciclo de replicación produciendo virus. El transporte de viriones al organismo puede

darse a través de la linfa y posteriormente a la sangre. En las primeras 2-3 semanas es posible detectar el VIH en plasma y una pérdida de células T CD4⁺. Después del periodo de infección aguda, se establece en aproximadamente 9 meses, un punto de equilibrio entre la producción de virus, el desarrollo de respuestas inmunológicas y el número de células T CD4⁺. Durante este periodo se presentan muy pocas o incluso ninguna manifestación clínica de la infección por VIH^{69,70} (Fig. 3). El tiempo que pasa entre la infección inicial por VIH y el desarrollo de los síntomas de SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) varía entre los individuos infectados por VIH. El tiempo promedio de evolución a SIDA es de 10 años. Existen evoluciones rápidas, en las que en 5 años se desarrolla SIDA, pero también se han descrito evoluciones lentas en que hay individuos con más de 10 años, con cuentas de células T CD4⁺ muy estables y sin síntomas clínicos de SIDA⁷⁰. En la mayoría de los pacientes con más de 10 años de evolución de la enfermedad se observa alta replicación viral y disminución del número de células T CD4⁺⁷¹. En los pacientes con evoluciones promedio asintomáticos se observa una pérdida promedio de 50-90 células T CD4⁺/μL por año⁷². La ausencia de tratamiento antirretroviral causará la muerte de una persona infectada por VIH en 10 años como promedio.

Existen reportes de evolución rápida de la infección por VIH en niños infectados por transfusión sanguínea, aunque es raro que ocurra una evolución rápida en los primeros 2 años de infección⁷³. Después del periodo de infección aguda, los niveles indetectables de carga viral en sangre periférica se han asociado con niveles estables de células T CD4⁺, y los incrementos en carga viral plasmática se asocian con disminución en el número de células T CD4⁺⁷⁴.

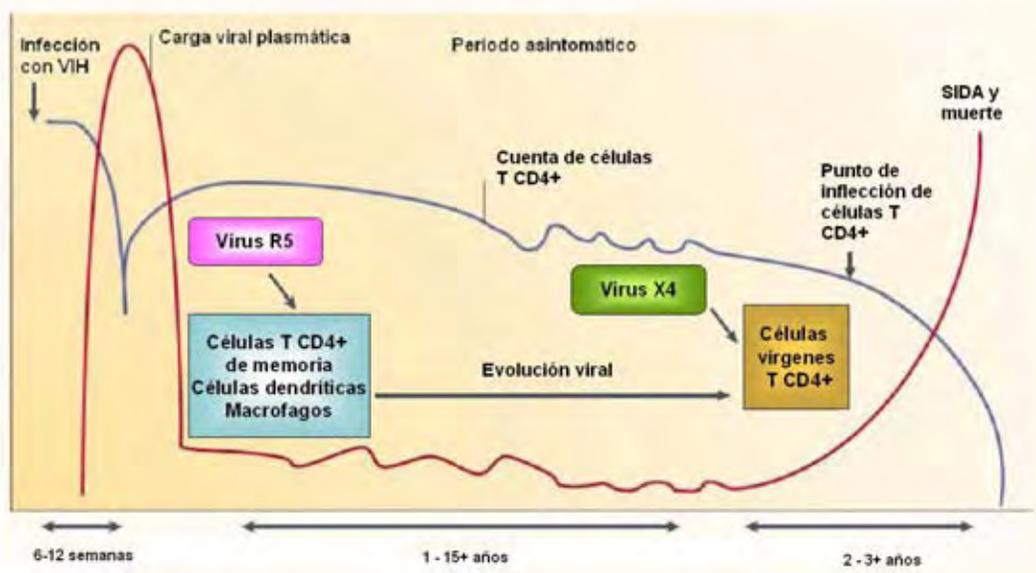


Fig. 3. Diagrama del curso de la infección por VIH.

Esta figura ilustra la relación entre la carga viral de VIH (línea roja), y la cuenta de células T CD4⁺ (línea azul), con respecto al tiempo en un curso promedio de la infección no tratada por VIH. Virus R5, con tropismo por células que expresan el co-receptor CCR5. Virus X4, con tropismo por células que expresan el co-receptor CXCR4 (Modificado de ⁷⁵).

La infección de un individuo por el VIH, así como el tiempo evolución a SIDA, depende de varios factores:

a) Factores del huésped:

En el caso de la infección por VIH se ha descrito que la presencia de ciertos alelos de HLA favorece el control de la replicación por VIH durante la etapa de infección aguda e incluso durante la presencia de síntomas, a diferencia de aquellos individuos que carecen de este alelo⁷⁶. Como contraparte aquellos virus con proteínas que no son reconocidos por células T CD8⁺ son capaces de replicar y son la fuente de altos niveles carga viral plasmática⁷⁷. Las respuestas de células T CD8⁺ en individuos HLA-

A2 capaces de controlar la infección primaria, se pierden por la aparición de virus mutantes⁷⁸. Algunos genes del complejo mayor de histocompatibilidad como el HLA-A*6802 y HLA-B18 se han asociados a la susceptibilidad de adquirir VIH⁷⁹, a diferencia de presencia de IgA en mucosa vaginal⁸⁰ y de la mutación homocigota CCR5Δ32 del co-receptor de VIH⁸¹, que se han asociado a una baja susceptibilidad de adquirir la infección por VIH. La presencia de los genes de HLA-B35⁸² y HLA-Cw4⁸³ en individuos con infección por VIH, se ha asociado a una rápida evolución a SIDA, mientras que los genes HLA-B27, HLA-B63 HLA-B57 se han asociado a una evolución lenta⁸⁴⁻⁸⁶.

b) Factores virológicos:

El tropismo de VIH es mediado por el uso los co-receptores CXCR4 y CCR5⁸⁷. El predominio del cepas con tropismo por células T se ha asociado a una rápida disminución del número de células T CD4⁺, y por lo tanto, con una rápida evolución a SIDA⁸⁸. Por otro lado, se han descrito pacientes en quienes la presencia de mutaciones o supresión de regiones en el gen *nef* de VIH se han asociado con bajos niveles de carga viral y con lenta evolución a SIDA^{89,90}.

1.5. Respuestas inmunológicas anti-VIH

La infección por VIH se caracteriza por el desarrollo de dos tipos respuestas inmunológicas: a) respuestas específicas y b) respuestas inespecíficas. En ambos casos el VIH condiciona su desarrollo, pero sólo las respuestas específicas son capaces de reconocer proteínas de VIH, mientras que las respuestas inespecíficas están enfocadas a la producción de citocinas u otras proteínas que pueden tener efecto sobre VIH, pero también sobre otros virus.

Como parte de las respuestas específicas, se encuentran la producción de anticuerpos y el desarrollo de células T CD8⁺ citolíticas. Los anticuerpos son capaces de reconocer secuencias cortas de 8-15 aminoácidos de VIH. Los anticuerpos son desarrollados por el procesamiento de péptidos de VIH por los linfocitos B. La producción de anticuerpos tiene poca relevancia para el control de la infección por VIH, pero son de gran utilidad para el diagnóstico de la infección. En cambio, las células citolíticas reconocen secuencias de péptidos unidos a moléculas de HLA en la superficie de células presentadoras de antígenos. Las células T CD8⁺ son capaces de proliferar, controlar la replicación de VIH⁹¹ y de tener efectos citolíticos sobre las células infectadas con VIH⁹². En modelos con simios infectados por virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), se ha mostrado claramente que si se eliminan las células T CD8⁺, existe un rápido incremento en los niveles de carga viral⁹³. Cuando se incrementan los niveles de células CD8⁺ específicas del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), los niveles plasmáticos del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) disminuyen⁹³. Las células T CD8⁺ que reconocen secuencias de VIH unidas a moléculas de HLA en la superficie otras células, liberan gránulos que contienen enzimas citolíticas. Las células infectadas con VIH que expresan proteínas de VIH en

su superficie, son destruidas por estos gránulos citolíticos. Sin embargo, la capacidad de reconocimiento de las células infectadas por las células T CD8⁺ citolíticas depende de los niveles antigénicos. La dependencia de las células T CD8⁺ por los niveles antigénicos de VIH se ha mostrado claramente en pacientes que inician tratamiento antirretroviral, en quienes se observa una disminución del número de células T CD8⁺ citolíticas en correlación con la disminución de los niveles plasmáticos de VIH.

Dentro de las respuestas inespecíficas, se encuentra capacidad de las células T CD8⁺ de producir factores solubles que inhiben la replicación de VIH, mediante dos mecanismos descritos:

- a) La producción de β -quimiocinas. Como se mencionó en la sección 1.3, el VIH tiene dos co-receptores además de la molécula CD4, que son las moléculas CCR5 y CXCR4. La molécula CXCR4 es receptor de α -quimiocinas, y las β -quimiocinas se unen al receptor CCR5. Durante la infección por VIH, las quimiocinas bloquean la unión de VIH a los receptores. Sólo las β -quimiocinas son capaces de inhibir la infección de las células por el VIH que utiliza exclusivamente el receptor CCR5, debido a que existen virus duales o que utilizan otros receptores como CCR1 o CCR3^{94,95}. Las β -quimiocinas conocidas de bloquear la entrada de VIH a las células son MIP-1 β , MIP-1 α y RANTES. Algunas quimiocinas como se unen al receptor CXCR4, pero su participación en el bloqueo de entrada de VIH a la célula es mucho menor³⁸. El mecanismo de bloqueo de entrada es de tal relevancia que se han desarrollado medicamentos que bloquean este mecanismo⁹⁶⁻⁹⁸.
- b) La actividad la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (del inglés *CD8 non-cytotoxic anti-HIV response*), como se verá en la sección 1.5.4, inhibe la replicación de VIH mediante la producción de factores solubles que inhiben la

transcripción de genes de VIH, esencialmente a nivel de región LTR presente en genoma de los retrovirus. Su principal efecto in vitro es la inhibición de la replicación, mostrando baja o nula producción viral de las células infectadas en presencia de células T CD8⁺ de pacientes con VIH.

Estos dos mecanismos, correlacionan con la condición clínica del paciente, es decir, se observa baja actividad en las etapas avanzadas de la infección por VIH, y se desarrollan por efecto de la infección por VIH y otros retrovirus. Los dos tipos de respuestas de las células T CD8⁺, tanto las específicas como las inhibitorias, son dependientes de la función general del sistema inmunológico, razón por la cual pierden la capacidad controlar la infección por VIH en etapas avanzadas de la infección.

1.5.1. Respuestas de anticuerpos anti-VIH

Las respuestas inmunológicas mediadas por anticuerpos tienen mucha importancia para el control en las infecciones virales. Existen 3 anticuerpos que han mostrado tener actividad antiviral: IgG, IgM e IgA. Estos anticuerpos pueden neutralizar la infectividad viral de muchos de los virus conocidos⁹⁹. Ejemplos claros de esta neutralización son las vacunas desarrolladas para el virus de la influenza^{100,101} o la rabia¹⁰². Otro ejemplo es la presencia de anticuerpos neutralizantes en infección por virus de la hepatitis C¹⁰³, los cuales se desarrollan después de establecida la infección. Los anticuerpos pueden bloquear la infección de una célula mediante tres mecanismos: a) bloqueo de la unión del virus a la célula; b) bloqueo de la entrada del virus en la célula; c) impidiendo su separación dentro de la célula. Los anticuerpos que pueden unirse a proteínas de la superficie de los virus, por lo cual neutralizan o

bloquean inmediatamente su interacción con las células. El mecanismo de neutralización viral involucra la unión del anticuerpo a las proteínas del virus, lo que en muchas ocasiones altera el receptor viral de la célula blanco⁹⁹.

En el caso de VIH, los anticuerpos dirigidos a proteínas de VIH tienen muy poca actividad neutralizante. Existen anticuerpos neutralizantes que tienen especificidad a aislados virales primarios de VIH¹⁰⁴, así como anticuerpos dirigidos a restos virales¹⁰⁵. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos a proteínas de VIH reconocen una de las tres distintas regiones de las proteínas de la envoltura de VIH: a) la tercer asa de la región hipervariable (V3) de las glicoproteína de envoltura gp120; b) los sitios de unión a la molécula CD4; y c) la proteína transmembranal gp41¹⁰⁶.

La replicación de VIH es muy activa en los primeros días de infección, pero los primeros anticuerpos no aparecen hasta varios días después, por lo que su efectividad en las etapas iniciales es muy limitada. De hecho, experimentos con monos en quienes se les han eliminado las células B, mediante la administración de anticuerpos anti-CD20, se retrasa significativamente la aparición de anticuerpos neutralizantes, pero no se altera la dinámica de eliminación viral¹⁰⁷. En experimentos en donde los macacos son vacunados con el virus quimérico SHIV_{89.6PD} y posteriormente infectados con SIV_{mac239}, se ha observado que aunque es importante el desarrollo de anticuerpos neutralizantes dirigidos a la cepa vacunal, no tienen importancia en el control de la replicación de la cepa infectiva, y los niveles de anticuerpos neutralizantes disminuyen después de la administración de anticuerpos anti-CD20 a los macacos¹⁰⁸.

1.5.2. Funciones de las células T CD8⁺ citotóxicas

Las células T CD8⁺ son esenciales para el control de las infecciones virales^{109,110}. Es claro que las células T CD8⁺ citotóxicas son capaces de controlar a VIH^{60,61,92}. El reconocimiento de los antígenos de VIH depende de la capacidad de unión del antígeno a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad en la células presentadora de antígeno y del reconocimiento del complejo antígeno-HLA por el receptor de células T CD8⁺ (TCR)¹¹¹.

Las células T CD8⁺ de pacientes con infección por VIH reconocen a los antígenos Gag, Pol y Env, Nef y Tat en las primeras 3 semanas de infección^{61,92}, aunque estas células pierden muy tempranamente su capacidad de proliferar conforme los niveles de carga viral se incrementan¹¹². Las respuestas de las células T CD8⁺ citotóxicas más intensas en la respuesta primaria a la infección por VIH están dirigidas hacia epítomos de Nef, Gag y Pol, aunque se han mostrado en menor grado respuestas hacia Env, Vif, Rev, Vpr, Tat y Vpu^{113,113}.

El número de clonas de células T CD8⁺ específicas de VIH desarrolladas, así como en el grado de expansión de estas clonas correlacionan positivamente con el grado de control de la replicación de VIH y correlacionan inversamente con el grado de evolución de la enfermedad^{60,61,92}. Un problema observado es que existe un gran número de células T CD8⁺ específicas de VIH en los pacientes con rápida evolución de la enfermedad y que presentan altos niveles plasmáticos de VIH¹¹⁴. Por otro lado, la incapacidad de reconocer ciertos péptidos de VIH, permite la replicación de las cepas no reconocidas por las células T CD8⁺ específicas de VIH¹¹⁵⁻¹¹⁸. La presencia de virus con mutaciones en ciertos epítomos está relacionado a la disminución de la afinidad del complejo mayor de histocompatibilidad por el epítomo, lo que disminuye la capacidad de respuesta de las células T CD8⁺ citotóxicas¹¹⁹.

Cuando se inicia el reconocimiento de antígenos en la etapa inicial de la infección, existe una alta replicación de VIH, lo que se refleja con altos niveles de viremia plasmática. Las células T CD8⁺ proliferan después del reconocimiento de antígenos de VIH, aunque su capacidad de proliferación es limitada en etapas tempranas de la infección^{120,121}. La posterior disminución de los niveles plasmáticos de carga viral correlaciona con el desarrollo y expansión de células T CD8⁺ capaces de reconocer antígenos de VIH^{60,92}. El control de la replicación de VIH mediado por células T CD8⁺ específicas depende tanto de la capacidad de reconocer antígenos, del número de antígenos reconocidos, como del número de células que proliferaron después del reconocimiento^{122,123}. Después de que las células T CD8⁺ reconocen un antígeno, rápidamente pueden entrar a ciclos de más de 15 divisiones para producir más de 10,000 células dentro de los primeros 7 días, con ciclos de 4-8 horas¹¹¹.

Después del reconocimiento y expansión, las células T CD8⁺ pueden tener funciones efectoras actividades citotóxicas muy potentes, y pueden entrar a cualquier tejido y destruir sus blancos¹¹¹. Las células T CD8⁺ que reconocen antígenos de VIH son capaces de producir citocinas e interferón, proteínas relacionadas con la función citotóxica como granzima⁵⁴, y liberarlos en gránulos citotóxicos¹²². Los niveles de perforinas en las células de CD8⁺ en tejidos linfoides, se ven disminuidos desde las etapas de infección aguda¹²⁴, y en etapas crónicas, la perforina deja de expresarse en tejidos linfoides^{125,126}. Los pacientes con bajo número de células T CD4⁺ tienen baja producción de IFN γ por células T CD8⁺ que se relaciona con altos niveles de carga viral¹²⁷. Algunas de las células T CD8⁺ expandidas por la exposición a antígenos, deben persistir y ser capaces de manejar reencuentros con los mismos patógenos, es decir establecer memoria inmunológica. A posteriores encuentros con el antígeno, las células T CD8⁺ pueden reaparecer en sitios de infección crónica o latente, o por la presencia de nuevas infecciones¹¹¹.

1.5.3. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺

Las células T CD8⁺ de pacientes con infección por VIH, tienen la capacidad de producir dos tipos de factores solubles que tienen la capacidad de inhibir la replicación de VIH:

- a) Las β -quimiocinas. Como se mencionó en la sección 1.3, además de la molécula CD4 el VIH tiene dos co-receptores que son las moléculas CCR5 y CXCR4. El receptor de las β -quimiocinas es CCR5. Durante la infección por VIH, las β -quimiocinas por las células T CD8⁺ bloquean la infección de las células mediante la unión al receptor CCR5³⁸.
- b) La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, que es mediada por factores solubles que inhiben la transcripción de genes virales a nivel de región LTR presente en los retrovirus. Las principales características de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es que inhibe todas las cepas de VIH y otros retrovirus, no se requiere el contacto célula-célula como en la respuesta específica de células T CD8⁺, y estímulos externos pueden inducir su producción, como la interleucina-2.

A diferencia del bloqueo de la entrada del VIH a la célula mediada por β -quimiocinas producidas por las células T CD8⁺, la inhibición de la replicación de VIH por células T CD8⁺ mediante la inhibición de la transcripción es conocida como respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ inhibe la replicación de VIH tanto en células infectadas in vitro como en células de paciente infectadas naturalmente¹²⁸, pero no impide la entrada del VIH a la célula. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ se describió inicialmente en 1986 en pacientes con

anticuerpos anti-VIH en quienes no era posible aislar el virus en cultivo¹²⁰. A diferencia de la respuesta específica, estos factores solubles fueron descritos¹²⁸ en cultivos en los que se utilizaron membranas semipermeables, colocando en una cámara las células T CD4⁺ infectadas y en la otra a las células T CD8⁺ en los que se observó que VIH no replicaba, a diferencia de los cultivos sin células T CD8⁺, donde VIH replicaba fácilmente. En cultivos de células T CD4⁺ infectadas con VIH, la adición de células T CD8⁺ resultan en una inhibición dosis dependiente¹²⁹. El mecanismo de inhibición de VIH por la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ no está relacionado a la actividad citotóxica, como muestran los ensayos con membranas¹²⁸ y los ensayos de infección aguda de células T CD4⁺¹³⁰. Cuando se ha buscado determinar la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ específicas, no ha podido ser detectada¹³¹. Otras características es que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ no afecta los procesos de proliferación de las células T CD4⁺ y no afecta la expresión de marcadores CD38⁺, la expresión de la proteína HLA-DR⁺ y CD25⁺ en las células infectadas por VIH. Adicionalmente, se ha descrito que las células con la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, muestran un fenotipo de células activadas¹³². La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ se ha observado no sólo en humanos, sino en ensayos in vitro con células de chimpancés y macacos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV)^{133,134} y en células T CD8⁺ de gatos infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina¹³⁵. Es posible que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ sea el resultado de la expresión de una o varias proteínas producidas por células T CD8⁺ y que por sus características podría tratarse de alguna citocina o citocinas. Sin embargo, cuando se ha buscado relacionar la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ con alguna citocina, no ha podido establecerse relación alguna entre ellas¹³⁶ (Tabla 1).

Inicialmente se pensaba que las β -quimiocinas producidas por las células T CD8⁺ eran las responsables de controlar la replicación de VIH *in vitro*⁹⁵. Sin embargo, cuando se buscaron los mecanismos por los cuales ocurre esta inhibición, se mostró que aunque las β -quimiocinas bloqueaban la entrada de VIH a la célula, son incapaces de inhibir la replicación en células infectadas. Esto es debido a que las β -quimiocinas interfieren con el uso del co-receptor CCR5, pero no tiene efecto sobre inhibición de la transcripción de VIH¹³⁷. En un estudio en el que emplearon líneas celulares de monocitos/macrófagos, las β -quimiocinas no mostraron inhibición de la replicación, a diferencia de las células T CD8⁺, que lograron inhibir la replicación de VIH⁹⁴. Por estas razones, el efecto de las β -quimiocinas no son consideradas dentro de la actividad anti-VIH no citotóxica.

También se ha tratado de relacionar a las α -defensinas 1, 2 y 3 con la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺¹³⁸. Las α -defensinas son asociadas clásicamente a las actividades antimicrobianas de los neutrófilos. Trabajos posteriores han mostrado que las células T CD8⁺ con respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ no expresan α -defensinas¹³⁹, y ante las nuevas evidencias se han dejado de considerar como parte de la respuesta anti-VIH no citotóxica¹⁴⁰.

La búsqueda de la identidad de respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ ha ido en tantos sentidos que se ha postulado incluso que la supresión mediada por células T CD8⁺ es por medio de la antitrombina III bovina modificada¹⁴¹. Lo cierto que muchas proteínas pueden tener actividad anti-VIH, entre ellas las β -quimiocinas y las α -defensinas, pero ninguna de ellas hasta el momento, reúne las características descritas para la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (Tabla 1). Existe la posibilidad de que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ no ha sido identificada por las condiciones en que se han conducido los experimentos, pero

también es posible que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ sea en realidad el conjunto de una serie de respuestas que permite la inhibición de la replicación de VIH.

Las células de CD8 de los pacientes asintomáticos y los individuos no-progresores a largo plazo, con más de 10 años de infección, sin síntomas clínicos de SIDA, tienen altos niveles de actividad antiviral. En algunos casos, se requiere de sólo una célula T CD8⁺ para inhibir la replicación de VIH en 20 células T CD4⁺ infectadas¹⁴². En contraste, pacientes en etapas tardías de la enfermedad y con síntomas clínicos de SIDA, requieren de 4 ó 8 células T CD8⁺ para inhibir la replicación de una células T CD4⁺ infectada^{143,144}. Por esta razón, la intensidad respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ parece estar relacionada con las características clínicas del individuo. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en individuos no-progresores a largo plazo es más intensa en células T CD8⁺ de tejidos linfoides, que en células de sangre periférica, a diferencia de los pacientes que han progresado a SIDA en quienes existe una marcada reducción de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en células T CD8⁺ de ganglios linfáticos, aunque en este estudio, el número de individuos estudiados es muy pequeño¹⁴⁵.

Tabla 1. Resumen de características de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.Modificado de ^{146,147}

- ✓ Observada exclusivamente en células T CD8⁺.
- ✓ Observada en células T CD8⁺ de tejidos linfoides y sangre periférica.
- ✓ Efecto dosis dependiente.
- ✓ No involucra muerte de la célula infectada.
- ✓ No requiere compatibilidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.
- ✓ Expresada en células T CD8⁺, HLA-DR⁺, CD28⁺.
- ✓ Correlaciona con los estadios clínicos de la enfermedad.
- ✓ Inhibe la replicación de VIH a niveles de transcripción.
- ✓ Suprime la replicación de VIH-1, VIH-2, virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) y el virus de la inmunodeficiencia felina.
- ✓ Mediado (al menos en parte) por un factor soluble.
- ✓ No se encuentra en los gránulos citotóxicos de las células T CD8⁺.
- ✓ No está asociada a las siguientes citocinas probadas:
 - Interleucinas 1 a 13, 15, IL-16.
 - Interferones α , β y γ .
 - Factor de necrosis tumoral (TNF) α , β .
 - Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF).
 - Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).
 - Factor de crecimiento transformante (TGF) β 1.
 - RANTES, Proteína regulada sobre activación, expresada en células T normales y secretada.
 - Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , -1 β .
 - Proteína quimio-atrayente de monocitos (MCP)-1 y -3.
 - GRO α , β , onco-gen regulador de crecimiento.
 - Factor inhibitorio de leucemia (LIF)
 - Linfotactina.
 - Proteína inducible por interferon 10 (IP-10)

El efecto más relevante de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es la inhibición de replicación de VIH¹²⁰ mediante la inhibición de la transcripción de genes de VIH¹⁴⁸ en comparación con cultivos controles sin células T CD8⁺ ¹⁴⁹⁻¹⁵¹. En modelos *in vitro* utilizando genes reporteros, se observa que la inhibición de la transcripción de genes ocurre en regiones LTR del genoma retroviral¹⁵². La unión de NFAT-1 al LTR de VIH es inhibida en presencia de sobrenadantes de cultivos de células T CD8⁺ ¹⁵³.

La inhibición de la transcripción mediada por células T CD8⁺ origina que disminuyan los niveles de transcriptasa reversa y los niveles de antígeno p24 de VIH en sobrenadantes de cultivo. Los procesos de inhibición ocurren dentro de las 24 horas después de la entrada del virus, pero posteriores a la entrada, transcripción reversa e integración de VIH a la célula¹⁵⁴.

Las células T CD8⁺ de pacientes con VIH tienen la capacidad de inhibir la replicación de VIH ante estímulos de activación externos, efecto que no ocurre con las células T CD8⁺ de individuos sin VIH. Una vez que un paciente tiene infección por VIH, las células T CD8⁺ pueden ser inducidas a generar respuesta anti-VIH no citotóxica, por medio de interleucina 2 o activadores policlonales como la fitohemaglutinina. Las células T CD4⁺ son capaces de estimular a las células T CD8⁺ facilitando la respuesta de las células T CD8⁺, mediante la producción de citocinas como la interleucina 2 (IL-2). La calidad de respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ parece estar más asociado al estado inmunológico de los pacientes infectados por VIH como lo muestran los estudios en los que se relaciona la condición clínica. Conforme la infección por VIH va progresando a SIDA, la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ va disminuyendo, y en pacientes con largo control de la replicación de VIH, es alta la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

1.5.4. Estructura y función normal del ganglio linfático

Los órganos linfoides secundarios son tejidos que se encargan de capturar y concentrar eficientemente antígenos extraños e iniciar la respuesta inmunológica adaptativa. Estos órganos especializados incluyen a los ganglios o nódulos linfáticos, el bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas entre los que se encuentran las placas de Peyer, amígdalas, y tejidos linfoides asociados a bronquios¹⁵⁵. En conjunto estos órganos conforman una compleja red que mantiene la interacción entre las células presentadoras de antígenos y linfocitos específicos de antígenos, resultando en una estimulación de la inmunidad protectora. Los ganglios linfáticos se encuentran localizados a través del cuerpo, permitiéndoles la captura de antígenos para el reconocimiento¹⁵⁵.

Los ganglios linfáticos tienen varias funciones importantes, que van desde la retener de linfocitos vírgenes de la sangre, recolectar antígenos y células dendríticas de tejidos periféricos, proveer el ambiente para el desarrollo de la tolerancia antígeno-específica, llevar a cabo respuestas efectoras primarias y secundarias, modular las características de retención de células T de memoria y efectoras, dirigiéndolas a tejidos que contienen sus antígenos cognados, y proveer un sitio para el desarrollo de las células de memoria central¹⁵⁶.

Los ganglios linfáticos están constituidos por una cápsula fibrosa y un seno sub-capsular rodeando el contenido celular. El nódulo linfoide puede ser dividido en tres regiones: corteza, paracorteza y médula¹⁵⁵ (Fig. 4a). La corteza contiene discretos nódulos compuestos de células B y células dendríticas foliculares (CDFs) llamados folículos primarios. Después de la estimulación por el antígeno las células B entran en intensa proliferación, dando lugar a la formación de los folículos secundarios llamados centros germinales. Dentro de la corteza se encuentra la para-corteza compuesta de

células T y células dendríticas. La médula consta de tejido linfático llamado cordones medulares, los cuales se encuentran separados por espacios llenos de linfa llamados senos medulares. La vasculatura del nódulo linfático incluye vénulas endoteliales altas y vasos linfáticos. Las células T y B entran al nódulo linfático mediante las vénulas endoteliales altas y salen usando los vasos linfáticos eferentes. El transporte de linfocitos a través de la vénulas endoteliales es altamente eficiente debido a que transportan cada día aproximadamente el 2% de las células circulantes y durante los procesos inflamatorios, ocurre una acumulación en los ganglios linfáticos¹⁵⁷.

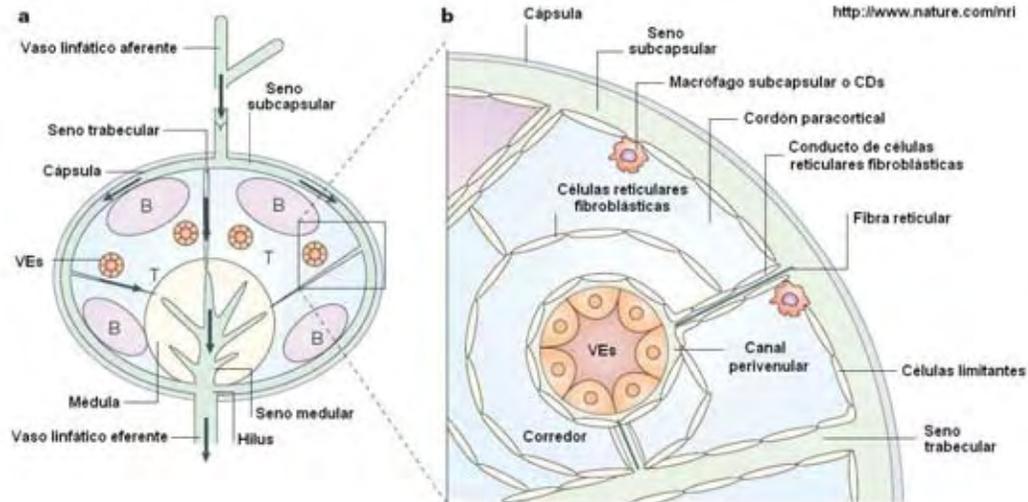


Fig. 4. Estructura de ganglio linfático.

a) Ilustración de ganglio linfático, b) Ilustración de un corte paracortical. Modificada de von Andrian U. H. 2003¹⁵⁶.

Las células dendríticas entran utilizando los vasos linfáticos aferentes. La linfa (producto de la salida de fluidos tisulares al espacio extravascular) entra a través de los vasos linfáticos aferentes y contiene antígenos en células dendríticas y solubles que son depositados en el seno subcapsular. Los linfocitos vírgenes entran en el ganglio utilizando las vénulas endoteliales altas. Si los linfocitos vírgenes no reconocen antígenos, retornan a la circulación utilizando los vasos linfáticos eferentes

y el ducto torácico. Los linfocitos vírgenes requieren menos de 1 hr, en circulación antes de entrar a un nuevo nódulo linfoide¹⁵⁶.

La ilustración del corte paracortical (Fig. 4b) muestra que el ganglio contiene fibras reticulares de colágena tipo 1 y 3 que se encuentran contenidas por células reticulares fibroblásticas. En el centro se encuentran las vénulas endoteliales altas (Vénulas endoteliales altas) que son rodeadas por capas concéntricas de las células reticulares fibroblásticas. Los conductos de las células reticulares fibroblásticas drenan linfa en el canal perivenular¹⁵⁶.

La migración de los linfocitos hacia los ganglios linfáticos es mediada por la expresión de moléculas de adhesión (Fig. 5)¹⁵⁸. La L-selectina (CD62L) expresada en los linfocitos y su ligando expresado en vénulas endoteliales altas pueden mediar las interacciones de adhesión y rodamiento en vénulas endoteliales de ganglios linfáticos periféricos. Sin embargo, es necesaria la expresión de LFA-1 (heterodímero CD11 α /CD18 β) en el linfocito y la interacción con su ligando ICAM-1 (CD54) e ICAM-2 (CD102) en las vénulas endoteliales altas¹⁵⁹. En las células que se encuentran en rodamiento¹⁵⁸, el anclaje con L-selectina es breve y restringido a una pequeña fracción del total de moléculas de L-selectina dentro del área de contacto en la pared del vaso. Los linfocitos de ganglios linfáticos no inflamados son principalmente células T y células B vírgenes que expresan L-selectina^{hi} y LFA-1⁺. Los linfocitos que expresan muy bajo nivel de L-selectina, pueden ser excluidos de los ganglios linfáticos periféricos debido a que no podrán unirse a las paredes de los vasos¹⁵⁸.

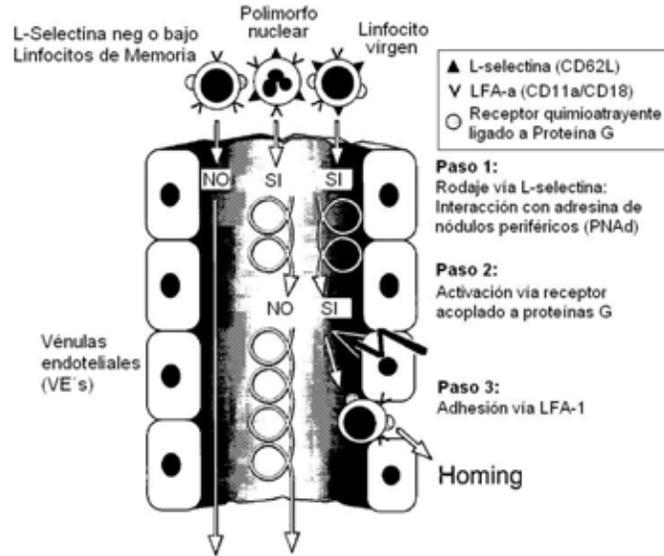


Fig. 5. Eventos activados durante la migración celular.

Modificado de Warnock R. A. 1998 ¹⁵⁸.

1.6. Tratamiento anti-VIH

La zidovudina (3'-azido-3'-deoxitimidina, AZT) se describe en 1985, como el primer medicamento con un efecto inhibitorio *in vitro* sobre la replicación de VIH¹⁶⁰, que fue confirmado en los años siguientes¹⁶¹. En estos reportes iniciales se determina que inhibe el efecto de la transcriptasa reversa y la expresión de Antígeno p24 de VIH en células H9 infectadas. Es también el primer medicamento que recibe una rápida aprobación por la Agencia Federal de Alimentos de E.U. (FDA)¹⁶², después de un controvertido pero fundamental estudio clínico para determinar la efectividad del medicamento^{163,164}, y donde se demostró que zidovudina era capaz de mejorar la condición clínica e inmunológica de los individuos infectados. Zidovudina (AZT) es histórico debido a que es la primera vez en que una nueva enfermedad es descrita¹⁶⁵, el agente infeccioso identificado⁹ y se describe un medicamento con eficacia probada en un periodo de 6 años¹⁶⁰, considerado un record en la historia de la medicina.

Después de la descripción del AZT, se han descrito medicamentos de por lo menos 5 familias, clasificadas con base en el mecanismo por el cual inhiben la replicación de VIH, las cuales son: análogos de nucleótidos-nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa, análogos no nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa, inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión e inhibidores de integrasa. En todas las familias excepto para los inhibidores de integrasa al menos uno de ellos ha sido aprobado para su uso en terapéutico en humanos (Ver Anexo 2).

1.6.1. Familias de fármacos antirretrovirales

Los análogos de nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa tienen mecanismos de acción muy similares¹⁶⁶. La actividad antiviral de los análogos nucleósidos depende de la conversión intracelular del fármaco al metabolito 5'-trifosfato por las cinasas celulares. Las formas 5'-trifosfato tienen afinidad por la transcriptasa reversa y compiten con los nucleótidos endógenos para la incorporación de DNA proviral sintetizado. Cuando los deoxinucleótidos se incorporan en la cadena, actúan como terminadores, previniendo la adición de nuevos nucleótidos¹⁶⁶.

Los análogos no nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa son componentes hidrofóbicos pequeños (<600 Da) con estructuras diversas¹⁶⁷. Existen varios compuestos que pueden agruparse en más de 30 clases químicas, pero solamente tres compuestos han sido aprobados para su uso en humanos: delavirdina, efavirenz y nevirapina. Los análogos no nucleósidos interactúan con la transcriptasa reversa uniéndose a la subunidad p66, muy cerca de sitio catalítico de la transcriptasa reversa¹⁶⁷. La presencia de los análogos no nucleósidos en el sitio activo de la enzima ocasionan distorsiones en la estructura terciaria de la transcriptasa reversa, lo que altera el modo de unión del sustrato y afecta la formación de la doble cadena.

Los inhibidores de proteasa están basados en el reconocimiento de secuencias de aminoácidos para el corte de las proteínas de VIH^{168,168}. Todos los inhibidores se encuentran estructuralmente relacionados. Algunos contienen un análogo de la secuencia fenilalanina-prolina de la posición 167 y 168 de la poliproteína gag-pol de VIH. Estos fármacos son difíciles de sintetizar debido a su estructura. Inhiben el corte de gag y los precursores gag-pol en células infectadas, impidiendo la maduración y bloqueando la infectividad de los viriones que emergen. Por esto, los inhibidores de

proteasa inhiben nuevas infecciones, pero no tienen efecto alguno sobre las células que transportan DNA proviral integrado¹⁶⁸.

Existen varias moléculas consideradas inhibidores de fusión, pero sólo dos fármacos tienen aprobación para su uso en humanos. Enfuvirtide actúa durante el primer paso en el proceso de entrada del VIH a la célula, cuando ocurre la unión de gp120 a la molécula CD4 de la superficie celular. Enfuvirtide es un péptido sintético de 36 aminoácidos que tiene secuencias la región HR2 de gp41 de VIH. Enfuvirtide se une a la región HR1 de gp41 de VIH y bloquea la fusión de las membranas¹⁶⁹. Este fármaco es utilizado como terapia de rescate en pacientes que han probado múltiples esquemas de tratamiento. Maraviroc es una imidazopiridina que bloquea la unión y la señalización de CCR5, requerido por ciertas cepas de VIH para la infección de las células. Maraviroc promueve la formación de un estado inactivo de la molécula CCR5, lo que origina una inhibición de la unión de gp120 de VIH a CCR5, bloqueando la fusión a la célula⁹⁷.

Los inhibidores de integrasa actúan durante la inserción del DNA viral en el DNA de la célula infectada, que es un paso primordial en la replicación de VIH. La transcripción de genes de VIH depende de la integración mediada por la enzima integrasa¹⁷⁰. Los procesos de reparación de DNA posteriores son llevados a cabo por las enzimas celulares¹⁷⁰. Debido a que la integrasa es una molécula viral, y no se encuentra en las células, es un blanco terapéutico óptimo. Existen varias moléculas inhibidoras de integrasa, dentro de los compuestos con mayor futuro se encuentran los inhibidores DKA (diceto-aril)^{171,171}. Un inhibidor de integrasa, Raltegravir (MK-0518), se ha aprobado recientemente para uso en humanos. Raltegravir genera una rápida disminución de la carga viral, en comparación con los mejores esquemas de tratamiento¹⁷².

1.6.2. Uso de fármacos antirretrovirales y su efecto en el sistema inmunológico.

Inicialmente el uso de fármacos como monoterapia estaba regido por la capacidad de mejorar las condiciones clínicas como son las disminución de la aparición de infecciones oportunistas^{163,164}. Muy tempranamente en el inicio del uso de antirretrovirales como monoterapia, se observó que eran capaces de disminuir los niveles plasmáticos de virus, pero que esta disminución se detenía, o incluso que se observaban incrementos, cuando se detectaban las primeras mutantes de resistencia¹⁷³. Ahora se sabe que ningún fármaco inhibe completamente la replicación viral por sí solo, si no que se requiere del uso de varios fármacos para poder inhibir la replicación de VIH a niveles indetectables en plasma. Aún cuando en virus no es detectable en el plasma, no es posible hablar de inhibición completa de la replicación, ya que se ha observado que en ganglios linfáticos podemos encontrar replicación residual¹⁷⁴. Es claro que entre mejor sea el control de la replicación, menor es la probabilidad de que se desarrollen mutaciones de resistencia.

Desde finales de 1995, con la introducción e incremento del uso de inhibidores de proteasa se ha descrito reducción significativa de las muertes por VIH, así como una disminución significativa de infecciones oportunistas⁶⁸. El uso combinado de los fármacos ha producido una dramática disminución de la mortalidad y morbilidad⁶⁷. El tratamiento antirretroviral altamente activo, es una combinación de por lo menos 3 de los medicamentos de por lo menos dos familias de fármacos antirretrovirales. Su efectividad es medida como una supresión de la replicación de VIH hasta niveles que no es posible detectar el virus en plasma con los actuales métodos de medición (<50 copias de RNA-VIH/mL)¹⁷⁵. El tratamiento antirretroviral altamente activo no erradica a VIH, ya que se ha detectado replicación viral en ganglios linfáticos en pacientes con

carga viral indetectable¹⁷⁴. Cuando se suspende el tratamiento anti-VIH, comienza nuevamente la replicación de VIH y altos niveles de VIH en plasma¹⁷⁶, y en muchos casos se presentan síntomas semejantes al síndrome retroviral agudo⁴⁷. Otro de los parámetros de la efectividad del tratamiento es el gradual incremento en el número de linfocitos T CD4⁺¹⁷⁷. La inhibición de la replicación de VIH sostenida a largo plazo por los medicamentos antirretrovirales permite el mantenimiento de los niveles de células T CD4⁺ y la mejoría clínica del paciente bajo el tratamiento antirretroviral altamente activo¹⁷⁸.

Las guías internacionales de inicio de tratamiento sugieren que deberá iniciarse el tratamiento antirretroviral altamente activo en todos aquellos pacientes con síntomas definitorios de SIDA¹⁷⁹, o menos de 200 células T CD4⁺/μl, aunque en la mayoría de los casos de pacientes con infecciones oportunistas, se recomienda resolver el problema infeccioso antes de iniciar los antirretrovirales. Un ejemplo es la coinfección con tuberculosis, donde se ha descrito el empeoramiento paradójico de la tuberculosis cuando se inicia simultáneamente el tratamiento antirretroviral altamente activo y tratamiento para la tuberculosis, con exacerbación de síntomas, signos o manifestaciones radiográficas de la tuberculosis¹⁸⁰. El empeoramiento de la tuberculosis puede ser debido al desarrollo de un proceso inflamatorio, desarrollado por la reconstitución de la capacidad del sistema inmunológico a responder a las infecciones por efecto de el tratamiento antirretroviral altamente activo¹⁸¹.

Para los pacientes asintomáticos las guías internacionales establecen es necesario individualizar la decisión del inicio de el tratamiento antirretroviral altamente activo, en aquellos pacientes con cuentas entre 200 y 350 células T CD4⁺/μl, y no recomiendan el inicio de tratamiento en aquellos pacientes con cuentas de más de 350 células T CD4⁺/μl¹⁷⁹. La decisión deberá basarse en el grado de caída de células T CD4⁺, nivel

de carga viral así como el compromiso del paciente para tomar el tratamiento durante muchos años.

El uso de inhibidores de proteasa induce una disminución de los niveles de carga viral plasmática y un incremento significativo de los niveles de células T CD4⁺ ^{182,182}, como por ejemplo en los pacientes que dentro del esquema de tratamiento contienen indinavir. La disminución de VIH en plasma hasta niveles en los que no es posible detectarlos, ha permitido establecer la dinámica de la disminución de VIH, y su relación con los grupos celulares en los que se inhibe la replicación¹⁸³.

El uso de los fármacos antirretrovirales no es inocuo al organismo. Existe una larga lista de efectos adversos entre las que se encuentran las complicaciones metabólicas, las interacciones con otros fármacos ocasionando incrementos o disminuciones de las concentraciones plasmáticas de los fármacos, los síntomas temporales en muchos casos como náuseas, vómito, diarrea, pérdida del apetito, sueños vívidos, dolor de cabeza insomnio, que terminan ocasionando la falta de apego al tratamiento, y en muchos casos, generando resistencias a los fármacos. Dependiendo del fármaco, se pueden observar signos de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, pancreatitis, acidosis láctica, lipoatrofia, resistencia a la insulina, reacciones de hipersensibilidad (síndrome de Stevens Johnson), neuropatía periférica entre otros. Por ejemplo, los antiácidos administrados a pacientes con acidez gástrica, disminuyen la absorción ocasionando una disminución de la concentración sérica de los antirretrovirales. Otros fármacos, como la anfotericina B, favorecen una disminución de la eliminación renal ocasionando un incremento en la concentración sérica.

Los pacientes bajo tratamiento en quienes se ha disminuido la capacidad de responder ante diversos microorganismos, cuando se incrementan sus niveles de células T CD4⁺ circulantes y disminuido los niveles plasmáticos de VIH, se recuperan

algunas funciones inmunológicas contra otros microorganismos, tales como la respuesta linfoproliferativa de células T contra antígenos de *C. Albicans*, *M. Tuberculosis*, toxoplasma y otros¹⁸⁴. El problema es que las respuestas específicas anti-VIH, como la respuesta efectora de las células T citotóxicas específicas de VIH, disminuyen conforme disminuyen los niveles plasmáticos de VIH, mostrando una dependencia de los niveles de antígeno¹¹⁶.

En los pacientes sin tratamiento antirretroviral existe un alto grado de división de células T CD4⁺ y CD8⁺, lo cual correlaciona con los niveles de carga viral, y que estos niveles de división disminuyen al inicio de tratamiento antirretroviral. Cuando estos pacientes suspenden el tratamiento, se observan nuevamente altos grados de división celular, relacionados con los incrementos de carga viral¹⁸⁵.

Existen otros tratamientos que son de uso muy limitado, pero que se han planteado como alternativas al tratamiento antirretroviral altamente activo¹⁸⁶. La replicación de VIH requiere un estado de activación celular que permita la transcripción de genes. Estos fármacos conocidos como inmunomoduladores, disminuyen la activación celular necesaria para la replicación de VIH. La talidomida, la hidroxiurea y la cloroquina son ejemplos de fármacos inmunomoduladores. Talidomida inhibe la producción de RNA mensajero, proceso necesario para la síntesis de RNA de VIH¹⁸⁷. Hidroxiurea administrada en presencia de didanosina incrementa la incorporación de didanosina durante la síntesis de RNA^{188,189}. Cloroquina es un anti-inflamatorio que tiene varios sitios de acción en el ciclo de replicación de VIH¹⁹⁰, entre los que se incluyen: Inhibición de integrasa, inhibición de transactivación mediada por Tat y reducción de almacenes de iones intracelulares afectando la transcripción reversa y la maduración post-transcripcional de gp120^{191,192}.

El tratamiento antirretroviral disminuye los niveles plasmáticos de VIH¹⁷⁵ hasta niveles indetectables²⁰, e incrementa gradualmente los niveles de linfocitos T CD4⁺ ¹⁷⁵. Los niveles de VIH en ganglios linfáticos, amígdalas y ganglios de colon de pacientes con VIH disminuyen por efecto del tratamiento antirretroviral, aunque se observa una replicación residual en estos tejidos^{174,193}. A pesar de que existe una disminución de los niveles plasmáticos de RNA de VIH en los pacientes con el tratamiento antirretroviral altamente activo, existe una persistencia proteínas estructurales (p17, p24, gp41 y gp120) en los centros germinales de los nódulos linfoides^{193,194}. Existe una redistribución de la población de linfocitos, observándose que el número de linfocitos disminuye en los ganglios linfáticos y aumenta en sangre periférica después del tratamiento antirretroviral¹⁹⁵. Después del inicio de tratamiento antirretroviral, existe un incremento de células T CD4⁺ y una disminución de células T CD8⁺ en los tejidos linfoides, con una marcada disminución de la expresión de marcadores de activación CD8⁺CD38⁺ y CD3⁺HLA-DR⁺¹⁹⁶. El tratamiento antirretroviral disminuye los niveles de mRNA de citocinas pro-inflamatorias como IFN γ , inteleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y MIP-1 α , así como la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 por efecto del tratamiento antirretroviral¹⁹⁵. El tratamiento antirretroviral favorece la disminución de las células CD8⁺ específicas del virus⁹³. La disminución de los niveles de células T CD8⁺ citotóxicas, tiene una alte dependencia de los niveles de carga viral¹⁹⁷.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad de las células T CD8⁺ es esencial para el control de la replicación de VIH. Existen dos respuestas efectoras mediadas por células T CD8⁺ en contra de la infección por VIH: a) Respuesta efectora citolítica, mediada por el reconocimiento de secuencias de péptidos de VIH, que requieren del contacto célula-célula (HLA-péptido-TCR) y que inducen la lisis de las células infectadas mediante perforinas y granzimas. La respuesta citolítica es dependiente de los niveles de antígeno, sin embargo la capacidad de reconocer antígenos se pierde a medida que la enfermedad progresa^{116,198}; y b) Respuesta efectora anti-VIH no citotóxica, mediada por células T CD8⁺, en las que no es necesario el contacto célula-célula⁹⁴. Algunos factores solubles, hasta ahora no identificados y que son producidos por las células T CD8⁺, inhiben la transcripción de VIH^{128,201,199,200}.

La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ ha sido identificada en infecciones por VIH en humanos¹²⁰ y en primates²⁰¹, inhibe la replicación del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV)²⁰² y el virus de la inmunodeficiencia felina¹³⁵. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ correlaciona con la condición clínica de los pacientes, es decir, en etapas tempranas presenta alta actividad, pero a medida que la enfermedad progresa, esta respuesta disminuye^{143,203,145}.

El tratamiento antirretroviral disminuye la carga viral de VIH y permite el incremento del número de células T CD4⁺ circulantes. Estudios previos muestran que la monoterapia con zidovudina en pacientes con infección crónica, no tiene efecto sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, sin embargo la carga viral es detectable²⁰⁴. Otro estudio ha mostrado que el tratamiento antirretroviral altamente activo administrado durante la infección aguda, disminuye la respuesta anti-VIH no

citotóxica de células T CD8⁺ en algunos pacientes²⁰⁵, pero es posible que el inicio temprano de antirretrovirales limite el desarrollo de la respuesta inmunológica en contra del virus. Estos estudios no permiten saber si la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ disminuye por efecto del tratamiento antirretroviral o como consecuencia de la limitación de la respuesta inmune debida a la inhibición de la replicación viral en etapas tempranas.

Los ganglios linfáticos son sitios importantes de replicación de VIH y de reconocimiento de antígenos de VIH. Sin embargo, solo existe un reporte de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en tejido linfoide en el que se observa que la respuesta está relacionada con el estadio clínico del paciente. Es decir, los pacientes en etapa temprana presentan una buena respuesta anti-VIH no citotóxica; por el contrario, los pacientes en etapa avanzada presentan una mala respuesta anti-VIH no citotóxica¹⁴⁵.

Por esta razón, en este trabajo decidimos estudiar el efecto del tratamiento antirretroviral altamente activo sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y ganglios linfáticos de pacientes con infección crónica por VIH.

3. HIPÓTESIS

Si la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ depende de los niveles antigénicos, el tratamiento antirretroviral provocará la disminución de la respuesta anti-VIH no citotóxica en sangre periférica y en ganglios linfáticos. Por otro lado, si la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ depende del número de células T CD4⁺, el tratamiento antirretroviral inducirá un aumento de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y ganglios linfáticos y del número de células T CD4⁺ circulantes.

4. OBJETIVOS

A. General

Medir la actividad anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y tejidos linfoides de pacientes con VIH que inician tratamiento antirretroviral altamente activo en diferentes etapas de la enfermedad.

B. Particulares

1. Cuantificar la carga de VIH en plasma y los niveles de células T CD4⁺ de sangre periférica.
2. Cuantificar la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y ganglio linfático de pacientes con VIH que inician tratamiento antirretroviral.
3. Identificar la correlación entre los niveles de células T CD4⁺ circulantes y la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y ganglios linfáticos.
4. Identificar la correlación entre los niveles de carga viral plasmática y la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y ganglios linfáticos.
5. Identificar la correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y la respuesta en ganglios linfáticos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

Este trabajo se realizó en dos partes. La primera parte se basó el estudio de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica, y la segunda parte en pacientes con linfadenopatía por VIH.

El proyecto en sus dos partes, fue revisado y aprobado por Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Los pacientes que acudieron a la consulta del Servicio de Infectología por diagnóstico de VIH que cumplieran los criterios de inclusión y superaran los de exclusión (Tabla 2), fueron invitados a participar en la realización de este estudio. Los pacientes que aceptaron participar se les solicitó que firmaran la Carta de Consentimiento Informado aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto, en donde se les explica los objetivos del estudio, los riesgos y los procedimientos a los que fueron sometidos durante su participación.

5.1. Población de estudio.

5.1.1. Selección de pacientes y diseño del estudio en sangre periférica.

Los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y superaran los de exclusión se incluyeron en el estudio (Tabla 2). Los pacientes fueron citados a la toma de muestras antes del inicio de tratamiento antirretroviral y en las semanas 4, 12, 24 y 48 después del inicio del tratamiento. En cada cita de laboratorio se tomaron muestras para las determinaciones de química sanguínea, biometría hemática, pruebas de función hepática, examen general de orina, carga viral, cuenta de células T CD4⁺ circulantes y células para la cuantificación de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Los pacientes fueron asignados a los siguientes grupos de estudio, conforme a la agrupación de estadios clínicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud⁶⁴ y el Centro de Control de Enfermedades (E.U.)⁶³: a) Grupo I, etapa temprana (sin tratamiento), asintomáticos, sin infección oportunista previa, con cuentas de células T CD4⁺ mayores a 350 células T CD4⁺/μl y quienes por su condición clínica no requirieron iniciar tratamiento antirretroviral; b) Grupo II, etapa intermedia, pacientes asintomáticos con cuentas entre 200 a 500 células T CD4⁺/μl quienes iniciarán tratamiento antirretroviral; c) Grupo III, etapa tardía, pacientes con síntomas definitorios de SIDA y/o <200 células T CD4⁺/μl, quienes iniciaron tratamiento antirretroviral.

Tabla 2. Criterios para el ingreso de pacientes al estudio en sangre periférica.

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Criterios de exclusión</i>	<i>Criterios de eliminación</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infección documentada por VIH ▪ Sin tratamiento antirretroviral altamente activo ▪ Sin infección oportunista activa 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tratamiento antirretroviral altamente activo ▪ Infección oportunista activa ▪ Uso de Inmunosupresores o inmunomoduladores 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Suspensión del tratamiento. ▪ Falla al tratamiento antirretroviral ▪ Infección oportunista activa

5.1.2. Selección de pacientes y diseño del estudio en ganglios linfáticos

A los pacientes que reunieran los criterios de inclusión y superaran los de exclusión se invitaron a participar en el estudio (Tabla 3). Los pacientes fueron citados a la toma de muestras antes del inicio de tratamiento antirretroviral y en la semana 12 después del inicio del tratamiento.

Tabla 3. Criterios para el ingreso de pacientes al estudio en ganglios linfáticos.

<i>Criterios de inclusión</i>	<i>Criterios de exclusión</i>	<i>Criterios de eliminación</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Infección documentada por VIH ✓ Linfadenopatía ✓ Sin tratamiento antirretroviral altamente activo ✓ Sin infección oportunista activa 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tratamiento antirretroviral altamente activo ✓ Infección oportunista activa ✓ Uso de Inmunosupresores o inmunomoduladores 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diagnóstico de infección ganglionar ✓ Diagnóstico de células de origen canceroso en ganglio

Los pacientes fueron asignados a los siguientes grupos de estudio descritos. A los pacientes se programaron citas de seguimiento clínico y de laboratorio, y se tomaron muestras para las determinaciones de química sanguínea, biometría hemática, pruebas de función hepática, examen general de orina, carga viral, cuenta de células T CD4⁺ circulantes y obtención de células de sangre periférica y ganglio linfático para la cuantificación de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (Fig. 6). Las muestras de ganglios linfáticos se tomaron mediante cirugía excisional. Los pacientes fueron ingresados al Servicio de Cirugía y se les colocó línea con solución de Hartman en venas, fueron anestesiados localmente y con técnica estéril se extrajeron los ganglios cervicales o axilares (derecho o izquierdo). Las muestras fueron divididas en tres porciones. Una parte de la biopsia se colocó en formaldehído para análisis

histopatológico. La segunda porción de la biopsia se colocó en medio de transporte para cultivo de hongos, bacterias y micobacterias, así como para realizar diagnóstico de micobacterias por PCR. La tercera porción se colocó en medio HUT (RPMI-1640, 10% SBF, 1% Penicilina/estreptomicina y 1% de L-Glutamina [200 mM]) y se procesó en laboratorio de VIH para la obtención de células mononucleares de tejido linfoide. Los pacientes con resultados positivos para microorganismos o diagnóstico de cáncer fueron retirados del estudio. Los pacientes fueron citados 8 días después de la biopsia para revisión del procedimiento quirúrgico y para retirar los puntos de sutura.

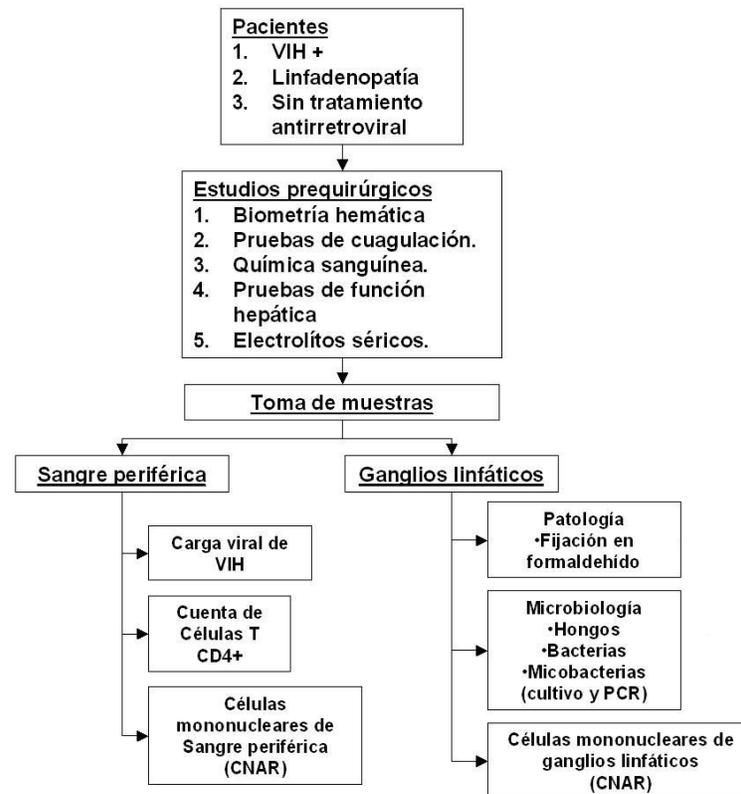


Fig. 6. Esquema de muestras y estudios realizados a los pacientes en estudio de ganglios linfáticos.

5.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica.

Para obtener células mononucleares de sangre, a los pacientes se les tomaron muestras de sangre con heparina como anticoagulante (Vacutainer, BD, CA. USA). Las muestras se centrifugaron y se separó el plasma. En tubos de polipropileno de 50 mL se colocaron 10 mL de Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). La sangre sin plasma se resuspendió con el mismo volumen de HBSS (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. Walkersville, USA) a 37°C. Con la sangre diluida se realizó el gradiente en el tubo con Lymphoprep. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 20 min, sin freno. Las células se colectaron y colocaron en 20 mL de medio HBSS a 37°C y los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Este proceso se repitió tres veces. Las células se contaron y se congelaron con suero bovino fetal (SBF, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. Walkersville, USA) y DMSO al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA).

5.3. Obtención de células mononucleares de tejido linfóide

La biopsia de ganglio linfático obtenida y colocada en medio HUT a temperatura ambiente se transfirió a una placa de cultivo estéril con medio HBSS a 37°C. El ganglio se cortó en piezas pequeñas (1-2 mm) con bisturí y se coloca en un tubo con tamiz (Cell strainer, Cat. 352340, BD) con poro de 40 µM. La muestra se disgrega en el tamiz con ayuda de un émbolo de jeringa estéril y se agrega medio Hank's, para permitir el paso de las células a través del tamiz y separar el tejido conectivo. El medio HUT se agregó constantemente para impedir el secado de la muestra. Las células se lavaron con medio HBSS a 1500 rpm durante 10 min. Las células se congelaron en SBF y DMSO (10%).

5.4. Determinación de carga viral y cuenta de células T CD4⁺ circulantes.

Las muestras de sangre de los pacientes se tomaron en tubos al vacío con EDTA. Para la carga viral plasmática, los tubos fueron centrifugados 20 min a 2500 rpm y se almacenó el plasma a -80 °C. Posteriormente las muestras se procesaron mediante el sistema automatizado para carga viral de VIH-1 de Cobas Amplicor (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, a la muestra se le realiza la extracción de RNA viral. El extracto viral se somete a transcripción reversa para producir secuencias de DNA, y posteriormente se somete a ciclos de amplificación por PCR cuantitativo. En cada bloque de reacciones de retrotranscripción y PCR se cuantifican controles estándar para realizar una curva de cuantificación. El límite de detección para la técnica estándar es de 400 copias de RNA de VIH/mL de plasma. En caso requerido, se puede realizar el método ultrasensible con una sensibilidad de 50 copias de RNA-VIH/mL de plasma. Brevemente, se descongelan las muestras y se emplea el método de COBAS AmpliPREP para la extracción de RNA.

Las subpoblaciones de linfocitos circulantes se midieron por citometría de flujo utilizando el FACScalibur de empleando la técnica BD MultiTEST que contienen anticuerpos anti-CD3 (FITC), anti-CD8 (PE), anti-CD45 (PerCP) y anti-CD4 (APC) (Becton Dickinson, San Jose, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, a partir de una muestra de sangre total se agrega un buffer de lisis para eliminar los eritrocitos (FACS Lysing Solution, BD). Posteriormente, las células del paciente son incubadas con los anticuerpos marcados con fluorocromos en cada tubo que se unirán a los antígenos de superficie y se incuban 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se analizan en citómetro de flujo FACScalibur utilizando el programa MultiSET (Becton Dickinson).

5.5. Determinación de dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID₅₀)

Para estandarizar la cantidad de virus utilizado en cada infección, se determina la dosis infecciosa en cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀). El resultado es expresado como el volumen de cultivo de virus requerido para infectar el 50% de las células tratadas (Fig. 7). La determinación de TCID₅₀ es preferible a los ensayos donde se determinan concentraciones de proteínas o ácidos nucleicos, por la ventaja de medir viabilidad y la infectividad viral.

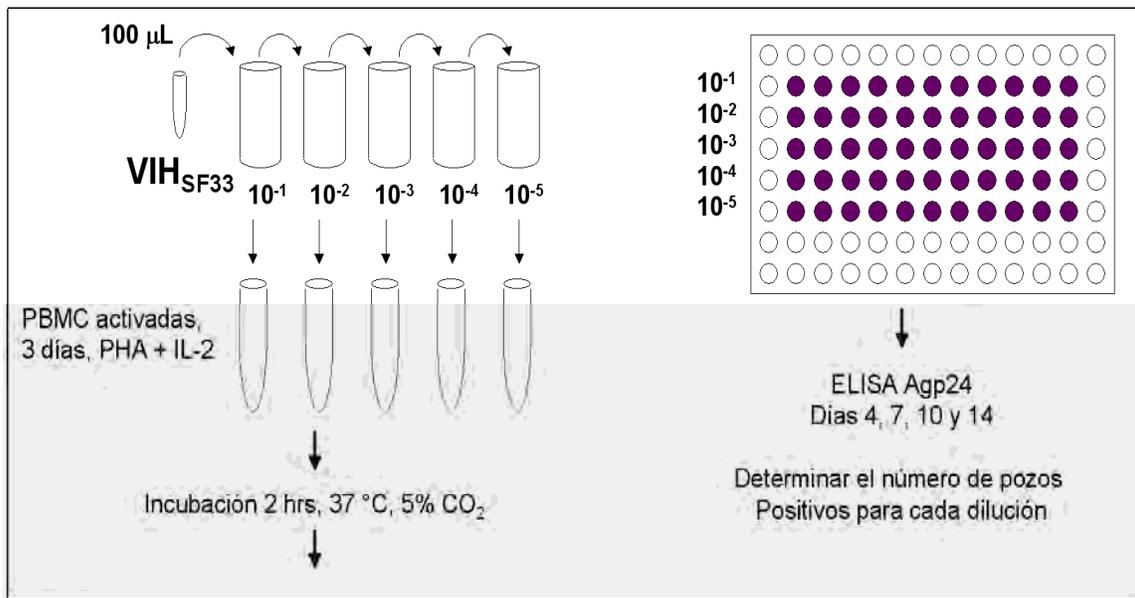


Fig. 7. Diagrama de determinación de dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID₅₀) para VIH_{SF33}.

En esta gráfica se muestran las diluciones realizadas con el virus (izquierda), y el esquema de cómo se colocaron en una placa de ELISA (derecha)

Para esto, es necesario estimular células mononucleares de donador durante 3 días en medio con Interleucina-2 recombinanta humana (100 U/mL). 25x10⁶ células a una concentración de 3 x 10⁶ células/mL en medio IL-2 (100 U/mL), son tratadas con 2 µg/mL de polibreno, durante 30 minutos a 37°C en incubadora. Las células son

lavadas 3 veces con medio HBSS, centrifugando a 1500 rpm durante 10 min. Las células se resuspenden en medio IL-2 y son contadas en cámara de Nuebaure con la técnica de azul tripano al 0.4%. Las células (4×10^6) son colocadas en cada uno de 5 tubos de 15 mL. El sobrenadante del cultivo de VIH es diluído logarítmicamente (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}). Las células fueron centrifugadas y se aspiró el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas con 0.5 mL de cada dilución de virus. Las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C con la tapa semiabierta, resuspendiendo cada 30 minutos. Al final de la incubación, las células se centrifugaron y se lavaron 3 veces con medio HBSS. Las células infectadas se resuspendieron en medio IL-2 a una concentración de 5×10^5 células/mL. Las células se colocaron en placa de fondo redondo de 96 pozos en 10 replicas (1×10^5 células/pozo). Los cultivos se incubaron a 37°C y se recolectó 100 µl de sobrenadante los días 4, 7, 10 y 14 de cultivo, adicionando 120 µl de medio IL-2 a cada pozo. Los sobrenadantes fueron tratados con 10µL de Tritón X-100 al 0.5% para eliminar las proteínas de VIH. Posteriormente se determinó la presencia o ausencia de Agp24 de VIH en cada pozo. Los resultados se colocaron en una tabla indicando para cada dilución el número de pozos infectados, número de pozos no infectados, la suma de pozos infectados, la suma de pozos no infectados, el cociente de mortalidad y el porcentaje de mortalidad. Los resultados se graficaron como % de pozos con antígeno positivo contra días de infección (una curva separada para cada dilución de virus). La fórmula de Reed-Muench²⁰⁶ se utilizó para determinar el TCID₅₀:

$$I = h \left[\frac{\% \text{ pozos infectados } > 50\% - 50\%}{\% \text{ pozos infectados } > 50\% - \% \text{ pozos infectados } < 50\%} \right]$$

Donde h es el factor de dilución 10
Por lo que:

$$\text{TCID}_{50} = 10^{\log \text{ de la dilución total } \geq 50\% - (I \times \log h)}$$

5.6. Determinación de respuesta no-citotóxica de células T CD8+ anti-VIH (ensayo agudo)

La técnica de ensayo agudo es empleada para medir la respuesta no citotóxica de las células T CD8⁺. En este ensayo se emplea un virus linfotrópico VIH_{SF33}, inductor de sincicia para infectar las células T CD4⁺ activadas de donador no infectado. Para cada paciente se emplea en la medida de lo posible, un solo donador, empleando células congeladas en cada ensayo. Las PBMC del donador y del paciente son crioperservadas, hasta el momento del ensayo. Después del proceso de descongelación, las células se mantienen por lo menos 6 horas en reposo antes de ser utilizadas. Se purifican células T CD4⁺, por medio del uso de esferas inmunomagnéticas (esferas metálicas recubiertas con anticuerpos, Fig. 8), y mediante del uso de un magneto, se puede aislar todas las células adheridas a éstas.

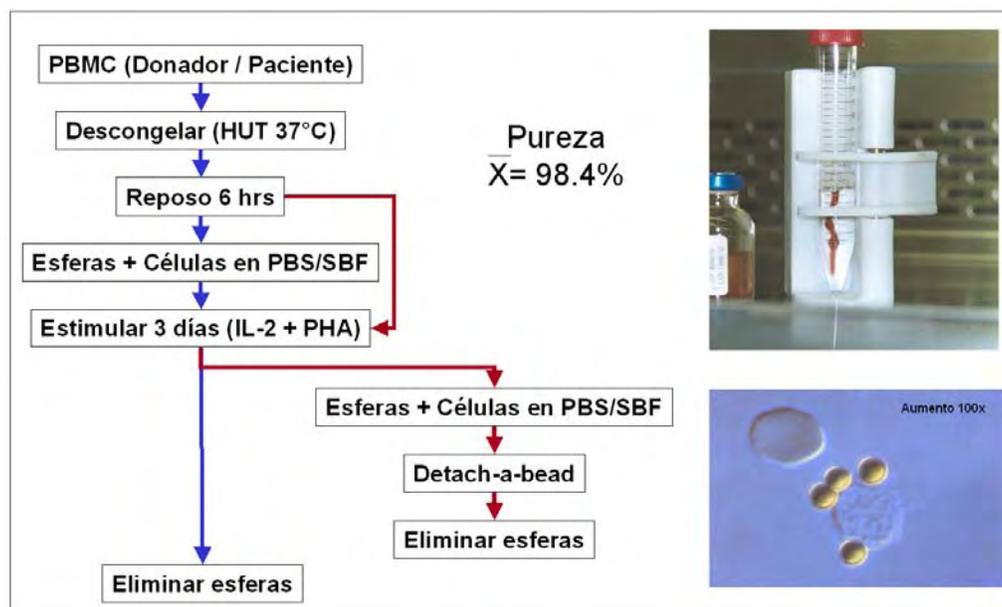


Fig. 8. Diagrama de separación con esferas inmunomagnéticas.

En el extremo superior derecho una fotografía de los tubos colocados en el magneto. En la parte inferior izquierda, fotografía de las esferas inmunomagnéticas unidas a la célula.

Para determinar la eficacia de la separación, se emplean anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 (BD) y se analizan por citometría para medir la efectividad de la separación. Con esta técnica se logran purzas mayores al 96%. Las células son estimuladas en medio que contiene IL-2 y fitohemaglutinina (lectina, PHA-P), que induce activación y proliferación blástica de las células. Las células se incuban durante 3 días a 37 °C, 5% CO₂ y 85% humedad. El día 3 de estimulación, son separadas las células T CD8⁺, y las células T CD4⁺ son infectadas, empleando 500 TCID₅₀ (dosis infecciosa de tejido al 50%) como medida funcional del virus. Posteriormente se realizan cocientes colocando en placas de 24 pozos 4 células CD8 por cada CD4 (4:1), 2 CD8 por cada CD4 (2:1), 1 CD8 por cada CD4 (1:1), 1 CD8 por cada 2 CD4 (1/2:1), 1 CD8 por cada 4 CD4 (1/4:1) y una CD8 por cada 8 CD4 (1/8 :1). Este método nos permite medir el % de inhibición de la replicación en cada uno de los cocientes comparado contra un pozo control, que contiene sólo células T CD4⁺ infectadas. Se recolectan sobrenadantes los días 4, 7, 10 y 14 después de establecido los cocientes. Para medir la producción de Antígeno p24 se emplea la técnica de ELISA.

Existen varios métodos para determinar la producción viral que miden la cantidad de proteína de virus, la cantidad de material genético o la cantidad de enzimas contenidas en un cultivo viral. Las células T CD8 inhiben la transcripción de genes de VIH, por lo cual no se produce ninguno de los componentes virales (proteínas estructurales, enzimas o RNA viral). Los dos métodos estándar de medir cantidad de VIH en cultivo es la medición de la enzima transcriptasa inversa o la cantidad de antígeno p24 de VIH. Empleamos la determinación cuantitativa de Agp24 de Beckman Coulter, que es un método aprobado internacionalmente para la cuantificación de VIH.

5.7. Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) para determinación de Antígeno p24 de VIH-1

El análisis COULTER para antígeno p24 de HIV-1 es un inmunoanálisis enzimático o análisis de absorción ligado a enzimas (ELISA) cualitativo y cuantitativo in vitro para detectar la presencia del antígeno p24, no unido a complejo, del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) en plasma humano, suero humano o sobrenadantes de tejidos. El ensayo se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, el ensayo para antígeno p24 del HIV-1 usa un anticuerpo monoclonal de ratón contra el antígeno p24 del HIV-1 para revestir micropozos de titulación dispuestos en tiras sobre placas. El antígeno p24 del HIV-1, purificado y proveniente de una línea de células T humanas infectados con la cepa HTLV-II B del VIH-1 se usa como estándar de calibración cuantitativa, que es colocado por duplicado en 5 pozos con las siguientes concentraciones: 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.8 pg/mL. Como controles se asigna un pozo para blanco de reactivos (con todos, excepto muestra), tres pozos para control negativo (medio de cultivo) y dos pozos para control positivo (125 pg/mL). Las muestras son diluidas para obtener diluciones cuyas absorbancias entren dentro del intervalo de la curva, que pueden ir desde 1:10 hasta 1:10,000. Se agrega tampón de lisis que rompe las partículas de virus presentes en la muestra, y el antígeno p24 es liberado y capturado por el anticuerpo monoclonal. Se realiza una incubación de 1 hr a 37°C, y se realizan 5 lavados con solución de lavado 1x. Se agrega una IgG humana biotinilada anti-VIH-1, esta se une al antígeno p24 del VIH. Se realiza una incubación de 1 hr a 37°C, y se realizan 5 lavados con solución de lavado 1x. Posteriormente se agrega estreptavidina – peroxidasa de rábano (SA-HRPO) que forma un complejo con los anticuerpos biotinilados. Se realiza una incubación de 30 min a 37°C, y se realizan 5 lavados con

solución de lavado 1x. En un paso final se agrega tetrametilbenzidina y agua oxigenada (TMB), se incuba a temperatura ambiente durante 30 min reaccionando con la peroxidasa formando un color azul. La reacción se detiene al agregar ácido HCl 4N (CSR-1) y se determina la absorbancia en cada pozo con un espectrofotómetro con lecturas a 450/570 nm. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno p24 del HIV-1, no unido a complejos, presente en el plasma, suero o medio de cultivo de tejidos. La presencia del antígeno p24 queda indicada cualitativamente si la absorbancia es mayor o igual al valor límite del análisis. La cantidad de antígeno p24 del HIV-1 en una muestra se determina mediante la comparación de su absorbancia con la de los estándares de calibración preparados con antígeno p24 purificado de VIH-1. Para determinar el punto de corte de muestras positivas y negativas, se utiliza la siguiente fórmula:

Punto de Corte: $2X$ (control negativo) + $0.050 \pm 4SD$ (control negativo)

Donde: $2X$ = dos veces la media del control negativo.

0.050 = constante.

$4 SD$ = 4 veces la desviación estándar del control negativo.

5.8. Análisis estadístico

Para comparar las medias de los grupos se empleó análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos, se aplicó la prueba *post-hoc* de Fisher para comparar pares de grupos. Para comparar los efectos del tiempo en los grupos se utilizó el ANOVA para muestras repetidas (RM-ANOVA). Cuando se encontraron efectos, se empleó la prueba T-pareada para determinar diferencias entre pares de medidas entre dos puntos específicos del tiempo. Para determinar las diferencias entre en una variable en un punto determinado de tiempo se realizó la prueba T no-pareada, cuando sólo se tuvieron dos grupos de comparación. Para determinar la correlación entre dos variables continuas dadas (la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, carga viral, cuenta de células T CD4⁺) se empleó el análisis de regresión lineal. Para determinar las diferencias en las frecuencias de una variable categórica entre dos grupos (clasificación histopatológica de un tejido), se empleó la prueba de Chi². Todas las pruebas se realizaron con el programa StatView versión 4.5.

6. RESULTADOS:

6.1. La respuesta no-citotóxica de células T CD8⁺ anti-VIH inhibe la replicación de VIH in vitro dependiente de la dosis.

Debido a que se han descrito contaminaciones en otros ensayos¹⁴⁰, es importante determinar la pureza de las células obtenidas por esferas inmunomagnéticas. La pureza se determina mediante la cuantificación de subpoblaciones por citometría de flujo utilizando anticuerpos, con el método descrito anteriormente. Para la purificación de células T CD4⁺ se observó un promedio de 98.4% de células T CD4⁺ (± 1.4 DE). Para la purificación de células T CD8⁺ se observó un promedio de 98.2% de células T CD8⁺ (± 1.1 DE) (Fig. 9).

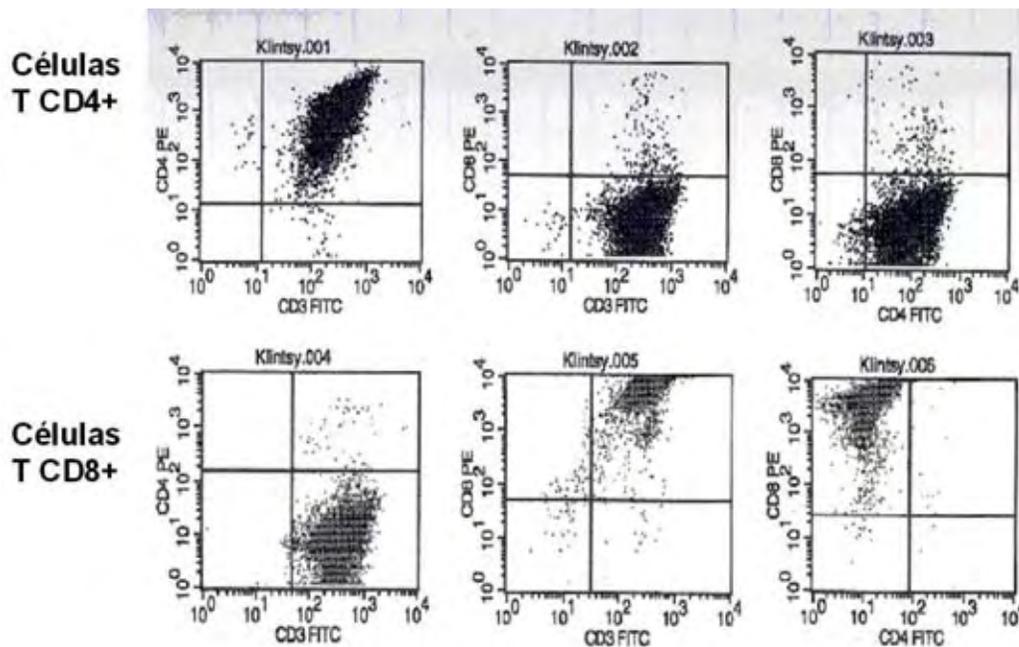


Fig. 9. Determinación de pureza por citometría de flujo.

En esta figura se muestran la especificidad de los anticuerpos marcados con los fluorocromos correspondientes. En tres combinaciones: CD3-CD4, CD3-CD8 y CD4-CD8.

Durante la estandarización del método para medir la respuesta de CNAR, debe asegurarse que la cantidad de virus viable con el que se tratan las células es la misma. Con este fin se determina el volumen de cultivo de VIH_{SF33} necesario para infectar el 50% de las células tratadas (TCID₅₀) por el método de Reed-Muench²⁰⁶. Ya determinada la dosis infecciosa, se realiza una curva para determinar los días de cultivo con mayor cantidad de virus viable. (Fig. 10).

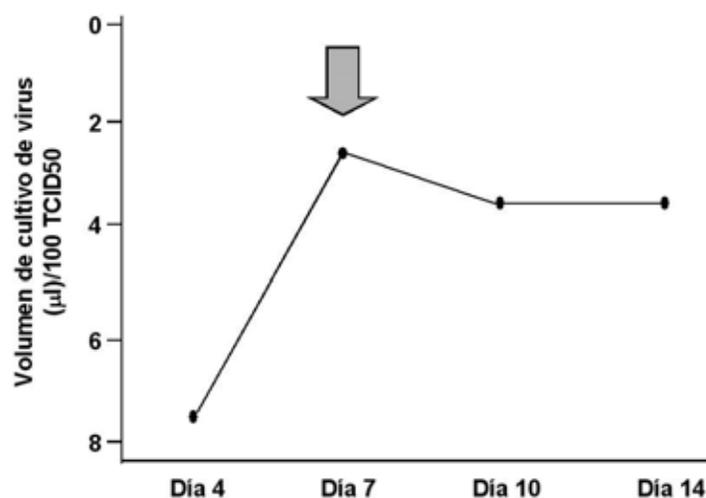


Fig. 10. Determinación de dosis infecciosa mediante curva de titulación de VIH_{SF33}.

Un TCID₅₀ se expresa como el volumen (µl) requerido para la infección del 50% de 1×10^6 células.

Las células T CD8 inhiben la transcripción de genes de VIH, por lo cual no se produce los componentes virales (proteínas estructurales, enzimas o RNA viral). Los dos métodos estándar de medir cantidad de VIH en cultivo es la medición de actividad de transcriptasa inversa de VIH o la cantidad de antígeno p24 de VIH y elegimos este último por ser un método no radioactivo. Para determinar los días de mayor producción de VIH en cultivo, y poder determinar los días óptimos para la cuantificación de Agp24 de VIH en el cultivo, se realizó una curva con las concentraciones por día de cultivo en células mononucleares. Se determinó que los las determinaciones de antígeno en los cultivos se realizaría el día 7 (Fig. 11).

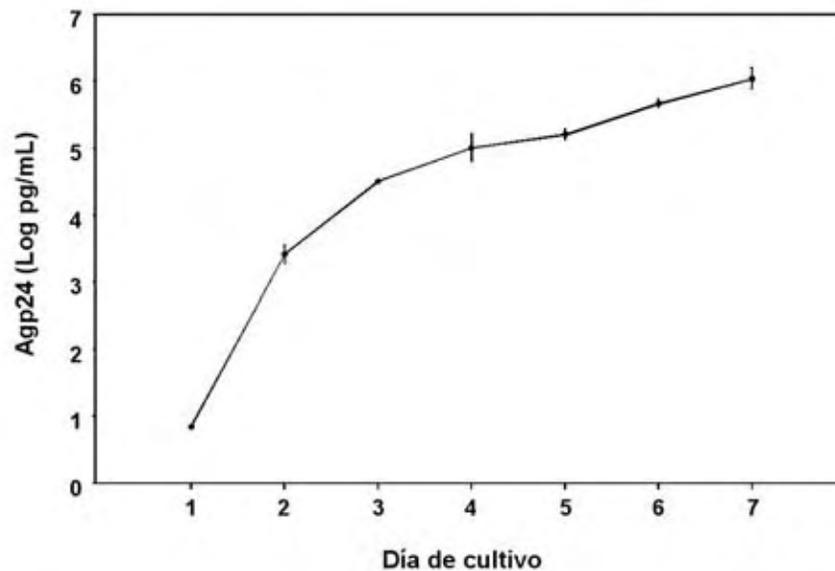


Fig. 11. Curva de replicación de VIH SF33.

En la figura se muestran la concentración de Antígeno p24, en sobrenadantes de cultivos de células cultivadas con VIH SF₃₃, colectados diariamente (\pm DE).

Para determinar la concentración óptima de células T CD8⁺ para el cultivo, se realizaron curvas dosis-respuesta, realizando diversos cocientes de células T CD4⁺/CD8⁺ (Fig. 12). Cocientes de células T CD4⁺/CD8⁺ menores a 0.25, es muy baja la inhibición de la replicación en cultivos de células de pacientes en etapas tardías que dificulta su cuantificación. Por el contrario, cocientes de células T CD4⁺/CD8⁺ mayores a 0.25, la inhibición de la replicación en cultivos de células de pacientes en etapas tempranas es tan alta que no es posible cuantificarlo. Por estas razones, se empleó el cociente 0.25 de células T CD4⁺/CD8⁺.

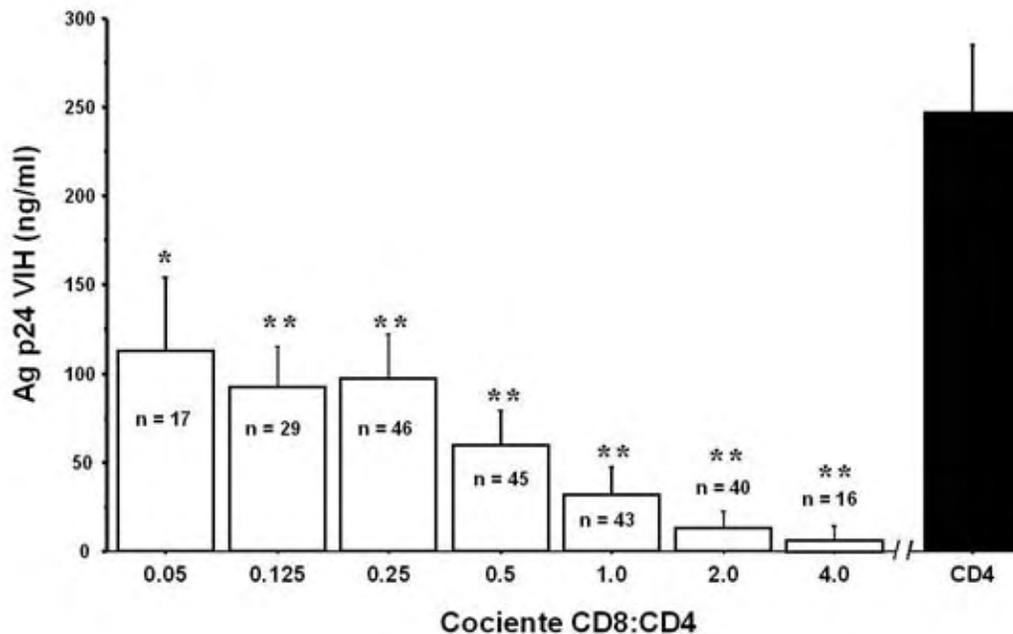


Fig. 12. Curva dosis respuesta de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

Para realizar la curva se colocaron 500,000 células T CD4⁺ infectadas a 500 TCID₅₀/10⁶ células con VIH_{SF33}. El control de replicación se realizó cultivando células T CD4⁺ infectadas sin células CD8⁺. Resultados de prueba *post-hoc* de Fisher * p<0.005, ** p<0.0001.

6.2. Población de pacientes

6.2.1. Características basales de los pacientes del estudio en sangre periférica

Para realizar el estudio de sangre periférica se invitaron a participar a 49 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y superaron los de exclusión. Durante el seguimiento, 4 pacientes suspendieron el tratamiento, 5 pacientes decidieron no participar y 3 pacientes salieron debido a condiciones clínicas. Los datos presentados corresponden a los restantes 37 pacientes. Los pacientes del grupo II y III fueron tratados con una combinación de análogos de nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa y un inhibidor de proteasa o un análogo no nucleósido inhibidor de transcriptasa reversa. Los tratamientos más comunes fueron: a) Zidovudina (AZT), estavudina (d4T) o didanosina (ddl) + lamivudina (3TC) + efavirenz (EFV); b) zidovudina + 3TC + indinavir o nefinavir (NFV); c) zidovudina + 3TC + Abacavir (Aba).

En la tabla 4 se muestran las características basales de los pacientes por grupo. Cuando se comparó la edad y el sexo de los pacientes de los tres grupos, no se observó diferencia significativa. Cuando se compararon los grupos en los niveles de células T CD4⁺ y carga viral plasmática se observaron diferencias significativas.

Tabla 4. Características basales de los pacientes en estudio de sangre periférica

Característica	Etapa temprana	Etapa intermedia	Etapa tardía	Valor p
Número de pacientes	8	12	17	
Media de edad (+/- DE)	34.7 +/- 11	27.9 +/- 4.2	33.6 +/- 8.1	NS
Número de hombres (%)	5 (62.5%)	12 (100%)	17 (100%)	
Media de células T CD4 ⁺ (+/- DE)	606 +/- 213 [†]	340 +/- 70 [†]	65 +/- 43 [†]	<0.0001*
Media carga viral plasmática (Log copias RNA VIH-1/mL +/- DE)	3.65 +/- 1.02 [†]	5.12 +/- 0.46 [‡]	5.79 +/- 0.46 [‡]	<0.0001*
Tratamiento [§]	No	Si	Si	

§ El tratamiento antirretroviral consiste en una combinación de dos análogos de nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa y un inhibidor de proteasa o un análogo no nucleósido inhibidor de transcriptasa reversa. NS, no significativo. * Resultados del ANOVA. Prueba *post hoc* de Fisher: [†] p<0.0001, comparado con todos los grupos, y [‡] p<0.01 entre etapa intermedia y tardía.

6.2.2. Características basales de los pacientes del estudio en ganglios linfáticos.

Para participar en el estudio de ganglios linfáticos invitó a participar a 102 pacientes que presentaban linfadenopatía, de los cuales solo 24 pacientes reunieron los criterios de inclusión. Los pacientes que no reunieron los criterios o los pacientes para los que existió alguna razón para retirarlos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Pacientes evaluados para ingreso al estudio de ganglios linfáticos y que fueron excluidos o retirados del protocolo.

Pacientes	Causa de retiro o exclusión
34	Tratamiento previo con antirretrovirales
4	No aceptó realizarse la biopsia
7	No se obtuvo muestra
7	No se obtuvieron células de la muestra
4	No corresponde a ganglio (tejido mamario, graso y muscular)
2	Infección por <i>M. avium-intracellulare</i>
12	Infección por <i>M. tuberculosis</i>
4	Diagnóstico de Sarcoma de Kaposi
2	Diagnóstico de Lymphoma Non-Hodking

Los 24 pacientes que cumplieron los criterios, presentaron resultados de análisis microbiológico negativo (cultivo de bacterias, hongos, micobacterias y PCR para *M. tuberculosis*). Tanto en la cuenta de células T CD4⁺ y como los niveles de carga viral plasmática se observaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 6). Cuando se compararon la edad o el sexo entre los grupos, no se observó diferencias significativas. Los hallazgos histopatológicos de los 24 pacientes se clasificaron en la

presencia o ausencia de dos características reportadas, hiperplasia folicular o depleción linfoide, realizando posteriormente un análisis de X² entre los grupos. Después de análisis, no se observó diferencia significativa entre los grupos. Se determinó que el 79.2% de las muestras de ganglio linfático presentaban hiperplasia folicular y 20.8% de las muestras de ganglio mostraban disminución de la población linfoide (Tabla 6).

Tabla 6. Características basales de los pacientes del estudio en ganglios linfáticos

Característica	Etapa temprana	Etapa intermedia	Etapa tardía	Valor p
Número de pacientes	6	12	6	
Media de edad (+/- DE)	30.8 + 7.6	27.4 + 5.8	31.6 + 6.8	NS
Sexo (hombres, %)	67%	67%	67%	
Media de células T CD4+ (+/- DE)	685 + 163 ‡	330 + 56 ‡	114 + 35 ‡	< 0.0001*
Media Log carga viral plasmática (copias RNA VIH-1/mL +/- DE)	3.7 + 0.41‡	4.8 + 0.23§	5.2 + 0.31§	0.01*
Patología (% hiperplasia folicular)	50%	75%	100%	NS

NS, no significativo. * Resultados del ANOVA. Los resultados de prueba *post-hoc* de Fisher mostraron diferencias significativas entre cada grupo. ‡p <0.0001, §p <0.01

6.3. Resultados de estudio en sangre periférica.

6.3.1. Correlación entre carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺.

Dado que está ampliamente descrita la correlación entre los niveles de carga viral plasmática y los niveles de células T CD4⁺²⁰⁷, se realizó el análisis de regresión lineal de los datos para determinar si este efecto era observado en nuestra población. De acuerdo a lo esperado, se observó correlación negativa entre ambas variables ($r=0.644$, $p < 0.0001$, Fig. 13). Cuando se estratificaron los datos por grupos de pacientes, no observó correlación entre ambas variables (datos no mostrados).

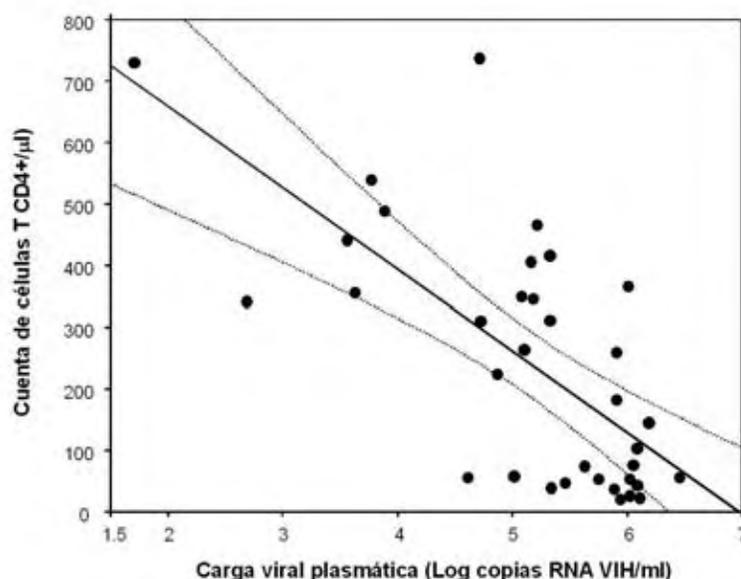


Fig. 13. Correlación basal entre carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺.

Análisis de regresión lineal (mostrando bandas de 95% de intervalo de confianza, $r=0.644$, $p < 0.0001$) de la cuenta de células T CD4⁺ de sangre periférica y la carga viral plasmática.

6.3.2. Las células T CD8⁺ de sangre periférica de pacientes en etapa tardía muestran una menor respuesta anti-VIH no citotóxica.

Como ya se ha descrito que existe una relación entre la etapa clínica¹⁴³, es importante determinar si existen diferencias en la actividad anti-VIH no citotóxica entre los grupos de pacientes estudiados. En la media de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica basal se observó diferencia significativa ($p > 0.001$; ANOVA) (Fig. 14) en el cociente 0.25:1, con valores de 65%, 81% y 40% para los grupos temprano, intermedio y tardío respectivamente. El grupo de etapa tardía fue significativamente menor que los otros dos grupos ($p < 0.05$, prueba *post-hoc* de Fisher).

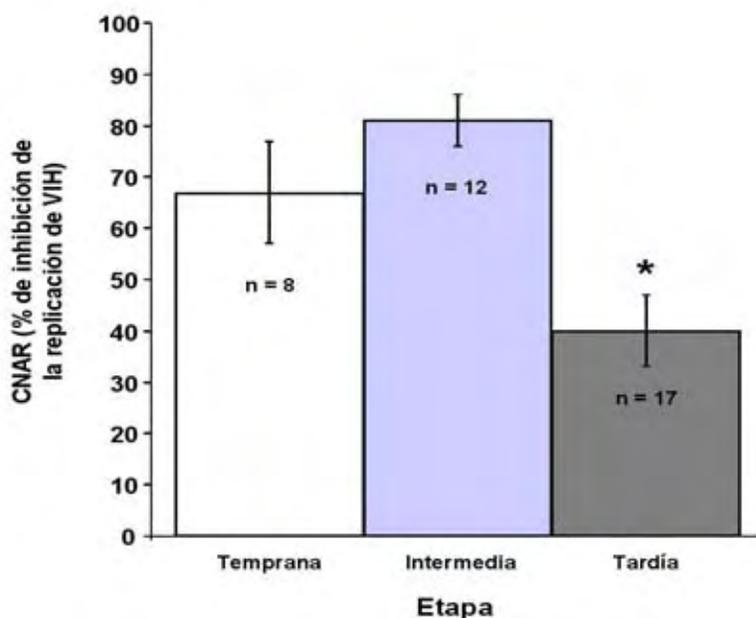


Fig. 14. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica en diferentes estadios de la enfermedad.

Media de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (+/- ES) en cada grupo, expresado como por ciento de supresión de la replicación de VIH SF33 con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ a cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25. *La media de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en estadio tardío es menor con respecto a los otros grupos ($p < 0.01$ en la prueba *post-hoc* de Fisher).

6.3.3. Correlación basal entre la respuesta anti-VIH no citotóxica en células T CD8⁺ de sangre periférica y cuenta de células T CD4⁺.

Debido a que las etapas clínicas están relacionadas con los niveles de células T CD4⁺, buscamos determinar si existe correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ con la cuenta de células T CD4⁺. Al realizar el análisis se observa una correlación positiva entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ y cuenta de células T CD4⁺ ($r=0.589$, $p<0.0001$. Fig. 15).

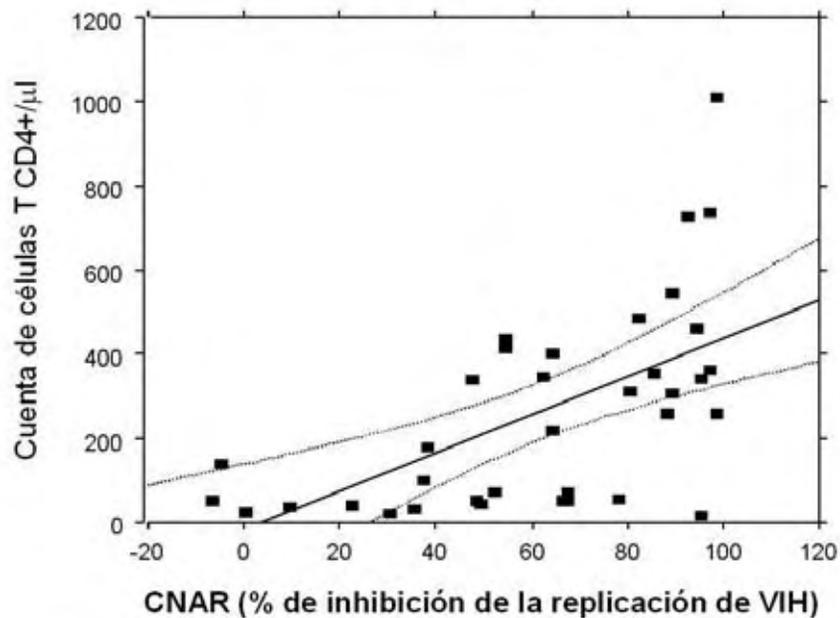


Fig. 15. Correlación basal entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ y cuenta de células T CD4⁺.

Análisis de regresión lineal (mostrando bandas de 95% de intervalo de confianza) de la cuenta de células T CD4⁺ de sangre periférica contra la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ ($r=0.589$, $p<0.0001$, ANOVA). La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es expresada como el porcentaje de la inhibición de la replicación de VIH SF33 con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25.

6.3.4. Correlación inversa entre la respuesta anti-VIH no citotóxica basal en células T CD8⁺ de sangre periférica y carga viral plasmática.

Los bajos niveles de carga viral plasmática se han relacionado a una buena actividad anti-VIH de las células T CD8⁺ citotóxicas, por lo que se buscó determinar si existe correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ y los niveles de carga viral plasmática. Se realizó regresión lineal de los datos, mostrándose una correlación negativa entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ y carga viral plasmática (Fig. 16) ($r=0.625$, $p<0.0001$).

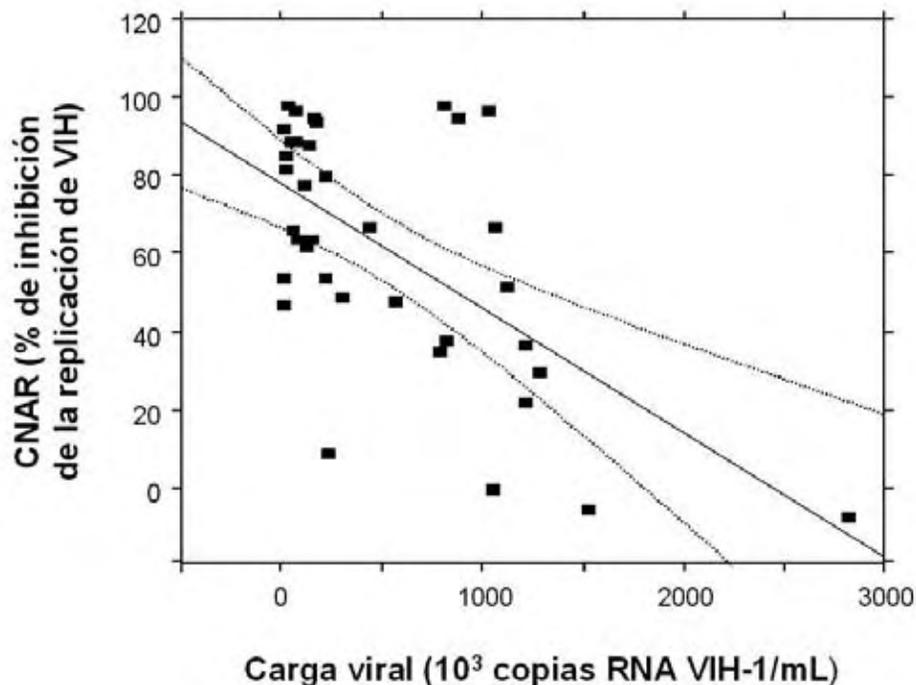


Fig. 16. Correlación inversa basal entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ y carga viral plasmática.

Regresión lineal de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ con carga viral plasmática de los pacientes estudiados (se muestran bandas de 95% de intervalo de confianza, $r=0.625$, $p<0.0001$). Sólo una medición se encontraba en el límite de detección (50 copias de RNA-VIH/mL). Por ciento de la inhibición de la replicación de VIH_{SF33} con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25.

6.3.5. El tratamiento antirretroviral disminuye la carga viral plasmática de pacientes en etapa intermedia y tardía.

A los pacientes se les realizó el seguimiento de niveles de carga viral plasmática antes y después del inicio del tratamiento antirretroviral (tabla 7, Fig. 18). Como ya se mencionó (Tabla 4) existe diferencia significativa en los niveles basales de carga viral plasmática entre los grupos de paciente ($p < 0.0001$, ANOVA). El análisis de los niveles de carga viral plasmática con respecto al tiempo, muestra que no existe diferencia en los pacientes en etapa temprana (RM-ANOVA) (tabla 7, Fig. 17). Sin embargo, se observa diferencia en los niveles de carga viral en los pacientes que recibieron tratamiento antirretroviral, en etapa intermedia ($p < 0.0001$, RM-ANOVA) y en etapa tardía ($p < 0.0001$, RM-ANOVA). Cuando se comparan los niveles de carga viral en las primeras 4 semanas de tratamiento con respecto a la basal se muestra una diferencia estadísticamente significativa en los pacientes de etapa intermedia ($p < 0.001$, T-pareada), así como en los pacientes de etapa tardía ($p < 0.0001$, T-pareada). Si comparamos los niveles de carga viral plasmática de los diferentes puntos en el tiempo con respecto a la carga viral plasmática basal, observamos que esta disminución se mantiene hasta la semana 48 en los pacientes en etapa intermedia y tardía ($p < 0.0001$, T-pareada), quienes iniciaron tratamiento antirretroviral.

Tabla 7. Niveles carga viral plasmática por etapa de la enfermedad, con respecto al tiempo.

Etapa	Basal	Sem 4	Sem 12	Sem 24	Sem 48
Temprana (copias RNA-VIH/mL \pm ES)	3.65 \pm 0.36	ND	3.71 \pm 0.42	3.58 \pm 0.44	3.75 \pm 0.34
Intermedia (copias RNA-VIH/mL \pm ES)	5.12 \pm 0.17	3.12 \pm 0.26	1.85 \pm 0.34	0.72 \pm 0.35	1.13 \pm 0.55
Tardía (copias RNA-VIH/mL \pm ES)	5.79 \pm 0.11	2.39 \pm 0.33	1.23 \pm 0.24	1.2 \pm 0.37	1.17 \pm 0.41

ND = No determinado. ES = Error estándar

Para determinar si la diferencia en los niveles de carga viral entre los grupos se mantienen a través del tiempo, se compararon valores de carga viral entre los grupos en cada punto del tiempo de seguimiento. Existe diferencia significativa en los niveles de carga viral plasmática entre los grupos (tabla 4) antes del inicio de tratamiento. En la semana 4 después del inicio de el tratamiento antirretroviral altamente activo, la carga viral plasmática (Log copias RNA-VIH/mL) disminuye en el orden de 1.97 log de carga viral en la etapa intermedia y 3.53 log de carga viral en la etapa tardía, produciendo que se pierda la diferencia en los niveles de carga viral basales entre las etapas intermedia y tardía). Durante el seguimiento de las semanas 12, 24 y 48, las cargas virales plasmáticas se mantienen por debajo del 1.8 Log, y no se observan diferencias entre los grupos. Debido a que los pacientes de etapa temprana no reciben tratamiento antirretroviral, los niveles de carga viral de VIH se mantienen en un intervalo de 3.58 a 3.75 Log, permitiendo que a partir de la semana 12 se mantengan significativamente mayores a los niveles de los otros grupos ($p < 0.001$, ANOVA) (Fig. 17).

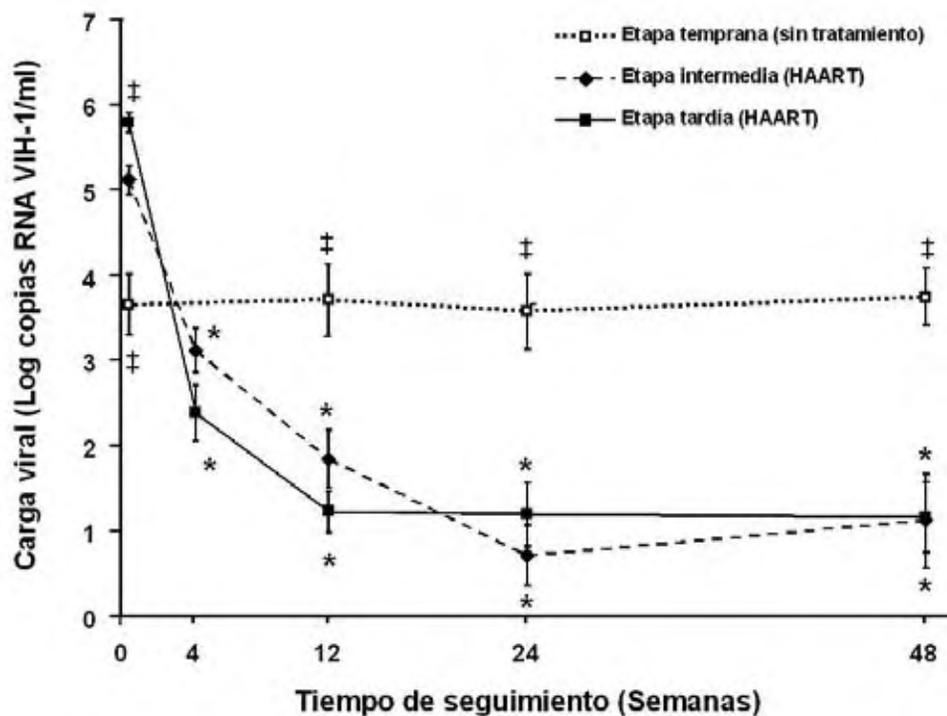


Fig. 17. Cinética de niveles de carga viral plasmática durante el tratamiento antirretroviral.

Valores promedio de la carga viral plasmática (Log copias RNA-VIH/mL \pm ES) antes (semana 0) y durante el tratamiento antirretroviral. Prueba T-pareada, diferencia significativa (* $p < 0.001$) de la determinación de carga viral en un punto en el tiempo con respecto a la determinación basal; Prueba *post-hoc* de Fisher, diferencia significativa († $p < 0.01$) de la determinación de carga viral entre grupos en un punto del tiempo.

6.3.6. El tratamiento antirretroviral incrementa la cuenta de células T CD4⁺ en sangre de pacientes en etapa intermedia y tardía.

A los pacientes se les realizó el seguimiento de niveles de carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺ en sangre periférica a los pacientes antes y después del inicio del tratamiento antirretroviral (Tabla 8, Fig. 18). En los niveles de células T CD4⁺ en sangre periférica en pacientes de etapa temprana con respecto al tiempo de seguimiento no se observa diferencia significativa (RM-ANOVA). Los pacientes en etapa intermedia que iniciaron tratamiento muestran una tendencia al incremento en los niveles de células T CD4⁺ ($p=0.09$, RM-ANOVA). Cuando se analiza cada punto en el tiempo con respecto a la basal, se observa que hay un incremento significativo en las semanas 12, 24 y 48 ($p<0.05$, T-pareada). En los pacientes de etapa tardía, después del inicio de tratamiento antirretroviral, se observa un incremento significativo en los niveles de células T CD4⁺ ($p<0.0001$, RM-ANOVA). Cuando se analizan los niveles de células T CD4⁺ de los pacientes en etapa intermedia y tardía en cada punto en el tiempo con respecto a la basal, se observa un incremento significativo a partir de la semana 4 ($p<0.01$, T-pareada). El incremento en los niveles de células T CD4⁺ de los pacientes en etapa intermedia y tardía que recibieron tratamiento antirretroviral, se mantiene hasta la semana 48.

Tabla 8. Niveles de células T CD4⁺ por etapa con respecto al tiempo, en estudio de sangre periférica.

Etapa	Basal	Sem 4	Sem 12	Sem 24	Sem 48
Temprana (células/ μ l \pm ES)	606 \pm 75	ND	632 \pm 94	605 \pm 63	596 \pm 95
Intermedia (células/ μ l \pm ES) [§]	340 \pm 20	431 \pm 55	452 \pm 52	419 \pm 38	513 \pm 52
Tardía (células/ μ l \pm ES) [§]	65 \pm 11	127 \pm 21	163 \pm 23	171 \pm 22	236 \pm 29

ND = No determinado. ES = Error estándar. [§]Los pacientes en etapa intermedia y tardía iniciaron tratamiento antirretroviral después de la muestra basal.

Para realizar un análisis más detallado de los cambios en los niveles de células T CD4⁺ en sangre periférica con respecto al tiempo de tratamiento, se realizaron comparaciones entre los grupos. Como ya se mencionó (Tabla 4), se observa diferencia significativa en los niveles de células T CD4⁺ en sangre periférica entre los grupos antes del inicio de tratamiento. En la semana 4 después del inicio de el tratamiento antirretroviral altamente activo, se observó diferencia significativa en los niveles de células T CD4⁺ entre las etapas intermedia y tardía ($p < 0.0001$). En la semana 12 y 24 mantiene una diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.0001$, ANOVA). En la semana 48, aunque se muestra una diferencia significativa en los niveles de células T CD4⁺ entre los grupos ($p < 0.0001$, ANOVA), la prueba *post-hoc* de Fisher muestra que esta diferencia existe sólo en los niveles de células T CD4⁺ de los pacientes de etapas intermedia y temprana ($p < 0.001$). Es decir, los niveles de células T CD4⁺ en sangre periférica en los pacientes de etapa intermedia, quienes iniciaron tratamiento, dejan de ser distintos a los niveles de los pacientes en etapa temprana a las 48 semanas después de iniciado el tratamiento, a diferencia de los pacientes de

etapa tardía, que aunque se incrementan con el tiempo, no logran alcanzar los niveles de ninguna de las etapas.

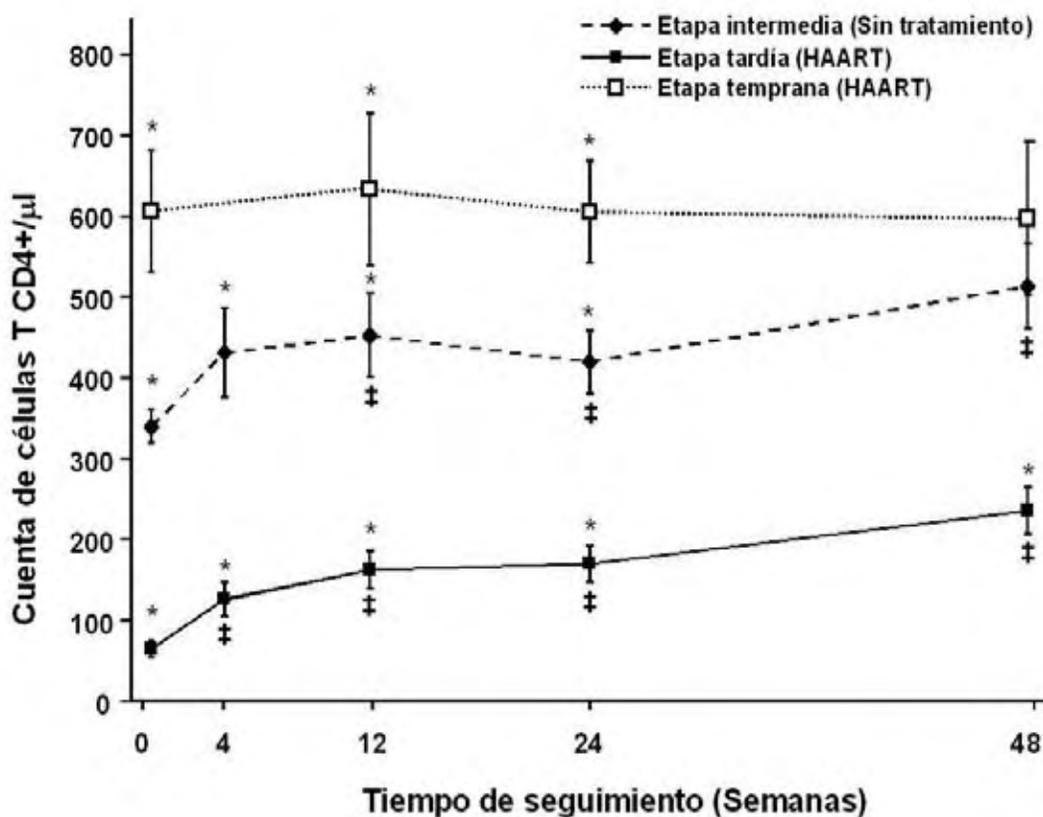


Fig. 18. Cinética de niveles de células T CD4⁺/μl en sangre periférica durante el tratamiento antirretroviral.

Media de la cuenta de células T CD4⁺ en sangre periférica (células/μl ± ES) antes y después del inicio de tratamiento antirretroviral. Diferencias inter-grupo en un punto en el tiempo, *p<0.05 (ANOVA). Diferencias con respecto a la muestra basal con respecto al tiempo †p<0.001 (*Post-hoc Fisher*).

6.3.7. El tratamiento antirretroviral incrementa la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de pacientes en etapa tardía.

Para determinar el efecto del tratamiento antirretroviral sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica, se tomaron muestras de sangre periférica antes del inicio del tratamiento y durante las semanas 4, 12, 24 y 48 después de iniciado el tratamiento. A pacientes en etapa temprana sin tratamiento antirretroviral, se les realizó el seguimiento de la respuesta anti-VIH no citotóxica. Como ya se mencionó (Tabla 4, Fig. 19), se observa que los niveles basales de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ son significativamente menores ($p < 0.01$, ANOVA) en etapa tardía.

Tabla 9. Niveles de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (% de inhibición de la replicación) por etapa de la enfermedad, con respecto al tiempo.

Etapa	Basal	Sem 4	Sem 12	Sem 24	Sem 48
Temprana (% inhibición \pm ES)	72 \pm 10	ND	79 \pm 7	81 \pm 5	75 \pm 6
Intermedia (% inhibición \pm ES)	81 \pm 5	74 \pm 7	82 \pm 5	79 \pm 3	71 \pm 6
Tardía (% inhibición \pm ES)	40 \pm 7 *	69 \pm 8	65 \pm 6	69 \pm 5	55 \pm 5

ND = No determinado. ES = Error estándar, $p < 0.01$ prueba *post-hoc* de Fisher.

En pacientes en etapa temprana, no se observan diferencias en la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica durante el seguimiento. En pacientes en etapa intermedia, después de iniciado el tratamiento antirretroviral, no se observa diferencia (RM-ANOVA) en los niveles de respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica. En los pacientes de etapa tardía con bajos niveles basales de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, esta respuesta se incrementa a niveles semejantes a los niveles de la etapa intermedia en

las primeras 4 semanas de iniciado el tratamiento antirretroviral. El incremento de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de pacientes en etapa tardía es temporal, debido a que comienza a disminuir progresivamente. Para la semana 48 posterior al inicio del tratamiento antirretroviral, la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de pacientes en etapa tardía muestra una diferencia significativa ($p < 0.05$, *post-hoc* de Fisher) con respecto a los otros grupos (Tabla 9, Fig. 19).

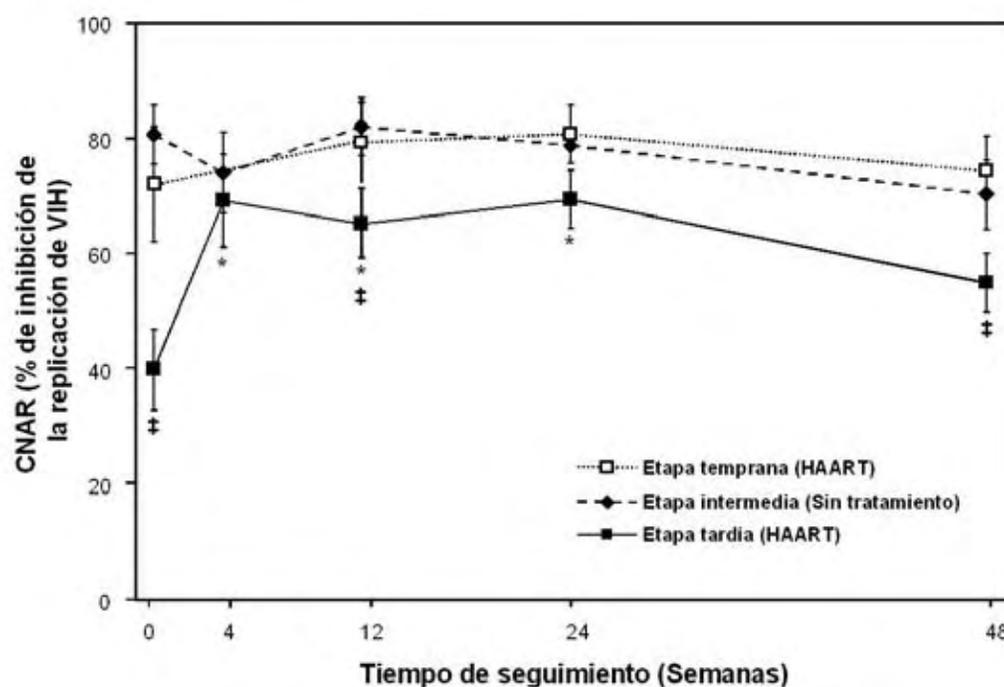


Fig. 19. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica de pacientes en las etapas temprana, intermedia y tardía de la infección por VIH.

Por ciento de la inhibición de la replicación de VIH_{SF33} con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25 (media \pm ES). Semana 0 indica la actividad basal, medida antes al inicio del tratamiento antirretroviral. Prueba T-pareada: diferencia significativa (* $p < 0.001$) de la determinación de carga viral en un punto en el tiempo con respecto a la determinación basal. Prueba *post-hoc* de Fisher: diferencia significativa († $p < 0.01$) de la determinación de carga viral entre grupos en un punto del tiempo.

6.4. Resultados del estado basal del estudio en tejidos linfoides.

6.4.1. Correlación entre la cuenta de células T CD4⁺ y carga viral plasmática.

Los ganglios linfáticos son los principales sitios de replicación de VIH incluso en pacientes clínicamente estables²⁰⁸, son los principales sitios de patogénesis de VIH^{209,210}, y el grado de evolución de la infección por VIH se ve reflejada en la estructura y función de los ganglios linfáticos^{53,208}, razones por las cuales es importante determinar el efecto de VIH sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de ganglios linfáticos. A partir de las células obtenidas de sangre periférica y ganglios linfáticos obtenidas de los pacientes, se realizó en la cuantificación de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, además de la determinación de carga viral y cuenta de células T CD4⁺ circulantes.

Cómo ya se mostró, existe diferencia significativa en los niveles de carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺ (Tabla 4). Para determinar si los pacientes a quienes se les extrajeron muestras de sangre periférica y ganglio linfático mostraban correlación entre los niveles de carga viral plasmática y los niveles de células T CD4⁺ (Fig. 20), como se ha descrito en otros estudios²⁰⁷, se realizó la regresión lineal de los datos, observándose correlación negativa entre ambas variables ($r=0.550$, $p<0.01$).

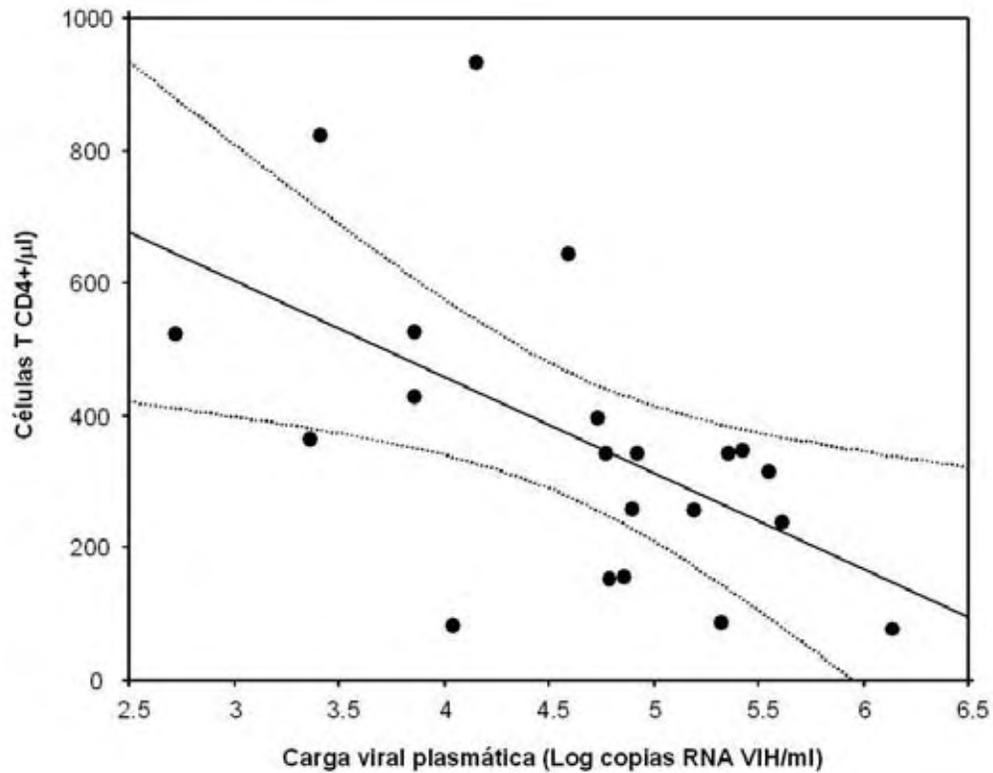


Fig. 20. Correlación basal entre carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺.

Regresión lineal mostrando bandas de 95% de intervalo de confianza ($r = 0.550$, $p < 0.01$). La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es expresada como el por ciento de la inhibición de la replicación de VIH SF33 con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25.

6.4.2. Los niveles de carga viral plasmática y cuenta de células T CD4⁺ en pacientes con linfadenopatía son similares a los descritos.

Para determinar que los pacientes a quienes se les obtuvo ganglio linfático reúnen las características inmunológicas y virológicas para los grupos de pacientes, se analizaron los niveles de carga viral plasmática y número de células T CD4⁺ por grupo. Como se puede observar en la

Tabla 6, la cuenta de células T CD4⁺ (Fig. 21A), son significativamente distintos entre los grupos ($p < 0.0001$, ANOVA), mostrándose que la media es menor en la etapa tardía con respecto a ambos grupos ($p < 0.001$, *post-hoc* de Fisher), y que los pacientes en etapa temprana tienen los niveles más altos de células T CD4⁺/ μ l ($p < 0.0001$, *post-hoc* de Fisher). Los niveles basales de carga viral plasmática (Fig. 21B) son significativamente distintos entre los grupos ($p < 0.01$, ANOVA). Los niveles de carga viral plasmática en la etapa temprana son significativamente menores que los otros grupos ($p \leq 0.01$, *post-hoc* de Fisher), y no se observan diferencias en las etapas intermedia y tardía.

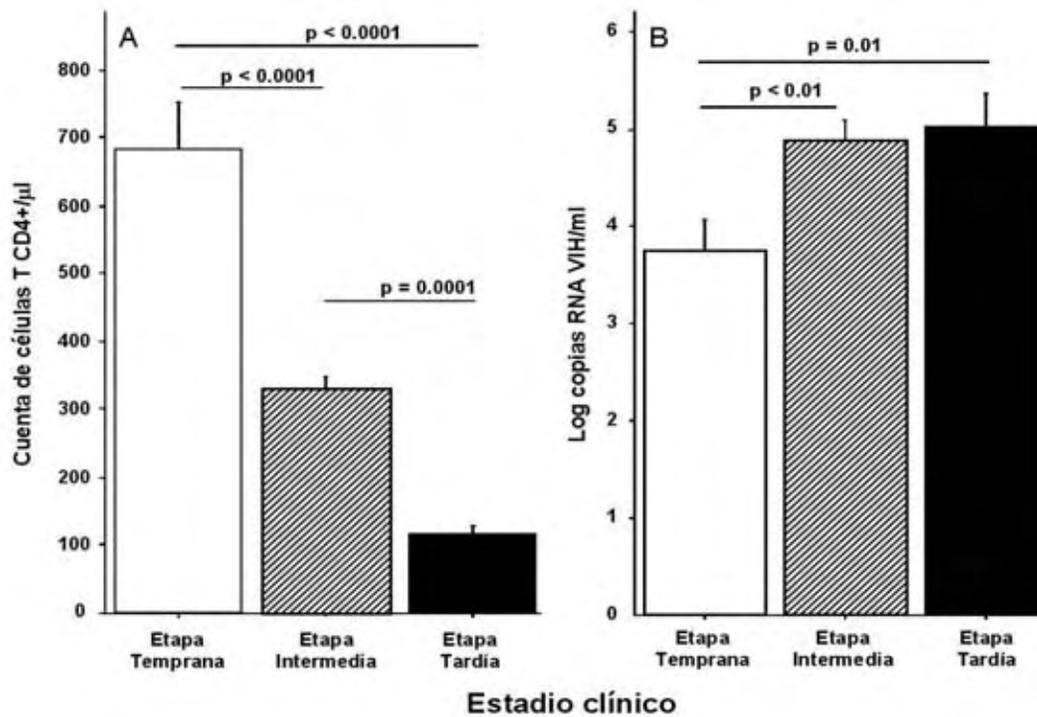


Fig. 21. Niveles de células T CD4⁺ y carga viral plasmática por estadio clínico.

Cuenta de células T CD4⁺ (A) y niveles de carga viral plasmática (B) por estadio clínico. Resultados de prueba *post-hoc* de Fisher.

6.4.3. Las células T CD8⁺ de sangre periférica y tejido linfoide de pacientes de etapa tardía, presentan una menor respuesta anti-VIH no citotóxica.

Para determinar si existe diferencia entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y tejido linfoide de pacientes en diferentes etapas de la infección por VIH, se obtuvieron células de sangre periférica y de tejido linfoide de cada paciente. Las células T CD8⁺ obtenidas se utilizaron para determinar la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

Entre los grupos en las muestras de sangre periférica se encontró diferencia significativa (Fig. 22A, $p=0.01$, ANOVA), mostrándose que la etapa tardía es significativamente menor que el resto de los grupos ($p<0.05$, *post-hoc* de Fisher). En las muestras de tejido linfoide, también se encontró diferencia entre los grupos (Fig. 22B, $p<0.01$, ANOVA), observándose que la etapa tardía es significativamente menor que el resto de los grupos ($p<0.01$, *post-hoc* de Fisher).

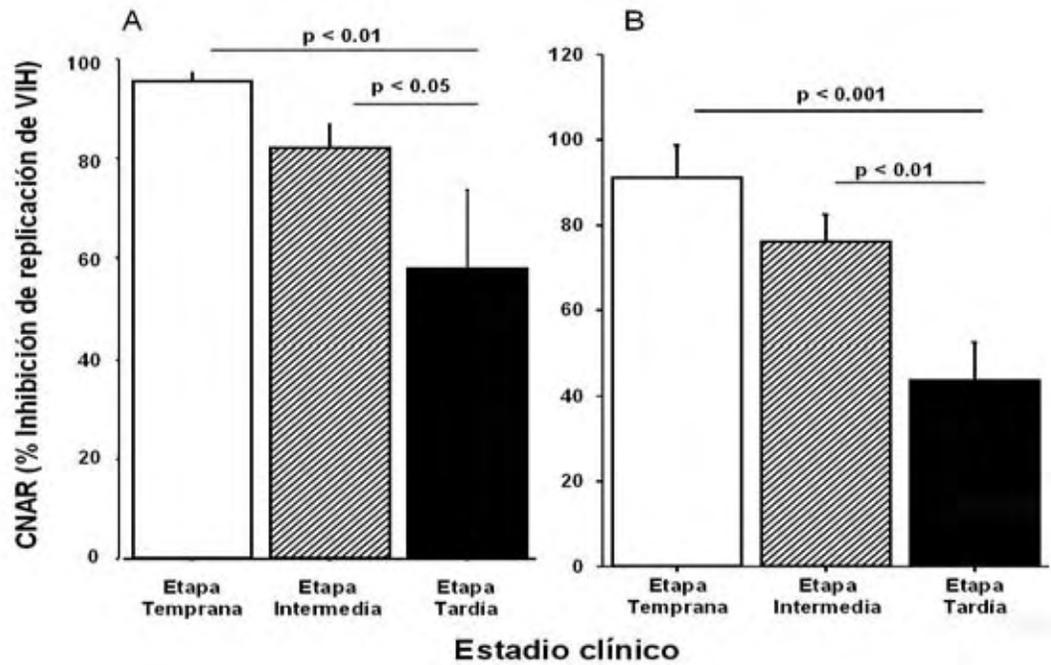


Fig. 22. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ por etapa clínica y por tejido.

Sangre periférica (A) y tejido linfoides (B). Por ciento de la inhibición de la replicación de VIH_{SF₃₃} con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25 (media ± ES). Resultados de prueba *post-hoc* de Fisher.

6.4.4. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica es similar a la respuesta de las células TCD8⁺ de tejido linfoide.

Cuando se comparó la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica con tejido linfoide de todos los pacientes (Fig. 23A) no se observó diferencia entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y tejido linfoide. Cuando se analizó por etapa de la enfermedad no se encontró diferencia entre diferencias entre el origen de las muestras para la medición de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (Fig. 23B).

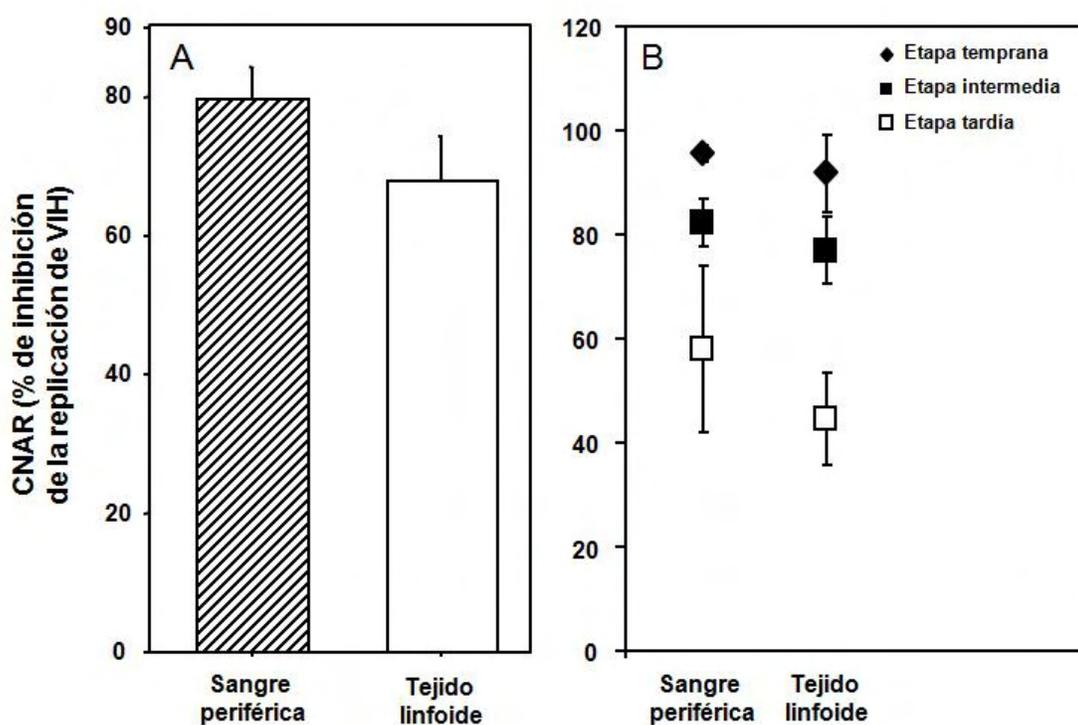


Fig. 23. Respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ por tejido.

Actividad en el total de pacientes por tejido (A) y por estadio clínico (B). Por ciento de la inhibición de la replicación de VIH_{SF33} con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25 (media ± ES).

6.4.5. Correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de tejido linfoide y la cuenta de células T CD4⁺ de sangre periférica.

En las muestras de los pacientes del estudio de sangre periférica se encontró correlación de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ con el conteo de células T CD4⁺ y carga viral, por lo cual se buscó verificar este dato en los pacientes a quienes se les obtuvo ganglio linfático. En las muestras de tejidos linfoides, se encontró correlación entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de y los niveles de carga viral plasmática y conteo de células T CD4⁺.

En las muestras de sangre periférica se observó correlación positiva entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ y el conteo de células T CD4⁺ ($r=0.481$, $p<0.05$, ANOVA) (Fig. 24A). En las muestras de tejido linfoide también se encontró correlación positiva con el número de células T CD4⁺ ($r=0.546$, $p<0.01$, ANOVA) (Fig. 24B).

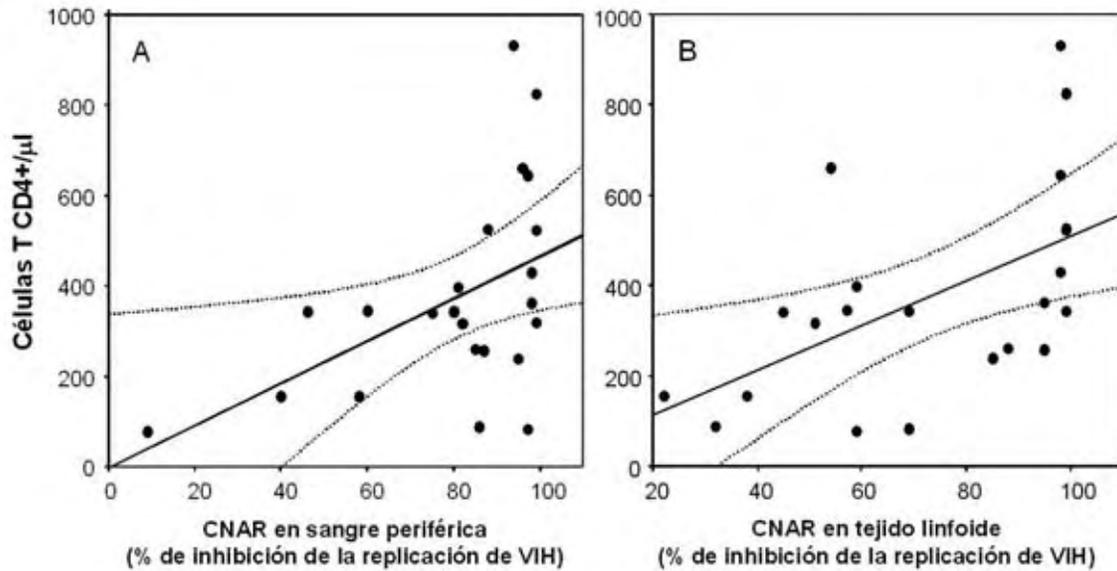


Fig. 24. Correlación basal entre cuenta de células T CD4⁺ y respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ por tejido.

Correlación basal entre cuenta de células T CD4⁺ y respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica (A) y tejido linfoide (B). La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es expresada como el por ciento de la inhibición de la replicación de VIH_{SF33} con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25. Se muestran bandas de 95% de intervalo de confianza.

6.4.6. Correlación inversa entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de tejido linfóide y la carga viral plasmática.

En los pacientes, se observó correlación negativa entre la carga viral plasmática y la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica ($r=0.594$, $p<0.005$, ANOVA, Fig. 25A) y en tejido linfóide ($r=0.562$, $p<0.01$, ANOVA) (Fig. 25B).

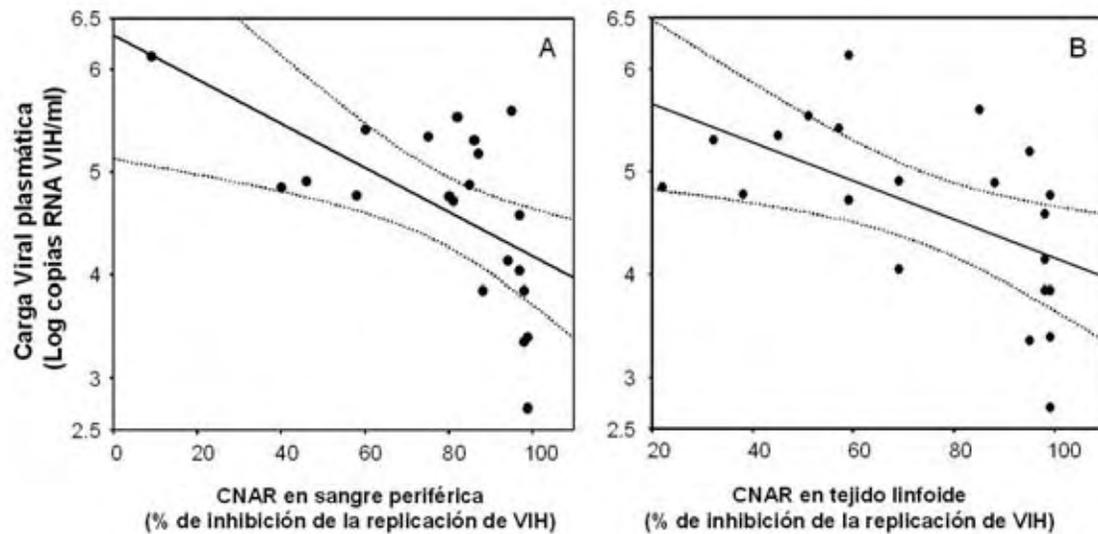


Fig. 25. Correlación basal entre cuenta de carga viral plasmática y respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

Correlación basal entre carga viral plasmática y la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica (A) y tejido linfóide (B). La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es expresada como el por ciento de la inhibición de la replicación de VIH SF33 con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25. Se muestran bandas de 95% de intervalo de confianza.

6.4.7. Correlación entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica y la respuesta de las células TCD8⁺ de tejido linfoide.

Obtenidas estas correlaciones, se buscó determinar si existe correlación entre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de ambos compartimentos, y se observó correlación positiva entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y en tejido linfoide ($r = 0.553$, $p < 0.01$, ANOVA) (Fig. 26).

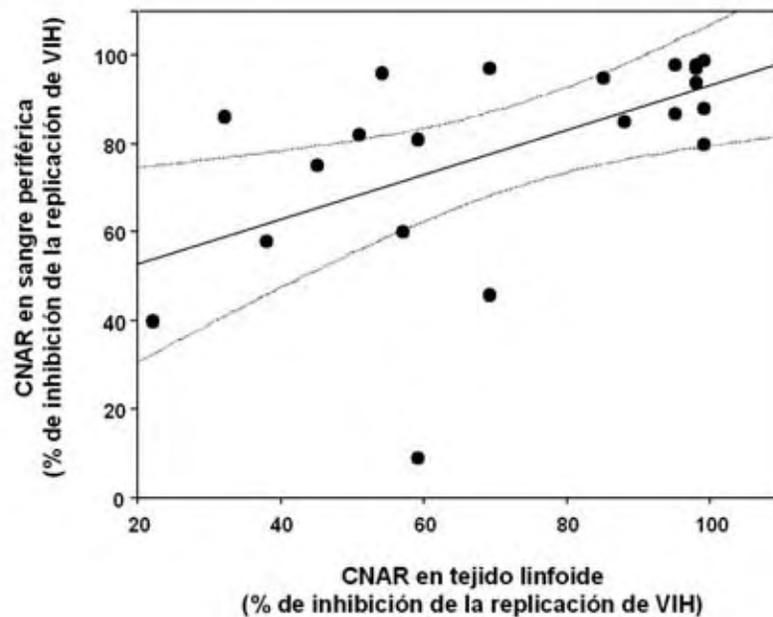


Fig. 26. Correlación basal entre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y tejido linfoide.

La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es expresada como el por ciento de la inhibición de la replicación de VIH₃₃ con tropismo CXCR4 en células T CD4⁺ al cociente CD8⁺/CD4⁺ de 0.25. Se muestran bandas de 95% de intervalo de confianza.

7. DISCUSIÓN

La infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tiene graves efectos sobre el sistema inmunológico. Existe una disminución progresiva del número de células T CD4⁺, lo que favorece el desarrollo de infecciones oportunistas en los individuos. En las etapas finales de la enfermedad es casi nula la capacidad de respuesta a los microorganismos lo que lleva a la muerte del individuo con VIH¹. Con el inicio del uso de medicamentos antirretrovirales en los pacientes con VIH se ha observado una disminución significativa de la mortalidad y morbilidad⁶⁷ como consecuencia de una mejoría del sistema inmunológica y una disminución de la presencia de infecciones oportunistas⁶⁸. Las células T CD8⁺ específicas de VIH son capaces de proliferar⁹¹ y tener diversas funciones efectoras⁹². La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es una respuesta inmunológica importante para el control de la infección^{211, 144}. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ correlaciona con el estado clínico de los individuos infectados con VIH¹⁴³ y la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de ganglios linfáticos de individuos con una lenta evolución de la enfermedad, tiene una mayor respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ ¹⁴⁵, aunque ha sido una descripción 5 pacientes con 3 características clínicas.

Existen algunos reportes en los que se ha evaluado el efecto de el tratamiento antirretroviral altamente activo sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en pacientes durante la infección primaria²⁰⁵, y durante la infección crónica²¹². En estos estudios, se observa que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ disminuye por efecto del tratamiento antirretroviral. Desafortunadamente estos trabajos presentan algunos inconvenientes, como el hecho de que se desconocen los

mecanismos para el desarrollo de la respuesta anti-VIH no citotóxica en las etapas tempranas de la infección²⁰⁵, y desconocemos el efecto que el tratamiento puede tener en el desarrollo de dicha respuesta. Por otra parte, es difícil evaluar el efecto del tratamiento antirretroviral en quienes se ha utilizado previamente medicamentos antirretrovirales²¹².

Los ganglios linfáticos son sitios importantes de la producción, almacenaje y persistencia de VIH, y se observa un alto número de células T CD4⁺ infectadas y altos niveles de carga viral desde etapas tempranas de la infección⁴⁹. Conforme la infección progresa, la población de células T CD4⁺ de ganglios linfáticos disminuye, y el grado de evolución de la infección por VIH se ve reflejada en la estructura y función de los ganglios linfáticos⁵³, con eventual pérdida de todas las estructuras anatómicas reconocibles^{52,208}.

En el presente estudio buscamos determinar si existe diferencia en la respuesta de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en dos compartimentos, como son sangre periférica y tejidos linfoides, y determinar el efecto de el tratamiento antirretroviral altamente activo sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en grupos de pacientes con infección crónica por VIH, clasificados por el grado de evolución de la enfermedad.

Las etapas clínicas de la infección por VIH ha sido ampliamente documentada, y son utilizadas como parámetros de evolución y para el inicio de tratamiento antirretroviral⁶³. Es clásica la correlación negativa entre los niveles de carga viral plasmática y el número de células T CD4⁺ circulantes²⁰⁷ de los pacientes con VIH. Estos parámetros son lo que utilizamos para la clasificación de las etapas clínicas del estudio (Tabla 4 y 6), por lo que fue posible identificar la correlación que existe entre los niveles plasmáticos de carga viral y número de células T CD4⁺. Esta relación entre

las etapas clínicas es importante, para que al realizar la medición de respuesta anti-VIH no citotóxica, pudiéramos estar seguros de los resultados de respuesta anti-VIH no citotóxica. Como ya se había descrito¹⁴³, los pacientes en etapas tardías presentan una menor respuesta anti-VIH no citotóxica, y que esta actividad depende del nivel de células T CD4⁺²¹¹. Lo que no ha quedado muy claro en otros estudios, es si la respuesta anti-VIH no citotóxica tiene alguna relación sobre la carga viral plasmática, por la correlación encontrada en nuestro trabajo en los dos grupos de pacientes estudiados (Fig. 16 y 25) provee de evidencia en este sentido. Lo que no es posible definir con estos datos es si la respuesta anti-VIH no citotóxica depende directamente del número de células T CD4⁺ o de los niveles de carga viral plasmática. La administración del tratamiento antirretroviral provee de cierta información.

El tratamiento antirretroviral efectivo disminuye los niveles de carga viral plasmática y es claro que la suspensión del tratamiento permite la evolución de la infección^{175,213}. A los pacientes de las etapas intermedias y tardías (Tabla 4 y 6), les administramos tratamiento antirretroviral, y los seguimos prospectivamente. Como ya se ha descrito, el tratamiento antirretroviral disminuyó la carga viral de los pacientes (Fig. 17), y permitió el incremento de las células T CD4⁺ (Fig. 18), los pacientes sin tratamiento antirretroviral permanecieron estables durante el seguimiento. Ambos efectos son similares en magnitud y cinética en los dos grupos.

En el grupo de pacientes con muestras de sangre periférica, el tratamiento antirretroviral incrementa la respuesta anti-VIH no citotóxica de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, llegando a niveles similares de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de los pacientes de etapas intermedias, en las primeras 4 semanas (Fig. 19). Este incremento en los pacientes en etapa tardía ocurre simultáneamente con la disminución de la carga viral plasmática y el incremento de

los niveles de células T CD4⁺. Los pacientes en etapa intermedia no mostraron incremento en la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ durante el tratamiento.

Podría interpretarse que el tratamiento antirretroviral altamente activo no tiene efecto en la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en los pacientes en etapa intermedia (Fig. 19). Sin embargo, un problema observado es que al analizar los datos en cocientes distintos (CD8/CD4, 0.5:1 ó 0.125:1), los valores de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ salían del intervalo medible (datos no mostrados). Por ejemplo, la mayoría de valores de inhibición de replicación de células T CD8⁺ de pacientes de cualquier etapa en el cociente 0.5:1, fueron cercanos al 100%. Por el contrario, en el cocientes 0.125:1, los valores eran tan bajos (<10%), que impedían el análisis de los datos.

Debido a que se ha mostrado que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ disminuye con el tiempo, en las etapas avanzadas de la infección^{143-145,214}, nuestros resultados muestran que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es estable a lo largo del tratamiento en pacientes de etapa intermedia.

En los estudios con pacientes sin tratamiento antirretroviral¹⁴³ se muestra que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica tiene una correlación positiva con los niveles de células T CD4⁺, y una correlación negativa con los niveles de carga viral, lo que favorece la teoría del efecto benéfico que puede tener el incremento del número de células T CD4⁺ sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

Bajo tratamiento antirretroviral las correlaciones de la respuesta anti-VIH no citotóxica con el número de células T CD4⁺ y carga viral se pierden, lo que muestra la compleja relación existente entre ellos. En este sentido, se ha descrito que el tratamiento

antirretroviral no solo favorece el incremento del número de células T CD4⁺, sino que además permite la restauración de la función de las células T CD4⁺. Un ejemplo de restauración de la función de las células T CD4⁺ es el incremento de la producción de IL-2^{215,216}, uno de los principales activadores de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺^{217,218}.

Aunque existe la posibilidad de que altos niveles de carga viral por si misma pudieran inhibir respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Sin embargo varios pacientes con control viral antes del tratamiento antirretroviral (7 de 17 pacientes en etapa tardía), no mostraban altos niveles de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Además, algunos individuos con baja respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en etapa intermedia, no mostraron altos niveles de carga viral. Por estas razones, la respuesta no parece estar influenciada por la viremia plasmática.

Dado que las respuestas específicas contra el VIH, tanto de células T como células B, disminuyen en relación a los niveles de carga viral por efecto de el tratamiento antirretroviral altamente activo^{116,197,219-222}, el efecto de el tratamiento antirretroviral altamente activo en otras respuestas inmunológicas son de enorme interés.

Como ya mencionamos, los estudios previos del efecto de tratamiento antirretroviral sobre la respuesta anti-VIH no citotóxica sugieren datos discordantes. Por ejemplo, que se requieren ciertos niveles de antígeno circulante para iniciar o mantener la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺²⁰⁵, y por otra parte, es difícil evaluar si realmente el tratamiento disminuye la actividad anti-VIH no citotóxica en quienes se ha utilizado previamente medicamentos antirretrovirales²¹².

En contraste nuestros resultados muestran poca evidencia de que el tratamiento antirretroviral altamente activo disminuya la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Incluso en pacientes en etapa avanzada, los niveles de la respuesta

anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ se incrementan después de iniciado el tratamiento antirretroviral altamente activo. Además, en los grupos de pacientes con tratamiento la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ se mantiene en altos niveles durante más de 1 año, y en algunos casos incluso en más de 2 años. Estos resultados no favorecen la teoría del efecto negativo del tratamiento antirretroviral altamente activo sobre respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, pero pueden reflejar que después de la etapa aguda, cuando la infección se ha establecido, no se requiere de carga viral sostenida para mantener la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺. Al momento, no tenemos una explicación sobre el porqué nuestros resultados difieren de los reportados por Wilkinson et al.²¹², por lo que se requiere de mayor trabajo con pacientes bajo tratamiento antirretroviral en diferentes estadios de la infección por VIH, para aclarar estas diferencias. Especialmente determinar si el incremento la respuesta anti-VIH no citotóxica depende directamente de la función de células T CD4⁺, como puede ser la producción de citocinas.

Los estudios de sangre periférica y tejido linfoide tuvieron que trabajarse por separado debido a las condiciones logísticas. Primero, muchos de los pacientes con linfadenopatía presentaron infecciones oportunistas en los tejidos linfoides (tabla 5), considerado un criterio de exclusión. Segundo, muy pocos pacientes con linfadenopatía cumplían los criterios de inicio de tratamiento (< 350 células T CD4⁺). Tercero, los pacientes de quienes obtuvimos ganglio linfático basal e iniciaron tratamiento antirretroviral, los ganglios linfáticos antes identificables, disminuyeron de tamaño, impidiendo a los cirujanos obtener muestras utilizables. Por estas razones, el seguimiento de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica fue logísticamente más sencillo, con respecto al seguimiento de los

pacientes con biopsias de ganglio linfático. Sin embargo, la descripción de los ganglios linfáticos nos provee de cierta información, y consideramos continuar el seguimiento de este grupo de pacientes.

La posible relación entre los niveles de carga viral y cuenta de células T CD4⁺ con los niveles de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en ganglios linfáticos, fue sugerida previamente¹⁴⁵. Este estudio muestra que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en ganglios linfáticos es distinta entre los pacientes, y que puede ser distinta con respecto a la respuesta anti-VIH no citotóxica de sangre periférica. En este estudio es difícil evaluar si realmente existen diferencias entre las etapas clínicas de los pacientes o si el origen de las células favorece una mejor respuesta, si sólo se estudiaron 5 pacientes. Como se sugirió en el estudio descrito¹⁴⁵, la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en ganglios linfáticos de los pacientes en etapas avanzadas de la infección por VIH mostraron una menor actividad con respecto a los pacientes en etapas tempranas (Fig. 22). Sin embargo, no encontramos diferencias en la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de sangre periférica o tejidos linfoides en las distintas etapas de la infección por VIH. Esto puede reflejar que el efecto de la replicación de VIH sobre el sistema inmunológico afecta a todos los compartimentos, y que la pérdida progresiva de la arquitectura y función de los ganglios linfáticos afecta a las células CD8⁺ presentes.

Aunque encontramos diferencias individuales, cuando se buscaron diferencias de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y ganglios linfáticos en pacientes de un mismo grupo, no fue posible encontrar dichas diferencias (Fig. 23). Al contrario, encontramos una correlación entre los niveles de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en sangre periférica y ganglios linfáticos (Fig. 26). Al parecer el efecto de la replicación de VIH tiene el mismo efecto sobre la

respuesta anti-VIH no citotóxica tanto en sangre periférica como en tejido linfoide, puesto que encontramos una correlación positiva con los niveles de células T CD4⁺ (Fig. 24) y una correlación negativa con la carga viral plasmática (Fig. 25). Si el ambiente linfoide es importante para la respuesta anti-VIH no citotóxica, como la producción de citocinas, es posible que la pérdida de la arquitectura y función^{223,224} tengan el mismo efecto sobre las células T CD8⁺ de cualquier origen tisular.

Para determinar si realmente el ambiente linfoide puede tener algún efecto sobre esta actividad, es necesario el análisis de las diversas funciones del tejido linfoide y su relación con la respuesta anti-VIH no citotóxica células T CD8⁺, tales como la producción de citocinas, la interacción con células dendríticas por mencionar solo algunas.

Finalmente, consideramos que la respuesta anti-VIH no citotóxica puede estar más relacionada a la función del sistema inmunológico (Fig. 27). Por ejemplo, en la etapa temprana de la infección el número y función de las células T CD4⁺ son altos, y la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ son altos. Sin embargo, conforme la enfermedad avanza, las cargas virales se incrementan y la función de las células T CD8⁺ disminuyen. Si el control de la replicación de VIH por el tratamiento antirretroviral permite una reconstitución de diversas funciones inmunológicas, podría favorecer el incremento mostrado de la respuesta anti-VIH no citotóxica. Sin embargo, aún queda por demostrar cuales son las funciones que la respuesta anti-VIH no citotóxica requiere para su desarrollo y permanencia.

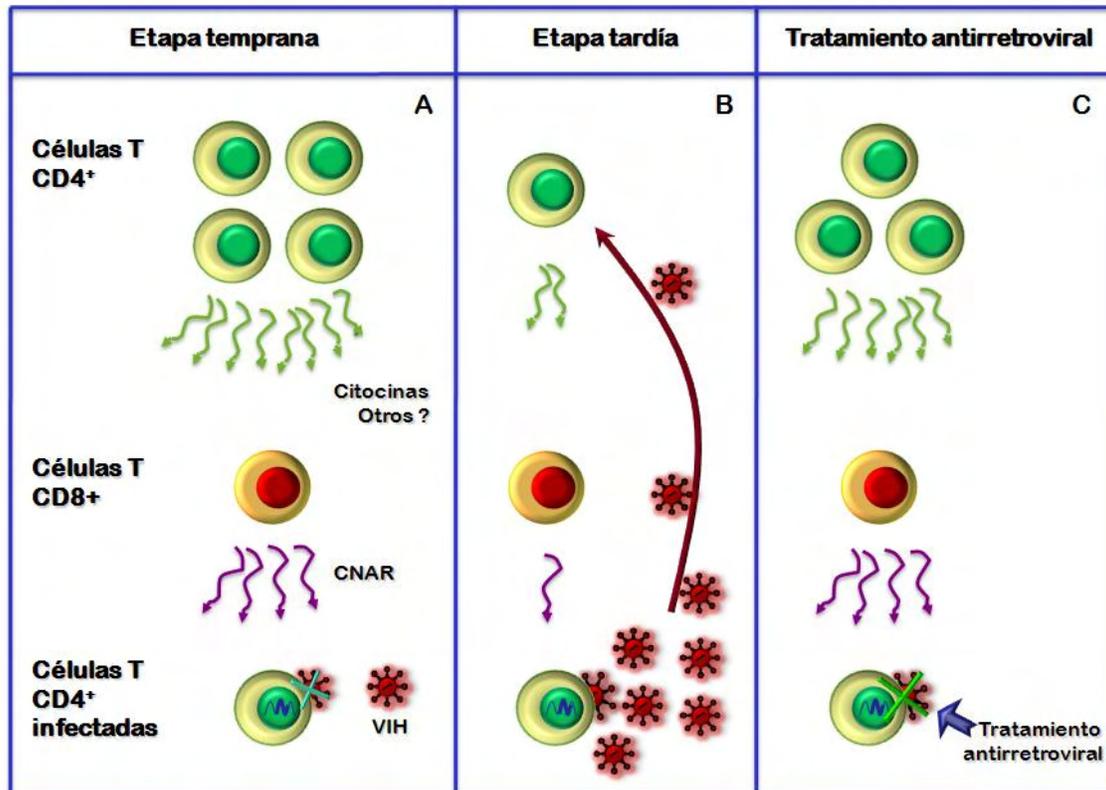


Fig. 27. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ depende de la función del sistema inmunológico.

A) En la etapa temprana de la infección por VIH, las células del sistema inmunológico generan diversas respuestas efectoras que inducen la generación de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ (CNAR). La respuesta de las células T CD8⁺ limita la replicación de VIH. En esta etapa existen continuos ciclos de replicación, estos se dan a pesar del control que ejercen de las células T CD8⁺, permitiendo la evolución de la enfermedad. B) En las etapas tardías de la infección por VIH la pérdida de las células T CD4⁺ da como resultado una disminución de la capacidad funcional del sistema inmunológico, impidiendo que la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, sea capaz de controlar la replicación de VIH. La falta del control de la replicación de VIH favorece la eliminación de las células T CD4⁺. C) El tratamiento antirretroviral altamente activo controla la replicación de VIH permitiendo la recuperación del número y función de células T CD4⁺. Esta recuperación incrementa la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺.

8. CONCLUSIONES

1. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ inhibe la replicación de VIH in vitro y es dependiente de dosis.
2. Los niveles de células T CD4⁺ y la carga viral plasmática definen las etapas clínicas de la infección por VIH.
3. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ está asociada a la etapa clínica, y por lo tanto, al número de células T CD4⁺ circulantes y a los niveles de carga viral plasmática.
4. El tratamiento antirretroviral efectivo disminuye la carga viral plasmática e incrementar el número de células T CD4⁺, permitiendo el incremento de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ en pacientes en etapa tardía de la infección por VIH.
5. La respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ de ganglios linfáticos es similar a la respuesta de células T CD8⁺ de sangre periférica, mostrando correlación positiva con los niveles de células T CD4⁺ circulantes y correlación negativa con la carga viral plasmática.

9. PERSPECTIVAS

Este trabajo ha permitido el desarrollo de nuevas preguntas asociadas a la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺:

1. La identidad de la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, es necesaria para describir los mecanismos por los que la inhibición de la replicación de VIH ocurre. Si la respuesta anti-VIH no citotóxica es mediada por una proteína, ¿cuáles son los receptores?, ¿cuáles son las vías de señalización?, ¿cómo es producida por las células T CD8⁺?, ¿cuáles son los mecanismos de regulación?
2. Si la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ es dependiente de la función de las células T CD4⁺, ¿las citocinas producidas por las células T CD4⁺ inducen el desarrollo de esta respuesta? ¿o depende de la función de otros grupos celulares? Es importante evaluar la producción de citocinas como primer paso.
3. Si la respuesta anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺ inhibe la replicación de VIH in vivo, es importante evaluar su efecto sobre los niveles de carga viral. Un ejemplo, es la medición de carga viral en tejidos linfoides de pacientes con alta respuesta anti-VIH no citotóxica.
4. Si el tratamiento antirretroviral mejora la anti-VIH no citotóxica de células T CD8⁺, ¿es posible mantener altos niveles de inhibición de la replicación por largos periodos de tiempo?

10. ANEXOS

ANEXO 1. Categorías clínicas de la infección por VIH

Las categorías clínicas de la infección por VIH del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) están basadas en la cuenta de células T CD4⁺ más baja y exacta, que no necesariamente es la más reciente⁶³.

Categoría 1: ≥ 500 céls/ μ L

Categoría 2: 200-499 céls/ μ L

Categoría 3: < 200 céls/ μ L

De acuerdo a la revisión de la clasificación, los pacientes pueden agruparse clínicamente en 3 categorías:

Categoría A:

- Infección asintomática por VIH
- Linfadenopatía generalizada persistente
- Infección aguda por VIH

Categoría B:

Estado sintomática de individuo infectado por VIH, con características que no se encuentran enlistadas en la categoría C y que reúnen los siguientes criterios: a) condiciones atribuidas a infección por VIH o indicativas de defectos en la inmunidad celular; b) condiciones consideradas médicas que tienen un curso clínico o requieren de manejo que puede ser complicado por la infección por VIH. Ejemplos que se incluyen, pero que no son limitados a éstos, son:

- Angiomatosis bacilar
- Candidiasis orofaríngea
- Candidiasis vulvovaginal, persistente o de poca respuesta al tratamiento

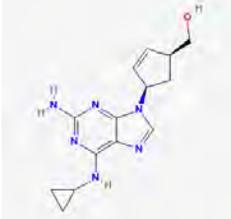
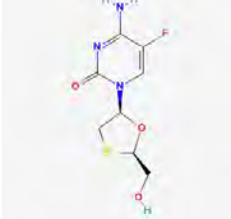
- Displasia cervical (moderada o severa)/carcinoma cervical in situ
- Síntomas constitutivos, fiebre (38.5 °C), diarrea crónica > 1 mes
- Leucoplasia vellosa oral
- Herpes zoster, dos episodios distintos, o más de un dermatoma
- Púrpura trombocitopénica idiopática
- Listeriosis
- Enfermedad inflamatoria pélvica, si es complicada por abscesos del tubo ovárico
- Neuropatía periférica

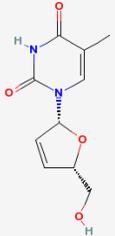
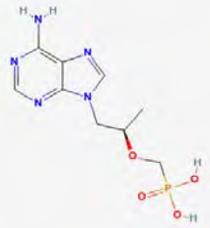
Categoría C

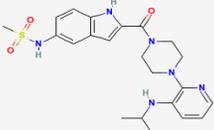
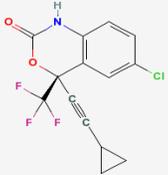
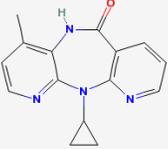
Incluye las condiciones clínicas listadas a continuación. Para propósitos de clasificación, una vez que se ha presentado una condición de categoría C, la persona permanecerá en esa categoría

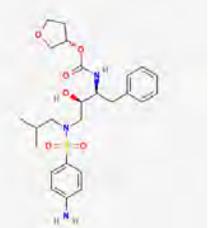
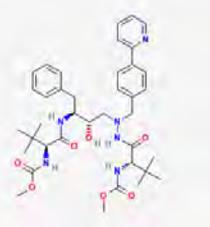
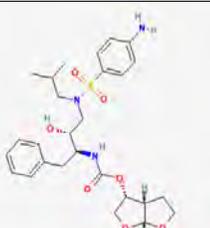
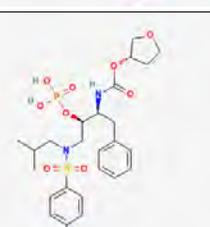
- Candidiasis bronquial, traqueal o pulmonar,
- Candidiasis en esófago
- Cáncer cervical invasivo
- Coccidioidomicosis, diseminada o extrapulmonar
- Criptococosis extrapulmonar
- Criptosporidiosis intestinal crónica (> de 1 mes)
- Infección por CMV (hígado, bazo, ganglios)
- Retinitis por CMV (con pérdida de la visión)
- Encefalopatía relacionada a VIH
- Infección por Herpes simples, úlceras crónicas (> de 1 mes), bronquitis, neumonitis, esofagitis
- Histoplasmosis, diseminada o extrapulmonar
- Infección por *Isospora*, intestinal crónica
- Sarcoma de Kaposi
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma inmunoblástico
- Linfoma primario en cerebro
- Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. kansasii*, diseminada o extrapulmonar
- *Mycobacterium tuberculosis*, pulmonar o extrapulmonar
- Otras especies de *Mycobacterium*, diseminadas o extrapulmonares
- Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (antes *P. carinii*)
- Neumonía recurrente
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva
- Septicemia por salmonela, recurrente
- Toxoplasmosis cerebral
- Síndrome de desgaste asociado a VIH

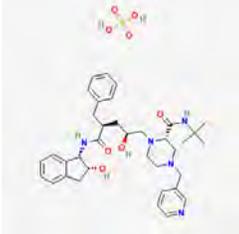
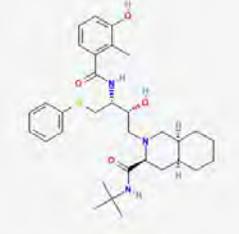
ANEXO 2. Medicamentos anti-VIH aprobados por Agencia Federal de Alimentos de E.U. (FDA) para su uso en humanos hasta 2007.

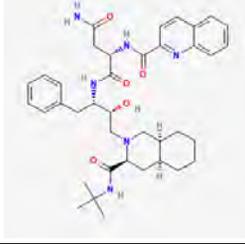
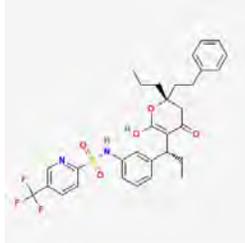
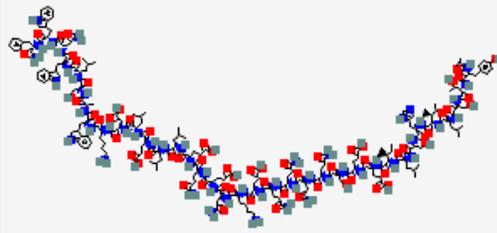
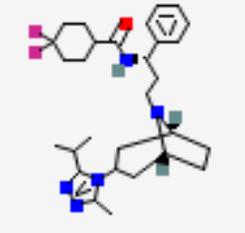
	Medicamento	Aprobación FDA	Observaciones	Estructura	Referencia
Análogos Nucleósidos / Nucleótidos inhibidores de transcriptasa reversa					
1	Abacavir (Ziagen)	1998	Se han descrito selección con al menos dos mutaciones de resistencia Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: [(1R,4R)-4-[2-amino-6-(cyclopropylamino)purin-9-yl]-1-cyclopent-2-enyl]methanol Peso molecular: 286.333 Fórmula: C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O Pubmed número indicador de sustancia: 612310		McDowell J.A. ²²⁵
2	Didanosina (Videx)	1991	Se han descrito selección con al menos dos mutaciones de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 9-[(2R,5S)-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-3H-purin-6-one Peso molecular: 236.227 Fórmula: C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃ Pubmed Número indicador de sustancia 7847362		Dolin R. ²²⁶
3	Emtricitabina (Emtriva)	2003	Mutaciones en el codón 184 han sido asociadas a resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 1-[(2R,5R)-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]-5-methyl-pyrimidine-2,4-dione Peso molecular: 224.213 Fórmula: C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ Pubmed Número indicador de sustancia: 7848262		Saag M.S. ²²⁷

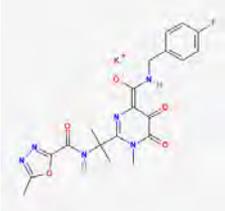
	Medicamento	Aprobación FDA	Observaciones	Estructura	Referencia
4	Lamivudina (Epiriv)	1995	Mutaciones en el codón 184 han sido asociadas a resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 4-amino-1-[(2R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]pyrimidin-2-one Peso molecular: 229.257 Fórmula: C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S Pubmed Número indicador de sustancia: 197069		Eron J.J. ²²⁸
5	Estavudina (Zerit)	1994	Selección con al menos una mutación de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 1-[(2R,5R)-5-(hydroxymethyl)-2,5-dihydrofuran-2-yl]-5-methyl-pyrimidine-2,4-dione Peso molecular: 224.213 Fórmula: C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ Pubmed Número indicador de sustancia: 7847511		Havir D.V. ²²⁹
6	Tenofovir	2000	Selección con al menos una mutación de resistencia Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: [(2R)-1-(6-aminopurin-9-yl)propan-2-yl]oxymethylphosphonic acid Peso molecular: 287.213 Fórmula: C ₉ H ₁₄ N ₅ O ₄ P Pubmed Número indicador de sustancia: 699321		Squires K. ²³⁰
7	Zalcitabina (Hivid)	1992	Descontinuado por el fabricante el 31 de Diciembre de 06 Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 4-amino-1-[(2R,5S)-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]pyrimidin-2-one Peso molecular: 211.218 Fórmula: C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃ Pubmed Número indicador de sustancia: 7847478		

	Medicamento	Aprobación FDA	Observaciones	Estructura	Referencia
8	Zidovudina (Retrovir)	1987	Se han descrito al menos 6 mutaciones de resistencia Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 1-[(2R,4S,5R)-4-azido-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5-methyl-pyrimidine-2,4-dione Peso molecular: 267.242. Fórmula: C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄ Pubmed Número indicador de sustancia: 7847479		Fischl M.A. ¹⁶⁴
Análogos no nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa					
9	Delavirdina (Rescriptor)	1997	Selección con al menos una mutación de resistencia. Resistencia cruzada con nevirapina y efavirenz. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: N-[2-[4-[3-(propan-2-ylamino)pyridin-2-yl]piperazine-1-carbonyl]-1H-indol-5-yl]methanesulfonamide Peso molecular: 456.562. Fórmula: C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O ₃ S Pubmed Número indicador de sustancia:		Friedland G.H. ²³¹
10	Efavirenz (Sustiva)	1998	Selección al menos una mutación de resistencia. Resistencia cruzada con nevirapina y delavirdina. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: (10R)-3-chloro-10-(2-cyclopropylethynyl)-10-(trifluoromethyl)-9-oxa-7-azabicyclo[4.4.0]deca-2,4,11-trien-8-one Peso molecular: 315.675. Fórmula: C ₁₄ H ₉ ClF ₃ NO ₂ Pubmed número indicador de sustancia: 7847960		Staszewski S. ²³²
11	Nevirapina (Viramune)	1996	Selección con al menos una mutación de resistencia. Resistencia cruzada con efavirenz y delavirdina. Peso molecular: 266.298. Fórmula: C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O Pubmed número indicador de sustancia: 7847501		D'Aquila R.T. ²³³

	Medicamento	Aprobación FDA	Observaciones	Estructura	Referencia
Inhibidores de proteasa					
12	Amprenavir (Agenerase)	1999	Selección con al menos una mutación de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: [(3S)-oxolan-3-yl] N-[(2S,3R)-4-[(4-aminophenyl)sulfonyl-(2-methylpropyl)amino]-3-hydroxy-1-phenyl-butan-2-yl]carbamate Peso molecular: 505.628 Fórmula: C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₆ S Pubmed número indicador de sustancia: 206962		Notermans D.W. ²³⁴
13	Atazanavir (Zrivada)	2003	Selección con al menos una mutación de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: methyl N-[(1S)-1-[[[(2S,3S)-3-hydroxy-4-[[[(2S)-2-(methoxycarbonylamino)-3,3-dimethylbutanoyl]amino]-[(4-pyridin-2-ylphenyl)methyl]amino]-1-phenyl-butan-2-yl]carbamoyl]-2,2-dimethyl-propyl]carbamate Peso molecular: 704.856 Fórmula: C ₃₈ H ₅₂ N ₆ O ₇ Pubmed número indicador de sustancia: 621982		Sanne I. ²³⁵
14	Darunavir	2006	Selección con al menos una mutación de resistencia. V32I, L33F, I47V, I54L, G73S, y L89V Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: [(1S,5R,8S)-4,6-dioxabicyclo[3.3.0]oct-8-yl] N-[(2S,3R)-4-[(4-aminophenyl)sulfonyl-(2-methylpropyl)amino]-3-hydroxy-1-phenyl-butan-2-yl]carbamate Peso molecular: 547.665 Fórmula : C ₂₇ H ₃₇ N ₃ O ₇ S Pubmed número indicador de sustancia: 786894		Katlama C. ²³⁶
15	Fosamprenavir (Lexiva)	2003	Selección con al menos una mutación de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: [(2R,3S)-1-[(4-aminophenyl)sulfonyl-(2-methylpropyl)amino]-3-[(3S)-oxolan-3-yl]oxycarbonylamino]-4-phenyl-butan-2-yl]oxyphosphonic acid Peso molecular: 585.608 Fórmula: C ₂₅ H ₃₆ N ₃ O ₉ PS Pubmed número indicador de sustancia: 630866		Rodriguez-French A. ²³⁷

	Medicamento	Aprobación FDA	Observaciones	Estructura	Referencia
16	Indinavir (Crixivan)	1996	M46I es asociada con resistencia cruzada a ritonavir, nelfinavir, y amprenavir Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: (2S)-1-[(2S,4S)-2-hydroxy-4-[[[(1R,2R)-2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl]carbamoyl]-5-phenyl-pentyl]-4-(pyridin-3-ylmethyl)-N-tert-butyl-piperazine-2-carboxamide; sulfuric acid Peso molecular: 711.869 Fórmula: C ₃₆ H ₄₉ N ₅ O ₈ S Pubmed número indicador de sustancia: 197165		Gulick R.M. ²³⁸
17	Lopinavir/ Ritonavir (Kaletra)	Kaletra 2000	Selección con varias mutaciones de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (Lopinavir): (2S)-N-[(2R,4S,5S)-5-[[2-(2,6-dimethylphenoxy)acetyl]amino]-4-hydroxy-1,6-diphenyl-hexan-2-yl]-3-methyl-2-(2-oxo-1,3-diazinan-1-yl)butanamide Peso molecular: 628.801. Fórmula: C ₃₇ H ₄₈ N ₄ O ₅ Pubmed número indicador de sustancia: 615079		Walmsley S. ²³⁹
		Ritonavir 1996	La mutación M46I es asociada con resistencia cruzada a ritonavir, nelfinavir, y amprenavir Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (Ritonavir): 1,3-thiazol-5-ylmethyl N-[(2S,3S,5R)-3-hydroxy-5-[[[(2S)-3-methyl-2-[[methyl-[(2-propan-2-yl-1,3-thiazol-4-yl)methyl]carbamoyl]amino]butanoyl]amino]-1,6-diphenyl-hexan-2-yl]carbamate Peso molecular: 720.946. Fórmula: C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂ Pubmed número indicador de sustancia: 612199		Notermans D.W. ²³⁴
18	Nelfinavir (Viracept)	1997	Selección con al menos una mutación de resistencia. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: (3S,4aS,8aR)-2-[(2R,3S)-2-hydroxy-3-[(3-hydroxy-2-methyl-benzoyl)amino]-4-phenylsulfanyl-butyl]-N-tert-butyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1H-isoquinoline-3-carboxamide Peso molecular: 567.784 Fórmula: C ₃₂ H ₄₅ N ₃ O ₄ S Pubmed número indicador de sustancia: 206971		Tebas P. ²⁴⁰

	Medicamento	Aprobación FDA	Observaciones	Estructura	Referencia
19	Saquinavir (Fortovase)	1995	Selección con al menos dos mutaciones de resistencia. G48V, L90M. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: (2S)-N-[(2S,3R)-4-[(3S,4aS,8aR)-3-(tert-butylcarbonyl)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1H-isoquinolin-2-yl]-3-hydroxy-1-phenyl-butan-2-yl]-2-(quinoline-2-carbonylamino)butanediamide Peso molecular: 670.841 Fórmula: C ₃₈ H ₅₀ N ₆ O ₅ Pubmed número indicador de sustancia: 7847495		Mitsuyasu R.T. ²⁴¹
20	Tipranavir (Aptivus)	2005	Selección con al menos una mutación de resistencia. 10V/I/S, 13V, 33F/I/V, 82L/T, and 84V Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: N-[3-[(1R)-1-[(6R)-2-hydroxy-4-oxo-6-phenethyl-6-propyl-5H-pyran-3-yl]propyl]phenyl]-5-(trifluoromethyl)pyridine-2-sulfonamide Peso molecular: 602.665 Fórmula: C ₃₁ H ₃₃ F ₃ N ₂ O ₅ S Pubmed número indicador de sustancia: 615083		Hicks C. ²⁴²
Inhibidores de fusión					
21	Enfuvirtide (Fuzeon)	2003	Selección con varias mutaciones de resistencia en gp41. Peso Molecular: 4491.87604 Fórmula: C ₂₀₄ H ₃₀₁ N ₅₁ O ₆₄ Pubmed número indicador de sustancia: 623635		Lalezari J.P. ²⁴³ , Clotet B. ²⁴⁴
22	Maraviroc (Celsentry)	2008	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: 4,4-difluoro-N-[(1S)-3-[(1R,5S)-3-(3-methyl-5-propan-2-yl-1,2,4-triazol-4-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-yl]-1-phenylpropyl]cyclohexane-1-carboxamide Peso molecular: 513.665546 Fórmula: C ₂₉ H ₄₁ F ₂ N ₅ O Pubmed número indicador de sustancia: 3002977		Dorr P ⁹⁷ Eggink D ²⁴⁵

Inhibidores de Integrasa					
23	Raltegravir (Isentress)	2007	<p>No se han descrito hasta el momento mutaciones relacionadas. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada: potassium (Z)-[(4-fluorophenyl)methylamino]-[1-methyl-2-[2-[(5-methyl-1,3,4-oxadiazole-2-carbonyl)amino]propan-2-yl]-5,6-dioxypyrimidin-4-ylidene]methanolate Peso Molecular: 482.5 g/mol Fórmula: C₂₀H₂₀FKN₆O₅ PUBMED número indicador de sustancia: 26683830</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Raltegravir potassium salt. It features a central pyrimidine ring system with a methyl group at the 5-position and a 2-oxo-2-(propan-2-ylamino)ethylamino group at the 4-position. This is linked to a 1-methyl-2-oxo-2-(propan-2-ylamino)ethylamino group, which is further connected to a 4-fluorophenylmethylamino group. A potassium ion (K+) is shown as a counterion.</p>	Markowitz M. ²⁴⁶

CD8⁺ Cell Noncytotoxic Anti-HIV Response: Restoration by HAART in the Late Stage of Infection

KLINTSY J. TORRES,¹ FERNANDA GUTIÉRREZ,² ENRIQUE ESPINOSA,¹ CARL MACKEWICZ,³
JUSTINO REGALADO,⁴ and GUSTAVO REYES-TERÁN¹

ABSTRACT

Highly active antiretroviral therapy (HAART) is currently the best HIV infection management strategy. However, its effects on the CD8⁺ T cell noncytotoxic anti-HIV response (CNAR) are not well known. We investigated if HAART has different effects on CNAR in patients at the intermediate and late stages of HIV infection. Untreated healthy HIV-infected subjects with a mean CD4⁺ T cell count of 606 cells/ μ l were examined as a reference group. Plasma viral load, CD4⁺ T cell count, and CNAR activity were measured at baseline and regular intervals for at least 48 weeks following initiation of HAART. Baseline CNAR activity in all subjects correlated inversely with viral load and directly with CD4⁺ T cell counts. The level of CNAR in the late-stage group was significantly lower than in the intermediate-stage and the healthy reference group ($p < 0.01$). Following initiation of HAART, substantial increases in CD4⁺ T cell counts and decreases in viral loads were observed in both groups, indicating treatment success. CNAR activity was found to be increased significantly during HAART, but only in the late-stage group ($p < 0.01$). This increase in CD8⁺ cell function was seen within 4 weeks of treatment initiation and resulted in levels of CNAR activity almost equal to those observed in the healthy reference subjects. Our findings suggest a beneficial effect on CNAR in those individuals with reduced activity, typically in late-stage infection.

INTRODUCTION

HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY (HAART) is currently the best strategy for the management of HIV infection. This form of treatment typically reduces HIV plasma loads to low or undetectable levels within 1–2 months,^{1,2} increases CD4⁺ T cell number,^{3,4} and is associated with an improvement in clinical status.^{5–8} An important issue pertaining to the clinical efficacy of HAART is its effect upon the immune system in general and upon anti-HIV-specific immune responses. In this regard, the immune reconstitution that follows HAART includes increases in T cell proliferative responsiveness to recall antigens and mitogens,^{9–12} increases in cytokine production,^{9,13,14} increases in B cell responses,^{15,16} and the restoration of an immune phenotype characterized by low level activation antigen expression.^{9,17–19} The effect of HAART on CD8⁺ T cell cytotoxic T lymphocyte (CTL) function is vari-

able. Specific CTL activity toward certain pathogens is increased during HAART,^{20,21} whereas, CTL responses directed toward HIV can increase,^{11,22,23} decrease,^{24,25} or remain unchanged as a result of HAART.^{26,27} However, the number of HIV-specific CD8⁺ cells, enumerated by tetramer staining or cytokine production, usually decreases following effective HAART therapy.^{24,26,28–30}

The effect of HAART on the CD8⁺ T cell noncytotoxic anti-HIV response (CNAR), potentially an innate CD8⁺ T cell-mediated activity against HIV,³¹ is not well understood. CNAR is characterized as a suppression of virus replication in acutely infected CD4⁺ cells by CD8⁺ T cells from HIV-infected subjects.^{32,33} This activity is independent of cytotoxic effects on the CD4⁺ target cells,^{32,34–37} and can be mediated by one or more soluble mediators.^{34,38,39} Investigation of CNAR activity in various clinical settings suggests that it may constitute an important immune response against HIV.^{40–43} CNAR activity

¹Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México City, México.

²Clínica 72, Instituto Mexicano del Seguro Social, Tlalnepantla, Estado de México.

³Laboratory of Tumor and AIDS Virus Research, University of California, San Francisco, California 94105.

⁴Clínica de Tabaquismo, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México City, México.

correlates positively with both CD4⁺ T cell count and clinical status,^{41,44–46} and is often lost with HIV disease progression.⁴⁷

Two studies have addressed the effect of HAART on the level of CNAR activity in HIV-infected individuals. One study reported that patients in the chronic phase of HIV infection showed a decrease in CNAR when treatment was switched from mono- or bitherapy to HAART.⁴⁸ In the other study, initiation of HAART in the primary stage of HIV infection resulted in decreases in CNAR activity in the first 24 weeks of treatment.⁴⁹ It is unknown if this same effect would be seen in individuals at the late stage of HIV infection, who typically exhibit lower levels of CNAR activity. Therefore, we studied an HIV-positive population in which untreated individuals at the late stage of HIV infection are frequent. We monitored CNAR levels longitudinally in 37 chronically infected subjects, of whom those at either the intermediate or late stage of HIV infection received HAART for at least 48 weeks.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Forty-nine subjects with documented HIV infection were enrolled in this prospective study at the Center for Research in Infectious Diseases at INER in Mexico City. All subjects were antiretroviral therapy naive. During the follow-up, four subjects discontinued the treatment, five subjects did not initiate the protocol, and three patients were withdrawn a priori due to medical complications. Thirty-seven subjects (34 male) completed the study. The study groups complied with the following inclusion criteria: Group 1: asymptomatic patients without previous opportunistic infections, and with CD4⁺ T cell counts above 350 CD4 T cells/ μ l (mean: 606 cells/ μ l), who therefore did not initiate HAART. Based on these characteristics, this group was considered to be in an early stage. Group 2: patients in the intermediate phase of HIV disease; asymptomatic, with 200–500 CD4⁺ T cells/ μ l, who had to initiate antiretroviral therapy. Group 3: patients in the late phase of HIV disease;

without evidence of active opportunistic infections, with \leq 200 CD4⁺ T cells/ μ l, who also had to initiate antiretroviral therapy.

At the initiation of the study (baseline), all subjects underwent a complete clinical evaluation and laboratory tests that included complete blood count, blood chemistry, hepatic function, urine analysis, lipid profile, circulating CD4⁺ T cell count, and plasma viral load determinations. The baseline characteristics of the subjects are summarized in Table 1. Clinical evaluations were repeated on weeks 4, 12, 24, 48, and 72 after the baseline visit. Additionally, blood samples were collected at these time points for serum and plasma samples, and for the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to measure CNAR. The CD4⁺ target cells used in the acute infection assay for CNAR (see below) were prepared from buffy-coat bags obtained from healthy donors by the Blood Bank of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). All study participants voluntarily signed an informed consent form to participate in the study. This study was approved by the INER Scientific and Bioethical Committee and by the Committee for Human Research at the University of California, San Francisco (UCSF).

Treatment regimen

Subjects in groups 2 and 3 were treated with a HAART combination consisting of two nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors and one protease inhibitor or a nonnucleoside RT inhibitor. The most frequent regimens were (1) zidovudine (AZT), stavudine (d4T) or didanosine (ddI) + lamivudine (3TC) + efavirenz (EFV), and (2) AZT + 3TC + indinavir (IDV) or nelfinavir (NFV). Two late stage patients received AZT + 3TC + abacavir, and were included based on the viral and immunological efficacy of the treatment.

Quantification of viral load and lymphocyte subpopulations

Plasma samples, collected using EDTA tubes and stored at -80°C , were processed following the Cobas Amplicor system

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF SUBJECTS

Characteristic	Early stage	Intermediate stage	Late stage	p value ^a
Number of subjects	8	12	17	
Mean age \pm SD	34.7 \pm 11	27.9 \pm 4.2	33.6 \pm 8.1	
Number of male subjects (%)	5 (62.5%)	12 (100%)	17 (100%)	
Mean baseline CD4 ⁺ T cells \pm SD	606 \pm 213	340 \pm 70	65 \pm 43	< 0.0001
Mean CD4 ⁺ T cells \pm SD, week 24 ^b (p value vs. baseline)	596 \pm 268 [NS]	512 \pm 163 [p < 0.005 ^c]	235 \pm 117 [p < 0.0001 ^c]	< 0.005
Mean baseline plasma viral load (log copies/ml) \pm SD	3.6 \pm 1.0	5.2 \pm 0.4	5.7 \pm 0.5	< 0.001
Mean plasma viral load (log copies/ml) \pm SD, week 24 ^b [p value vs. baseline]	3.7 \pm 0.4 [NS]	1.8 \pm 0.3 [p < 0.0001 ^c]	1.2 \pm 1.7 [p < 0.0001 ^c]	< 0.0001
Treatment ^d	No	Yes	Yes	

^aANOVA results.

^bWeek 24 after HAART initiation.

^cRepeated measures. ANOVA results. NS, nonsignificant.

^dAntiviral triple therapy consisted of a combination of two nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors with one protease inhibitor or with a nonnucleoside RT inhibitor. There was no significant difference in age among groups.

(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) instructions for HIV viral load determination. The standard method was used with baseline samples, and the ultrasensitive method (detection limit equal to 50 copies/ml of HIV RNA) with samples from patients under treatment. For the quantification of CD4 and CD8 T cells, blood lymphocytes were stained for flow cytometry analysis using the anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 monoclonal antibodies of the TriTest kit (Becton Dickinson) according to the manufacturer's instructions. All samples were analyzed in a FACScan system using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Isolation and culture of cells

PBMC from patients and healthy HIV-negative donors, needed for CD8 and CD4 T cell purification, were obtained from heparinized peripheral blood by centrifugation in Ficoll/Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) density gradient. In all cases the cells were cryopreserved in fetal bovine serum (FBS) (90%, BioWhittaker, Walkersville, MD) and dimethylsulfoxide (DMSO) (10%, Sigma), by storing in liquid nitrogen. For the longitudinal measurements of CNAR activity, the frozen PBMC from all the time points of a given individual were thawed in warm complete medium consisting of RPMI-1640 (BioWhittaker), plus 10% (v/v) FBS (BioWhittaker) heat-inactivated (30 min, 56°C), 20 U L-glutamine (BioWhittaker), and 1% (v/v) antibiotics, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (BioWhittaker). The cells were then washed three times before culturing for 6 h at 37°C in complete medium. CD8⁺ and CD4⁺ cell populations were obtained using immunomagnetic microspheres (DynaL, Brown Deer, WI) with anti-CD8 or anti-CD4 antibodies following the manufacturer's instructions. The purity of these cells was >95% in all cases, as measured by flow cytometry.

Quantification of the CD8⁺ T cell noncytotoxic antiviral response

CNAR activity was measured using acutely infected CD4⁺ cells as previously described.⁴⁵ Briefly, CD4⁺ T cells purified from healthy HIV-negative donors and PBMC from patients were stimulated for 3 days with 3 µg/ml PHA (Sigma) in complete medium supplemented with 10% natural human interleukin (IL)-2 (20 U/ml, Roche). CD8⁺ T cells were purified from the patient's stimulated PBMC using CD8 immunomagnetic microspheres, and were immediately separated from the microspheres with Detach-a-bead antibody (DynaL) per the manufacturer's protocol. CD4⁺ T cells were treated with 2 µg/ml polybrene (Sigma) in IL-2 medium then infected with 500 TCID₅₀ of HIV-1_{SF33} virus per 10⁶ cells for 1 h. This strain of HIV-1 is syncytia-inducing (×4-specific), highly cytopathic, and β-chemokine-insensitive.^{50,51} The virus stock was prepared and titrated essentially as described,^{51,52} and stored frozen at -80°C.

Patient CD8⁺ effector cells and acutely infected CD4⁺ target cells were cocultured at various CD8⁺/CD4⁺ cell input ratios, namely 4:1, 2:1, 1:1, 0.5:1, and 0.25:1, in duplicate wells of a 24-well plate in complete medium supplemented with 100 U/ml recombinant human IL-2 (rhIL-2, Roche). A virus replication control consisted of wells containing only HIV-infected CD4⁺ T cells. Plates were cultured for 10 days, with supernatant collection and medium renewal on days 4, 7, and 10. Virus replication was quantified by measuring HIV p24 antigen in the culture media, using an ELISA assay (Beckman-Coulter, Fullerton, CA) with a CODA EIA automated Analyzer (BioRad, Hercules, CA). The average of results from duplicate wells was obtained, and was used for all data analyses. The range of duplicate variability was 0–58% (mean 10%).

The extent of CNAR activity was determined at the day of maximal virus production (typically day 7 of culture) by com-

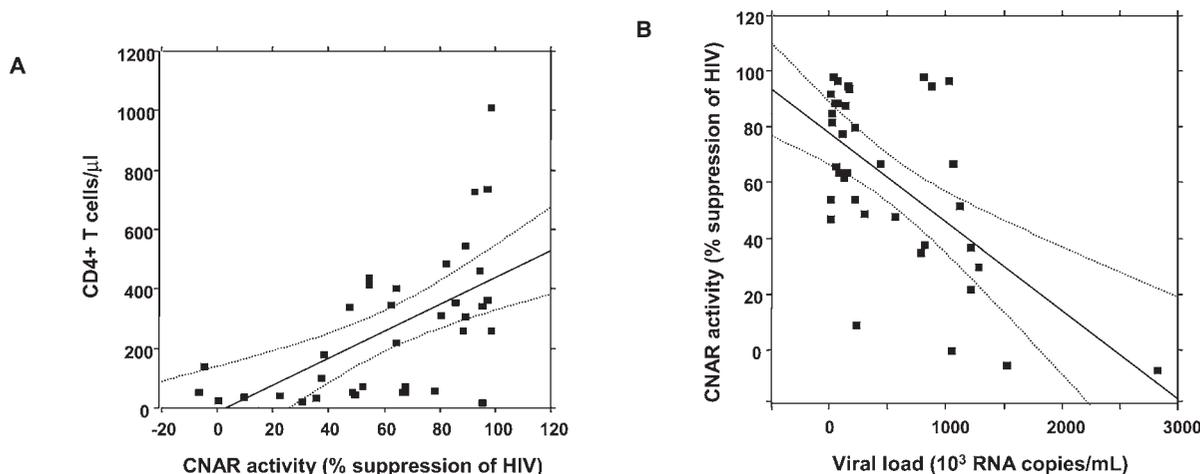


FIG. 1. Baseline CD8⁺ T cell noncytotoxic antiviral responses. **(A)** Linear regression analysis (showing 95% confidence bands) of peripheral blood CD4⁺ T cell count versus CNAR activity in all the subjects studied ($r = 0.589$, $p < 0.0001$). **(B)** Linear regression analysis (showing 95% confidence bands) of CNAR activity versus peripheral blood viral load in all the subjects studied ($r = 0.625$, $p < 0.0001$). Negative CNAR values indicate that HIV replication in the CD4⁺ cells was slightly enhanced by exposure to the CD8⁺ cells. One viral load measurement was below the detection limit of the assay (50 RNA copies/ml), and is represented as 50 RNA copies/ml, graphically and statistically.

paring the amount of viral replication in wells containing CD8⁺ T cells with that of the control wells containing CD4⁺ T cells alone. The percent suppression of HIV production was determined by calculating percent reduction of peak HIV p24 antigen in wells containing CD8⁺ and CD4⁺ cell cocultures compared to that of the CD4⁺ cells cultured alone.⁴⁵ For this study, only the results at an effector/target ratio of 0.25:1 are shown. This ratio is the nearest to the titration point (lowest ratio at which inhibition can still be detected) that was assayed. This ratio allowed measuring inhibition values in the cases with the lowest CNAR, while still making it possible to compare individuals with high activity. Inhibition values obtained with higher ratios were frequently above 90%, which could make it difficult to detect differences in CNAR. Lower ratios yielded undetectable limits in many late-stage patients.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean group values. When ANOVA revealed significant differences between groups, Fisher's post-hoc test was applied

to compare pairs of groups. Repeated-measures ANOVA were performed in single groups for time (treatment) effects. When these effects were found, paired *t*-tests were performed to determine differences between pairs of measurement from specific time points. Linear regression analysis was used to determine the correlation between CNAR and other variables. All tests were performed using StatView software.

RESULTS

CD8⁺ T cell noncytotoxic responses in the untreated setting; baseline and stability over time

The mean baseline CNAR activity, measured at an input CD8⁺/CD4⁺ cell ratio of 0.25, in the early-, intermediate-, and late-stage groups was 65%, 81%, and 40% reduction of HIV replication, respectively. These mean CNAR values for the three clinical groups were statistically different ($F_{2,33} = 12.4$, $p < 0.001$; ANOVA). CNAR levels in the late-stage group were significantly lower than in the other two groups ($p < 0.05$ in

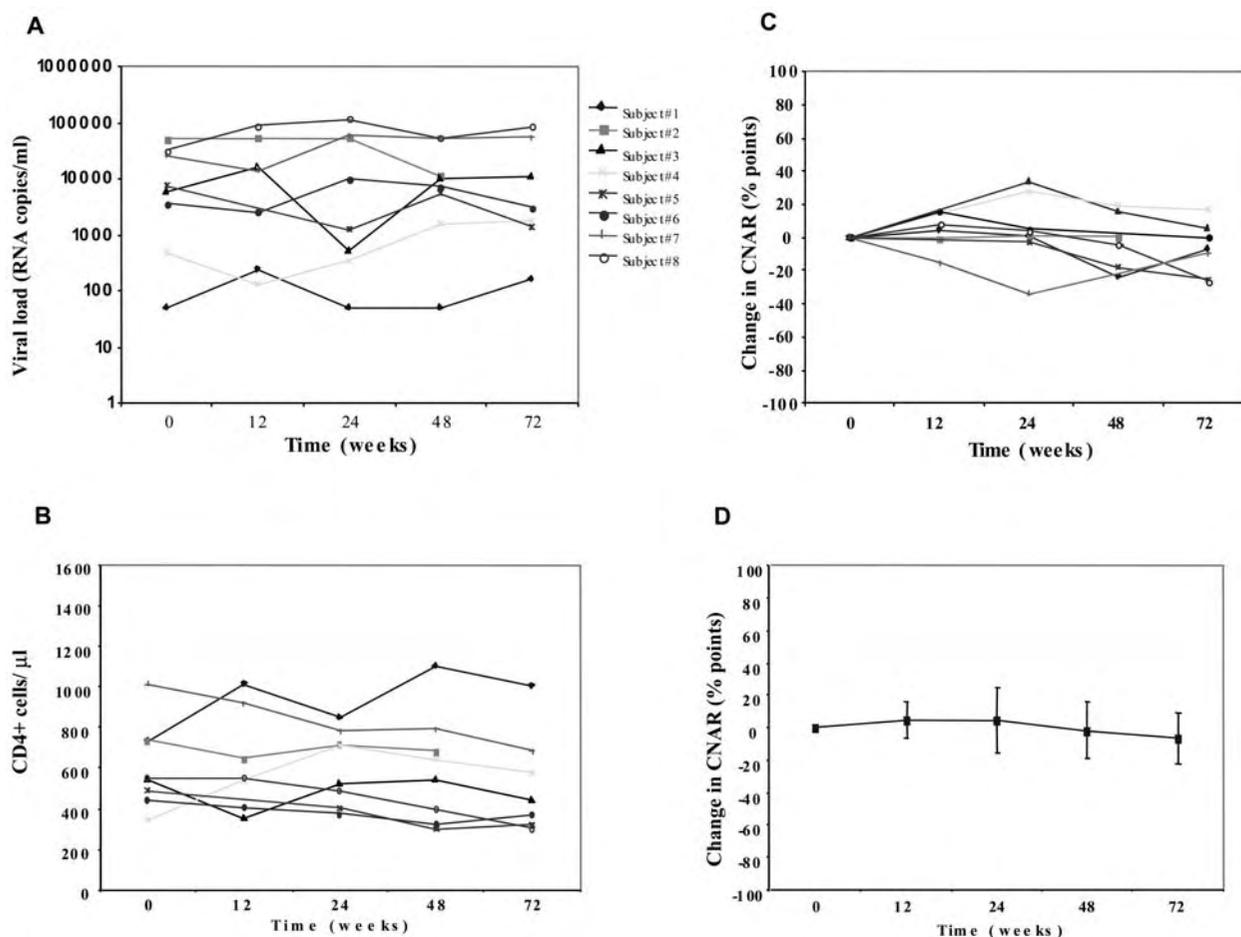


FIG. 2. Stability of clinical and functional attributes of the untreated Early stage group. Peripheral blood viral loads (A) and CD4⁺ T cell counts (B) over time. Change in CNAR activity over time shown for individual subjects (C) and as mean values (\pm SD) (D). The change in CNAR activity was determined by subtracting the percent suppression of HIV replication measured at week 0 from that measured at a given time point. Viral load measurements at or below the detection limit of the assay (50 RNA copies/ml) are represented as 50 RNA copies/ml.

each comparison; Fisher's post-hoc test). Upon examination of the relationship of this CD8⁺ cell function with CD4⁺ T cell count and plasma viral load in all subjects studied, a statistically significant direct correlation was observed with the CD4⁺ T cell count ($r = 0.589$, $p < 0.0001$; Fig. 1A), while CNAR and viral load showed a significant inverse correlation ($r = 0.625$, $p < 0.0001$, Fig. 1B).

To determine if a change in CNAR activity following a clinical treatment is significant, and thus likely to be a result of the specific treatment, we assessed the variability of CNAR over time in HIV-infected individuals with a healthy clinical state (the reference untreated early-stage group). These subjects demonstrated both virologic and immunologic stability, reflected by their relatively consistent levels of plasma virus and CD4⁺ cells over a 6-month time period (Fig. 2A and B). At the same 12–24 week intervals, their levels of CNAR activity were also relatively stable and generally did not fluctuate by more than 20 percentage points from baseline (Fig. 2C and D). These fluctuations did not reach statistical significance ($F_4 = 0.67$, NS, repeated measures ANOVA). These findings suggest that HIV-infected individuals with a stable viral load and CD4⁺ cell count should have relatively consistent CNAR levels.

Efficacy of HAART

HAART showed the expected impact both in viral load and in CD4⁺ T cell counts. Peripheral blood CD4⁺ T cell counts, serving as a measure of immune reconstitution, showed a progressive increase after HAART initiation in both treated groups ($F_4 = 10.26$, $p < 0.0001$; repeated measures ANOVA), reaching statistical differences relative to baseline at week 4 for the late-stage group ($t_{15} = -3.2$, $p < 0.01$; paired t -test), and at week 12 for the intermediate-stage group ($t_{10} = -2.3$, $p < 0.05$) (not shown).

At baseline, the intermediate-stage group had a significantly lower mean viral load than the late-stage group (see Table 1). Following initiation of HAART, both treated groups showed significant decreases in viral load over time ($F_4 = 74.77$, $p < 0.0001$; repeated measures ANOVA, data not shown). From week 4 on, viral loads remained significantly lower than basal levels ($p < 0.0001$ paired t -test). By week 12, 83% patients in the intermediate-stage group and 88% in the late-stage group had a viral load of less than 400 copies/ml. Viral loads remained in a stable nadir in all but one intermediate-stage and two late-stage patients who

A

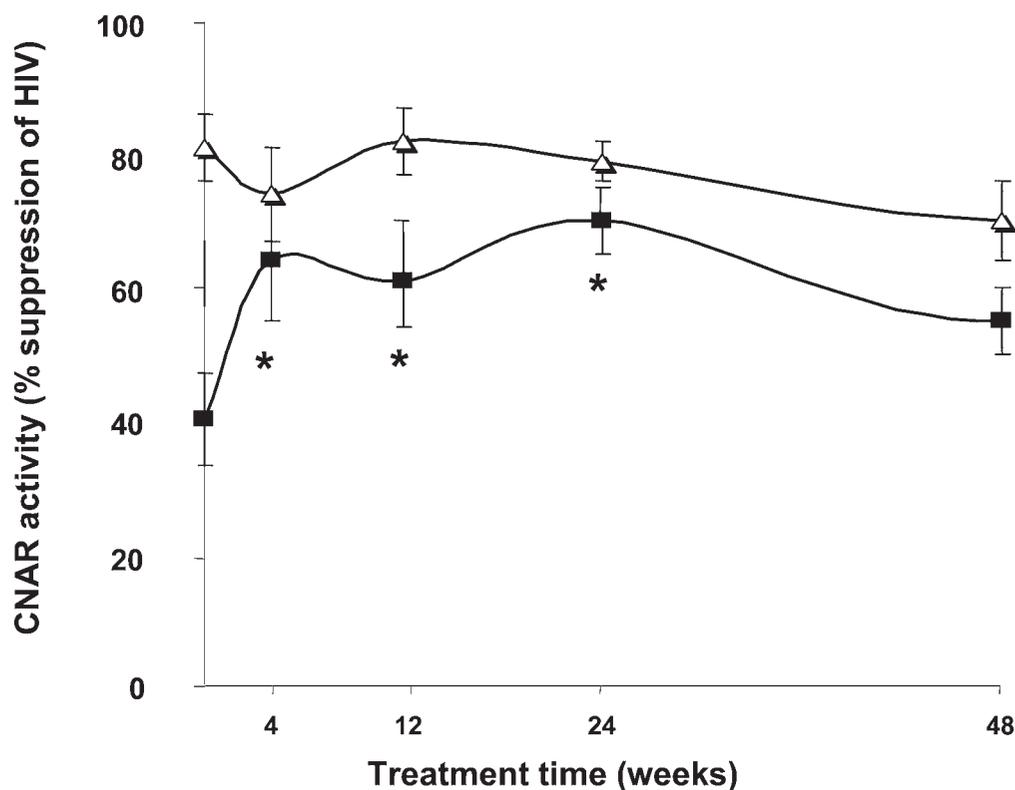


FIG. 3. Effect of HAART on CD8⁺ T cell nontoxic antiviral response. (A) Mean CNAR activity (\pm SEM) in subjects in the intermediate (Δ) and late (\blacksquare) stage groups, indicated by the percent suppression of CXCR4-tropic HIV-1_{SF33} replication in CD4⁺ cells at a CD8⁺/CD4⁺ cell input ratio of 0.25. Week 0 indicates baseline activity measured in samples taken just prior to initiation of therapy. *CNAR activity significantly higher than at baseline (see results). (B) Change in CNAR activity over time shown for each subject in the intermediate and (C) late stage groups. The change in CNAR activity was determined by subtracting the percent suppression of HIV replication measured at week 0 from that measured at a given time point.

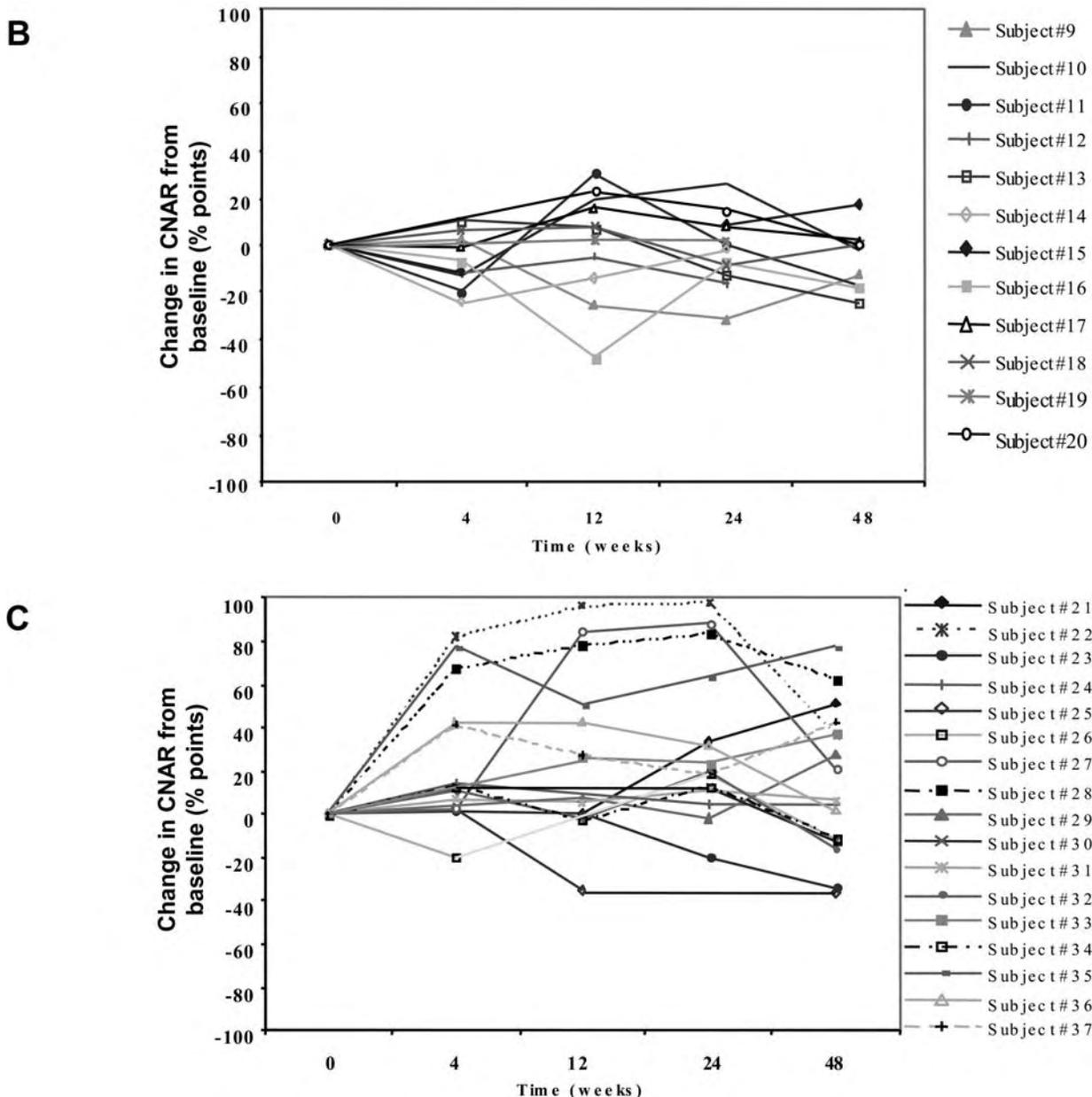


FIG. 3. (continued)

showed rebounds by the end of the study (4.2, 5.0, and 5.5 HIV log RNA copies/ml, respectively).

CD8⁺ T cell noncytotoxic response during HAART

Intermediate- and late-stage groups were the ones receiving HAART. As a whole, the intermediate-stage group did not show any significant change in the mean CNAR activity level during HAART (Fig. 3A). However, there were diverse trends at the individual level. Only three subjects (#10, #11, #20) of 12 showed a slight increase in CNAR (22–32 percentage points above baseline), and three other subjects (#9, #14, #16) showed a decrease in CNAR (by 22–46 percentage points, Fig. 3B).

In contrast, late-stage patients showed as a group a signifi-

cant increase in mean CNAR after HAART initiation, most prominently during the first 4 weeks ($F_9 = 6.1, p > 0.001$; repeated-measures ANOVA) (Fig 3A). In this late-stage group, statistically significant differences in CNAR were observed between baseline and week 4 ($t_{13} = -3.04, p < 0.01$; paired *t*-test), week 12 ($t_{13} = -2.6, p < 0.05$), and week 24 assessments ($t_{15} = -3.5, p < 0.01$). Examination of changes in CNAR in this group on an individual basis revealed that 8 of the 17 subjects (#21, #22, #27, #28, #33, #35, #36, #37) demonstrated marked increases in CNAR activity of 40–97 percentage points (Fig 3C), which is greater than two average standard deviations (28 percentage points). Six of these 17 subjects showed an increase equal or above three standard deviations. Only two individuals showed an appreciable, but limited, decrease (#23,

#25). Importantly, in those who showed elevated CNAR, their activity often remained elevated (although not necessarily maximally) through 48 weeks, and in some of them (four of five monitored) for as long as 72 or 96 weeks of therapy (data not shown). Improvement in CNAR activity did not correlate with the specific triple therapy regimen used. Additionally, upon a separate examination of the three women in this study, no important gender effects were found.

DISCUSSION

CNAR is an important natural anti-HIV immune response for the control of HIV infection.⁵⁴ The effect of HAART on CNAR activity has been examined in subjects at the primary stage of HIV infection,⁴⁹ and less extensively at the chronic stage of HIV infection.⁴⁸ In these studies CNAR activity was generally found to be decreased after administering HAART. In the present study we assessed the effect of HAART on CNAR in two groups of chronically HIV-infected subjects classified according to their degree of disease progression. Our results indicate that HAART increases the CD8⁺ cell noncytotoxic response of patients at the late stage of HIV infection, reaching levels similar to those seen at an earlier stage of infection, 4 weeks after treatment initiation.

This increase of CNAR activity in the late-stage group soon after treatment initiation occurred simultaneously with the HAART-mediated decrease in plasma viral load and the increase in CD4⁺ T cell count. A similar decrease in viral load and an increase in CD4⁺ cell numbers, both in magnitude and kinetics, occurred in the intermediate-stage group. Yet, this group did not show an appreciable increase in CNAR during treatment.

The lack of change in CNAR in the intermediate-stage group can be interpreted as HAART having no effect on this immune response in this particular group (Fig. 3A and 3C). However, the readouts for most of the subjects in the intermediate group at the different ratios tested were all near maximal for this assay (>90% suppression), and thus it cannot be excluded that lower E:T ratios could have allowed the detection of potential changes in this group. Alternatively, since CNAR activity has been reported to decrease over time in the chronic phase of HIV infection,^{44–47} our results could reflect a stabilizing effect of HAART on the already high level of CNAR activity in this group of patients. A “true” placebo control for this group and further titrating CNAR activity (using lower E:T ratios) would clarify this possibility.

Our findings show a positive correlation of baseline CNAR with CD4⁺ T cell count, and a negative correlation with viral load, which confirms previous observations,^{33,44,46,48,51,54} and supports a possible beneficial role of CNAR. Under HAART, however, these correlations are lost. Taken together our observations could indicate that a more complex relationship exists between this CD8⁺ T cell function (CNAR) and CD4⁺ T cells. In this regard, restored CD4⁺ T cell function, such as IL-2 production,^{13,14} may be a more important parameter influencing CNAR activity⁴¹ than CD4⁺ T cell number alone.

It could be possible that a high viremia could directly inhibit CNAR. However, several subjects with suppressed viremia (7 of the 17 late-stage individuals) did not show improved CNAR.

Also, those few individuals with decreased CNAR did not all have increased viral load. Thus, viremia does not seem to be directly controlling CNAR activity.

Since specific responses against HIV, both B and T cell responses, can be diminished following elimination of detectable viral load by HAART,^{24,26,28,29,55–57} the effect of HAART on other arms of the immune response is of great interest. Initial studies examining the effects of HAART on CNAR indicate that this response also appears to be decreased, at least in some stages of infection. CNAR responses were decreased when HAART was given during acute⁴⁹ and chronic HIV infection,⁴⁸ suggesting a need for sustained antigen levels for the maintenance of high level CNAR, or possibly a direct inhibitory effect of HAART upon CD8⁺ T cell function. In contrast, in the present studies, the HAART-treated groups showed little evidence of decreases in CNAR. Furthermore, CNAR was sustained or elevated for up to 1 year and in some cases almost 2 years, in both treated groups. These results do not support a direct negative effect of HAART on CD8⁺ cells, but instead could reflect the fact that after the initial acute phase, in established chronic infection, the presence of a substantial viral load is not needed to maintain an anti-HIV noncytotoxic CD8⁺ cell response. We cannot explain why the CNAR activity of our chronically infected population responded differently to HAART than that reported by Wilkinson *et al.*⁴⁸ Further work with subjects under HAART at different stages of HIV infection is clearly needed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was part of a collaboration between the Laboratory for Tumor and AIDS Virus Research at UCSF, and the Department for Research in Infectious Diseases at INER, Mexico City. We gratefully acknowledge Dr. Jay A. Levy of the University of California in San Francisco for the thorough discussion of this work and the critical review of the manuscript. We gratefully acknowledge Dra. María Pizano of the Clínica 72, IMSS for her support on the clinical follow-up of the patients. This work was supported by UC-Mexus Grant HM/CN 01–59, Fogarty International, Miguel Alemán Foundation (México), and by Grant 28732M from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. K.J.T. was the recipient of CONACYT Ph.D. fellowship No. 153061. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D. Sc. degree for K.J.T. at Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

REFERENCES

1. Polis MA, Sidorov IA, Yoder C, Jankelevich S, Metcalf J, Mueller BU, Dimitrov MA, Pizzo P, Yarchoan R, and Dimitrov DS: Correlation between reduction in plasma HIV-1 RNA concentration 1 week after start of antiretroviral treatment and longer-term efficacy. *Lancet* 2001;358:1760–1765.
2. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, and Ho DD: Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997; 387:188–191.

3. Fleury S, Rizzardi GP, Chapuis A, Tambussi G, Knabenhans C, Simeoni E, Meuwly JY, Corpataux JM, Lazzarin A, Miedema F, and Pantaleo G: Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5393–5398.
4. Smith CJ, Sabin CA, Lame FC, Kinloch-de-Loes S, Gumley H, Carroll A, Prinz B, Youle M, Johnson MA, and Phillips AN: The potential for CD4 cell increases in HIV-positive individuals who control viraemia with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2003;17:963–969.
5. Hoffmann C, Tabrizian S, Wolf E, Eggers C, Stoehr A, Plettenberg A, Buhk T, Stellbrink HJ, Horst HA, Jager H, and Rosenkranz T: Survival of AIDS patients with primary central nervous system lymphoma is dramatically improved by HAART-induced immune recovery. *AIDS* 2001;15:2119–2127.
6. Cattelan AM, Calabro ML, Gasperini P, Aversa SM, Zanchetta M, Meneghetti F, De Rossi A, and Chieco-Bianchi L: Acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma regression after highly antiretroviral therapy: Biologic correlates of clinical outcome. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;28:44–49.
7. Semba RD, Shah N, and Vlahov D: Improvement of anemia among HIV-infected injection drug users receiving highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:315–319.
8. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, and Holmberg SD: Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998;338:853–860.
9. Al-Harhi L, Siegel J, Spritzler J, Pottage J, Agnoli M, and Landay A: Maximum suppression of HIV replication leads to the restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *AIDS* 2000;14:761–770.
10. Wendland T, Furrer H, Vernazza PL, Frutig K, Christen A, Mattered, Malinverni R, and Pichler WJ: HAART in HIV-infected patients: Restoration of antigen-specific CD4 T-cell responses in vitro is correlated with CD4 memory T-cell reconstitution, whereas improvement in delayed type hypersensitivity is related to a decrease in viraemia. *AIDS* 1999;13:1857–1862.
11. Pontesilli O, Kerkhof-Garde S, Notermans DW, Foudraire NA, Roos MT, Klein MR, Danner SA, Lange JM, and Miedema F: Functional T cell reconstitution and human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity during highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999;180:76–86.
12. Ullum H, Katzenstein T, Aladdin H, Nielsen C, Sondergaard SR, Gerstoft J, Skinhoj P, and Pedersen BK: Immunological changes in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals during HIV-specific protease inhibitor treatment. *Scand J Immunol* 1999;49:539–547.
13. Hardy GAD, Imami N, Sullivan AK, Pires A, Burton CT, Nelson MR, Gazzard BG, and Gotch FM: Reconstitution of CD4+ T cell responses in HIV-1 infected individuals initiating highly active antiretroviral therapy (HAART) is associated with renewed interleukin-2 production and responsiveness. *Clin Exp Immunol* 2003;134:98–106.
14. Weiss L, Ancuta P, Girard P, Bouhlal H, Roux A, Cavaillon NH, and Kazatchkine MD: Restoration of normal interleukin-2 production by CD4+ T cells of human immunodeficiency virus-infected patients after 9 months of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999;180:1057–1063.
15. Kim JH, Mascola JR, Ratto-Kim S, VanCott TC, Loomis-Price L, Cox JH, Michael NL, Jagodzinski L, Hawkes C, Mayers D, Gilliam BL, Birx DC, and Robb ML: Selective increases in HIV-specific neutralizing antibody and partial reconstitution of cellular immune responses during prolonged, successful drug therapy of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:1021–1034.
16. Kroon FP, Rimmelzwaan GF, Roos MTL, Osterhaus AME, Hamann D, Miedema F, and vanDissel JT: Restored humoral immune response to influenza vaccination in HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1998;12:F217–F223.
17. Silvestri G, Munoz C, Butini L, Bagnarelli P, and Montroni M: Changes in CD8 cell subpopulations induced by antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infected patients. *Viral Immunol* 1997;10:207–212.
18. Notermans DW, Pakker NG, Hamann D, Foudraire NA, Kauffmann RH, Meenhorst PL, Goudsmit J, Roos MTL, Schellekens PTA, Miedema F, and Danner SA: Immune restoration after 2 years of successful potent antiretroviral therapy in previously untreated human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *J Infect Dis* 1999;180:1050–1056.
19. Blazevic V, Sahgal N, Kessler HA, Landay AL, and Shearer GM: T cell responses to recall antigens, alloantigen, and mitogen of HIV-infected patients receiving long-term combined antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:1887–1893.
20. Hsieh SM, Hung CC, Pan SC, Wang JT, Tsai HC, Chen MY, and Chang SC: Restoration of cellular immunity against tuberculosis in patients coinfecting with HIV-1 and tuberculosis with effective antiretroviral therapy: Assessment by determination of CD69 expression on T cells after tuberculin stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;25:212–220.
21. Dalod M, Dupuis M, Deschemin J-C, Sicard D, Salmon D, Del-fraissy J-F, Venet A, Sinet M, and Guillet J-G: Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8+ responses in HIV type 1-infected patients: Comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *J Virol* 1999;73:7108–7116.
22. Ortiz GM, Hu J, Goldwitz JA, Chandwani R, Larsson M, Bhardwaj N, Bonhoeffler S, Ramratnam B, Zhang L, Markowitz MS, and Nixon DF: Residual viral replication during antiretroviral therapy boosts human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses in subjects treated early after infection. *J Virol* 2002;76:411–415.
23. Rinaldo CR, Jr., Huang X, Fan Z, Margolick JB, Borowski L, Hoji A, Kalinyak C, McMahon DK, Riddler SA, Hildebrand WH, Day RB, and Mellors JW: Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD8+ T-lymphocyte reactivity during combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients with advanced immunodeficiency. *J Virol* 2000;74:4127–4138.
24. Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS, and Walker BD: Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 1999;73:6721–6728.
25. Dalod M, Harzic M, Pellegrin I, Dumon B, Hoen B, Sereni D, Deschemin J-C, Levy J-P, Venet A, and Gomard E: Evolution of cytotoxic T lymphocytes responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. *J Infect Dis* 1998;178:61–69.
26. Seth A, Markee J, Hoering A, Sevin A, Sabath DE, Schmitz JE, Kuroda MJ, Lifton MA, Hirsch MS, Collier AC, Letvin NL, and McElrath MJ: Alterations in T cell phenotype and human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxicity after potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001;183:722–729.
27. Malhotra U, Berrey MM, Huang Y, Markee J, Brown DJ, Ap S, Musey L, Schacker T, Corey L, and McElrath MJ: Effect of combination antiretroviral therapy on T-cell immunity in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000;181:121–131.
28. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Moss P, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, McMichael AJ, and Nixon DF: Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1999;73:797–800.

29. Casazza JP, Betts MR, Picker LJ, and Koup RA: Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood after initiation of highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2001;75:6508–6516.
30. Sester M, Sester U, Kohler H, Schneider T, Deml L, Wagner R, Mueller-Lantzsch N, Pees HW, and Meyerhans A: Rapid whole blood analysis of virus-specific CD4 and CD8 T cell responses in persistent HIV infection. *AIDS* 2000;14:2653–2660.
31. Levy JA, Scott I, and Mackewicz C: Protection for HIV/AIDS: The importance of innate immunity. *Clin Immunol* 2003;108:167–174.
32. Walker CM, Erikson AL, Hsueh FC, and Levy JA: Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol* 1991;65:5921–5927.
33. Levy JA, Mackewicz CE, and Barker E: Controlling HIV pathogenesis: The role of noncytotoxic anti-HIV activity of CD8+ cells. *Immunol Today* 1996;17:217–224.
34. Walker CM and Levy JA: A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology* 1989;66:628–630.
35. Mackewicz C and Levy JA: CD8+ cell anti-HIV activity: Nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:1039–1050.
36. Mackewicz CE, Blackburn DJ, and Levy JA: CD8+ cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2308–2312.
37. Mackewicz CE, Patterson BK, Lee SA, and Levy JA: CD8(+) cell noncytotoxic anti-human immunodeficiency virus response inhibits expression of viral RNA but not reverse transcription or provirus integration. *J Gen Virol* 2000;81:1261–1264.
38. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, and Lusso P: Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811–1815.
39. Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, and Kurth R: HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995;378:563.
40. Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, and Levy JA: Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary infection. *Lancet* 1994;344:1671–1673.
41. Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Teran G, Sato A, Stranford SA, Fujimura SH, Christopherson C, Chang SY, and Levy JA: Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared to those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 1998;92:3105–3114.
42. Stranford S, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang S, Sninsky J, Ferrari G, Weinhold K, Lindquist C, and Levy J: Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1030–1035.
43. Levy JA, Hsueh F, Blackburn DJ, Wara D, and Weintrub PS: CD8 cell noncytotoxic antiviral activity in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected children. *J Infect Dis* 1998;177:470–472.
44. Blackburn DJ, Mackewicz CE, Barker E, Hunt TK, Herndier B, Haase AT, and Levy JA: Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13125–13130.
45. Mackewicz CE, Ortega HW, and Levy JA: CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 1991;87:1462–1466.
46. Gomez AM, Smaill FM, and Rosenthal KL: Inhibition of HIV replication by CD8+ T cells correlates with CD4 counts and clinical stage of disease. *Clin Exp Immunol* 1994;97:68–75.
47. Landay AL, Mackewicz C, and Levy JA: An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;69:106–116.
48. Wilkinson J, Zaunders JJ, Carr A, and Cooper DA: CD8+ anti-human immunodeficiency virus suppressor activity (CASA) in response to antiretroviral therapy: Loss of CASA is associated with loss of viremia. *J Infect Dis* 1999;180:68–75.
49. Stranford SA, Ong JC, Martinez-Marino B, Busch M, Hecht FM, Kahn J, and Levy JA: Reduction in CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV activity in individuals receiving highly active antiretroviral therapy during primary infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:597–602.
50. Tateno M, Gonzalez-Scarano F, and Levy JA: The human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4287–4290.
51. Mackewicz CE, Barker E, Greco G, Reyes-Teran G, and Levy JA: Do β -chemokines have clinical relevance in HIV infection? *J Clin Invest* 1997;100:921–930.
52. McDougal JS, Cort SP, Kennedy MS, Cabridilla CD, Feorino PM, Francis DP, Hicks D, Kalyanaraman VS, and Martin LS: Immunoassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy-associated virus (LAV). *J Immunol Methods* 1985;76:171–183.
53. Levy JA: The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol* 2001;22:312–316.
54. Castelli JC, Deeks SG, Shiboski S, and Levy JA: Relationship of CD8+ T cell non-cytotoxic anti-HIV response to CD4+ T cell number in untreated asymptomatic HIV-infected individuals. *Blood* 2002;99:4225–4227.
55. Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K, Cao Y, Binley JM, Talal A, Hurlley A, Ji X, Chaudhry MR, Yaman M, Frankel S, Heath-Chiozzi M, Leonard JM, Moore JP, Racz P, Nixon DF, and Ho DD: The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses. *J Infect Dis* 1999;179:527–537.
56. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, and Picker LJ: HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* 1999;5:518–525.
57. Giovannetti A, Piedominici M, Mazzetta F, Salemi S, Marziali M, Kuonens D, Iebba F, Lusi EA, Cossarizza A, and Aiuti F: T cell responses to highly active antiretroviral therapy defined by chemokine receptors expression, cytokine production, T cell receptor repertoire and anti-HIV T-lymphocyte activity. *Clin Exp Immunol* 2000;124:21–31.

Address reprint requests to:

Gustavo Reyes-Terán
Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Calzada de Tlalpan 4502
14080 México. D.F.

E-mail: reyesteran@iner.gob.mx

ABREVIATURAS

AP-1	Factor de transcripción, del inglés “activator protein 1”
CCR	Receptor de quimiocinas CC
CD4 ⁺	Células que expresan el marcador CD4 en su superficie
CD8 ⁺	Células que expresan el marcador CD8 en su superficie
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente unido a una enzima
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IL-2	Interleucina-2
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones, unidad de masa igual a 1000 daltones
LFA	Antígeno asociado a función de linfocito
LTR	Terminaciones largas repetidas
MADCAM	Molécula de adhesión celular para mucosas
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
Nef	Factor regulador negativo
NF- κ B	Factor de transcripción, nuclear factor-kappa B
RANTES	Proteína regulada de activación, expresada en células T normales y secretada
Rev	Proteína reguladora viral
RNA	Ácido ribonucleico
Tat	Trans-activador de transcripción
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
UNAIDS	Programa Conjunto de las Naciones Unidas para sobre VIH/SIDA
Vif	Factor de infectividad viral
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Vpr	Proteína viral R
Vpu	Proteína viral U

11. Referencias

- 1 Gottlieb MS. Pneumocystis Pneumonia --- Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30:1-3.
- 2 Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30:305-308.
- 3 A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982;31:305-307.
- 4 Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982;31:365-367.
- 5 Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982;31:652-654.
- 6 Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants--New York, New Jersey, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982;31:665-667.
- 7 Immunodeficiency among female sexual partners of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - New York. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1983;31:697-698.
- 8 Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in prison inmates--New York, New Jersey. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1983;31:700-701.
- 9 Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220:868-871.
- 10 Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984;224:500-503.
- 11 Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science.* 1984;225:840-842.
- 12 Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA), Organización Mundial de la Salud (OMS) 2007. Situación de la epidemia de sida: informe especial sobre la prevención del VIH, Diciembre de 2007. UNAIDS, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS . 12-1-2007. Ref Type: Internet Communication
- 13 Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA. Panorama Epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México. Secretaría de Salud . 30-6-2006. Secretaría de Salud. Ref Type: Electronic Citation
- 14 Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 1991;5:2349-2360.
- 15 Rey MA, Spire B, Dormont D et al. Characterization of the RNA dependent DNA polymerase of a new human T-lymphotropic retrovirus (lymphadenopathy associated virus). *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;121:126-133.
- 16 Fisher RA, Bertonis JM, Meier W et al. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature.* 1988;331:76-78.
- 17 Bahraoui E, Clerget-Raslain B, Chapuis F et al. A molecular mechanism of inhibition of HIV-1 binding to CD4+ cells by monoclonal antibodies to gp110. *AIDS.* 1988;2:165-169.
- 18 Propiedades Generales de las respuestas inmunitarias. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, eds. *Inmunología Celular y Molecular.* Barcelona España: McGraw-Hill Interamericana; 2002:3-6.
- 19 Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature.* 1985;313:450-458.

- 20 Chun TW, Stuyver L, Mizell SB et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13193-13197.
- 21 Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:663-668.
- 22 Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M. HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature*. 1988;333:504.
- 23 Hope TJ, Trono D. Structure, Expression, and Regulation of the HIV Genome. *HIV InSite Knowledge Base Chapter [Nov 2000]*, 1. 11-1-2000. UCSF. Ref Type: Electronic Citation
- 24 Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5781-5785.
- 25 Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*. 1995;83:569-576.
- 26 Jacks T, Power MD, Masiarz FR et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 1988;331:280-283.
- 27 Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR et al. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*. 1990;61:213-222.
- 28 Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science*. 1990;249:1555-1558.
- 29 Daniel R, Greger JG, Katz RA et al. Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol*. 2004;78:8573-8581.
- 30 Morikawa Y, Barsov E, Jones I. Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *J Virol*. 1993;67:3601-3604.
- 31 Capon DJ, Ward RH. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:649-678.
- 32 Ruben S, Perkins A, Purcell R et al. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*. 1989;63:1-8.
- 33 Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 1989;338:254-257.
- 34 Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. 1994;76:853-864.
- 35 Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7311-7315.
- 36 Schubert U, Bour S, Ferrer-Montiel AV et al. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol*. 1996;70:809-819.
- 37 Strebel K, Daugherty D, Clouse K et al. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1987;328:728-730.
- 38 Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:657-700.
- 39 Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004;200:749-759.

- 40 Lee B, Montaner LJ. Chemokine immunobiology in HIV-1 pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 1999;65:552-565.
- 41 Douek DC, Picker LJ, Koup RA. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:265-304.
- 42 Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:625-656.
- 43 Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1998;339:33-39.
- 44 Zhang Z, Schuler T, Zupancic M et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science.* 1999;286:1353-1357.
- 45 Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B et al. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature.* 2005;434:1093-1097.
- 46 Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324:961-964.
- 47 Cooper DA, Gold J, Maclean P et al. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet.* 1985;1:537-540.
- 48 Cavert W, Notermans DW, Staskus K et al. Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science.* 1997;276:960-964.
- 49 Pantaleo G, Graziosi C, Butini L et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:9838-9842.
- 50 Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today.* 1990;11:406-410.
- 51 Hufert FT, van Lunzen J, Janossy G et al. Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *AIDS.* 1997;11:849-857.
- 52 Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature.* 1993;362:355-358.
- 53 Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ et al. Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naive CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:556-560.
- 54 Espersen C, Pakkenberg B, Harder E et al. High levels of CD8-positive lymphocytes expressing CD45RO, granzyme B, and Ki-67 in lymph nodes of HIV-infected individuals are not associated with increased mortality. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001;17:287-293.
- 55 Chen G, Shankar P, Lange C et al. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood.* 2001;98:156-164.
- 56 Bollinger RC, Brookmeyer RS, Mehendale SM et al. Risk factors and clinical presentation of acute primary HIV infection in India. *JAMA.* 1997;278:2085-2089.
- 57 Gupta KK. Acute immunosuppression with HIV seroconversion. *N Engl J Med.* 1993;328:288-289.
- 58 Busch MP, Lee LL, Satten GA et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion.* 1995;35:91-97.
- 59 Hecht FM, Busch MP, Rawal B et al. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS.* 2002;16:1119-1129.
- 60 Roos MT, de Leeuw NA, Claessen FA et al. Viro-immunological studies in acute HIV-1 infection. *AIDS.* 1994;8:1533-1538.
- 61 Koup RA, Safrit JT, Cao Y et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;68:4650-4655.

- 62 Constantine NT, van der GG, Belsey EM, Tamashiro H. Sensitivity of HIV-antibody assays determined by seroconversion panels. *AIDS*. 1994;8:1715-1720.
- 63 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992;41:1-19.
- 64 Proposed 'World Health Organization staging system for HIV infection and disease': preliminary testing by an international collaborative cross-sectional study. The WHO International Collaborating Group for the Study of the WHO Staging System. *AIDS*. 1993;7:711-718.
- 65 Gottlieb MS. Discovering AIDS. *Epidemiology*. 1998;9:365-367.
- 66 Gail MH, Tan WY, Pee D, Goedert JJ. Survival after AIDS diagnosis in a cohort of hemophilia patients. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;15:363-369.
- 67 Hogg RS, Heath KV, Yip B et al. Improved survival among HIV-infected individuals following initiation of antiretroviral therapy. *JAMA*. 1998;279:450-454.
- 68 Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338:853-860.
- 69 Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272:1167-1170.
- 70 Bacchetti P, Moss AR. Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature*. 1989;338:251-253.
- 71 Lefrere JJ, Morand-Joubert L, Mariotti M et al. Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;90:1133-1140.
- 72 Phillips AN. CD4 lymphocyte depletion prior to the development of AIDS. *AIDS*. 1992;6:735-736.
- 73 van den BH, Gerritsen EJ, van Tol MJ, Dooren LJ, Vossen JM. Ten years after acquiring an HIV-1 infection: a study in a cohort of eleven neonates infected by aliquots from a single plasma donation. *Acta Paediatr*. 1994;83:173-178.
- 74 Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*. 1997;126:946-954.
- 75 Rowland-Jones SL. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol*. 2003;3:343-348.
- 76 Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES et al. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS*. 2003;17:2581-2591.
- 77 Allen TM, Altfeld M, Geer SC et al. Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol*. 2005;79:13239-13249.
- 78 Altfeld M, Allen TM, Kalife ET et al. The majority of currently circulating human immunodeficiency virus type 1 clade B viruses fail to prime cytotoxic T-lymphocyte responses against an otherwise immunodominant HLA-A2-restricted epitope: implications for vaccine design. *J Virol*. 2005;79:5000-5005.
- 79 Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest*. 1998;102:1758-1765.
- 80 Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS*. 1999;13:23-29.
- 81 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.

- 82 Tomiyama H, Miwa K, Shiga H et al. Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol.* 1997;158:5026-5034.
- 83 Jeannet M, Sztajzel R, Carpentier N, Hirschel B, Tiercy JM. HLA antigens are risk factors for development of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1989;2:28-32.
- 84 Kaslow RA, Carrington M, Apple R et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med.* 1996;2:405-411.
- 85 Frahm N, Adams S, Kiepiela P et al. HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. *J Virol.* 2005;79:10218-10225.
- 86 McNeil AJ, Yap PL, Gore SM et al. Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease. *QJM.* 1996;89:177-185.
- 87 Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med.* 1997;3:1259-1265.
- 88 Tersmette M, de Goede RE, Al BJ et al. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol.* 1988;62:2026-2032.
- 89 Huang Y, Zhang L, Ho DD. Biological characterization of nef in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1995;69:8142-8146.
- 90 Rhodes DI, Ashton L, Solomon A et al. Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. *J Virol.* 2000;74:10581-10588.
- 91 Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature.* 1994;370:463-467.
- 92 Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68:6103-6110.
- 93 Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science.* 1999;283:857-860.
- 94 Moriuchi H, Moriuchi M, Combadiere C, Murphy PM, Fauci AS. CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:15341-15345.
- 95 Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995;270:1811-1815.
- 96 Willey S, Peters PJ, Sullivan WM et al. Inhibition of CCR5-mediated infection by diverse R5 and R5X4 HIV and SIV isolates using novel small molecule inhibitors of CCR5: effects of viral diversity, target cell and receptor density. *Antiviral Res.* 2005;68:96-108.
- 97 Dorr P, Westby M, Dobbs S et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:4721-4732.
- 98 Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN et al. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol.* 2000;74:8358-8367.
- 99 Klimpel GR. Immune Defenses. In: Baron S., Peake R.C., James D.A., Susman D., Kennedy D.A., Durson Singleton M.J. et al., eds. *Medical Microbiology.* Galveston, TX: The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996:On line Edition.

- 100 Taylor HP, Dimmock NJ. Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J Exp Med.* 1985;161:198-209.
- 101 Taylor HP, Dimmock NJ. Mechanisms of neutralization of influenza virus by IgM. *J Gen Virol.* 1985;66 (Pt 4):903-907.
- 102 Bakker AB, Marissen WE, Kramer RA et al. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants. *J Virol.* 2005;79:9062-9068.
- 103 Zeisel MB, Fafi-Kremer S, Fofana I et al. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:4824-4830.
- 104 Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol.* 1997;71:3734-3741.
- 105 Pognard P, Sabbe R, Picchio GR et al. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity.* 1999;10:431-438.
- 106 Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med.* 2003;9:861-866.
- 107 Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S et al. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 2003;77:2165-2173.
- 108 Tsukamoto T, Yuasa M, Yamamoto H et al. Induction of CD8+ cells able to suppress CCR5-tropic simian immunodeficiency virus mac239 replication by controlled infection of CXCR4-tropic simian-human immunodeficiency virus in vaccinated rhesus macaques. *J Virol.* 2007.
- 109 He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5692-5697.
- 110 Mbawuikie IN, Zhang Y, Couch RB. Control of mucosal virus infection by influenza nucleoprotein-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Respir Res.* 2007;8:44.
- 111 Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:595-602.
- 112 Lichterfeld M, Kaufmann DE, Yu XG et al. Loss of HIV-1-specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restoration by vaccine-induced HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Exp Med.* 2004;200:701-712.
- 113 Masemola A, Mashishi T, Khoury G et al. Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *J Virol.* 2004;78:3233-3243.
- 114 Cohen OJ, Vaccarezza M, Lam GK et al. Heterozygosity for a defective gene for CC chemokine receptor 5 is not the sole determinant for the immunologic and virologic phenotype of HIV-infected long-term nonprogressors. *J Clin Invest.* 1997;100:1581-1589.
- 115 Johnson RP, Trocha A, Buchanan TM, Walker BD. Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation. *J Exp Med.* 1992;175:961-971.
- 116 Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S et al. Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J Virol.* 1999;73:797-800.
- 117 Peyerl FW, Bazick HS, Newberg MH et al. Fitness costs limit viral escape from cytotoxic T lymphocytes at a structurally constrained epitope. *J Virol.* 2004;78:13901-13910.
- 118 Goulder PJ, Walker BD. The great escape - AIDS viruses and immune control. *Nat Med.* 1999;5:1233-1235.

- 119 Jones NA, Wei X, Flower DR et al. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med.* 2004;200:1243-1256.
- 120 Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science.* 1986;234:1563-1566.
- 121 Walker BD, Chakrabarti S, Moss B et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature.* 1987;328:345-348.
- 122 Betts MR, Nason MC, West SM et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006;107:4781-4789.
- 123 Almeida JR, Price DA, Papagno L et al. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med.* 2007;204:2473-2485.
- 124 Andersson J, Kinloch S, Sonnerborg A et al. Low levels of perforin expression in CD8+ T lymphocyte granules in lymphoid tissue during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis.* 2002;185:1355-1358.
- 125 Andersson J, Behbahani H, Lieberman J et al. Perforin is not co-expressed with granzyme A within cytotoxic granules in CD8 T lymphocytes present in lymphoid tissue during chronic HIV infection. *AIDS.* 1999;13:1295-1303.
- 126 Heintel T, Sester M, Rodriguez MM et al. The fraction of perforin-expressing HIV-specific CD8 T cells is a marker for disease progression in HIV infection. *AIDS.* 2002;16:1497-1501.
- 127 Kostense S, Ogg GS, Manting EH et al. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol.* 2001;31:677-686.
- 128 Walker CM, Levy JA. A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology.* 1989;66:628-630.
- 129 Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ T lymphocyte control of HIV replication in cultured CD4+ cells varies among infected individuals. *Cell Immunol.* 1989;119:470-475.
- 130 Walker CM, Erickson AL, Hsueh FC, Levy JA. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in acutely infected CD4+ cells by CD8+ cells involves a noncytotoxic mechanism. *J Virol.* 1991;65:5921-5927.
- 131 Mackewicz CE, Wang B, Metkar S et al. Lack of the CD8+ cell anti-HIV factor in CD8+ cell granules. *Blood.* 2003;102:180-183.
- 132 Jiang JQ, Balasubramanian S, Hawley-Foss NC et al. Production of CD8+ T cell nonlytic suppressive factors by CD28, CD38, and HLA-DR subpopulations. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2003;19:497-502.
- 133 Castro BA, Walker CM, Eichberg JW, Levy JA. Suppression of human immunodeficiency virus replication by CD8+ cells from infected and uninfected chimpanzees. *Cell Immunol.* 1991;132:246-255.
- 134 Gauduin MC, Glickman RL, Means R, Johnson RP. Inhibition of simian immunodeficiency virus (SIV) replication by CD8(+) T lymphocytes from macaques immunized with live attenuated SIV. *J Virol.* 1998;72:6315-6324.
- 135 Hohdatsu T, Okubo M, Koyama H. Feline CD8+ T cell non-cytolytic anti-feline immunodeficiency virus activity mediated by a soluble factor(s). *J Gen Virol.* 1998;79 (Pt 11):2729-2735.
- 136 Mackewicz CE, Ortega H, Levy JA. Effect of cytokines on HIV replication in CD4+ lymphocytes: lack of identity with the CD8+ cell antiviral factor. *Cell Immunol.* 1994;153:329-343.
- 137 Mackewicz CE, Barker E, Levy JA. Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication. *Science.* 1996;274:1393-1395.

- 138 Zhang L, Yu W, He T et al. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science*. 2002;298:995-1000.
- 139 Mackewicz CE, Yuan J, Tran P et al. alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS*. 2003;17:F23-F32.
- 140 Zhang L, Lopez P, He T, Yu W, Ho DD. Retraction of an interpretation. *Science*. 2004;303:467.
- 141 Geiben-Lynn R, Brown N, Walker BD, Luster AD. Purification of a modified form of bovine antithrombin III as an HIV-1 CD8+ T-cell antiviral factor. *J Biol Chem*. 2002;277:42352-42357.
- 142 Nixon DF, Broliden K, Ogg G, Broliden PA. Cellular and humoral antigenic epitopes in HIV and SIV. *Immunology*. 1992;76:515-534.
- 143 Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest*. 1991;87:1462-1466.
- 144 Landay AL, Mackewicz CE, Levy JA. An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;69:106-116.
- 145 Blackburn DJ, Mackewicz CE, Barker E et al. Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13125-13130.
- 146 Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today*. 1996;17:217-224.
- 147 Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. The CD8+ Cell Antiviral Factor. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.Hum.Retrovirol*. 15[Suppl. 1], S23-S26. 1997. Ref Type: Journal (Full)
- 148 Chen CH, Weinhold KJ, Bartlett JA, Bolognesi DP, Greenberg ML. CD8+ T lymphocyte-mediated inhibition of HIV-1 long terminal repeat transcription: a novel antiviral mechanism. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993;9:1079-1086.
- 149 Mackewicz CE, Blackburn DJ, Levy JA. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2308-2312.
- 150 Chang TL, Mosoian A, Pine R, Klotman ME, Moore JP. A soluble factor(s) secreted from CD8(+) T lymphocytes inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication through STAT1 activation. *J Virol*. 2002;76:569-581.
- 151 Locher CP, Witt SA, Levy JA. The nuclear factor kappa B and Spl binding sites do not appear to be involved in virus suppression by CD8 T lymphocytes. *AIDS*. 2001;15:2455-2457.
- 152 Powell JD, Bednarik DP, Folks TM et al. Inhibition of cellular activation of retroviral replication by CD8+ T cells derived from non-human primates. *Clin Exp Immunol*. 1993;91:473-481.
- 153 Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL. Suppression of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is dependent on the NFAT-1 element. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996;12:143-148.
- 154 Tomaras GD, Lacey SF, McDanal CB et al. CD8+ T cell-mediated suppressive activity inhibits HIV-1 after virus entry with kinetics indicating effects on virus gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3503-3508.
- 155 Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol*. 2006;7:344-353.
- 156 von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:867-878.
- 157 von Andrian UH. Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation*. 1996;3:287-300.

- 158 Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med.* 1998;187:205-216.
- 159 von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000;343:1020-1034.
- 160 Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:7096-7100.
- 161 Nakashima H, Matsui T, Harada S et al. Inhibition of replication and cytopathic effect of human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus by 3'-azido-3'-deoxythymidine in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30:933-937.
- 162 Young FE. The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep.* 1988;103:242-245.
- 163 Richman DD, Fischl MA, Grieco MH et al. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 1987;317:192-197.
- 164 Fischl MA, Richman DD, Grieco MH et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 1987;317:185-191.
- 165 Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30:250-252.
- 166 Sperling R. Zidovudine. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6:197-203.
- 167 Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res.* 2004;2:323-332.
- 168 Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med.* 1998;338:1281-1292.
- 169 Weiss CD. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Rev.* 2003;5:214-221.
- 170 Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J Biol Chem.* 2001;276:23213-23216.
- 171 Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:236-248.
- 172 Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E et al. Rapid and Durable Antiretroviral Effect of the HIV-1 Integrase Inhibitor Raltegravir as Part of Combination Therapy in Treatment-Naive Patients With HIV-1 Infection: Results of a 48-Week Controlled Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007.
- 173 Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R et al. Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis.* 1995;171:1411-1419.
- 174 Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 1999;340:1605-1613.
- 175 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.
- 176 Davey RT, Jr., Bhat N, Yoder C et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:15109-15114.
- 177 Rizzardì GP, Tambussi G, Bart PA et al. Virological and immunological responses to HAART in asymptomatic therapy-naive HIV-1-infected subjects according to CD4 cell count. *AIDS.* 2000;14:2257-2263.
- 178 Hogg RS, Yip B, Chan KJ et al. Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy. *JAMA.* 2001;286:2568-2577.

- 179 Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS et al. Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA*. 2004;292:251-265.
- 180 Narita M, Ashkin D, Hollender ES, Pitchenik AE. Paradoxical worsening of tuberculosis following antiretroviral therapy in patients with AIDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:157-161.
- 181 Schluger NW, Perez D, Liu YM. Reconstitution of immune responses to tuberculosis in patients with HIV infection who receive antiretroviral therapy. *Chest*. 2002;122:597-602.
- 182 Hammer SM, Squires KE, Hughes MD et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med*. 1997;337:725-733.
- 183 Finzi D, Siliciano RF. Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell*. 1998;93:665-671.
- 184 Wendland T, Furrer H, Vernazza PL et al. HAART in HIV-infected patients: restoration of antigen-specific CD4 T-cell responses in vitro is correlated with CD4 memory T-cell reconstitution, whereas improvement in delayed type hypersensitivity is related to a decrease in viraemia. *AIDS*. 1999;13:1857-1862.
- 185 Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW et al. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13778-13783.
- 186 Fumero E, Garcia F, Gatell JM. Immunosuppressive drugs as an adjuvant to HIV treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53:415-417.
- 187 Makonkawkeyoon S, Limson-Pobre RN, Moreira AL, Schauf V, Kaplan G. Thalidomide inhibits the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:5974-5978.
- 188 Barreiro P, de Mendoza C, Camino N et al. Hydroxyurea plus didanosine as maintenance therapy for HIV-infected patients on long-term successful highly active antiretroviral therapy. *HIV Clin Trials*. 2003;4:361-371.
- 189 Gao WY, Cara A, Gallo RC, Lori F. Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8925-8928.
- 190 Savarino A, Gennero L, Chen HC et al. Anti-HIV effects of chloroquine: mechanisms of inhibition and spectrum of activity. *AIDS*. 2001;15:2221-2229.
- 191 Savarino A, Lucia MB, Rastrelli E et al. Anti-HIV effects of chloroquine: inhibition of viral particle glycosylation and synergism with protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;35:223-232.
- 192 Sperber K, Louie M, Kraus T et al. Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Ther*. 1995;17:622-636.
- 193 Popovic M, Tenner-Racz K, Pelsler C et al. Persistence of HIV-1 structural proteins and glycoproteins in lymph nodes of patients under highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:14807-14812.
- 194 Tenner-Racz K, Stellbrink HJ, van Lunzen J et al. The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J Exp Med*. 1998;187:949-959.
- 195 Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA et al. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest*. 1999;103:1391-1398.
- 196 Lafeuillade A, Chouraqui M, Hittinger G, Poggi C, Delbeke E. Lymph node expansion of CD4+ lymphocytes during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 1997;176:1378-1382.

- 197 Casazza JP, Betts MR, Picker LJ, Koup RA. Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood after initiation of highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2001;75:6508-6516.
- 198 McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. *Nature.* 2001;410:980-987.
- 199 Mackewicz CE, Patterson BK, Lee SA, Levy JA. CD8(+) cell noncytotoxic anti-human immunodeficiency virus response inhibits expression of viral RNA but not reverse transcription or provirus integration. *J Gen Virol.* 2000;81:1261-1264.
- 200 Brinchmann JE, Gaudernack G, Vartdal F. CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J Immunol.* 1990;144:2961-2966.
- 201 Blackburn DJ, Locher CP, Ramachandran B et al. CD8+ cells from HIV-2-infected baboons control HIV replication. *AIDS.* 1997;11:737-746.
- 202 Kannagi M, Chalifoux LV, Lord CI, Letvin NL. Suppression of simian immunodeficiency virus replication in vitro by CD8+ lymphocytes. *J Immunol.* 1988;140:2237-2242.
- 203 Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Teran G et al. Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1998;92:3105-3114.
- 204 Mackewicz CE, Landay A, Hollander H, Levy JA. Effect of zidovudine therapy on CD8+ T cell anti-HIV activity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;73:80-87.
- 205 Stranford SA, Ong JC, Martinez-Marino B et al. Reduction in CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV activity in individuals receiving highly active antiretroviral therapy during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:597-602.
- 206 Flint S.J, Enquist L.W., Krug R.M. et al. Chapter 2: Virus cultivation, detection and genetics. In: Flint S.J, Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R., Skalka, A.M., eds. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control.* Washington D.C.: ASM Press; 2000:24-56.
- 207 Rodriguez B, Sethi AK, Cheruvu VK et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA.* 2006;296:1498-1506.
- 208 Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS.* 1993;7 Suppl 1:S19-S23.
- 209 Miller CJ, Li Q, Abel K et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 2005;79:9217-9227.
- 210 Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med.* 1996;124:654-663.
- 211 Castelli JC, Deeks SG, Shiboski S, Levy JA. Relationship of CD8(+) T cell noncytotoxic anti-HIV response to CD4(+) T cell number in untreated asymptomatic HIV-infected individuals. *Blood.* 2002;99:4225-4227.
- 212 Wilkinson J, Zaunders JJ, Carr A, Cooper DA. CD8+ anti-human immunodeficiency virus suppressor activity (CASA) in response to antiretroviral therapy: loss of CASA is associated with loss of viremia. *J Infect Dis.* 1999;180:68-75.
- 213 Ho DD, Zhang L. HIV-1 rebound after anti-retroviral therapy. *Nat Med.* 2000;6:736-737.
- 214 Gomez AM, Smaill FM, Rosenthal KL. Inhibition of HIV replication by CD8+ T cells correlates with CD4 counts and clinical stage of disease. *Clin Exp Immunol.* 1994;97:68-75.
- 215 Hardy GA, Imami N, Sullivan AK et al. Reconstitution of CD4+ T cell responses in HIV-1 infected individuals initiating highly active antiretroviral therapy (HAART) is associated with renewed interleukin-2 production and responsiveness. *Clin Exp Immunol.* 2003;134:98-106.

- 216 Weiss L, Ancuta P, Girard PM et al. Restoration of normal interleukin-2 production by CD4+ T cells of human immunodeficiency virus-infected patients after 9 months of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 1999;180:1057-1063.
- 217 Martinez-Marino B, Ashlock BM, Shiboski S, Hecht FM, Levy JA. Effect of IL-2 therapy on CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response during primary HIV-1 infection. *J Clin Immunol.* 2004;24:135-144.
- 218 Martinez-Marino B, Shiboski S, Hecht FM, Kahn JO, Levy JA. Interleukin-2 therapy restores CD8 cell non-cytotoxic anti-HIV responses in primary infection subjects receiving HAART. *AIDS.* 2004;18:1991-1999.
- 219 Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK et al. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 1999;73:6721-6728.
- 220 Seth A, Markee J, Hoering A et al. Alterations in T cell phenotype and human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxicity after potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2001;183:722-729.
- 221 Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K et al. The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses. *J Infect Dis.* 1999;179:527-537.
- 222 Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM et al. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med.* 1999;5:518-525.
- 223 Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF et al. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev.* 1994;140:105-130.
- 224 Li Q, Gebhard K, Schacker T, Henry K, Haase AT. The relationship between tumor necrosis factor and human immunodeficiency virus gene expression in lymphoid tissue. *J Virol.* 1997;71:7080-7082.
- 225 McDowell JA, Chittick GE, Ravitch JR et al. Pharmacokinetics of [(14)C]abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2855-2861.
- 226 Dolin R, Amato DA, Fischl MA et al. Zidovudine compared with didanosine in patients with advanced HIV type 1 infection and little or no previous experience with zidovudine. AIDS Clinical Trials Group. *Arch Intern Med.* 1995;155:961-974.
- 227 Saag MS, Cahn P, Raffi F et al. Efficacy and safety of emtricitabine vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naive patients: a randomized trial. *JAMA.* 2004;292:180-189.
- 228 Eron JJ, Benoit SL, Jemsek J et al. Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party. *N Engl J Med.* 1995;333:1662-1669.
- 229 Havlir DV, Tierney C, Friedland GH et al. In vivo antagonism with zidovudine plus stavudine combination therapy. *J Infect Dis.* 2000;182:321-325.
- 230 Squires K, Pozniak AL, Pierone G, Jr. et al. Tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside-resistant HIV-1 infection: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2003;139:313-320.
- 231 Friedland GH, Pollard R, Griffith B et al. Efficacy and safety of delavirdine mesylate with zidovudine and didanosine compared with two-drug combinations of these agents in persons with HIV disease with CD4 counts of 100 to 500 cells/mm³ (ACTG 261). ACTG 261 Team. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;21:281-292.
- 232 Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med.* 1999;341:1865-1873.

- 233 D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA et al. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med.* 1996;124:1019-1030.
- 234 Notermans DW, Jurriaans S, de Wolf F et al. Decrease of HIV-1 RNA levels in lymphoid tissue and peripheral blood during treatment with ritonavir, lamivudine and zidovudine. Ritonavir/3TC/ZDV Study Group. *AIDS.* 1998;12:167-173.
- 235 Sanne I, Piliro P, Squires K, Thiry A, Schnittman S. Results of a phase 2 clinical trial at 48 weeks (AI424-007): a dose-ranging, safety, and efficacy comparative trial of atazanavir at three doses in combination with didanosine and stavudine in antiretroviral-naive subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;32:18-29.
- 236 Katlama C, Esposito R, Gatell JM et al. Efficacy and safety of TMC114/ritonavir in treatment-experienced HIV patients: 24-week results of POWER 1. *AIDS.* 2007;21:395-402.
- 237 Rodriguez-French A, Boghossian J, Gray GE et al. The NEAT study: a 48-week open-label study to compare the antiviral efficacy and safety of GW433908 versus nelfinavir in antiretroviral therapy-naive HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;35:22-32.
- 238 Gulick RM, Mellors JW, Havlir D et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 1997;337:734-739.
- 239 Walmsley S, Bernstein B, King M et al. Lopinavir-ritonavir versus nelfinavir for the initial treatment of HIV infection. *N Engl J Med.* 2002;346:2039-2046.
- 240 Tebas P, Patick AK, Kane EM et al. Virologic responses to a ritonavir--saquinavir-containing regimen in patients who had previously failed nelfinavir. *AIDS.* 1999;13:F23-F28.
- 241 Mitsuyasu RT, Skolnik PR, Cohen SR et al. Activity of the soft gelatin formulation of saquinavir in combination therapy in antiretroviral-naive patients. NV15355 Study Team. *AIDS.* 1998;12:F103-F109.
- 242 Hicks CB, Cahn P, Cooper DA et al. Durable efficacy of tipranavir-ritonavir in combination with an optimised background regimen of antiretroviral drugs for treatment-experienced HIV-1-infected patients at 48 weeks in the Randomized Evaluation of Strategic Intervention in multi-drug reSistant patients with Tipranavir (RESIST) studies: an analysis of combined data from two randomised open-label trials. *Lancet.* 2006;368:466-475.
- 243 Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med.* 2003;348:2175-2185.
- 244 Lazzarin A, Clotet B, Cooper D et al. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med.* 2003;348:2186-2195.
- 245 Eggink D, Baldwin CE, Deng Y et al. Selection of T1249-resistant Human Immunodeficiency Virus type 1 variants. *J Virol.* 2008.
- 246 Bowen DL, Lane HC, Fauci AS. Immunopathogenesis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1985;103:704-709.