



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE FACTORES VIRALES Y CELULARES
QUE INDUCEN LA EXPRESIÓN DE PD-1 Y SUS
LIGANDOS EN LA INFECCIÓN POR VIH**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ÁNGEL CUAUHTÉMOC LEÓN FLORES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. PERLA MARIANA DEL RIO ESTRADA
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

León
Flores
Angel Cuauhtémoc
56751857
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
0304216866

2. Datos del tutor

Dra.
Perla Mariana
Del Rio
Estrada

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María Candela
Iglesias
Chiesa

4. Datos del sinodal 2

M en C
Suri Karina
Martínez
Yee

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Joel Armando
Vázquez
Pérez

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Juna Luis
Chávez
Pacheco

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de factores virales y celulares que inducen la expresión de PD-1 y sus ligandos en la infección por VIH
81p
2011

DEDICATORIAS

A todos mis Maestros, quienes con sus enseñanzas me han mostrado una manera diferente de vivir mi vida, principalmente a aquellos que luchan por una educación más justa.

A mi madre, por heredarme el gusto por la ciencia y nutrirme con sus experiencias e historias.

A mi padre, por darle dirección a mi vida y guiarme a través de ella, siempre con el ejemplo.

A mi hermano Jesús León por ser mi ayuda en los momentos de duda y aguantarme en mis momentos de enojo.

A mis sobrinos, primos y amigos. Con el deseo de que al igual que yo sigan sus sueños y los plasmen en papel

*A mis abuelos y tíos
Por su cariño y apoyo incondicional en momentos difíciles*

*A la Dra. Perla del Río
Por su excelente dirección para el desarrollo de este trabajo y por permitirme aprender de ella el amor por esta profesión.*

A la Dra. María Candela Iglesias Chiesa, al Dr. Joel Vázquez Pérez, a la M en C. Suri Karina Martínez Yee y al Dr. Juan Luis Pacheco. Por su acertada participación como sinodales.

Al Dr. Gustavo Reyes Terán, jefe del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Por su apoyo incondicional para el desarrollo de esta tesis.

*A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por brindarme la oportunidad de obtener una formación profesional de excelente calidad, con la convicción de aportar mis conocimientos en beneficio de mi país .
¡Por mi raza hablara el espíritu!*

Índice

1 Introducción	6
1.1 Epidemiología de la infección por el VIH	6
1.2 Estructura del VIH	8
1.3 Genoma y productos génicos del VIH	10
1.4 Ciclo de replicación del VIH	12
1.5 Tropicismo viral	15
1.6 Historia natural de la infección por el VIH	16
1.7 Fase aguda de la infección por el VIH	17
1.8 Fase crónica de la infección por el VIH	18
1.9 Fase de SIDA	19
1.10 Respuesta inmune innata	19
1.11 Respuesta inmune adaptativa	20
1.12 Activación del linfocito T	22
1.13 Moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras, familia B7-CD28	24
1.14 Estructura de PD-1, PD-L1 y PD-L2	25
1.15 Expresión de PD-1 y sus ligandos	27
1.16 Moléculas que inducen la expresión de PD-1 y sus ligandos	28
1.17 Interacción de la vía PD-1 y sus ligandos	28
1.18 Expresión de PD-1 en infecciones virales crónicas	31
2 Antecedentes	33
2.1 Factores virales que inducen la expresión de PD-1	33
3 Hipótesis	34
4 Objetivos	34
4.1 Objetivos generales	34
4.2 Objetivos específicos	34
5 Metodología	35
5.1 Muestras de estudio	35
5.2 Separación de CMSP	35
5.3 Generación de cultivos virales	35
5.4 ELISA para detección de la proteína p24 del VIH	37
5.5 Determinación de la TCID50 del VIH	38
5.6 Determinación de la expresión de PD-1 y sus ligandos en linfocitos T de sangre periférica	42
5.7 Determinación de carga viral (CV)	45
5.8 Obtención de células CD4+ a partir de CMSP totales	45
5.9 Infección de CMSP y células CD4+ puras con los virus SF33 y SF162	47

5.10 Seguimiento de la expresión de PD-1 y sus ligandos inducida por los virus SF33 y SF162	47
5.11 Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células TCD4+ puras	47
5.12 Análisis estadísticos	48
6 Resultados	49
6.1 Expresión de PD-1 y sus ligandos inducida en células T CD4+ por la infección con el VIH	49
6.2 Expresión de PD-1 y sus ligandos en células T CD4+ y T CD8+ de CMSP infectadas	53
6.3 Cinética de expresión de PD-1 y sus ligandos en linfocitos T CD4+ y T CD8+ de CMSP infectadas con los virus SF33 y SF162	56
6.4 Correlación de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ y T CD8+ con la cantidad de VIH	60
7 Discusión	62
8 Conclusiones	68
9 Perspectivas	68
10 Referencias	69

Índice de Figuras

Figura 1. Prevalencia global de infecciones por el VIH	7
Figura 2. Estructura del VIH	9
Figura 3. Genoma del VIH	12
Figura 4. Ciclo de replicación del VIH	14
Figura 5. Historia natural de la infección por el VIH	17
Figura 6. Mecanismo de activación e inhibición de un linfocito T naïve	23
Figura 7. Familia de receptores y ligandos B7/CD28	25
Figura 8. Representación de la estructura de PD-1, PD-L1 y PD-L2	26
Figura 9. Expresión de PD-1 y sus ligandos	27
Figura 10. Señalización de la vía PD-1 al activarse por sus ligandos	30
Figura 11. Pérdida de las funciones de los linfocitos T en la infección por el VIH	32
Figura 12. Esquema que ejemplifica las diluciones realizadas para la determinación. del valor de la TCID50	39
Figura 13. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de citometría en células T CD4+ expuestas al VIH	50
Figura 14. Cinética de producción del virus SF33 en el sobrenadante de los cultivos de células T CD4+ infectadas con el VIH	51
Figura 15. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ infectadas	52
Figura 16. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de citometría de flujo de las células T CD4+ y T CD8+ a partir de CMSP.....	54
Figura 17. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ al día 7 después de la infección con el VIH	55
Figura 18. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD8+ al día 7 después de la infección con el VIH	55
Figura 19. Cinética de expresión <i>in vitro</i> de PD-1 y de sus ligandos en células T CD4+ y T CD8+ infectadas	57
Figura 20. Cinética de crecimiento de los virus SF33 y SF162 en células CMSP	60
Figura 21. Correlación de la expresión de PD-1 y de sus ligandos con la CV	61
Figura 22. Diferencias en la expresión de PD-1 y de sus ligandos en las células T CD4+	63
Figura 23. Posibles escenarios que favorecen la inducción de la expresión de PD-1 y sus ligandos	67

Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas del VIH	9
Tabla 2. Ejemplo representativo de los datos obtenidos al final del ensayo de la TCID50	41
Tabla 3. Ejemplo representativo de la realización de la muestra problema y controles de FMO	44
Tabla 4. IMF de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ purificadas e infectadas	53
Tabla 5. IMF de la expresión de PD1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ sin VIH, en presencia del VIH (SF33 y SF162) y SEB	59
Tabla 6. IMF de la expresión de PD1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD8+ sin VIH, en presencia del VIH (SF33 y SF162) y SEB	59

1 Introducción

1.1 Epidemia de la infección por el VIH

La infección causada por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) ha representado un grave problema de salud pública a nivel mundial desde su identificación en el año de 1983 a la fecha (Rossouw *et al.*, 2011). El VIH es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El SIDA, la etapa final de la infección por el VIH, engloba a un conjunto de síntomas e infecciones oportunistas, resultado de la eliminación de las células del sistema inmune. La infección por el VIH se transmite principalmente a través del contacto sexual, mediante transmisión vertical (de madre a hijo) y vía sanguínea (por transfusión sanguínea o contacto accidental con sangre infectada).

El último reporte de ONUSIDA (UNAIDS, 2011) reporta un estimado de 34 millones de personas que viven con el VIH, un promedio de 2.6 millones de nuevas infecciones (2.3 millones - 2.8 millones), con un porcentaje de 1.8 % de prevalencia de adultos infectados entre 15 y 49 años de edad. La infección por el VIH ha causado más de 25 millones de muertes alrededor del mundo (Fig.1). En México el último reporte de CENSIDA (CENSIDA, 2011) estima que 149, 883 personas viven con el virus, del cual 28% son mujeres y 72% hombres, reporta un estimado al 2011 de 14,9883 casos acumulados por SIDA y una tasa de mortalidad 2009 por 100 mil habitantes del 4.8. Actualmente existen tratamientos que ayudan al control de la infección, disminuyen la cantidad de virus en sangre y permiten a las personas tener una mejor calidad de vida. Del 2001 al 2011 se ha incrementado el acceso al uso de antirretrovirales, por lo que actualmente 5 millones de personas alrededor del mundo reciben tratamiento basado en el uso de diferentes antirretrovirales. En México 37 mil personas tienen acceso a los antirretrovirales, lo que constituye el 24.6% del total de personas que viven con VIH en este país.

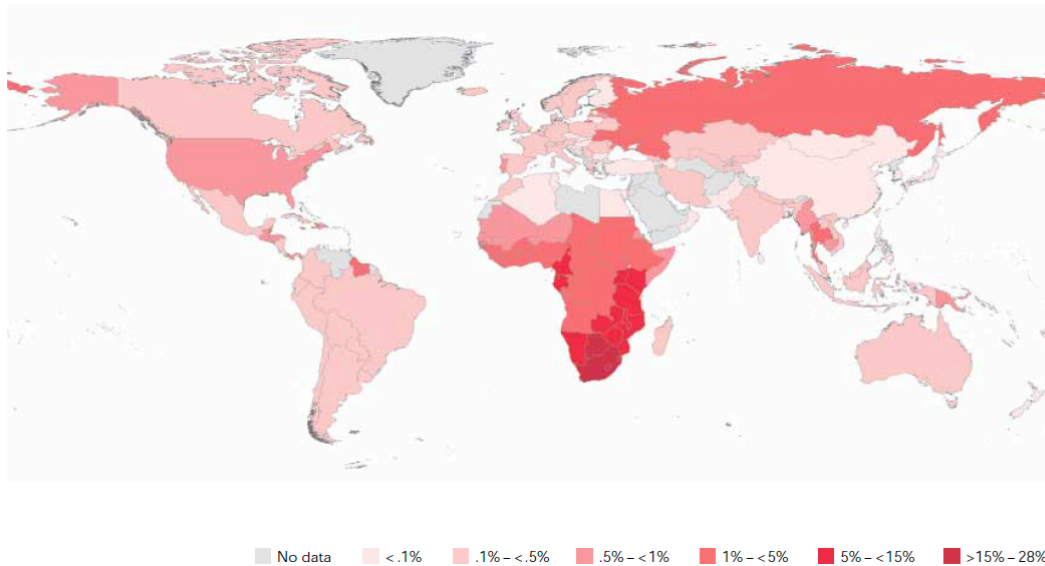


Fig.1 Prevalencia global de infecciones por el VIH en 2010. En tonalidades de rojo se muestra el porcentaje de infecciones por el VIH reportadas a nivel mundial. Las tonalidades más rojas representan los países con mayor porcentaje de infecciones (UNAIDS, 2011).

Actualmente se han descrito dos principales tipos de VIH: el VIH-1, aislado por primera vez en 1983, relacionado filogenéticamente con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) y cuyo huésped natural es el Rhesus macaco (*Macaco mulatta*) y, el VIH-2, aislado en 1986 (Clavel *et al.*, 1986) y relacionado filogenéticamente con el VIS del mono verde (*Sooty mongabey*) (Chen *et al.*, 1996). La distribución del VIH-1 es global, mientras que el VIH-2 se encuentra restringido a ciertas zonas de África subsahariana y es menos patogénico.

El VIH-1 se subdivide en tres grupos principales: M, N y O, clasificados por las diferencias genómicas que presentan, siendo el grupo M el virus más distribuido alrededor del mundo y causante de la mayoría de las infecciones a nivel mundial.

El grupo M tiene 9 subtipos o clados: A-D, F-H, J y K. Los clados más representativos son el B y C. El virus clado B se distribuye en América, Europa y Australia, siendo la forma de virus circulante más común en estas poblaciones. El clado C se distribuye en poblaciones del sur de África (McCutchan, 2000). En México, el tipo más predominante es el VIH-1, grupo M, subtipo B (Avila-Rios *et al.*, 2009).

1.2 Estructura del VIH

El VIH se clasifica taxonómicamente en la subfamilia *Lentiviridae*, familia *Retroviridae*, dentro del grupo VI (virus ARN monocatenario retrotranscrito) en la clasificación de Baltimore (Roizman B, 1996). Las partículas de VIH tienen un tamaño aproximado de 100-200nm de diámetro. Se encuentran cubiertas por una membrana o envoltura de lípidos proveniente de la célula infectada y en la cual se encuentran inmersas dos glicoproteínas de superficie: la proteína gp120, localizada en la superficie externa de la membrana viral y la proteína gp41. En la parte interior del virus se encuentra la matriz que es una estructura constituida por varias moléculas de la proteína p17 y que proporciona estructura y estabilidad al virus. Dentro de la matriz se encuentra la cápside, compuesta principalmente por la proteína p24 y que contiene un núcleo con forma cónica que alberga a dos cadenas de ácido ribonucleico (ARN) con polaridad positiva, a las nucleoproteínas p7, p6 y a las enzimas p32 (integrasa), p11 (proteasa) y p66 (transcriptasa reversa) (Fig.2).

Tabla. 1 Proteínas del VIH (Yabar, 2003)

Nombre	Tamaño	Función	Localización
Gag MA	P17	Anclaje a la membrana, interacción con env, transporte nuclear del core viral (proteína miristilada)	Virión
CA	P24	Forma la cápside central	Virión
NC	P7	Forma la nucleocápside, se une al ARN	Virión
Proteasa (PR)	P6	Une proteínas Vpr	Virión
Transcriptasa Reverasa (TR)	P15	Escisión de gag/pol y maduración	Virión
ARNasa H	p66, p51	Transcripción reversa	Virión
Integrasa (IN)	Heterodímero p31	Actividad ARNasa H	Virión
Integrasa (IN)	p31	Integración del provirus al ADN del hospedero	Virión
Env	gp120/gp41	Glicoproteínas virales externas que se unen al receptor CD4 y coreceptores de quimiocina	Membrana plasmática, envoltura del virión
Tat	p16/p14	Transactivador transcripcional viral	Inicialmente en el nucleolo y núcleo
Rev	p19	Transporte de ARN, estabilidad y factor de utilización (fosfoproteína)	Inicialmente en e nucleolo y núcleo y después entre el núcleo y el citoplasma
Vif	p23	Promueve la maduración del virión y la infectividad	Citoplasma (citósol, membranas), virión
Vpr	p10-15	Promueve la localización nuclear de complejos de preintegración, inhibe la división celular, arresta células infectadas a las fases de crecimiento G2/M	Virión, núcleo (posiblemente en la membrana del núcleo)
Vpu	p16	Promueve la liberación extracelular de partículas virales, degrada CD4 en el retículo endoplasmático,	Proteína de membrana integral
Nef	p27-p25	Ocasiona baja regulación en CD4 y MHC I	Membrana plasmática, citoplasma (no se sabe si localiza también en el virión)
Vpx	p12-16	Homólogo a Vpr. No se encuentra en VIH-1 pero sí en VIH-2 y SIV (Síndrome de inmunodeficiencia del simio)	Virión, posiblemente en el núcleo.
Tev	p28	Proteína tripartita tat-env-rev	Inicialmente en el núcleo y nucleolo

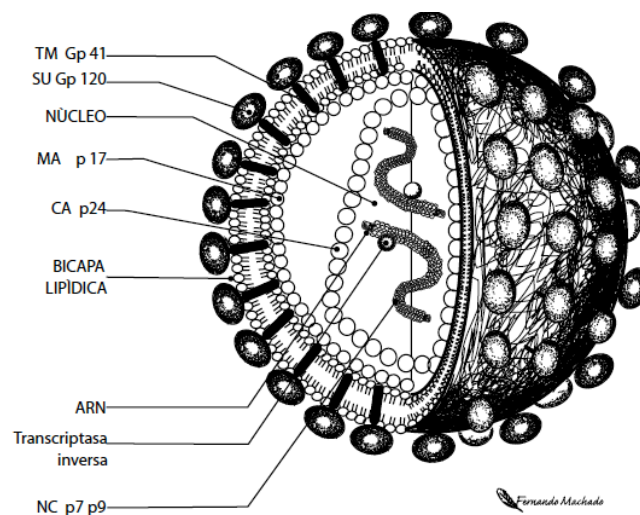


Fig.2 Estructura del VIH. Esquema general que muestra la estructura del VIH, las proteínas que lo conforman y las cadenas de ARN (Sudharshan y Biswas, 2008).

1.3 Genoma y productos génicos del VIH

El genoma del VIH se constituye de dos cadenas de ARN con una extensión de 9.8 kb. Su estructura genómica es característica de la mayoría de los lentivirus (Fig. 3). Contiene secuencias largas de nucleótidos o LTR (por sus siglas en inglés: long terminal repeat) que circunscriben al genoma viral, con sitios de unión a factores de transcripción como NFAT-2, NF- κ B y SP-1, así como un potenciador (“enhancer”) y un promotor para el inicio de la replicación del virus. Los genes virales *gag*, *pol* y *env* codifican para nueve proteínas que normalmente se clasifican en tres grupos: proteínas estructurales, proteínas reguladoras y proteínas accesorias (Greene y Peterlin, 2002). Estas proteínas forman en conjunto a las partículas virales, participan en procesos de regulación de la transcripción del virus, pueden incrementar la capacidad infectiva del VIH y participan en el proceso de integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera (Frankel y Young, 1998).

La región genómica del gen *Gag* codifica para proteínas que forman el esqueleto del virus, estas proteínas tienen como precursor a la proteína p55, la cual es procesada por la proteasa del VIH en las proteínas: p17, componente estructural que forma la matriz del virus; p24, formadora de la cápside y en las proteínas p7 y p6 que conforman la nucleocápside.

El gen *pol* codifica a las proteínas enzimáticas del virus. La proteína p11, un homodímero encargado de cortar los polipéptidos durante la maduración viral. La proteína integrasa que permite la unión del ADN proviral con el ADN celular mediante múltiples actividades enzimáticas: 1) actividad de exonucleasa, permite la eliminación de un par de nucleótidos terminales en el extremo 3' del ADN viral; 2) actividad de endonucleasa, permite el corte de ADN de la célula en el sitio donde es incorporado el ADN viral y 3) ligasa, permite la unión covalente de cada extremo del ADN proviral con el ADN celular. La proteína transcriptasa reversa tiene actividad de polimerasa del ADN dependiente de ARN, la cual degrada la cadena de ARN viral una vez que el ADN viral ha sido formado. (Bushman *et al.*, 1990).

La región genómica Env es transcrita y traducida como una proteína de 160 kDa (también llamada gp160) que, posteriormente, es proteolizada y procesada, dando como resultado a la glicoproteína de superficie gp120 y a la proteína transmembranal gp41. La unión en trímeros de gp120 y gp41, permite la interacción con el receptor CD4 y con co-receptores o receptores de quimiocinas como CCR5 ó CXCR4, presentes en las células susceptibles de ser infectadas.

La proteína transactivadora de la expresión génica del VIH (Tat), actúa mediante la unión a la secuencia de transactivación viral (TAR). La unión de Tat con su elemento TAR activa e incrementa la transcripción de los genes del VIH (Ruben *et al.*, 1989). Rev es otro factor regulador de la expresión del VIH-1, actúa mediante su unión con los elementos RRE (elemento de respuesta de Rev) y facilita el transporte del ARN sin modificaciones (“splicing”) del núcleo hacia el citoplasma (Malim *et al.*, 1989). RRE es una molécula de ARN codificada dentro de la región Env, está constituida por aproximadamente 200 nucleótidos localizados en la posición 7327 y abarca el borde de las proteínas gp120 y gp41. Este elemento es necesario para el funcionamiento mediante una unión de gran afinidad con Rev. La proteína accesoria Nef de aproximadamente 27 kDa se encuentra asociada a la cara citoplasmática de la membrana celular, se han descrito varias funciones para esta proteína. Disminuye la expresión de la molécula CD4 en la superficie de células infectadas, favoreciendo su endocitosis y degradación en los lisosomas (Lindwasser *et al.*, 2007). Nef también disminuye la expresión de moléculas HLA de clase I, específicamente HLA-A/B (Chen *et al.*, 1996). Así mismo, se le ha asociado con la disminución del complejo TCR-CD3 en la membrana celular (Thoulouze *et al.*, 2006).

La proteína Vpr tiene la habilidad de inhibir el ciclo celular en la fase G2, promueve la localización del complejo de preintegración en el núcleo de la célula (Zimmerman *et al.*, 2004). Vpu es una proteína integral de la membrana viral de 81 aminoácidos, interactúa con el receptor CD4 en el retículo endoplásmico (RE) y reduce la expresión de esta molécula (Binette *et al.*, 2007). De manera importante Vpu favorece la

liberación de los viriones de las células infectadas (Schubert *et al.*, 1996). La proteína Vif tiene un peso de 23 kDa compuesta por 192 aminoácidos, tiene la capacidad de inhibir la actividad de ciertos factores celulares como APOBEC3G (A3G) que de forma natural bloquean la replicación del VIH (Mercenne *et al.*, 2010).

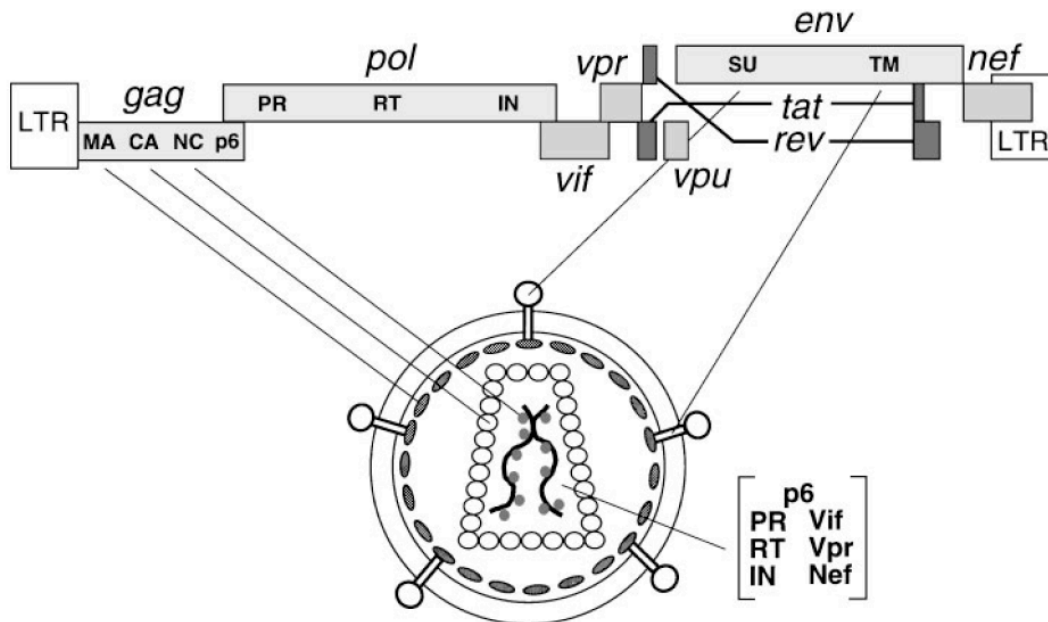


Fig. 3 Genoma del VIH. Esquema que muestra el genoma del VIH (Frankel y Young, 1998).

1.4 Ciclo de replicación del VIH

El ciclo de replicación del VIH se divide para su estudio en dos fases, la fase temprana y la fase tardía. Estas fases abarcan el proceso de interacción entre la célula blanco y el virión maduro, así como la formación y liberación de nuevos viriones. En la fase temprana, las partículas de VIH se unen específicamente a las células que portan el receptor CD4 en la superficie de su membrana (células T CD4+, monocitos, macrófagos y células dendríticas). Esta interacción ocurre por contacto entre la glicoproteína de superficie gp120 y el dominio amino terminal en el receptor CD4. La unión ocasiona cambios conformacionales en la proteína gp120 que, a su vez, permite la exposición de la proteína gp41 y como consecuencia permite su unión con el receptor de quimiocinas CCR5 ó CXCR4. Esto favorece la fusión de la membrana viral

con la membrana de la célula para la internalización del virión, iniciando el proceso de infección en la célula hospedera (Moore, 1997).

Una vez que el virus se ha internalizado dentro de la célula, se lleva a cabo el desensamble y degradación de la nucleocápside, así el ARN viral junto con las proteínas inician el proceso de retrotranscripción.

La conversión de una molécula de ARN de cadena sencilla a una hebra de ADN de cadena doble es catalizada en el citosol por la enzima transcriptasa reversa. Una vez sintetizado el ADN viral, este es transportado hacia el núcleo de la célula junto con otras proteínas virales que incluyen a las proteínas: integrasa, p17, RT y Vpr, así como proteínas del citoesqueleto, formando el complejo de preintegración (Zhan *et al.*, 2010) que dirige el genoma viral al núcleo. Después, el ADN viral es integrado al genoma de la célula hospedera por la actividad catalítica de la integrasa. Se desconocen exactamente los sitios de integración del virus en el genoma de la célula infectada, se ha reportado que el virus se integra preferencialmente en regiones de alta expresión de genes donde la cromatina es más laxa (Soto *et al.*, 2010) sin embargo, se considera que estos mecanismos pueden ser estocásticos.

Debido a las características del VIH, el virus tiene la capacidad de integrarse dentro del genoma de la célula y permanecer en estado de latencia (no expresión génica) por un periodo de tiempo prolongado, mecanismo que permite la formación de reservorios virales en las células infectadas (Shan *et al.*, 2011). La culminación del proceso de integración del virus en el genoma de la célula marca el final de la fase temprana del ciclo de replicación.

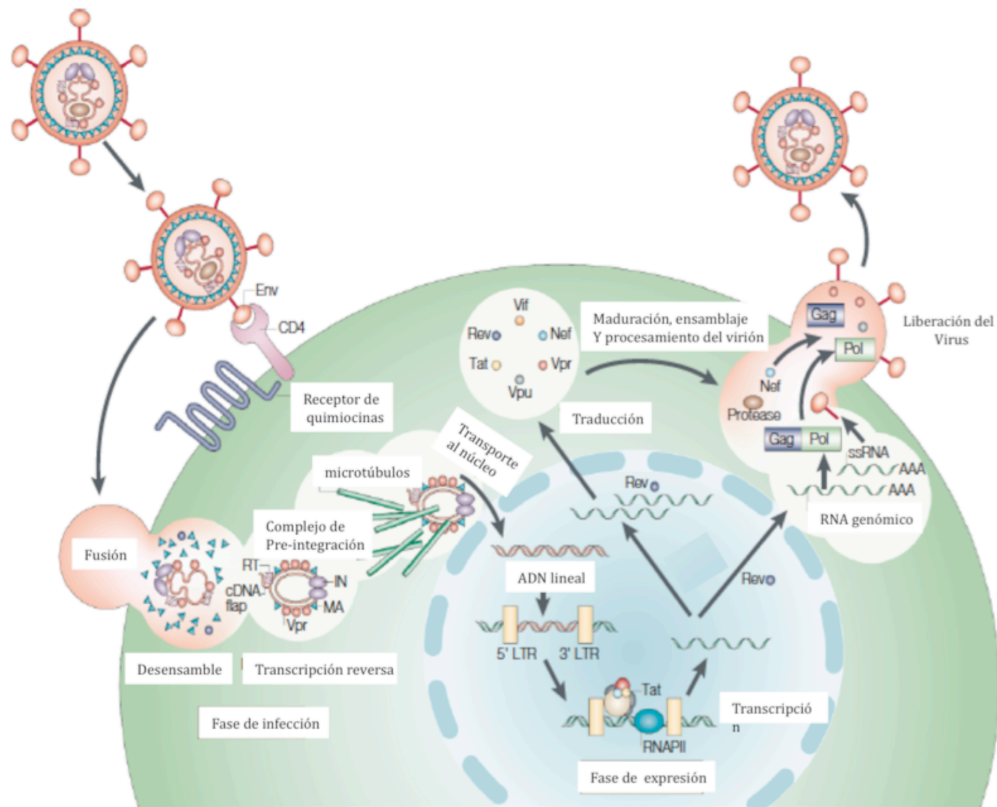


Fig.4. Ciclo de replicación del VIH, modificado de (Peterlin y Trono, 2003).

La fase tardía comienza con la unión de factores de transcripción en la región LTR del virus, esto favorece la síntesis de transcritos virales en forma de ARNm, los cuales son transportados fuera del núcleo para su posterior traducción.

Las proteínas virales Tat y Rev, son las encargadas de regular los eventos transcripcionales y pos-transcripcionales de los productos virales. En la etapa final del ciclo de replicación ocurre el ensamblaje del virión, las dos copias de ARN de cadena sencilla que se generaron, junto con los productos de los genes *gag* y *pol* se ensamblan para formar la estructura del virus. Posteriormente son dirigidos hacia la membrana celular, donde las proteínas gp120 y gp41, productos del gen *env*, están inmersas. Durante la maduración del virión, la enzima proteasa corta específicamente cada poliproteína para formar a las proteínas virales p24, p17, p7 y p6. En la mayoría de los casos el VIH maduro, es capaz de infectar a otras células y comenzar nuevamente su ciclo de replicación. No todos los virus que se producen durante el ciclo de

replicación tienen la capacidad de generar una infección exitosa, por tanto, el proceso de infección se puede separar en dos tipos: infección productiva e infección abortiva. Una infección exitosa o productiva es una infección en donde el virus tiene la capacidad de adentrarse en la célula, integrarse, expresarse y generar nuevos viriones. En contraste, en una infección no exitosa o abortiva, el virus tiene la capacidad de entrar en la célula pero no puede llevar a cabo todos los demás pasos del ciclo de replicación viral (Fig. 4).

1.5 Tropismo Viral

El tropismo viral se puede definir como la capacidad que tiene un virus para infectar de forma específica a un tipo celular. En la mayoría de los casos el tropismo es determinado en parte por las proteínas de superficie que presenta una célula y por las características estructurales del virus (Gorry y Ancuta, 2011). Para iniciar la infección, el VIH interactúa con el receptor CD4 y también con los receptores de quimiocinas CCR5 ó CXCR4, principalmente. En base a estas características, las células que expresan estos receptores o co-receptores, como las células dendríticas (Harman *et al.*, 2011), los monocitos/macrófagos (Benaroch *et al.*, 2010), los linfocitos T CD4+ (Mariani *et al.*, 2011), las células precursoras hematopoyéticas (Carter *et al.*, 2011) y algunas poblaciones de células NK (Bernstein *et al.*, 2009), son células susceptibles a ser infectadas.

El tropismo del VIH se basa en la capacidad del virus para reconocer al receptor CCR5 ó al receptor CXCR4 y es determinado por la región V3 de la proteína de envoltura gp120. Un cambio en la secuencia de la región V3 determina la afinidad para interactuar con los receptores de la superficie celular, favoreciendo así que el virus tenga tropismo CCR5 ó CXCR4 (Yuan *et al.*, 2011). Un virus con tropismo CCR5 infectará preferentemente a monocitos/macrófagos y células dendríticas, así también y de manera menos eficiente a linfocitos T. Mientras que un virus con tropismo CXCR4

infectará principalmente a linfocitos T CD4+ que expresen dicho receptor de quimiocinas (Cecilia *et al.*, 1998).

Se ha reportado que, durante la fase temprana de la infección por el VIH, los virus tienen preferencialmente tropismo para CCR5 y, conforme se desarrolla la infección, ocurre un cambio en el tropismo del virus a CXCR4 (Mild *et al.*, 2010). Este cambio en el tropismo se relaciona con una mayor eliminación de las células T CD4+ y con una progresión rápida a la fase de SIDA (Cavarelli y Scarlatti, 2009). Estudios *in vitro* demuestran que los virus que son CXCR4 tienen la capacidad de formar de sincicios (Chakrabarti *et al.*, 2002), son más patogénicos, debido a que tienen una mayor capacidad citopática, lo que favorece la eliminación de las células infectadas. La patogenicidad del virus también depende de la vía de contagio, los virus transmitidos por sangre tienden a ser CXCR4, mientras que los virus transmitidos por mucosas son preferentemente CCR5 (Hughes y Nelson, 2009).

1.6 Historia Natural de la Infección por el VIH

La historia natural de la infección por el VIH abarca una serie de cambios y procesos fisiológicos que ocurren en una persona infectada, producto de la interacción del virus con el hospedero. En base al número de linfocitos T CD4+ y a la cantidad de virus en sangre (carga viral), la historia natural de la infección por el VIH se divide en tres etapas: la etapa aguda, la etapa crónica y la etapa de SIDA (Fig. 5).

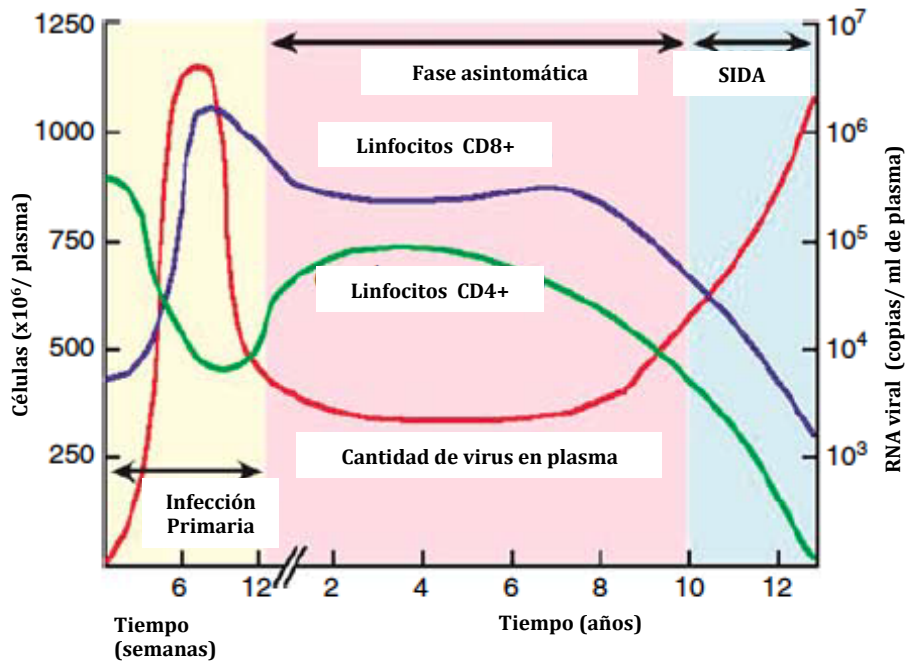


Fig.5 Historia natural de la infección por el VIH. Esquema que muestra las tres etapas en las que se divide la historia natural de la infección, basado en la cantidad de linfocitos T CD4+ y en la cantidad de virus en sangre. Modificado de (Forsman y Weiss, 2008).

1.7 Fase Aguda de la infección por el VIH

La fase aguda inicia con la transmisión de un virus fundador al hospedero (virus que da lugar a las cuasiespecies virales en un individuo infectado) (Keele *et al.*, 2008). Después de la transmisión del virus, hay un periodo de aproximadamente 10 días conocido como la fase eclipse, en la cual el ARN viral permanece indetectable en plasma (Nelson *et al.*, 2001). Al final de esta fase, el virus proveniente de las células infectadas alcanza los nódulos linfáticos, donde infecta a células T CD4+CCR5+ activadas (Koup *et al.*, 1994).

Durante la tercer semana y aproximadamente hasta la sexta semana después de la infección, se puede presentar un conjunto de síntomas conocido como síndrome retroviral agudo, caracterizado por dolor de cabeza, fiebre, dolor muscular, fatiga, diarrea, náuseas, entre otros, y suele presentarse en un 50% a un 70% de los adultos infectados (Pilcher *et al.*, 2004). Durante la fase aguda el virus se dispersa y replica rápidamente alcanzando los órganos linfoides, de manera particular al tejido linfoide

asociado a mucosas (GALT), donde hay un gran número de linfocitos T CD4+CCR5+ de memoria, los cuales son infectados y favorecen la producción de nuevos virus. Al final de la tercer o cuarta semana de iniciada la infección, el 20 % de estos linfocitos están activados y el 60% de los linfocitos T CD4+ presentes en GALT que no están infectados llegan a estarlo o mueren vía apoptosis (Veazey *et al.*, 1998). Mientras el virus replica en GALT y en otros tejidos linfoides, la cantidad de virus en plasma aumenta exponencialmente entre la semana 3-4 de infección, hasta llegar a un pico de replicación (usualmente de más de 1 millón de copias de ARN por mililitro de sangre; (Borrow *et al.*, 1994).

La respuesta inmunológica temprana contra el virus inicia en los primeros días de infección, días en los que aparece la respuesta de células NK y la activación de células dendríticas, semanas después a la infección se detecta la presencia de anticuerpos específicos para las proteínas de superficie del virus, para finalmente iniciar con la respuesta adaptativa específica de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (Alter *et al.*, 2007). La aparición de los linfocitos T CD8+ específicos para el VIH, se relaciona con una disminución de la carga viral y con la recuperación parcial en la cantidad de células T CD4+ en sangre (Jin *et al.*, 1999). Posterior a esto, se llega a un punto de equilibrio entre la cantidad de células T CD4+ y la carga viral presente en sangre, conocido como punto de equilibrio o “set point” (Kaul *et al.*, 2010). Este fenómeno inmunológico puede predecir la rapidez de la progresión de la infección por el VIH (Schacker *et al.*, 1998), un *set point* alto se asocia a una rápida progresión de la infección, mientras que un *set point* bajo se asocia con una lenta progresión a la fase de SIDA (McMichael *et al.*, 2010).

1.8 Fase crónica de la infección por el VIH

Después del periodo de infección aguda, comienza una fase de relativo equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmune del hospedero. El *set point* marca el inicio de la fase crónica, caracterizada por ser una etapa asintomática que puede durar en promedio 10 años sin un tratamiento oportuno (Kushnir y Lewis, 2011).

Durante este periodo clínicamente asintomático, la replicación del VIH continúa activamente, la carga viral aumenta gradualmente y el número de células T CD4+ en sangre y en tejidos linfoides disminuye de forma gradual hasta cantidades menores a 200 células/ μ l en sangre, alcanzando un grado de inmunodeficiencia importante y dando inicio a la fase de SIDA. (Brenchley *et al.*, 2004).

1.9 Fase de SIDA

En la fase de SIDA hay una baja considerable de linfocitos T CD4+ y una elevación progresiva de la cantidad de virus presente en plasma. En esta fase el abatimiento de las respuestas del sistema inmune es evidente y puede llevar al individuo infectado a desarrollar infecciones oportunistas como: Tuberculosis, *Pneumocystis jirovecii*, Cytomegalovirus, Cándida o Toxoplasma, entre otros. Éstos producen enfermedades, generalmente cuando la cantidad de células T CD4+ se encuentra por debajo de las 350 células/ μ l en sangre que en ausencia de tratamiento adecuado, pueden llevar a la muerte (Ponce de Leon Rosales y Rodriguez-Alvarez, 2010).

1.10 Respuesta inmune innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa durante la fase temprana de la infección por el VIH. Las células del sistema inmune innato: células NK (por sus siglas en inglés, natural killer) (Berger y Alter, 2011), monocitos (Collini *et al.*, 2010), células T gamma/delta (cT $\gamma\delta$) (Agrati *et al.*, 2011) y células dendríticas (CD) (Bordon, 2010) adquieren funciones efectoras. Posteriormente adquieren funciones reguladoras, con

capacidad de secretar citocinas como IL-2, IL-12, IL-4, IL-10, IL-15, IFN- γ , TNF- α e IFN α/β que ayudan al control de la infección (Lehner *et al.*, 2008).

Las células NK tienen un papel crítico en el control de las infecciones virales, son células con capacidad citotóxica que pueden eliminar a las células infectadas. Además, tienen la capacidad de secretar factores antivirales como IFN- γ , ayudando a la diferenciación de las células T CD4+ de tipo pro-inflamatorio o T_{H1}, también secretan TNF- α y GM-CSF y otras quimiocinas (Altfeld *et al.*, 2011).

Las células T $\gamma\delta$ (cT $\gamma\delta$) se localizan en las mucosas, generalmente no reconocen antígenos peptídicos presentados por moléculas HLA sino que interactúan directamente con antígenos no peptídicos o con proteínas de estrés celular o HSP (por sus siglas en inglés: *heat shock proteins*). Las cT $\gamma\delta$ producen citocinas tipo T_{H1} y T_{H2}, además lisan células blanco infectadas por el VIS o el VIH. Estas células también generan factores antivirales como RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β que se unen al co-receptor del virus CCR5, disminuyendo su expresión (Kabelitz y Wesch, 2001).

Las CD expresan receptores como DC-SIGN, CXCR4, CCR5 o CCR7 que, entre otras funciones, favorecen su migración hacia nódulos linfáticos. Se ha propuesto que también pueden dispersar el VIH ya que éste puede unirse a algunas de estas proteínas y, cuando las CD interactúa con otras células T CD4+, favorece su infección. Las CD son importantes como mediadoras del reconocimiento de antígenos y la activación de respuestas innatas y adaptativas mediante la secreción de citocinas como IL-7, IL-1, TNF- α e IL-12 (Cunningham *et al.*, 2010).

1.11 Respuesta inmune adaptativa

Como se mencionó anteriormente, la primera respuesta del organismo contra una infección es dada por las células del sistema inmune innato. Semanas posteriores a la infección, el organismo desarrolla la respuesta inmune adaptativa que está conformada por componentes celulares como: células B, células T CD4+, T CD8+ y por componentes solubles como anticuerpos específicos (producidos por las células B).

Las células T CD8+, también llamados linfocitos T citotóxicos (LTC) son un componente esencial en una respuesta inmune efectiva contra infecciones antivirales, se localizan en una gran variedad de compartimentos anatómicos: sangre periférica, espacios bronqueo alveolares, nódulos linfáticos, bazo, piel, fluido cerebroespinal, semen, mucosa vaginal y gastrointestinal (Freel *et al.*, 2011). Las células T CD8+ se activan a través del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés), cuando reconoce al antígeno en el contexto del complejo antígeno-HLA de clase I de la célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés). La activación del TCR desencadena sus funciones efectoras que pueden dividirse en tres principales mecanismos: la producción de IFN γ , la lisis de células infectadas vía interacción Fas-FasL ó la lisis de células mediante la secreción del contenido de gránulos citotóxicos cargados con granzima y perforina (Freel *et al.*, 2011).

Los linfocitos T CD4+ representan el 50-60% de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en un individuo sano. Se encuentran en sangre periférica, nódulos linfoides y mucosas y su activación se inicia posterior al reconocimiento del antígeno presentado por el HLA clase II. Las células T CD4+ tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, pueden estimular a células B, células T CD8+, CD, monocitos y células NK mediante la secreción de citocinas y factores antivirales como IL-4, IL10, IL-2, IFN γ y TGF- β que ayudan a direccionar una respuesta antigénica a ser de tipo pro- inflamatoria o de tipo anti-inflamatoria (Sakaguchi, 2011). Estas células

secretan IL-12, crucial para la iniciación de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos (McMichael y Rowland-Jones, 2001). Además, se ha demostrado que, en ausencia de los linfocitos T CD4+, la función citotóxica por parte de los linfocitos T CD8+ se ve afectada (Gandhi y Walker, 2002).

1.12 Activación del linfocito T

De acuerdo al modelo propuesto para explicar el proceso de activación de un linfocito T (Lafferty y Cunningham, 1975), para que la activación sea eficiente se requieren tres señales principales: la primera señal, se encarga de dar la especificidad a la respuesta inmune y está dada por la interacción HLA-péptido con el TCR, la segunda señal es proporcionada por la interacción de moléculas co-estimuladoras B7/CD28 y la tercera está basada en la estimulación por citocinas (Fig. 6).

Para que un linfocito T se active de forma específica, se requiere que una célula presentadora de antígeno reconozca al patógeno, lo fagocite, procese y presente el péptido unido a una molécula de HLA en la superficie de su membrana celular. Este péptido-HLA tiene que ser reconocido por el receptor del linfocito T específico, de tal manera que este desencadene una señal intracelular mediada por el TCR (Dustin *et al.*, 2010). De manera adicional a esta primera señal, se requiere de una señal co-estimuladora (señal positiva) proporcionada por proteínas que pertenecen a la familia B7/CD28 como CD80, CD86, CD28, B7, entre otras (Petroff y Perchellet, 2010). La tercer señal es proporcionada por la estimulación de citocinas, principalmente IL-2, la cual se encarga de inducir proliferación celular.

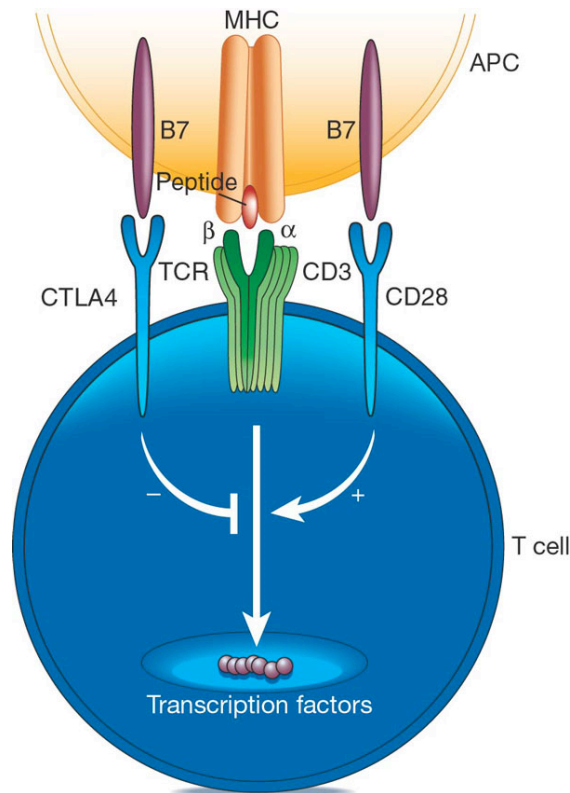


Fig. 6. Mecanismo de activación e inhibición de un linfocito T naïve (Frederick y Clayman, 2001)

La activación correcta del linfocito T permite que éste proliferare, se expanda clonalmente y ejerza sus funciones efectoras, tales como la secreción de citocinas ó la acción citotóxica. Sin la presencia de una segunda señal la activación no se lleva a cabo de manera adecuada y el linfocito T se vuelve anérgico (Lutz y Kurts, 2009).

Así como existen moléculas co-estimuladoras también existen moléculas co-inhibidoras (señal negativa), que son proteínas que pueden tener un efecto negativo sobre la activación de un linfocito T, actuando sobre la señalización del TCR (Khaitan y Unutmaz, 2011). Generalmente estas señales negativas son proporcionadas una vez que el antígeno ha sido eliminado, sin embargo también se han implicado en procesos de tolerancia inmunológica y mecanismos autoinmunes (Thangavelu *et al.*, 2011).

Esta segunda señal negativa modula la respuesta cuando la infección por un patógeno ha cesado, impidiendo que el linfocito T cause daños al organismo. En el contexto de una estimulación crónica y en especial en el de una infección crónica viral como la

infección por el VIH, el papel de las moléculas co-inhibidoras es decisivo para el futuro de la respuesta de las células T, como se describirá en los apartados siguientes.

1.13 Moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras, familia B7-CD28

Una molécula co-estimuladora se define como aquella molécula de superficie que, por sí sola, no es capaz de activar funcionalmente a las células T pero es capaz de amplificar o reducir de manera significativa la señalización inducida por el complejo TCR. Las moléculas de co-estimulación son glicoproteínas esenciales para la comunicación de los linfocitos T con el resto de las células del sistema inmune (Seliger *et al.*, 2008). Los miembros de la familia B7 tienen la habilidad de regular el destino del linfocito T y su función es crucial para la activación y en prevención de tolerancia inmune (Fig. 7). Las moléculas co-estimuladoras que han sido mejor caracterizadas en esta familia son CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) (Lombardi *et al.*, 2010). Una característica importante de las moléculas de esta familia es su capacidad dual para proveer señales co-estimuladoras y co-inhibidoras, función que depende del sitio de unión y del tipo de receptor al que se unan. CD80 y CD86 por ejemplo, se expresan en células presentadoras de antígeno y pueden interaccionar con el receptor CD28 presente en el linfocito T y estimular a la célula T, sin embargo también pueden interactuar con CTLA-4 (también llamado CD152) e inhibir la señalización del complejo TCR y de CD28 (Kaufmann y Walker, 2009).

Otras proteínas que pertenecen a esta familia son PD-L1 (por sus siglas en inglés Programmed cell death 1 ligand 1 o CD274) y PD-L2 (por sus siglas en inglés Programmed cell death 1 ligand 2 o CD273), las cuales se unen a su receptor llamado PD-1 (por sus siglas en inglés Programmed cell death 1, también llamado PDCD1 o CD279).

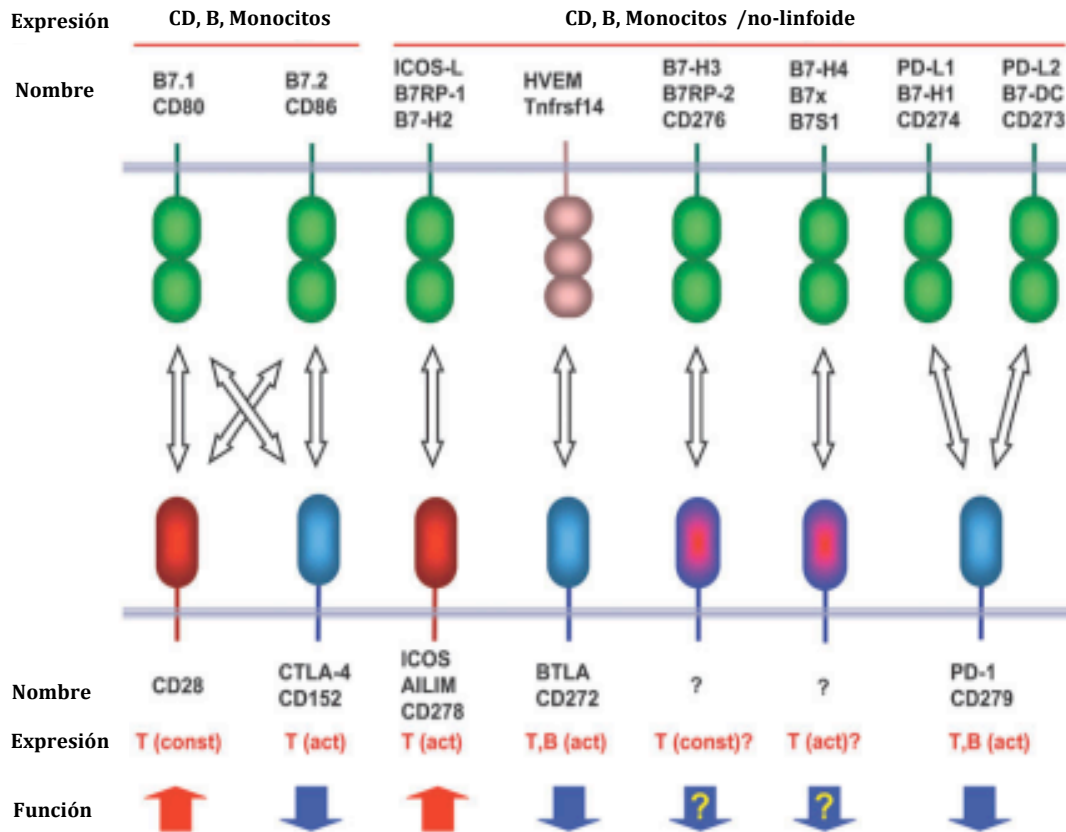


Fig. 7. Familia de receptores y ligandos B7/CD28. Esquema que muestra los ligandos y receptores que integran esta familia, su expresión en varios tipos celulares y sus posibles interacciones. Modificado de (Greenwald *et al.*, 2005).

1.14 Estructura de PD-1, PD-L1 y PD-L2

PD-1 es una molécula inhibidora, un importante regulador negativo de la activación de las células T que participa en el mantenimiento de la tolerancia periférica. PD-1 fue aislado como una proteína que se sobre-expresaba en un hibridoma de células T que se encontraban en proceso de apoptosis (Ishida *et al.*, 2002). PD-1 es miembro de la súper familia de inmunoglobulinas, es una glicoproteína de membrana tipo 1 de 50-55 kDa, compuesta por 288 aa. Se compone de tres regiones protéicas: una región transmembranal, una región extracelular y una región citoplasmática. La región extracelular está compuesta de aproximadamente 144 aa, forma un dominio variable similar a inmunoglobulina (IgV-like), responsable de la unión con sus ligandos: PD-L1 (Dong *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2000) y PD-L2 (Tseng *et al.*, 2001; Latchman *et al.*,

2001). La región transmembranal está compuesta de 27 aa con dos pases transmembranales, uno se localiza en la mitad de la proteína, lo que permite su anclaje en la membrana celular y el otro se encuentra localizado en el extremo N terminal, actuando como péptido señal. La región citoplasmática está constituida de 94 aminoácidos, con dos motivos de tirosina, un motivo ITIM (por sus siglas en inglés immune-receptor tyrosine motif) y un motivo ITSM (por sus siglas en inglés, immune-receptor tyrosine based switch motif) (Ishida *et al.*, 2002). PD-1 tiene cuatro sitios potenciales a glicosilación, los aminoácidos 49, 58, 74 y 116 (Shinohara *et al.*, 1994). Esta proteína se encuentra en monómero en la superficie de las células, mientras que otros miembros como CTLA-4 e ICOS se encuentran como homodímeros (Finger *et al.*, 1997) (Fig. 8).

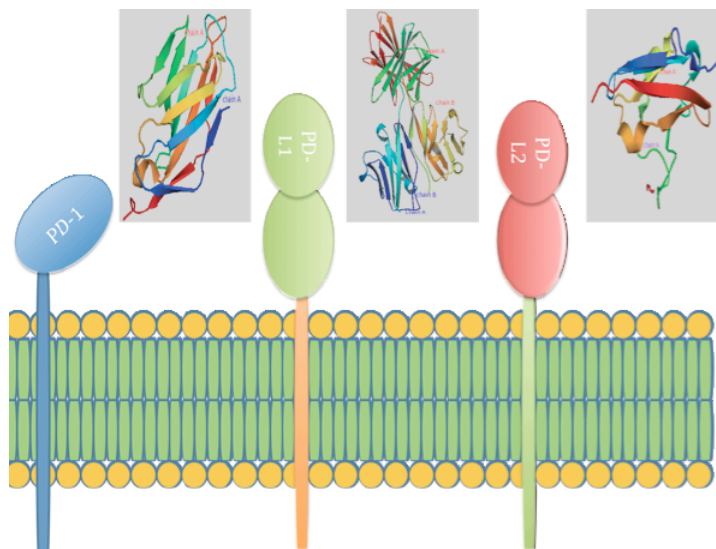


Fig.8. Representación de la estructura de PD-1, PD-L1 y PD-L2

PD-L1 es una glicoproteína de membrana tipo 1, compuesta de 229 aa, pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas con una región extracelular Ig-like tipo C2 y una región IgV-like compuesta de 122 aa, una región transmembranal de 21 aa hidrofóbicos y una región corta intracelular de 31 aa. PD-L1 tiene cuatro sitios potenciales de glicosilación en los aminoácidos 35, 92, 200 y 219 (Chen *et al.*, 2008) y cuatro uniones disulfuro en los aminoácidos 40, 114, 115 y 209 (Wang *et al.*, 2003).

PD-L2 es una proteína de membrana tipo 1 de 273 aa, pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, está compuesta por dos dominios extracelulares IgV-like e Ig-like tipo C2, una región transmembranal de 21 aa y una región intracelular corta de 32 aa (He *et al.*, 2004).

1.15 Expresión de PD-1 y sus ligandos

A diferencia de otros miembros de la familia B7/CD28 como CTLA-4 o CD28, PD-1 tiene un rango de expresión más amplio, se expresa en células B, monocitos, células NKT y en células T CD4+ y T CD8+ activadas, además de expresarse en células de tejidos no linfoides como las células del endotelio vascular (Fig. 9; Fife y Pauken, 2011). Se ha reportado la expresión de ARN mensajero de PD-1 en varios tejidos como corazón, hígado, pulmones y placenta, sin embargo no se ha encontrado la expresión superficial de la proteína en la membrana de estas células, por lo que se cree que esta expresión de ARN mensajero tiene otra función dentro de la célula (Jin *et al.*, 2010).

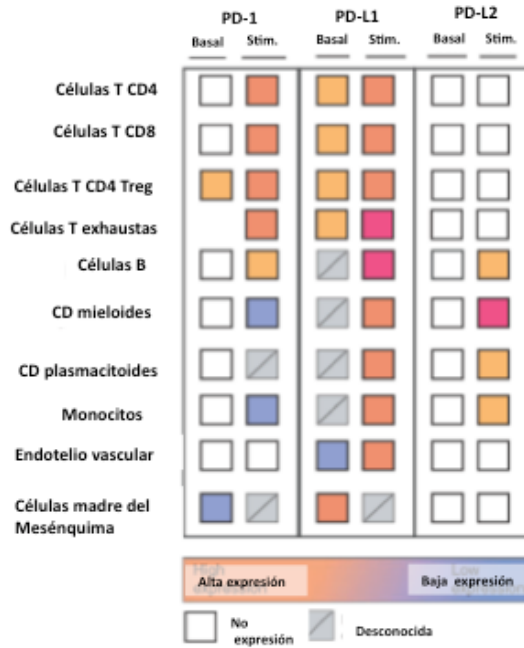


Fig. 9. Expresión de PD-1 y sus ligandos. Comparación de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células del sistema inmune no activadas y activadas. Modificado de (Francisco *et al.*, 2010).

PD-L1 se expresa fuertemente en células dendríticas convencionales, linfocitos T activados y células B. PD-L1 también se encuentra expresado en células de tejidos no linfoides como células de los islotes pancreáticos, keratinocitos, células de la microglía, células cardíacas y astrocitos (Liang *et al.*, 2003). La expresión de PD-L2 se encuentra restringida casi exclusivamente a células presentadoras de antígeno (Ishida *et al.*, 2002).

1.16 Moléculas que inducen la expresión de PD-1 y sus ligandos

Actualmente se ha empezado a conocer aspectos más generales de la regulación de la expresión de PD-1 y de sus ligandos. PD-1 es inducido en células T y en células B después de la activación del TCR y BCR respectivamente y su expresión permanece elevada ante una estimulación antigénica persistente (Watanabe *et al.*, 2010). Citocinas anti y pro-inflamatorias como IFN- α IL-10 y, principalmente, las citocinas de cadena gama IL-2, IL-7, IL-15 IL21 inducen la expresión de PD-1 y de PD-L1 a través

de una estimulación no específica en células T y monocitos (Thompson *et al.*, 2009) . PD-1 y PD-L1 también son inducidos en CD y monocitos tras la estimulación de los receptores TLR (por sus siglas en inglés: toll like receptor) intracelulares 7, 8 y 9 (Okazaki y Honjo, 2006). Se ha reportado que PD-L2 se induce tras la estimulación por las citocinas IL-4 e IL-13, GM-CSF e IFN- γ (Yamazaki *et al.*, 2002).

1.17 Interacción de la vía PD-1 y sus Ligandos

La función de PD-1 se encuentra muy caracterizada en células T, sin embargo, se ha reportado que PD-1 puede tener otra función en otros tipos celulares (Yao *et al.*, 2009) (Huang *et al.*, 2009). En los linfocitos T, PD-1 transmite una señal inhibitoria cuando se encuentra cerca del TCR o BCR (Chemnitz *et al.*, 2004; Agata *et al.*, 1996). Aunque PD-1 se induce rápidamente en células T después de su activación, los efectos de la interacción PD-1/PD-L1 se pueden registrar pocas horas después de iniciada esta interacción (Chemnitz *et al.*, 2004). La unión de PD-1 con alguno de sus dos ligandos bloquea la proliferación, producción de citocinas y función citotóxica, y hace susceptibles a las células ante estímulos apoptóticos (Riley, 2009). Se ha descrito que la magnitud de la inhibición de PD-1 depende de la fuerza de la señal del TCR, se ha reportado una correlación positiva entre una baja estimulación del TCR con una mayor inhibición de la célula T (Feinerman *et al.*, 2008). PD-1 inhibe directamente la función de la célula T y su sobrevivencia mediante el bloqueo temprano de la señal de activación del linfocito proporcionada por CD28 e IL-2. se ha documentado que una re-estimulación por CD28 ó IL-2 en la célula T puede revertir la inhibición mediada por la interacción de PD-1 con PD-L1 (Carter *et al.*, 2002), promoviendo la expansión clonal de la célula T mediante la estimulación de factores anti-apoptóticos, la estimulación del ciclo celular y mediante la expresión de genes de citocinas (Freeman *et al.*, 2006). La vía de señalización de PD-1 previene la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL, así como la expresión de factores de transcripción que se encuentran asociados

con las funciones efectoras de la célula T, como GATA-3, T-bet y Eomes (Nurieva *et al.*, 2006).

PD-1 inhibe la actividad de la PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa) y por lo tanto la señalización río abajo de Akt, factores clave para el transporte de glucosa y la glicólisis, alterando la bioenergética de la célula (Carter *et al.*, 2002). Esto explica en gran medida porqué IL-2 puede rescatar a la célula T de la inhibición de la vía PD-1 ya que IL-2 desencadena la activación de Akt mediante la activación de STAT5.

La unión de PD-1 con su ligando puede reducir la fosforilación de CD3 ζ , a la proteína ZAP 70 y la proteína cinasa Ch (PKCh), también inhibe la activación de Erk, con la excepción que el efecto último sobre Erk puede ser revertido mediante la estimulación de receptores de citocinas, particularmente por citocinas que activan a STAT5, como IL2, IL-7 e IL-15 (Bennett *et al.*, 2003).

Estudios que comparan las consecuencias funcionales del efecto de la inhibición de CTLA-4 y PD-1 con otros receptores inhibidores como CTLA-4 en las células T CD4⁺, revelan que PD-1 inhibe en mayor magnitud la activación de la célula T (Yamazaki *et al.*, 2005). La inhibición por CTLA-4 reduce el número de transcritos derivados de la activación de CD3 y CD28 en aproximadamente un 67%, mientras que la inhibición por la vía PD-1 reduce el número de transcritos en un 90%. Es importante mencionar que CTLA-4 induce la expresión del gen de supervivencia Bcl-xL, mientras que PD-1 no, lo que explica por qué la activación de PD-1 hace mas susceptible a la célula T a estímulos apoptóticos (Yamazaki *et al.*, 2005) (Fig.10).

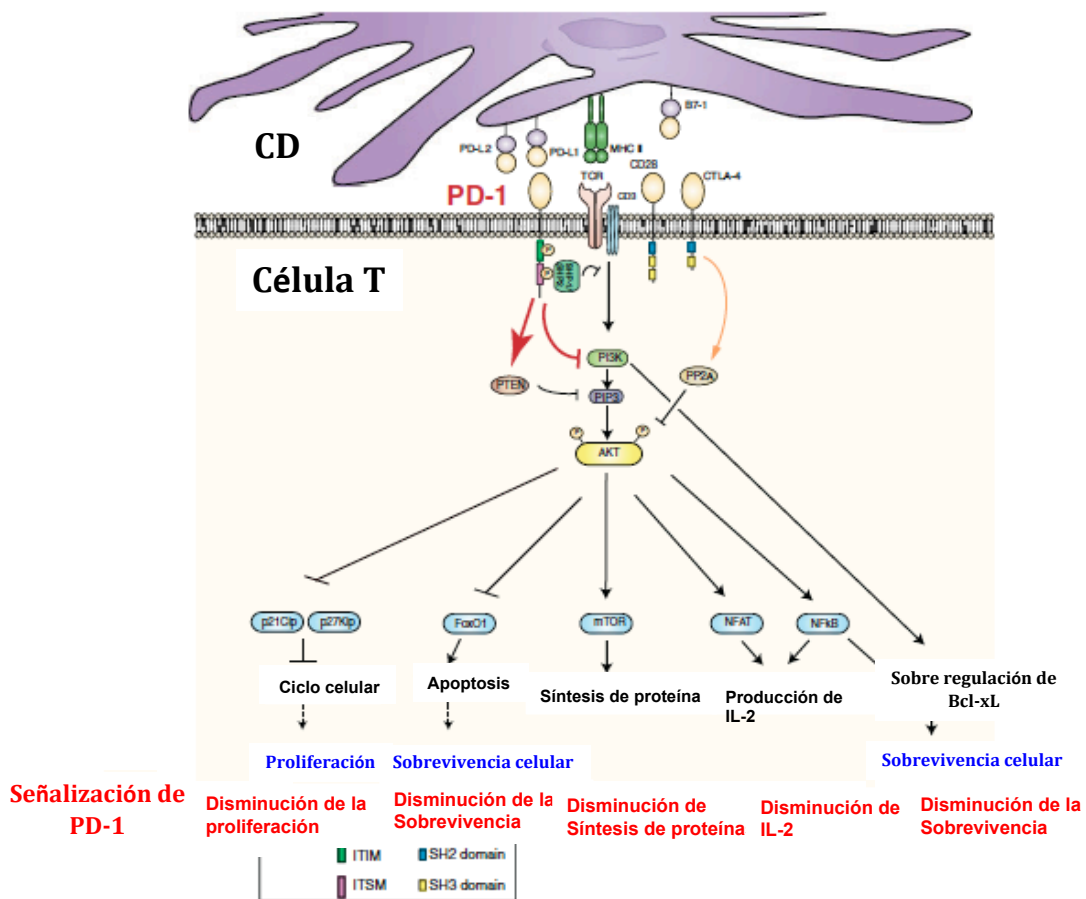


Fig. 10. Señalización de la vía PD-1 al activarse por sus ligandos. Modificado de (Francisco *et al.*, 2010).

La estimulación de PD-1 permite la fosforilación de las regiones ITIM e ITSM de la región citoplasmática de PD-1, lo que provoca la unión de las proteínas SHP-1 o SHP-2 y el inicio de la señalización de PD-1 para, posteriormente aumentar la expresión de PTEN, lo que atenúa la activación de la ruta PI3K y Akt. La señalización de PD-1 resulta en una disminución de la proliferación y supervivencia de la célula T, así como de la síntesis y producción de IL-2.

1.18 Expresión de PD-1 en infecciones virales crónicas

Una característica importante de las infecciones virales crónicas es el estado disfuncional “exhausto” de las células T (Jin *et al.*, 2011), se ha observado que en infecciones crónicas las células T pierden su capacidad proliferativa, de secreción de moléculas antivirales y de citólisis (Barber *et al.*, 2006). En infecciones virales crónicas, como la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), se ha demostrado que

estas células T “exhaustas” expresan altos niveles de PD-1 y de PD-L1 (Radziewicz *et al.*, 2007). Así mismo, se ha descrito que la funcionalidad de las células T CD8+ se puede recuperar *in vitro* al incubar las células con un anticuerpo bloqueador dirigido contra PD-L1 (Freeman *et al.*, 2006). En la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB), se ha descrito la sobre-expresión de PD-1 en las células T totales y ésta es aún mayor en las células T específicas contra HBV (Boni *et al.*, 2007). También se ha demostrado que la disfunción de estas células puede ser parcialmente restablecida cuando se bloquea la vía de PD-1 (Fisicaro *et al.*, 2010).

Es un hecho que durante la progresión de la infección por el VIH las células T son cada vez menos capaces de responder contra el virus. Esta incapacidad para responder contra el VIH se ha asociado también con un incremento en la expresión de la proteína PD-1 (Trautmann *et al.*, 2006). Artículos recientes muestran la importancia de PD-1 en este fenotipo “exhausto” de los linfocitos T y los efectos que tiene en la respuesta inmune ante el VIH (Petrovas *et al.*, 2006; Day *et al.*, 2006) (Fig.11).

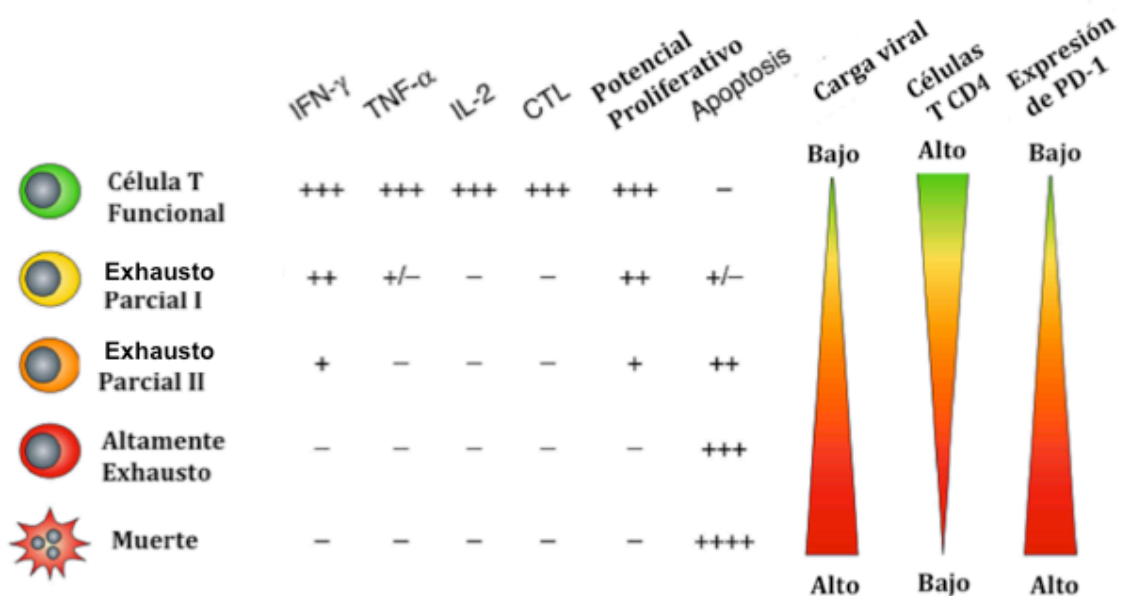


Fig.11. Pérdida de las funciones de los linfocitos T en la infección por VIH. Esquema que muestra la relación entre, la disminución de secreción de citocinas, la disminución en la proliferación celular, el aumento en la apoptosis y el fenotipo exhausto de las células T CD8+. Así como su relación con la cantidad de antígeno, el conteo de células T CD4+ y la expresión de PD1. Modificado de (Freeman *et al.*, 2006).

En la infección por el VIH, la expresión de PD-1 se correlaciona positivamente con la carga viral y negativamente con el conteo de linfocitos T CD4+ presentes en sangre (Zhang *et al.*, 2007). La interacción PD-1/PD-L1 induce la pérdida de la secreción de citocinas, de la capacidad proliferativa y de la actividad citotóxica de las células T CD8+ (Yamamoto *et al.*, 2011) y altera la producción de anticuerpos en las células B (Khaitan y Unutmaz, 2011). Actualmente se empieza a conocer que el estado de inhibición en las células T no se debe solamente a la expresión PD-1, si no a la expresión de varias moléculas inhibitoras como ITIM-3 (por sus siglas en inglés, T cell immunoglobulin mucin 3), CTLA-4 (por sus siglas en inglés, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), 2B4, LAG-3 (por sus siglas en inglés lymphocyte activation gene 3) y CD160 entre otras (Jin *et al.*, 2011; Porichis *et al.*, 2011), que actúan sinérgicamente con PD-1 e inhiben en mayor magnitud la función de las células T.

2 Antecedentes

2.1 Factores virales que inducen la expresión de PD-1

Como se mencionó anteriormente, en infecciones virales crónicas, que son infecciones que no se resuelven y en donde existe una constante estimulación de las células del sistema inmune debido a la presencia antigénica, se ha descrito un aumento de la expresión de PD-1. En la infección por VIH se ha reportado que la expresión de PD-1 es mayor en células T CD4+ y T CD8+ de personas infectadas, esto, en comparación con la expresión de PD-1 en células T de personas HIV+, que están bajo tratamiento antirretroviral (donde la carga antigénica es menor) y en comparación con la expresión de PD-1 reportada en células T de personas VIH negativas (Day *et al.*, 2006). Aunado a esto, se ha descrito que la expresión de PD-1 se encuentra aumentada en células T CD4+ y T CD8+ específicas para el VIH en comparación con la expresión de PD-1 en células T específicas para otras infecciones virales crónicas (Trautmann *et al.*, 2006).

En 2008 el grupo de Muthumani reportó que la proteína viral Nef del VIH induce la

expresión de PD-1 en células T CD4+, lo que muestra el primer mecanismo por el cual el virus induce la expresión de esta proteína (Muthumani *et al.*, 2008). En contraste con los hallazgos reportados por Muthumani, el grupo de Narasimhan reporta el mismo año que la infección por VIH baja la expresión de PD-1 en células T CD4+, argumentando que este mecanismo protege a la célula de morir vía apoptosis (Venkatachari *et al.*, 2008). Posteriormente Bousheri *et al.* reportaron que la expresión de PD-1 depende en gran medida del tipo de VIH, mostrando que células T CD4+ infectadas con el subtipo D tienen un incremento en la expresión de PD-1 en comparación con los otros subtipos de VIH (Bousheri *et al.*, 2009).

Pese a que se ha descrito la sobre-expresión de PD-1 y sus ligandos en la infección por VIH, actualmente se desconoce exactamente qué es lo que induce esta expresión aumentada en la infección por el VIH. La relación entre una alta carga viral y una alta expresión de PD-1 y de PD-L1 en células T, sugiere la existencia de factores virales que pueden estar involucrados en inducir su expresión. Estudios recientes muestran que el VIH está involucrado en la inducción de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en monocitos y en células dendríticas (Rodríguez-García *et al.*, 2011). Sin embargo se desconoce exactamente si en los linfocitos T CD4+ y T CD8+ el virus puede causar el aumento de la expresión de PD-1 y sus ligandos.

Estudios recientes han asociado la sobre-expresión de las moléculas co-inhibidoras PD-1, PD-L1 y PD-L2, con la disfuncionalidad de las células T CD4+ y T CD8+ en infecciones virales crónicas, como la infección por el VIH. A pesar de que se ha reportado que, tanto factores virales como celulares facilitan el aumento en la expresión de estas proteínas, aún se desconocen los mecanismos por los que se induce y regula su expresión. Importantemente, no se ha descrito a detalle la regulación de la expresión de estas proteínas en los linfocitos T, durante la infección con el VIH.

3 Hipótesis

El aumento en la expresión de estas proteínas será ocasionado por la infección con el VIH *per se* en células T CD4+. La presencia del VIH será suficiente para inducir la expresión de estas moléculas en las células T CD8+.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar si el VIH inducen la expresión de PD-1 y de sus ligandos en los linfocitos T.

4.2 Objetivos específicos

- Conocer si la infección por el VIH *per se* induce la expresión de PD-1 y sus ligandos en linfocitos T CD4+ y de manera indirecta en los linfocitos T CD8+.
- Determinar los patrones de expresión de PD-1 y sus ligandos de manera *in vitro* en linfocitos T, en las condiciones de infección por el VIH y de estimulación con SEB.

5 Metodología

5.1 Muestras de estudio

Para la realización de todos los experimentos se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de personas sin VIH. Los paquetes leucocitarios fueron proporcionados por el banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las CMSP se obtuvieron mediante gradiente de densidad como se describe posteriormente (Fuss et al., 2009).

5.2 Separación de CMSP

El paquete leucocitario se colocó en tubos de 50 ml y se diluyó 1:2 con medio HBSS a 37°C (Lonza, Switzerland). Para obtener las CMSP se realizó un cociente 1:3 Ficoll: sangre diluida y se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos (min) a baja desaceleración. Posteriormente, se recuperaron las CMSP y se diluyeron en 30 ml de medio HBSS previamente calentado a 37°C. Se realizaron tres lavados usando medio HBSS a 37°C. Para el primer lavado la muestra se centrifugó a 2000 rpm por 20 min. Para los otros dos lavados, la centrifugación se hizo a 1500 rpm por 10 min. Las células se contaron en una cámara de Neubauer (Hycor biomedical, California), se utilizó azul de tripano (Lonza, Switzerland) como marcador de viabilidad. Las CMSP obtenidas se emplearon en fresco para ensayos posteriores.

5.3 Generación de cultivos virales

Este ensayo se realizó para expandir los virus de VIH SF33 y SF162, a partir de cultivos de CMSP para utilizarlos en experimentos posteriores.

Se obtuvieron CMSP (1) como se describió anteriormente y se dejaron durante tres días a una densidad de 3×10^6 células/ml en medio HUT previamente calentado a 37°C (medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de

penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina) en presencia de IL-2 (100U/ml) y fitohemaglutinina (PHA-P, 3 μ g/ml). Al día siguiente, se obtuvieron nuevamente CMSP (2) y se dejaron tres días en medio HUT con IL-2 y PHA-P.

Infección de CMSP con VIH

Al tercer día, se resuspendieron las CMSP (1) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min. Se realizaron dos lavados con medio HBSS a 37°C centrifugando a 1500 rpm por 10 min y se apartaron 400×10^6 de CMSP. Estas células se dejaron a una densidad de 3×10^6 células/ml en medio HUT y se trataron con polibreno (2 μ g/ml) por 30 min en agitación constante. Después, se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min, las células se resuspendieron y se realizaron dos lavados con medio HBSS 37°C a 1500 rpm por 10 min. Se contaron las células y se resuspendieron en medio HUT a una densidad de 10×10^6 células/ml. Posteriormente, se infectaron 200×10^6 CMSP con dos alícuotas de los virus SF33 ó SF162, para esto, las CMSP se pusieron en agitación constante con los virus durante 2 horas a 37°C. Enseguida, los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 20 min y se realizaron dos lavados con medio HBSS 37°C a 1500 rpm por 10 min. Finalmente, se contaron las células y se resuspendieron en medio HUT con IL-2 a una densidad de 3×10^6 células/ml.

Alimentación del cultivo infectado de CMSP

Al siguiente día las células infectadas se alimentaron con las CMSP (2). Para esto las CMSP (2) se centrifugaron a 2000 rpm por 20 min y se lavaron dos veces con medio HBSS 37°C (1500 rpm por 10 min). Las células se contaron y se apartaron 400×10^6 de CMSP (2) resuspendiéndolas a una densidad de 3×10^6 células/ml en medio HUT con IL-2. Para alimentar los cultivos de CMSP (1) que fueron infectados con los virus SF33 ó SF162, se agregaron 200×10^6 de las CMSP (2) a cada cultivo infectado. Los cultivos

infectados de CMSP resultantes se dejaron en cultivo y se recolectó el sobrenadante a día 7.

Recolección de sobrenadante de cultivos infectados

Para la recolección de los virus provenientes del cultivo de células infectadas, las CMSP se resuspendieron y se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min. Se recolectó el sobrenadante y se descartó el pellet de células. Se guardaron alícuotas en tubos de 1.5 ml que se guardaron a -80°C. Es importante mencionar que todos los experimentos desarrollados en esta tesis, que involucran cultivo de virus y metodologías de infección de células, se realizaron en un laboratorio de bioseguridad nivel 3.

5.4 ELISA para detección de la proteína p24 del VIH

El ELISA es una técnica inmunológica que permite detectar la presencia y concentración de un antígeno o un anticuerpo. Esta técnica se implementó para detectar la presencia y cantidad de la proteína p24 del VIH en los sobrenadantes de CMSP y para comprobar la infección. Para la determinación de p24 se utilizó el kit de BioChain (HIV-1 p24 Elisa Assay Cat. no. Z7040001 BioChain) y el aparato automático CODA (Bio Analyser CODA, USA), el cual realiza una lectura a 450nm de la reacción enzima-colorimétrica obtenida al final del ensayo.

ELISA cualitativo para la detección de p24

Los sobrenadantes infectados con el VIH fueron descongeladas a temperatura ambiente (18-25°C). Se utilizaron placas de 96 pozos y se agregaron 200 µl de las muestras en cada pozo previamente sensibilizado con un anticuerpo anti-p24. Adicional a las muestras problema, se colocó un control positivo por duplicado (200 pg/ml de la proteína purificada p24) y un control negativo por triplicado (medio HUT) y

un blanco (pozo vacío). Posteriormente, se agregaron 20 μl de buffer de fosfatos (0.1M, pH7) con tritón al 1% a cada pozo y la placa se incubó a 37°C durante 60 min. En seguida, se realizaron 6 lavados con 350 μl de medio de lavado (buffer Tris pH 7.8-8.0 con Tween 20 al 0.05%). Posteriormente se incorporaron 100 μl de un anticuerpo anti-p24 conjugado a biotina y se incubó a 37°C durante 60 min. Después, se realizaron 6 lavados con 350 μl de medio de lavado. Se adicionaron 100 μl de streptavidina acoplada a peroxidasa de rábano y se incubó a 37°C por 30 min. Luego, se realizaron 6 lavados con 350 μl de medio de lavado. Se agregaron 100 μl de la solución sustrato (tetramethylbenzidine) y se incubaron las muestras a 37°C por 30 min. Para parar la reacción, se agregaron 100 μl de H_2SO_4 (1N). La lectura de las placas se realizó a 450 nm.

ELISA cuantitativo para la detección de p24

Este procedimiento es similar al ELISA cualitativo, pero se adiciona una curva estándar con valores conocidos de la proteína p24. Esto con la finalidad de poder conocer la cantidad de p24 presente en las muestras problema. La curva estándar se prepara realizando 5 diluciones seriadas 1:2 partiendo de una solución con una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de p24.

5.5 Determinación de la TCID₅₀ del VIH

Para determinar la TCID₅₀ (dosis a la cual se infecta el 50% de las células en contacto con el virus) se obtuvieron CMSP y se dejaron durante tres días a una densidad de 3×10^6 células/ml en medio HUT estimuladas con IL-2 y PHA-P, como se mencionó anteriormente. Después de los tres días, se recolectaron las CMSP y se lavaron 3 veces con medio HBSS 37°C. El primer lavado se realizó a 2000 rpm por 10 min, los dos restantes se realizaron a 1500 rpm por 10 min y, después del último lavado, se contaron las células. Se resuspendieron a una densidad de 3×10^6 células/ml en medio

HUT y se trataron con polibreno (2 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos a 37°C en agitación constante.

Luego, se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min, se realizaron dos lavados en medio HBSS a 37°C (1500 rpm por 10 min) y se contaron las células. Se colocaron 4×10^6 células en 5 tubos con 5 ml de medio HUT con IL-2 cada uno. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} de tres alícuotas de los virus SF33 y SF162, generados como se describió anteriormente.

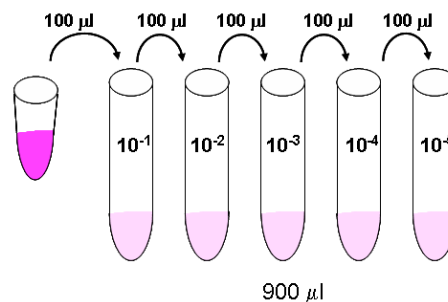


Fig.13. Esquema que ejemplifica las diluciones realizadas para la determinación del valor de la TCID50.

Las diluciones seriadas se realizaron agregando 900 μl de medio HUT con IL-2 y 100 μl de los virus. Las células presentes en los tubos, se infectaron con cada una de las diluciones del virus, los tubos se mantuvieron en agitación constante durante 2 horas a 37°C. Al final de la incubación, se adicionaron 5 ml de medio HUT con IL-2 y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. Se realizaron dos lavados con HBSS 37°C (1500 rpm por 10 min) y se contaron las células. Posteriormente, las células se dejaron a una densidad de 5×10^5 células/ml y, por cada dilución realizada se sembraron 10 pozos con 250,000 células resuspendidas en 200 μl de medio HUT. Las placas se mantuvieron en incubación por 7 días. Para alimentar los cultivos, se adicionaron 100 μl de medio HUT cada tercer día. Los días 5 y 7 se recolectaron 100 μl de los medios de cultivo y se guardaron en placas de 96 pozos con 25 μl de tritón al 1%. Las placas se congelaron a - 80°C.

Determinación del valor de TCID50

Para conocer la TCID50 se realizó un ELISA cualitativo para determinar la presencia o ausencia de la proteína p24. La determinación del valor de TCID50 se realizó con base en la cantidad de pozos que resultaron positivos en el ELISA y en base a un modelo matemático para determinar la cantidad infecciosa que se necesita para infectar 1×10^6 células/ml.

Cálculo de la TCID50 :

Definiciones:

- a) Células infectadas: número de pozos positivos dados como relación de la dilución (como se emplean 10 pozos por cada dilución, se anotan como número de pozos positivos de 10).
- b) Número de pozos infectados: número de pozos positivos para cada dilución.
- c) Numero de pozos no infectados: número de pozos negativos para cada dilución.
- d) Infección acumulada: se suman de forma inversa los pozos infectados (ver tabla) para cada dilución.
- e) Infección no acumulada: se suman los pozos no infectados (de izquierda a derecha, ver tabla) para cada dilución.
- f) Índice de mortalidad: el índice de mortalidad se obtuvo dividiendo la infección acumulada entre la infección acumulada + el número de pozos no infectados.
- g) Porcentaje de mortalidad: se obtiene expresando el resultado del índice de mortalidad en porcentaje.

Tabla 2. Ejemplo representativo de los datos obtenidos al final del ensayo de la TCID50

Dilución	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Pozos infectados	10/10	10/10	2/10	0/10	0/10
Numero de pozos infectados	10	10	2	0	0
Numero de pozos no infectados	0	0	8	10	10
Infección acumulada	22	12	2	0 ←	0
Infección no acumulada	0 →	0	8	18	28
Índice de mortalidad	22/22+0	12/12+0	8/8+2	0/0+18	0/0+28
Porcentaje de mortalidad	100%	100%	80%	0%	0%

Para poder realizar los cálculos de TCID50 necesitamos obtener una dilución con un porcentaje de mortalidad mayor al 50% y una dilución menor al 50%, a lo que llamamos porcentaje de positividad. Formula:

$$\% \text{ positividad} = [(\% > 50\%) - 50 / (\% > 50\%) - (\% < 50\%)]$$

Posteriormente, el porcentaje obtenido tiene que ser corregido por el factor de dilución empleado, el cual es el logaritmo de la primera dilución que resulta tener pozos no infectados (FC). Para obtener este valor (D1) se suma el número de la dilución más el factor de dilución expresado en decimales (DF).

Formula:

$$FC = D1 + (DF)$$

La suma del porcentaje de positividad, más la corrección dada por la dilución nos da los valores de TCID50.

Formula:

$$TCID50 = \% \text{ Positividad} + FC$$

Posteriormente, es necesario expresar los valores TCID50 en logaritmo base 10.

Formula:

$$10^{\text{TCID50}}$$

Para conocer el valor en volumen de una TCID50 en el cultivo viral, se suma el valor de TCID50, más el logaritmo de 5.

Formula:

$$\text{TCID50} + \log 5 = 1 \text{ TCID50/ml}$$

Para determinar la equivalencia en volumen de 100 TCID50, se descomponen los valores de TCID50/ml en logaritmo base 10 y se multiplica por 100. Al final se obtiene el volumen en ml necesario para 100 TCID50.

En nuestro ejemplo:

$$\% \text{ positividad} = [(100 - 50 / 100 - 0)]$$

$$\% \text{ positividad} = 0.5$$

$$\text{FC: } 3 + 0.3 = 3.3$$

$$\text{TCID50: } 0.5 + 3.3 = 3.8$$

$$\text{TCID50} = 10^{3.8} (200\mu\text{l})$$

$$1\text{TCID50/ml: } 3.8 + \log 5 (0.6989) = 4.4989$$

$$100\text{TCID50/ml: } 10^{4.4989} = (10^2)(10^{2.4989})$$

$$100\text{TCID50/ml: } 1/10^{2.4989} = 0.003170$$

$$\underline{100\text{TCID50}/\mu\text{l} = 3.17 \text{ para } 1 \times 10^6 \text{ CMSP}}$$

5.6 Determinación de la expresión de PD-1 y sus ligandos en linfocitos T de sangre periférica.

La determinación de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica en un citómetro FACS Aria (Becton Dickinson). Para esto, se utilizaron anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos: CD3 (AF7001:50), CD4 (PeCy5 1:20), CD8 (PercP5.5 1:50), PD-1 (PE 1:10), PD-L1 (PeCy7 1:30) y PD-L2 (APC 1:10). Adicionalmente se utilizó Amcyan (1:100, LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit, Invitrogen) como marcador de viabilidad.

Controles de compensación

Estos controles se emplearon en la citometría para eliminar el inherente solapamiento producto de la fluorescencia emitida por varios fluorocromos. Para realizar la compensación, se colocaron perlas recubiertas con un anticuerpo Ig-G (perlas positivas) y perlas sin anticuerpo (perlas negativas) en tubos falcon de citometría (BD Bioscience, California). Posteriormente, se agregaron 2 μ l de los anticuerpos acoplados a fluorocromos, y se incubaron en oscuridad a 4°C durante 15 min. Se realizó un tubo de compensación por cada anticuerpo utilizado. Después, se realizaron 2 lavados agregando 2 ml de medio PBA (PBS con 1% de albúmina bovina) por tubo y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 300 μ l de formalina (PBS con 1% de formaldehído).

Tinción de citometría y controles FMO

Los controles de FMO (fluorescencia menos uno) se emplearon para distinguir las poblaciones de células positivas para la expresión de una determinada proteína, de las poblaciones que resultan negativas. Para realizar estos controles, las células se incuban con todos los anticuerpos excepto uno, a diferencia de la muestra problema

que se incubaba con todos los anticuerpos. Para realizar las tinciones, los anticuerpos se diluyeron en PBA, como se muestra en la tabla.

Tabla 3. Ejemplo representativo de la realización de la muestra problema y controles de FMO. Los números mostrados en la tabla representan la cantidad de μ l utilizados

TUBO	flourocromo /proteína	PD1	PD-L1	PD-L2	CD3	CD4	CD8	SUBTOTAL	PBA
FMO	PD-1 PE	X	3	10	2	5	2	22	28
FMO	CD4 PECY5	10	3	10	2	X	2	27	23
FMO	PD-L1 PECY7	10	X	10	2	5	2	29	21
FMO	PDL2 APC	10	3	X	2	5	2	22	28
FMO	CD3 AF700	10	3	10	X	5	2	30	20
FMO	CD8 PERCP CY5.5	10	3	10	2	5	X	30	20
	Muestra problema	10	3	10	2	5	2	32	18

Para la tinción de las células, se colocaron 1×10^6 de CMSP en cada tubo de 5 ml (Becton Dickinson) resuspendidas en 99 μ l de PBS. Posteriormente, se agregó 1 μ l del marcador de viabilidad AquaDye a cada tubo de citometría y se incubaron en oscuridad a 4°C durante 15 min. Después se realizaron dos lavados con PBS (1500 rpm por 10min). Se decantó el sobrenadante y se agregó la mezcla de anticuerpos a los tubos de citometría. Las células se incubaron en oscuridad durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS a 1500 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 500 μ l de formalina al 1%.

Citometría de flujo multiparamétrica

Para determinar la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en linfocitos T, se utilizó el citómetro FacsAria (BD, USA), citómetro que tiene la capacidad de analizar 11 parámetros distintos en una misma célula (9 flourocromos, tamaño y granularidad celular). La estrategia de análisis de los experimentos fue la siguiente: se escogieron células únicas en base a parámetros de tamaño celular (FSC-H vs FSC-A), se escogieron a los linfocitos en base a su morfología (SSC-A vs FSC-A) y de estos, solo se analizaron células vivas (SSC-A vs Amcyan). Las células T por la presencia de CD3 (SSC-A vs CD3 AF700) y de éstas se escogieron las células T CD4+ y T CD8+ (CD4

Percy5 vs CD8 PercPCy5.5). De manera individual se analizó la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las células T CD4+ y en las células T CD8+. Para el análisis de citometría se recopilaron 20,000 eventos a partir de las células T CD4+.

5.7 Determinación de carga viral (CV)

Para comprobar la infección de las CMSP, se determinó la cantidad de copias de ARN viral presente en los sobrenadantes de los cultivos por PCR en tiempo real. Los reactivos utilizados para realizar la PCR se obtuvieron del kit de amplificación (Abbott real time HIV-1 amplification reagents kit) (Scott et al., 2009).

Se utilizó el sistema m200 de Abbott, sistema que es útil para el seguimiento de muestras infectadas por el VIH. El sistema m2000 se compone de dos principales instrumentos: el m2000sp que se encarga de realizar la extracción de ácidos nucleicos a partir de los sobrenadantes y el sistema m2000rt, encargado de realizar la PCR en tiempo real mediante la detección y la amplificación de los fragmentos del VIH. Este sistema nos permite detectar un rango de carga viral que va de 40 copias de ARN/ml a 10×10^6 copias de ARN/ml, con una especificidad del 100% para los clados B y C del VIH.

5.8 Obtención de células CD4+ a partir de CMSP totales

Este ensayo se realizó con el objetivo de obtener células CD4+ purificadas, a partir de CMSP totales. Para el ensayo se utilizó un kit de separación de células CD4+ que utiliza perlas inmunomagnéticas (Invitrogen Dynal, Cat. no. 113.46D).

Procedimiento de lavado de las perlas Dynabeads

Las Dynabeads son perlas magnéticas de 1.0 μm de diámetro hechas de poliestireno. Para lavarlas, primero se resuspendieron homogéneamente, tomando 2 ml de estas (equivalente a 200×10^6 perlas). Se agregó el mismo volumen de buffer de lavado (PBS

libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , 0.1% de BSA y EDTA 2mM, pH7.4) y se mezcló homogéneamente por 1 min. Posteriormente, se colocaron las perlas en un imán (DynaMag™-15, Cat.no.123.01D) por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se removieron las perlas del imán y se resuspendieron agregando el mismo volumen inicial de buffer de lavado. Se realizó el mismo lavado 2 veces. Al final las perlas se resuspendieron en 2 ml del buffer de lavado y se guardaron a 4°C.

Obtención de células CD4+

La obtención de células CD4+, se realizó a partir de 200×10^6 de CMSP resuspendidas en 2 ml de medio de lavado. Posteriormente, se agregaron 400 μL de SBF (suero bovino fetal inactivado) y se agregaron 400 μL del cóctel de anticuerpos (Ig-G dirigidos contra las proteínas CD56, CD19, CD14, HLA-DR y CD8). Las células con los anticuerpos se mantuvieron en rotación constante por 20 min a 4°C. Después, se agregaron 2 ml de medio de lavado y se centrifugó para eliminar los anticuerpos que no se pegaron a las CMSP (2500 rpm por 8 min). Las células se resuspendieron en 2 ml del medio de lavado. Se agregaron los 2 ml de perlas pre-lavadas y se incubó en rotación durante 15 min a temperatura ambiente (18-25°C). Terminada la incubación, las células se colocaron en un imán durante 2 min. El sobrenadante que contiene las células CD4+ libres de anticuerpos se transfirió en un tubo. Las células CD4+ se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 10 ml de medio HUT y se contaron. Las células CD4+ obtenidas se mantuvieron en medio HUT a 37°C a una densidad de 3×10^6 células/ml y se utilizaron para experimentos posteriores.

Para comprobar su pureza, se tomaron 1×10^6 células CD4+ y se tiñeron con los anticuerpos CD4 (Pecy5 1:20), CD3 (AF700 1:50) y CD8 (PercP5.5 1:50). Las células se incubaron en oscuridad durante 15 min a 4°C. Posteriormente se realizaron dos lavados de 1500 rpm por 10 min con medio PBA 4°C y se resuspendieron las células

en un volumen de 500 μ l de PBS. Las células se analizaron en el citómetro FACS Aria, se obtuvo una pureza del 98%.

5.9 Infección de CMSP y células CD4+ puras con los virus SF33 y SF162

Para infectar las células con las diferentes cepas de virus, se obtuvieron 200×10^6 de CMSP mediante la técnica descrita anteriormente, así mismo se obtuvieron 200×10^6 de células CD4+ puras. Se resuspendieron en 10 ml de medio HUT 37°C. Posteriormente, se incubaron con 100 TCID₅₀ de los virus SF33 ó SF162 (apartando algunas CMSP sin infectar como control negativo y algunas CMSP en presencia de 2 μ g/ml de SEB como control positivo) durante 2 horas en agitación constante. En seguida, las células se centrifugaron a 2000 rpm por 20 min con la finalidad de eliminar el sobrenadante con virus, se realizaron dos lavados con medio HBSS a 37°C (1500 rpm por 10 min). Las células obtenidas, se resuspendieron en medio HUT a una densidad de 3×10^6 células/ml y se sembraron en placas de 24 pozos (3×10^6 células/ml). Las placas con células se mantuvieron en incubación a 37°C y se cambió el medio HUT diariamente (10% de medio HUT presente en los cultivos).

5.10 Seguimiento de la expresión de PD-1 y sus ligandos inducida por los virus SF33 y SF162

Se obtuvieron CMSP de donadores sanos y se infectaron con 100 TCD50 de los virus SF33 (tropismo CXCR4) y SF162 (tropismo CCR5). Las CMSP infectadas se cultivaron en medio HUT por 10 días, con un cambio diario del 10% del medio. Para determinar la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 se realizó citometría de flujo multiparamétrica a los días 0, 1, 3, 5, 7 y 10 usando los marcadores: CD3 (AF700), CD4 (PeCy 5), CD8 (PercP 5.5), PD-1 (PE), PD-L1 (PeCy 7) y PD-L2 (APC). Los sobrenadantes se recolectaron a los mismos días en que se hizo el análisis de citometria para la determinación de CV.

5.11 Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ puras

Se purificaron células CD4+ a partir de CMSP mediante selección negativa por perlas inmunomagnéticas. Las CD4+ se infectaron con el virus SF33 y se determinó la expresión de PD-1 y PD-L1 a los días 0, 1, 3, 5, 7 y 10 mediante citometría de flujo multiparamétrica, usando los marcadores: CD3 (AF700), CD4 (PeCy 5), CD8 (PercP 5.5), PD-1 (PE), PD-L1 (PeCy 7) y PD-L2 (APC). Se recolectaron los sobrenadantes para la determinación de CV.

5.12 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Graphpad 4.2. Se utilizó la prueba U de Mann Whitney para comparar la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las células infectadas vs células no infectadas. Se realizó la prueba Friedman para comparar la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células infectadas a lo largo de los días de infección. Finalmente, se realizó la prueba de correlación de Spearman para conocer si el aumento en la expresión de PD-1, PD-L1 o PD-L2 se relaciona con la carga viral presente en los cultivos. Los datos mostrados en la sección de resultados representan las medianas y rangos intercuartiles. Los valores se consideraron significativos si $p \leq 0.05$ (*).

6 Resultados

6.1 Expresión de PD-1 y sus ligandos inducida en células T CD4+ por la infección con el VIH.

Estudios recientes han asociado la sobre-expresión de las moléculas co-inhibidoras PD-1, PD-L1 y PD-L2, con la disfuncionalidad de las células T CD4+ y T CD8+ en infecciones virales crónicas, como la infección por el VIH. A pesar de que se ha reportado que, tanto factores virales como celulares facilitan el aumento en la expresión de estas proteínas, aún se desconocen los mecanismos por los que se induce y regula su expresión. Importantemente, no se ha descrito a detalle la regulación de la expresión de estas proteínas en los linfocitos T, durante la infección con el VIH. Por tal motivo, lo primero que quisimos conocer fue si el aumento en la expresión de estas proteínas era ocasionado por la infección con el VIH *per se* en células T CD4+.

Para comprobar esto, se realizaron ensayos *in vitro* en donde se evaluó el efecto que tiene la infección sobre la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ purificadas. Para esto, se purificaron células T CD4+ a partir de CMSP de personas VIH negativas mediante selección negativa con perlas inmunomagnéticas y se infectaron con 100 TCID₅₀ del virus SF33. Las células se dejaron en cultivo y se realizó citometría de flujo multiparamétrica para conocer la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 a los días 1, 3, 5, 7 y 10 después de la infección (como se describió en la metodología).

La estrategia de análisis empleada se muestra en la (Fig.13). Se escogieron a las células únicas en base a parámetros de tamaño celular (FSC-H vs FSC-A) y, de estos, se escogieron a los linfocitos en base a su morfología y granularidad (SSC-A vs FSC-A). Se analizaron únicamente células vivas (SSC-A vs Amcyan). Las células T se determinaron por la presencia de la molécula CD3 (SSC-A vs CD3 AF700) y se analizaron las células T CD4+ (Fig.13A). Para determinar el porcentaje de células T CD4+ que expresan PD-1, PD-L1 y PD-L2 se realizaron las siguientes gráficas: SSC-A vs PD-1 PE, SSC-A vs PD-L1 PeCy7 y SSC-A vs PD-L2 APC. Los recuadros con las células positivas se determinaron usando como control el FMO (Fig.13B). De manera independiente, se evaluó la co-expresión PD-1 con PD-L1 en células T CD4+ (Fig. 13C). Además, se realizó el análisis de la intensidad mediana de fluorescencia (IMF) de la señal emitida por cada proteína, este análisis nos permitió determinar si la población de células analizada expresa más o menos moléculas de PD-1, PD-L1 o PD-L2 (Figura 13D).

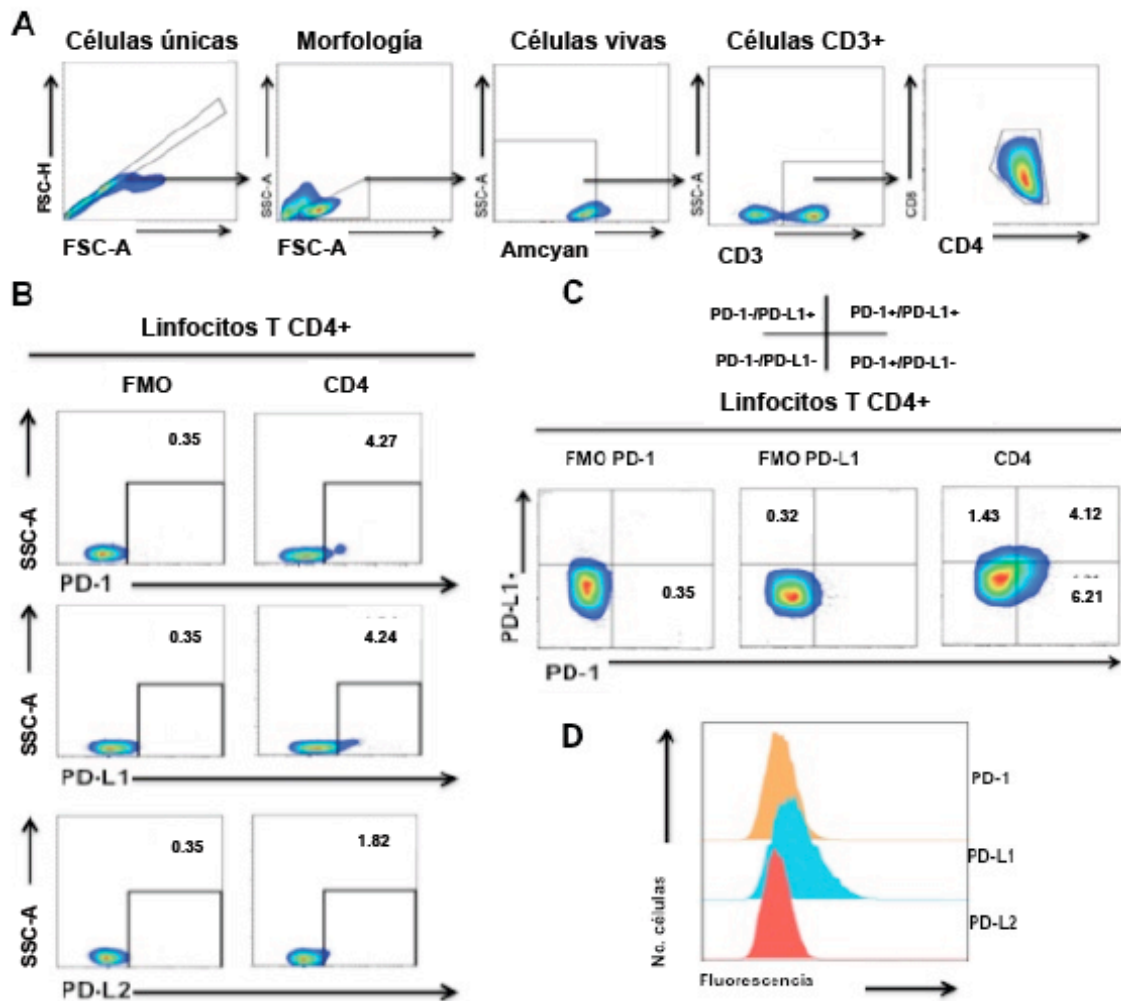


Fig.13. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de datos de citometría en células T CD4+ expuestas al VIH. **A)** Células únicas (FSC-H vs FSC-A), linfocitos T según sus características morfológicas de tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A), viabilidad celular (SSC-A vs AmCyan), células T ó CD3+ (SSC-A vs CD3 AF700), células T CD4+. **B)** Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+, del lado izquierdo el control de FMO y del lado derecho la condición de infección. **C)** Co-expresión de PD-1+/PD-L1+ en las células TCD4+. **D)** Histograma de la fluorescencia de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4 totales.

Para comprobar la infección de las células T CD4+ purificadas, se determinó la cantidad de virus presente en los sobrenadantes de los cultivos (los datos son mostrados como copias de ARN viral/ml de sobrenadante) (Fig.14).

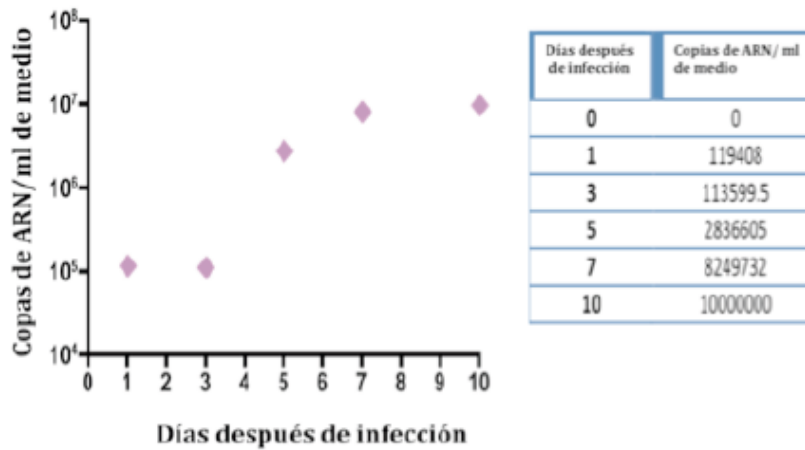


Fig.14. Cinética de producción del virus SF33 en el sobrenadante de los cultivos de células T CD4+ infectadas con el VIH. Los datos graficados y en la tabla representan la mediana de los datos obtenidos del seguimiento de cultivo de nueve experimentos independientes.

Los resultados de estos experimentos muestran que, la infección de las células T CD4+ con el VIH induce un aumento en la expresión de PD-1 desde el primer día después de la infección con este virus (Fig.15; Tabla 4). Tanto el porcentaje de células positivas como la IMF de la expresión de PD-1 aumenta significativamente ($p \leq 0.05$) en las células T CD4+ a partir del primer día después de la infección y continúa incrementada hasta el día 10 (Fig. 15A; Tabla 4). De manera similar, la expresión de PD-L1 se incrementa significativamente ($p \leq 0.05$) desde el día 1 y hasta el día 10 después de la infección con el VIH (Fig.15B; Tabla 4). En cambio la expresión de PD-L2, mostro un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de células T CD4+ desde el día 1 hasta el día 7 (Fig.15C) pero, no así la IMF (Tabla. 4). De forma separada, se analizó la co-expresión de estas proteínas (PD-1+PD-L1+, PD-1+PD-L2+ y PD-L1+PD-L2) en los linfocitos T CD4+. Se encontró que la infección con SF33, solamente incrementa el porcentaje y la IMF en las células T CD4+PD-1+PD-L1+ (p

≤ 0.05) (Fig. 15D; Tabla. 4), mientras que no se observó ningún incremento en la la co-expresión de las demás proteínas (dato no mostrado).

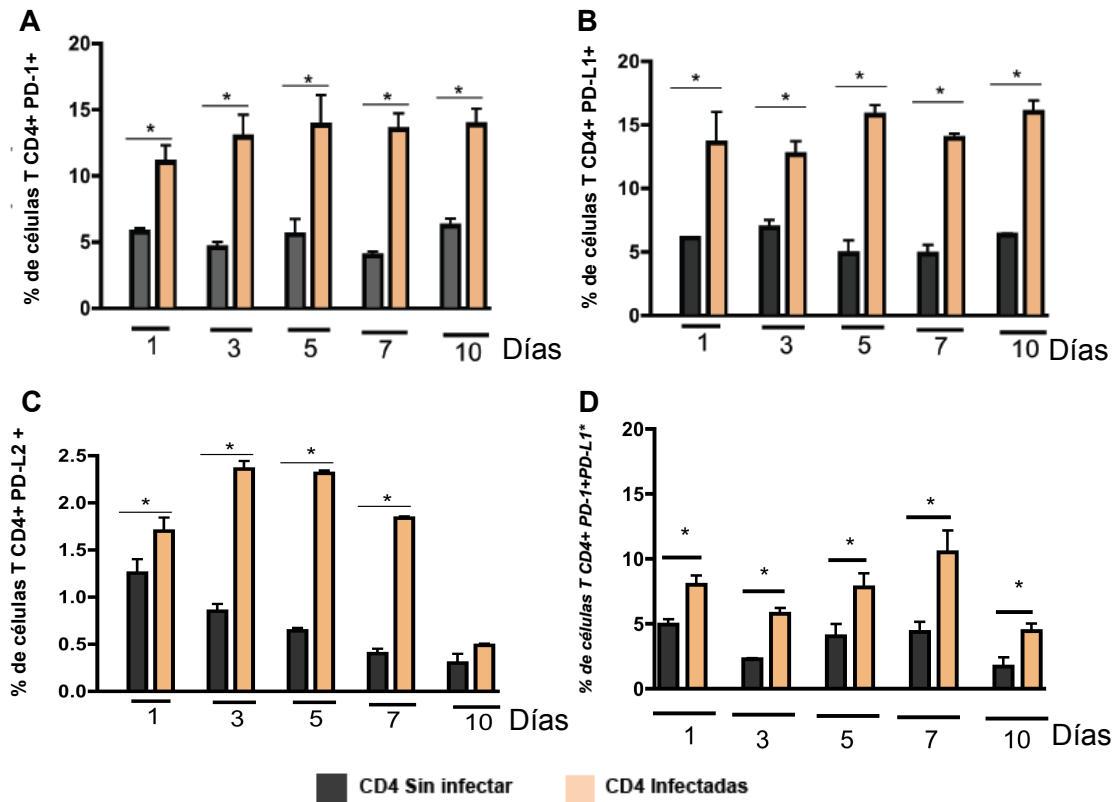


Fig. 15. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ infectadas. Porcentaje de células T CD4+ PD-1+, PD-L1+ y PD-L2+ a diferentes días de la infección con el virus SF33. Debido a que el % de células que expresan PD-L2 es bajo, la escala es diferente a los de las demás proteínas. Los datos mostrados son resultado de la mediana y error estándar de 9 experimentos independientes, * $p \leq 0.05$.

Tabla 4. IMF de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ purificadas e infectadas.

Días después de infección	IMF PD-1+		IMF PD-L1+		IMF PD-L2+		IMF PD-1+PD-L1+	
	Sin VIH	Con VIH	Sin VIH	Con VIH	Sin VIH	Con VIH	Sin VIH	Con VIH
1	25.3 (23.7-26.9)	47.35* (43.8-50.9)	96.5 (81-112)	127* (103-152)	-51.9 (-57.4 - -46.4)	-33.55 (-48.6 - -18.5)	23.63 (20.37-26.9)	49.59* (49.05-50.13)
3	11.21 (9.27-12.7)	38.25* (30.3-46.2)	95.1 (92-98)	128* (120-136)	-36.6 (-39.6 - -33.6)	-14.33 (-20.3 - -8.37)	13.17 (11.24-15.11)	39.9* (38.6-41.2)
5	26.65 (23.5-29.8)	47.75* (41.8-53.7)	142 (130-154)	194* (191-197)	-45 (-47.9 - -42.1)	-33.34 (-38.7 - -28.1)	28.32 (27.28-29.36)	58.35* (56.8-59.9)
7	38.5 (36.7-40.3)	66.10* (60.6-71.6)	171 (170-173)	220* (222-219)	-67.45 (-69.4 - -65.5)	-57.4 (-62.4 - -52.4)	24.37 (22.04-26.7)	46.45* (45.5-47.4)
10	37.25 (36.3-38.2)	106* (100-108)	184 (176-192)	293* (264-322)	9.93 (9.66 - 10.2)	12.7 (9.73 - 15.8)	12.9 (8.9-16.9)	22.9* (20.2-25.6)

*p≤0.05 .Entre paréntesis se muestra el intervalo menor y mayor de los valores de IMF

6.2 Expresión de PD-1 y sus ligandos en células T CD4+ y T CD8+ de CMSP infectadas.

Después de conocer que la infección por el VIH induce la expresión de PD-1 y de sus ligandos en las principales células blanco de infección, quisimos evaluar si, la presencia del virus también afecta la expresión de estas proteínas en otros tipos celulares que no se infectan con este virus. Para esto, se analizó la expresión de PD-1 y sus ligandos en los linfocitos T CD8+ de CMSP (células en las que durante infecciones virales crónicas se ha descrito la sobre-expresión de PD-1) en el contexto de la infección por el VIH. Así mismo, quisimos conocer los patrones de expresión de PD-1 y de sus ligandos en células T CD4+ de CMSP totales expuestas al VIH, con la finalidad de determinar si otras células (CD4-) pueden influenciar el control de la expresión de estas proteínas.

Para responder estas preguntas, se obtuvieron CMSP de personas sin VIH, se infectaron de manera independiente con dos cepas de VIH (SF33 y SF162) y se realizó el análisis de la expresión de PD-1 y sus ligandos mediante citometría de flujo multiparamétrica a diferentes días después de su exposición al virus. Esto con la finalidad de conocer en que momento después de la infección comienza la sobre-expresión de estas proteínas. En todos los experimentos se utilizaron como control positivo CMSP estimuladas con SEB (2µg/ml) y como control negativo CMSP no infectadas.

La estrategia de análisis de citometría que se utilizó para estos experimentos se muestra a continuación (Fig. 16). De igual manera al experimento anterior, se escogieron a las células únicas en base a parámetros de tamaño y granularidad (FSC-H vs FSC-A), a los linfocitos en base a su morfología (SSC-A vs FSC-A) y de estos, solo se analizaron células vivas (SSC-A vs AquaDye). Las células T se escogieron por la presencia del receptor CD3 (SSC-A vs CD3 AF700) y de éstas se escogieron las células T CD4+ y T CD8+ (Fig. 16). La expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las células T CD4+ y T CD8+ se analizó usando como control el FMO (Fig. 17 y 18).

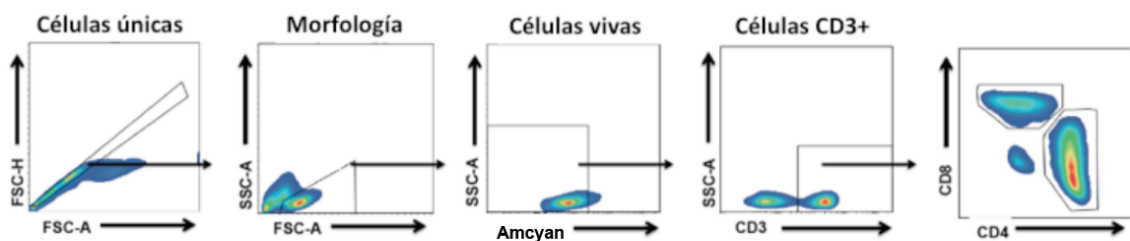


Fig. 16. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de citometría de flujo de las células T CD4+ y T CD8+ a partir de CMSP. Estrategia de análisis células únicas (FSC-H vs FSC-A), morfología de linfocitos T (SSC-A vs FSC-A), viabilidad celular (SSC-A vs Amcyan), células T CD3+ (SSC-A vs CD3 AF700), células T CD4+ y T CD8+ (CD4 Percy5 vs CD8 PercP5.5).

Para estos análisis se determinó el porcentaje de células T CD4+ o T CD8+ que expresan PD-1, PD-L1 o PD-L2 (Fig. 17A y 18A) y, también, se determinó la IMF de cada una de estas proteínas tanto en células T CD4+ como en T CD8+ totales (Fig. 17B y 18B). Los datos de la IMF se presentan en forma de histograma, en donde el eje de las X representa la fluorescencia emitida por cada marcador de interés. Un desplazamiento de los histogramas hacia la derecha indica una mayor fluorescencia, lo que representa una mayor expresión de las proteínas de interés en las poblaciones analizadas, linfocitos T CD4+ y T CD8+.

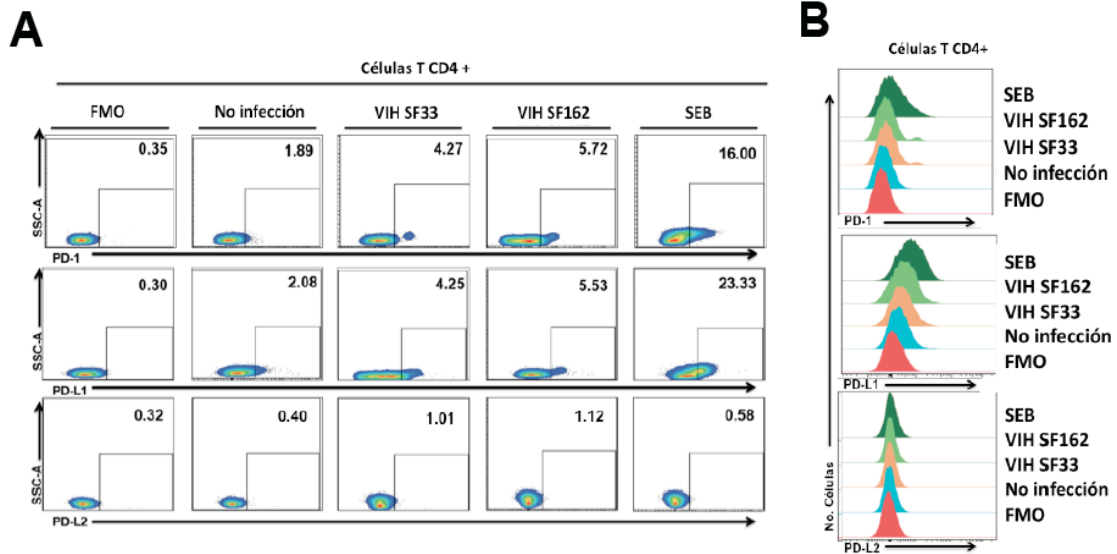


Fig. 17. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ al día 7 después de la infección con el VIH. **A)** Gráficas de citometría que muestran el porcentaje de células T CD4+ que expresan PD-1, PD-L1 ó PD-L2 al día 7 después de la infección con SF33 y SF162. Los números dentro de las gráficas representan el porcentaje de células positivas para cada condición. **B)** Histogramas de citometría que muestran la expresión de PD-1 y sus ligandos en células T CD4+.

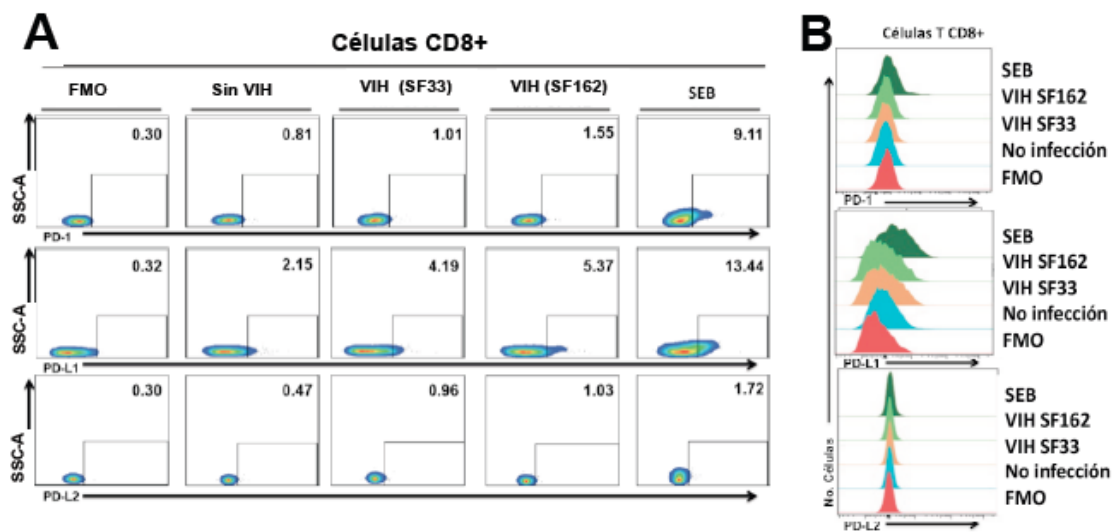


Fig.18. Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD8+ al día 7 después de la infección con el VIH. **A)** Gráficas que muestran el porcentaje de células positivas para la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD8+ al día 7 después de la infección con SF33 y SF162. Los números dentro de las gráficas representan el porcentaje de células positivas. **B)** Histogramas de citometría que muestran la expresión de PD-1 y sus ligandos.

6.3 Cinética de expresión de PD-1 y de sus ligandos en linfocitos T CD4+ y T CD8+ de CMSP infectadas con los virus SF33 y SF162.

Los resultados muestran que, a diferencia de lo observado en las células T CD4+ purificadas; En las CMSP el porcentaje de células T CD4+ que expresan PD-1 aumentan significativamente a partir del día 5 después de su exposición al VIH SF33 y SF162 (1-2.5% células T CD4+PD-1+ sin VIH, 2.7-4.8% células T CD4+PD-1+ expuestas a SF33, y 2.9-5.1% células T CD4+PD-1+ expuestas a SF162; Fig. 19A) y se mantiene hasta el día 10. No se encontró diferencia significativa entre el nivel de expresión de PD-1 en las células T CD4+ expuestas al virus al día 5, comparada con los días 7 y 10. Importantemente el porcentaje observado de células T CD4+ que expresan PD-1+ en las CMSP no expuestas al VIH es similar al reportado por otros autores (1-2%). Al comparar los resultados obtenidos de la expresión de PD-1 en las células T CD4+ puras expuestas al VIH, con la expresión de PD-1 obtenida en las células T CD4+ de las CMSP, observamos que hay una mayor expresión de PD-1 en las células T CD4+ puras expuestas al virus, * $p \leq 0.05$ (dato no mostrado).

De manera interesante, no se observó un aumento en las células T CD8+ que expresan PD-1 en los cultivos que fueron expuestos al SF33 ni al SF162, en comparación a las células T CD8+ de CMSP que no fueron expuestas al VIH (Fig. 19B). Sin embargo, en las CMSP estimuladas con SEB se observó un aumento significativo del porcentaje de células T CD8+ que expresan PD-1+ a partir del día 5 (Fig. 19B), lo que demuestra que estas células sí pueden expresar esta proteína.

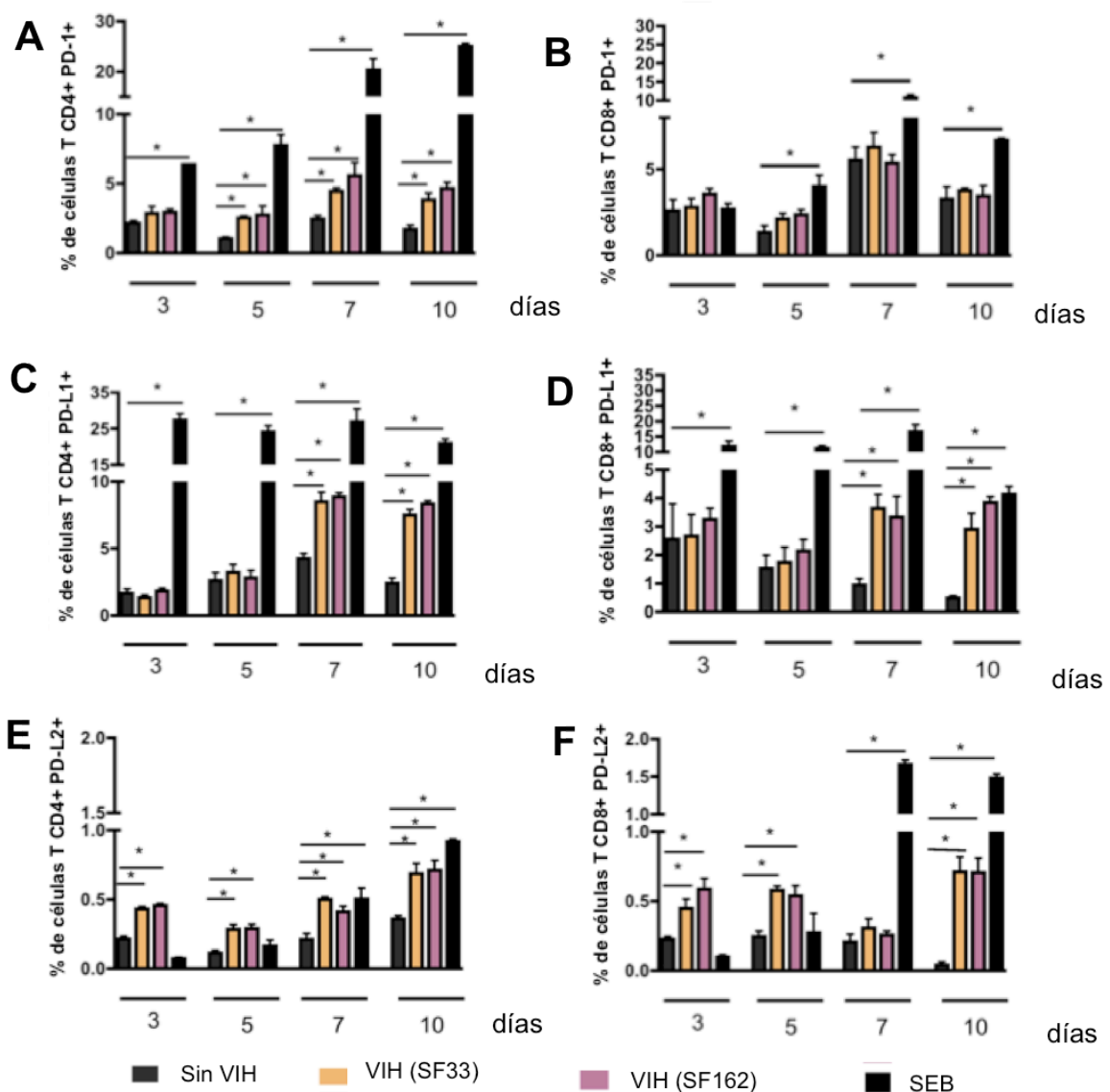


Fig.19. Cinética de expresión *in vitro* de PD-1 y de sus ligandos en células T CD4+ y T CD8+ infectadas. A) Porcentaje de células T CD4+PD-1+, B) T CD8+PD-1+, C) T CD4+PD-L1+, D) T CD8+PD-L1+, E) T CD4+PD-L2+ y F) T CD8+PD-L2+. Los datos mostrados son resultado de la mediana y Desviación Estándar de 9 experimentos independientes. *p<0.05

Los resultados también muestran que temporalmente, la expresión de PD-L1 en células T CD4+ o CD8+, ocurre después de la expresión de su receptor (Fig.19). El porcentaje de células T CD4+ que expresan PD-L1 aumenta significativamente al día 7 después de la infección con el SF33 o el SF162 (8.1% y 7.2% células T CD4+PD-L1+ al día 7 y 10 después de su exposición a SF33, respectivamente; y 8.3%, 8% T

CD4+PD-L1 al día 7 y 10 después de su exposición a SF162, respectivamente. Fig. 19C). Interesantemente, las células T CD8+ que expresan PD-L1 también aumentan significativamente a partir del día 7 después de su exposición al VIH (3.6%, 2.8% células T CD8+PD-L1+ al día 7 y 10 después de su exposición a SF33; y 3.2%, 3.8% al día 7 y 10 después de su exposición a SF162, Fig. 19D). El patrón de expresión de PD-L2 después de la exposición al VIH difiere al de PD-L1 ya que se observó un aumento pequeño pero significativo en el número de células T CD4+ y CD8+ que expresan PD-L2+ desde el día 3 después de su exposición al SF33 y SF162 (0.4% células T CD4+PD-L2+ y 0.41% T CD8+PD-L2+ 3 días después de su exposición a SF33; y 0.49% células T CD4+PD-L2+ y 0.65% T CD8+PD-L2+ 3 días después de su exposición a SF162, Fig.20E y F). Estos resultados sugieren que los mecanismos de regulación de la expresión de PD-1 difieren de los que regulan la expresión de sus ligandos PD-L1 y PD-L2.

Los datos de la IMF son similares a los relacionados con el porcentaje de células PD-1, PD-L1 ó PD-L2+. Para la expresión de PD-1, se encontró que en las células T CD4+ de CMSP infectadas con SF33 ó con SF162 la IMF aumenta desde el día 3 hasta el día 10 en comparación con los datos obtenidos en las CMSP no infectadas, $p \leq 0.05$ (Tabla 6). La IMF de PD-1 en células T CD8+ totales permanece sin cambios si se comparan con las células que no han sido expuestas al VIH, similar a lo reportado para el porcentaje de células T CD8+ PD1+ (Tabla 6). Dado que la IMF de células CD8+ estimuladas con SEB aumenta significativamente según lo esperado, estos datos indican que las células T CD8+ sí son capaces de aumentar la expresión de PD-1 (Tabla 6), pero que la infección por el VIH del cultivo de CMSP no induce una expresión de la molécula en las T CD8+.

El análisis de los datos de la IMF de los ligandos de PD-1 muestra que PD-L1 aumenta su IMF en los linfocitos T CD4+ a partir del día 7 y permanece incrementada al día 10 después de su exposición con el SF33 o SF162 (Tabla 6). No se encontraron cambios significativos en la IMF de PD-L1 en los linfocitos T CD8+ expuestos al VIH, a

ninguno de los tiempos analizados (Tabla.7). En cambio el análisis de la IMF de PD-L2 indica que sólo en los linfocitos T CD8+ ésta se aumenta significativamente desde el día 5 después de su incubación con el VIH (Tabla 7). No se encontraron cambios en la IMF de PD-L2 de los linfocitos T CD4+ (Tabla 6).

Contrario a lo mostrado en las células T CD4+ purificadas expuestas a VIH, no se observó un aumento de los linfocitos T CD4+ o T CD8+ que co-expresan PD-1+PD-L1+, PD-1+PD-L2+ ó PD-L1+PD-L2 cuando las CMSP son infectadas con SF33 o SF162 (dato no mostrado).

Tabla 5. IMF de la expresión de PD1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ sin VIH, en presencia del VIH (SF33 y SF162) y SEB.

Días después de infección	IMF PD-1 EN T CD4+				IMF PD-L1 EN T CD4+				IMF PD-L2 EN T CD4+			
	Sin VIH	SF33	SF162	SEB	Sin VIH	SF33	SF162	SEB	Sin VIH	SF33	SF162	SEB
3	121 (82.1-166)	215.8* (91.6-340)	223* (90-360)	348.5* (282-415)	45.8 (25.4-48.3)	44.5 (21.3-56.7)	45 (32-48)	31.8 (27.4-36.2)	-8.83 (-37.1,0.412)	-3.63 (-5.8, -4.57)	-7 (-11,-7)	-26.05 (-29.3, -22.8)
5	127 (102-172)	168* (154-284)	180* (170-250)	588.5* (550-627)	35.3 (23.5-45)	43.9 (25.5-47.7)	32 (22-42)	36.8 (33.7-39.9)	-56.4 (-70.7,-21.1)	-75.8 (-102, -17.9)	-80 (-87,-75)	-15.125 (-15.3,-14.95)
7	165 (153-185)	227* (197-241)	230* (180-260)	626* (581-671)	37.7 (23.2-44.6)	51.45* (36-52.3)	65* (56-72)	75.65* (64.6-86.7)	-65.1 (-79.9, -0.124)	-63.6 (-68,-0.169)	-78 (-81,-54)	-39.9 (-40.8,-39)
10	132 (122-146)	178* (160-246)	210* (176-230)	552* (517-587)	43.8 (31.4-47.1)	54.95* (52.8-86.4)	62* (59-72)	152.5* (246-159)	-67.6 (-75.5, -25.2)	-97.1 (-103,-109)	-90 (120,-76)	7.23 (5.91,-8.56)

*p≤0.05 .Entre paréntesis se muestra el intervalo menor y mayor de los valores de IMF

Tabla 6. IMF de la expresión de PD1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD8+ sin VIH, en presencia del VIH (SF33 y SF162) y SEB.

Días después de infección	IMF PD-1 EN T CD8+				IMF PD-L1 EN T CD8+				IMF PD-L2 EN T CD8+			
	Sin VIH	SF33	SF162	SEB	Sin VIH	SF33	SF162	SEB	Sin VIH	SF33	SF162	SEB
3	101 (95.5-124)	91.4 (80.4-93.1)	98 (89-104)	348.5* (282-415)	68.4 (56.9-82.6)	68.6 (61.4-72.3)	65 (62-81)	50.85 (51.6-50.1)	13.8 (11.6,-20.5)	14.5 (14.2-18.6)	13.5 (11-17)	24.55* (23.1-26)
5	85.5 (61.3-105)	73 (71-81.4)	79 (75-82)	146.5* (99-194)	61.9 (53.8-72.5)	67.4 (65.7-74.5)	64 (51-69)	66.35 (65.2-67.5)	4.29 (3.64,-7.73)	12* (9.75-14.7)	11.5* (8-16)	2.85 (1.41-4.29)
7	121 (117-127)	174* (157-193)	150 (145-180)	224* (195-253)	63.7 (61.1-66.6)	70.1 (68.7-81.8)	65 (60-71)	83.2* (85.1-81.3)	4.55 (3.68,-7.2)	13.6* (10-18.5)	13* (11-17)	22.45* (18.7-26.2)
10	88.5 (78-92.2)	126* (105-127)	111 (96-120)	459* (435-483)	60.4 (59.5-61.9)	65.4 (64.2-73.1)	62 (52-76)	152.5* (144-161)	3.5 (1.85,-3.5)	14.46* (7.77-16.4)	11.5* (10-19)	76.25* (72.2-80.3)

*p≤0.05 .Entre paréntesis se muestra el intervalo menor y mayor de los valores de IMF

Para comprobar la infección de las CMSP, se determinó la carga viral en los cultivos de células. Como era de esperarse conforme avanzan los días de cultivo también aumenta la cantidad de virus en los sobrenadantes (Fig. 21).

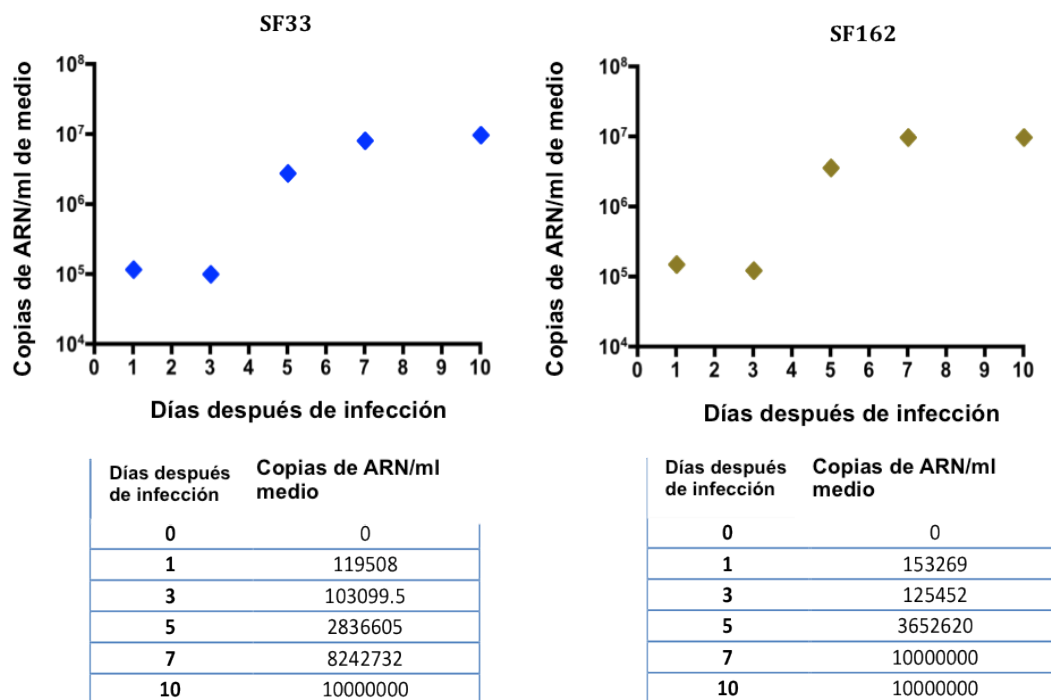


Fig.20. Cinética de crecimiento del los virus SF33 y SF162 en células CMSP. Copias de ANR/ml de medio presente en los sobrenadantes de los cultivos de CMSP infectadas con SF33 ó SF162. Los datos graficados y presentes en las tablas representan la mediana de los datos obtenidos de nueve experimentos independientes.

6.4 Correlación de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ y T CD8+ con la cantidad del VIH.

Para conocer si existe una relación entre el aumento en la expresión de PD-1 y de sus ligandos en las células T CD4+ y T CD8+ con el aumento en la carga viral presente en los sobrenadantes durante los días de cultivo, se realizaron análisis de correlación. Los resultados de estos análisis indican que hay una correlación entre el porcentaje de células T CD4+ que expresan PD-1+ ($p=0.0001, r=0.53$), T CD4+ que expresan PD-L1+ ($p=0.0001, r=0.75$) y T CD4+ que expresan PD-L2 ($p=0.0161, r=0.51$) con el aumento en la cantidad de copias de ARN/ml se sobrenadante. Al hacer los análisis de correlación en las células T CD8+, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 21).

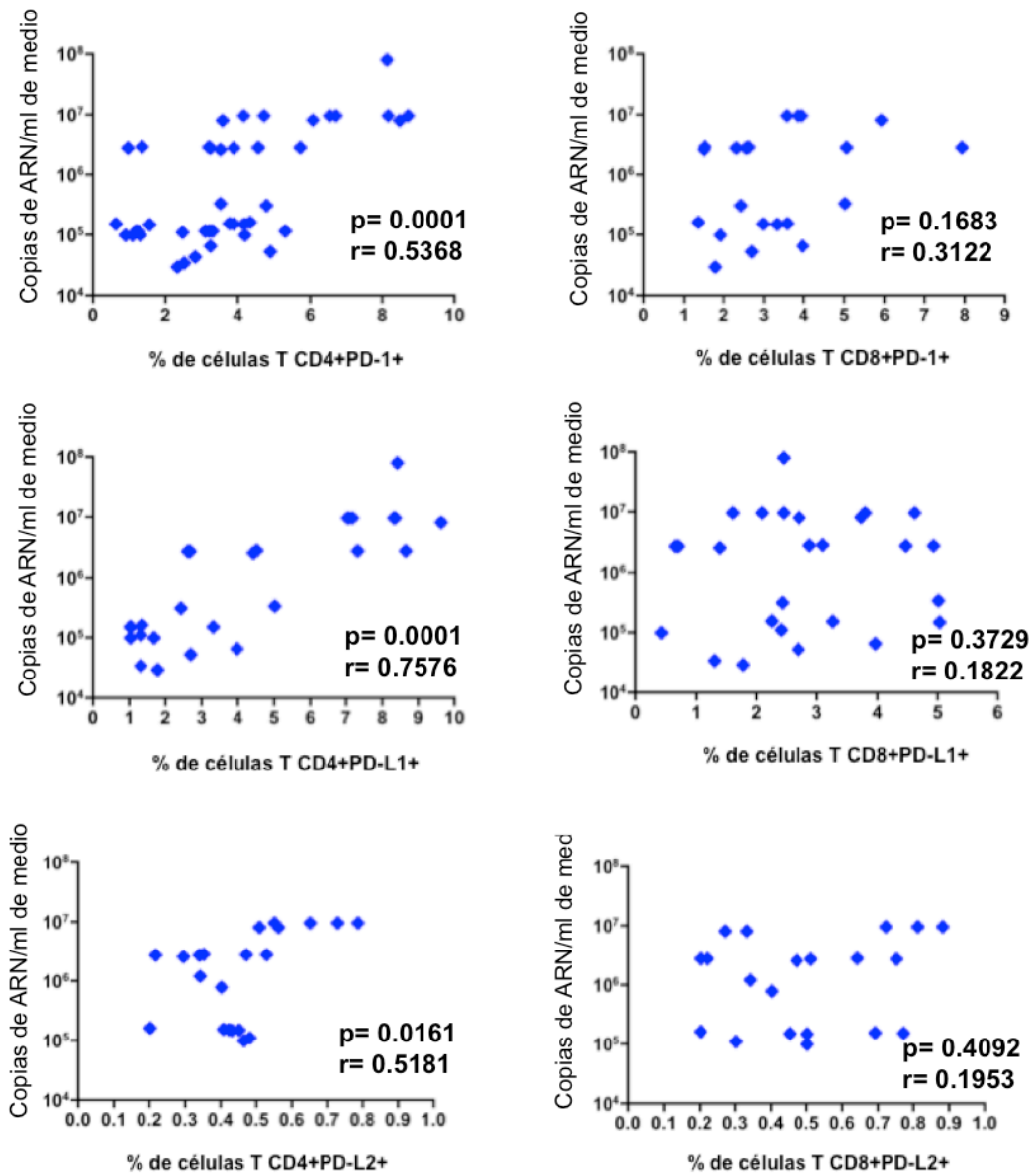


Fig. 21. Correlación de la expresión de PD-1 y de sus ligandos con la CV. Análisis de correlación entre el porcentaje de células T CD4+ y T CD8+ que expresan PD-1, PD-L1 ó PD-L2, con las copias de ARN presentes en los sobrenadantes de los cultivos infectados.

7 Discusión

Se postula que el balance entre señales co-estimuladoras y señales co-inhibidoras proporcionadas por proteínas de la familia B7-CD28 define el destino de los linfocitos T (Liu *et al.*, 2010; Porichis *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2011). En infecciones virales crónicas, dentro de las que se incluye a la infección por el VIH, este balance se inclina hacia una mayor presencia de señales co-inhibidoras (Shankar *et al.*, 2011). PD-1 y sus ligandos son proteínas que al interactuar regulan negativamente la activación de los linfocitos T (Khaitan y Unutmaz, 2011). La sobre-expresión de PD-1 en las células T se asocia con la disminución en el control de la infección por el VIH (Day *et al.*, 2006; Petrovas *et al.*, 2006; Trautmann *et al.*, 2006), reflejada en la pérdida de sus capacidades efectoras y de proliferación (Kaufmann and Walker, 2008; Yamamoto *et al.*, 2011).

Pese a que se ha descrito un aumento en la expresión de PD-1 en las células T CD4+ y T CD8+ de personas con el VIH (Brown *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2011), existen pocos reportes que describen cuales son los factores que inducen o regulan la expresión de esta proteína, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas (Yamamoto *et al.*, 2011). Estudios recientes sugieren que la infección con el VIH *per se*, puede ser un factor que incrementa la expresión de PD-1 (Francisco *et al.*, 2010). Estudios *ex vivo* han reportado una correlación positiva entre la expresión de PD-1 con la cantidad de virus presente en plasma (Day *et al.*, 2006) sin embargo, al día de hoy, esta relación no se ha demostrado directamente. Aunado a esto, en los pocos ensayos que se han publicado, existen discrepancias en si la infección *per se* con el VIH es capaz de inducir o no la expresión de PD-1 (Muthumani *et al.*, 2008; Venkatachari *et al.*, 2008) en las células T CD4+.

Los resultados de los experimentos realizados en esta tesis muestran que la exposición al VIH incrementa la expresión de PD-1 en las células T CD4+ puras y en las que forman parte de CMSP totales. En las células T CD4+ puras se encontró que PD-1 se sobre-expresa al día 1 de ser expuestas al VIH, mientras que en las

provenientes de las CMSP totales, el aumento en la expresión de PD-1 se retrasa hasta el día 5 y se mantiene. Estos datos confirman de manera *in vitro* lo reportado *ex vivo* en células de personas con VIH. Sin embargo, es interesante mencionar que el aumento encontrado en la expresión de PD-1 de las células T CD4+ provenientes de CMSP, fue menor en comparación con la expresión de PD-1 observada en las células T CD4+ puras. Esta diferencia en la magnitud de la expresión de PD-1, se podría explicar por el efecto de ciertas citocinas. Se ha descrito que citocinas como IL-10, IL-4, TNF- α e interferones pueden disminuir la expresión de PD-1 (Francisco *et al.*, 2010). Actualmente se sabe que, células dendríticas, monocitos, células NK y células T CD8+, todas presentes en las CMSP, son capaces de secretar alguna de estas citocinas. En los experimentos realizados, posiblemente sea éste el factor que dicte la diferencia entre los resultados obtenidos en células T CD4+ puras y en las provenientes de CMSP (Fig. 23). Es importante mencionar que en nuestros experimentos no se determinaron las citocinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos de células T CD4+ expuestas al virus, así como tampoco el posible efecto de citocinas sobre la expresión de PD-1.

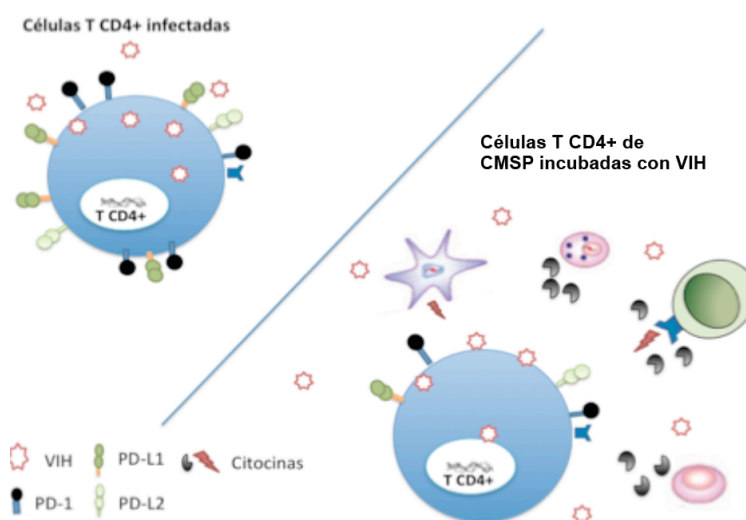


Fig.23 Diferencias en la expresión de PD-1 y de sus ligandos en las células T CD4+. Esquema que ejemplifica la diferencia encontrada en la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ puras vs. las células T CD4+ de CMSP infectadas.

Varios estudios documentan que las células T CD8+ de personas infectadas con el VIH tienen una expresión elevada de PD-1 (Nakamoto et al., 2008). Hasta ahora no existe ningún ensayo que demuestre exactamente, que es lo que causa el incremento de PD-1 en esta población celular. Está ampliamente documentado que las células T CD8+ no son células susceptibles a ser infectadas por el virus. En base a esto podemos inferir que la infección en estas células no es un factor que participe directamente en la inducción de PD-1. Los resultados que se obtuvieron al exponer CMSP al VIH y posteriormente analizar la expresión de PD-1 en las células T CD8+, muestran que durante no hay diferencia significativa en la expresión de PD-1 en cualquier punto de seguimiento de la infección. Por lo que inferimos que la presencia del virus o la posible interacción de este con las células T CD8+ no incrementa la expresión de PD-1.

Se ha descrito que PD-1 se expresa después de la activación del TCR (Watanabe et al., 2010). Posiblemente en las personas con VIH, la activación crónica de estas células sea el factor mas importante que ocasione el aumento en la expresión de PD-1 en las células T CD8+. En nuestros ensayos no se determinó el estado de activación de las células T CD8+, ni su relación con la expresión de PD-1, por lo que es interesante demostrarlo en ensayo *in vitro*. Aunado a esto, también falta evaluar la importancia de las citocinas que inducen activación bystander, citocinas que posiblemente influyan en la expresión de PD-1 durante la infección con el VIH.

El hecho de no observar en las células T CD8+ un aumento en la expresión de PD-1 al ser expuestas al virus, sugiere también que el microambiente en el que se encuentran las células *in vivo* contribuye en el aumento de la expresión de PD-1.

Los resultados de esta tesis también nos permiten hacer hipótesis sobre los mecanismos que inducen la expresión de PD-L1 y de PD-L2. Se ha reportado que PD-L1 se encuentra sobre-expresada en células dendríticas y en monocitos de personas infectadas por el VIH (Rodriguez-Garcia et al., 2010; Muthumani et al., 2011). Con respecto a PD-L2, se ha determinado que solamente ciertas poblaciones de monocitos

sobre-expresan esta proteína. Estos datos nos hacen pensar que el aumento en la expresión de PD-L1 y posiblemente de PD-L2 en células dendríticas y en monocitos, sea producto de la infección *per se* con el VIH ya que estas células pueden ser blanco de infección.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran por primera vez que la exposición al VIH induce la expresión de PD-L1 y de PD-L2 en las células T. En las células T CD4+ puras se encontró que PD-L1 y PD-L2 se sobre-expresan posterior a su exposición al virus, mientras que en las células T CD4+ de CMSP totales, se encontró que PD-L2 se expresa de forma temprana al día 3, mientras que la expresión de PD-L1 es más tardía (día 7). Contrario a lo reportado para la expresión de PD-1 en las células T CD8+, la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las células T CD8+ aumenta al ser expuestas al VIH. Esto sugiere que los mecanismo de inducción de PD-L1 y de PD-L2 son diferentes a los de PD-1 en éstas células.

La literatura muestra que en la infección por el VIH, las células dendríticas y los monocitos (los cuales sobre-expresan PD-L1 ó PD-L2) pueden interactuar con las células T e inducir en ellas su activación mediante la presentación antigénica. Esta interacción y el hecho de tener una mayor expresión de PD-L1 ó PD-L2 en la superficie de las CPA, facilita en la células T la interacción de PD-1 con sus ligandos, lo que favorece la inhibición de la respuesta de las células T, en lugar de inducir su activación y desencadenar sus funciones efectoras. Sin embargo, el hecho de que el VIH cause un incremento de PD-L1 y de PD-L2 en las células T CD4+ y T CD8+, implicaría que esta interacción de PD-1 con sus ligandos pueda ser entre las mismas células T. Se ha descrito que células T CD8+ pueden reconocer e interactuar con células T CD4+ infectadas por interacción TCR-HLA, pero no viceversa. Incluso es de mencionarse la idea de que PD-L1 o PD-L2 puedan funcionar como receptores y no solo como ligandos.

Los resultados de los análisis de co-expresión de PD-1 con PD-L1 ó PD-L2, muestran que la expresión de estas tres proteínas se da de manera independiente, los resultados describen la existencia de tres diferentes poblaciones de linfocitos T que sobre-expresan de forma separada PD-1 , PD-L1 ó PD-L2. Existe la posibilidad de que estas poblaciones de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+ interaccionen entre si y señalicen vía PD-1. Estos resultados sugieren que es poco probable que PD-1 y sus ligandos puedan interaccionar de forma autocrina en la misma célula T y causar su propia inhibición o su apoptosis.

Los resultados del seguimiento de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 muestran que PD-L2 se sobre expresa primero en las células T (al día 3), posteriormente se sobre expresa PD-1 (día 5) y finalmente PD-L1 (día 7). Si extrapolamos estos datos imaginando un escenario similar en personas con el VIH, es posible que durante las primeras etapas de la infección, PD-L2 tenga un papel más importante de interacción con PD-1 y posteriormente esta interacción sea mediada por PD-L1. De hecho, se ha descrito que la unión molecular entre PD-1 con PD-L2 es más fuerte en comparación con la unión con PD-L1 (Ghiotto et al., 2010). Pese a esto, la expresión de PD-L2 esta poco representada en las células del sistema inmune, y las pocas células que tienen PD-L2 lo expresan en bajas cantidades. PD-L1 por el contrario esta altamente expresado en células presentadoras de antígeno, en linfocitos T y en varios tejidos periféricos, y su expresión es más elevada en términos de porcentaje y de IMF que PD-L2.

Al ser este el primer trabajo que describe que la infección por el VIH induce la expresión de PD-L1 y de PD-L2 en las células T CD4+ y TCD8+. Nos permite hacer una hipótesis sobre los mecanismos de inducción de estas proteínas en las células T (Fig. 24):

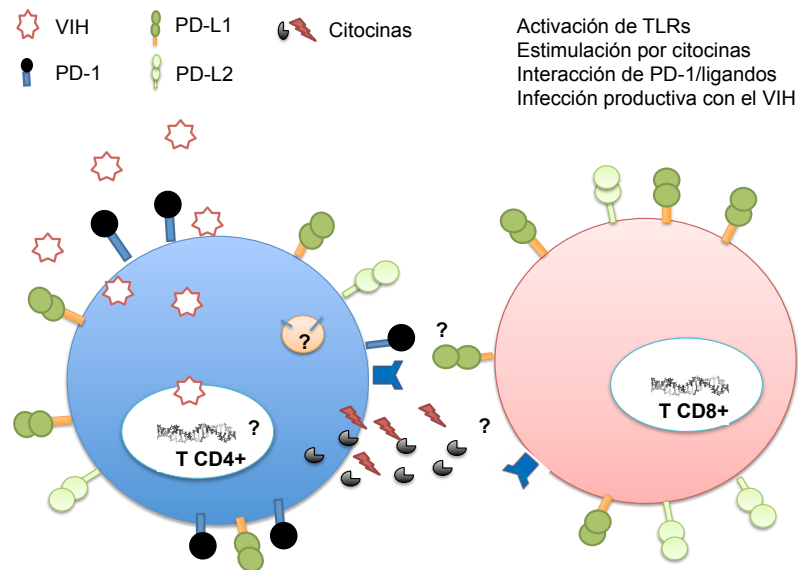


Fig. 24. Posibles escenarios que favorecen la inducción de la expresión de PD-1 y sus ligandos. Esquema que ejemplifica los posibles factores en la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2, producto de la infección por el VIH sobre las células T CD4+ así como los posibles escenarios que inducen la expresión en las células T CD8+.

La inducción de la expresión de PD-L1 y de PD-L2 en las células T CD4+ por la infección con el VIH, podría deberse a la activación de receptores intracelulares tipo toll (TLR), que reconocen ácidos nucleicos (Meier *et al.*, 2008) . Es posible también que la infección con el VIH aumente la producción de factores de transcripción relacionados con la inducción de la expresión de PD-L1 o PD-L2 (Shankar *et al.*, 2011).

En cambio, en las células T CD8+, se puede inferir que la inducción de PD-L1 y PD-L2 es causada por mecanismos extrínsecos a la infección por el VIH. La estimulación de las células T CD8+ por citocinas podría explicar el aumento en la expresión de estas proteínas. La activación bystander o la activación mediada por células presentadoras de antígeno pueda favorecer su expresión. Los experimentos diseñados en esta tesis, fueron planteados para conocer la causa-efecto de la infección sobre la expresión PD-1 y sus ligandos. Los datos que se obtuvieron son novedosos y permiten hacer nuevas preguntas sobre la biología y funcionalidad de la vía PD-1. La búsqueda de los procesos biológicos que desencadena el virus en las células T CD4+ y T CD8+ para inducir así la expresión de estas proteínas, es importante para contribuir con

información para el desarrollo de métodos para paliar la inhibición de funciones de estas células.

8 Conclusiones

Este estudio contribuyó a la descripción *in vitro* de la expresión de PD-1 y sus ligandos en linfocitos T durante la infección por el VIH. 1) Primeramente se demostró que la infección productiva por el VIH induce la expresión de PD-1 y de sus ligandos en linfocitos T CD4+. 2) Se demostró que la sobre-expresión de PD-1 en células T CD8+ depende de factores extrínsecos a la infección por el VIH. 3) Se demostró que la infección en CMSP por el VIH induce la expresión de PD-L1 y PD-L2 tanto en células T CD4+ como CD8+.

9 Perspectivas

Es necesario determinar la presencia de citocinas en los cultivos infectados, con la finalidad de determinar su posible papel en la inducción de la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T CD4+ y T CD8+ durante la infección por el VIH. Así como el estado de activación crónico de estas células.

10 Referencias:

- ABI PRISM® 3730xl DNA Analyzer User's Manual, Copyright 1999, PE Corporation. On-Line ABI PRISM® 3730xl DNA Analyzer User's Manual.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765-772.
- Agrati, C., D'Offizi, G., Gougeon, M.L., Malkovsky, M., Sacchi, A., Casetti, R., Bordoni, V., Cimini, E., Martini, F., 2011. Innate gamma/delta T-cells during HIV infection: Terra relatively Incognita in novel vaccination strategies? *AIDS Rev* 13, 3-12.
- Alter, G., Teigen, N., Ahern, R., Streeck, H., Meier, A., Rosenberg, E.S., Altfeld, M., 2007. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 195, 1452-1460.
- Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., Bhardwaj, N., 2011. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol* 11, 176-186.
- Althaus, C.L., De Boer, R.J., 2011. Implications of CTL-mediated killing of HIV-infected cells during the non-productive stage of infection. *PLoS One* 6, e16468.
- Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., Havlir, D.V., Richman, D.D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., 2000. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192, 63-75.
- Avila-Rios, S., Ormsby, C.E., Carlson, J.M., Valenzuela-Ponce, H., Blanco-Heredia, J., Garrido-Rodriguez, D., Garcia-Morales, C., Heckerman, D., Brumme, Z.L., Mallal, S., John, M., Espinosa, E., Reyes-Teran, G., 2009. Unique features of HLA-mediated HIV evolution in a Mexican cohort: a comparative study. *Retrovirology* 6, 72.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687.
- Benaroch, P., Billard, E., Gaudin, R., Schindler, M., Jouve, M., 2010. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 7, 29.
- Bennett, F., Luxenberg, D., Ling, V., Wang, I.M., Marquette, K., Lowe, D., Khan, N., Veldman, G., Jacobs, K.A., Valge-Archer, V.E., Collins, M., Carreno, B.M., 2003. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 170, 711-718.
- Berger, C.T., Alter, G., 2011. Natural killer cells in spontaneous control of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 6, 208-213.
- Bernstein, H.B., Wang, G., Plasterer, M.C., Zack, J.A., Ramasastry, P., Mumenthaler, S.M., Kitchen, C.M., 2009. CD4+ NK cells can be productively infected with HIV, leading to downregulation of CD4 expression and changes in function. *Virology* 387, 59-66.
- Betts, M.R., Exley, B., Price, D.A., Bansal, A., Camacho, Z.T., Teaberry, V., West, S.M., Ambrozak, D.R., Tomaras, G., Roederer, M., Kilby, J.M., Tartaglia, J., Belshe, R., Gao, F., Douek, D.C., Weinhold, K.J., Koup, R.A., Goepfert, P., Ferrari, G., 2005. Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T cell responses and their role in protection after HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4512-4517.
- Binette, J., Dube, M., Mercier, J., Halawani, D., Latterich, M., Cohen, E.A., 2007. Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. *Retrovirology* 4, 75.
- Boni, C., Fiscaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., Cavalli, A., Missale, G., Bertoletti, A., Ferrari, C., 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81, 4215-4225.
- Bordon, Y., 2010. Dendritic cells: An inner eye for HIV. *Nat Rev Immunol* 10, 678.

- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Oldstone, M.B., 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68, 6103-6110.
- Bousheri, S., Burke, C., Ssewanyana, I., Harrigan, R., Martin, J., Hunt, P., Bangsberg, D.R., Cao, H., 2009. Infection with different hiv subtypes is associated with CD4 activation-associated dysfunction and apoptosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52, 548-552.
- Brechley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., Douek, D.C., 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200, 749-759.
- Brown, K.E., Freeman, G.J., Wherry, E.J., Sharpe, A.H., 2010. Role of PD-1 in regulating acute infections. *Curr Opin Immunol* 22, 397-401.
- Bushman, F.D., Fujiwara, T., Craigie, R., 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249, 1555-1558.
- Carter, C.C., McNamara, L.A., Onafuwa-Nuga, A., Shackleton, M., Riddell, J.t., Bixby, D., Savona, M.R., Morrison, S.J., Collins, K.L., 2011. HIV-1 utilizes the CXCR4 chemokine receptor to infect multipotent hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Host Microbe* 9, 223-234.
- Carter, L., Fouser, L.A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C.R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G.J., Carreno, B.M., 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32, 634-643.
- Cavarelli, M., Scarlatti, G., 2009. Phenotype variation in human immunodeficiency virus type 1 transmission and disease progression. *Dis Markers* 27, 121-136.
- Cecilia, D., KewalRamani, V.N., O'Leary, J., Volsky, B., Nyambi, P., Burda, S., Xu, S., Littman, D.R., Zolla-Pazner, S., 1998. Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol* 72, 6988-6996.
- CENSIDA, 2008. Informe anual del la epidemia de el VIH.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al., 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-346.
- Collini, P., Noursadeghi, M., Sabroe, I., Miller, R.F., Dockrell, D.H., 2010. Monocyte and macrophage dysfunction as a cause of HIV-1 induced dysfunction of innate immunity. *Curr Mol Med* 10, 727-740.
- Cunningham, A.L., Donaghy, H., Harman, A.N., Kim, M., Turville, S.G., 2010. Manipulation of dendritic cell function by viruses. *Curr Opin Microbiol* 13, 524-529.
- Chakrabarti, L.A., Ivanovic, T., Cheng-Mayer, C., 2002. Properties of the surface envelope glycoprotein associated with virulence of simian-human immunodeficiency virus SHIV(SF33A) molecular clones. *J Virol* 76, 1588-1599.
- Chakrabarti, L.A., Simon, V., 2010. Immune mechanisms of HIV control. *Curr Opin Immunol* 22, 488-496.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., Riley, J.L., 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173, 945-954.
- Chen, S.Y., Guan, K.P., Guo, M.Z., Yi, Y., Jia, Z.Y., Yu, T., Guo, Y., Bi, S.L., 2008. [Cloning of PD-1 gene and its prokaryotic expression in Escherichia coli]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 22, 33-35.
- Chen, Z., Telfier, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D.D., Marx, P.A., 1996a. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J Virol* 70, 3617-3627.
- Chen, Z.P., Malapetsa, A., Marcantonio, D., Mohr, G., Brien, S., Panasci, L.C., 1996b. Correlation of chloroethylnitrosourea resistance with ERCC-2 expression in human tumor cell lines as determined by quantitative competitive polymerase chain reaction. *Cancer Res* 56, 2475-2478.

- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E.J., Coovadia, H.M., Goulder, P.J., Klemerman, P., Ahmed, R., Freeman, G.J., Walker, B.D., 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354.
- DeJucq, N., G. Simmons y P. R. Clapham (2000). T-cell line adaptation of human immunodeficiency virus type 1 strain SF162: effects on envelope, vpu and macrophage-tropism. *J Gen Virol*, 81, 2899-904.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L., 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5, 1365-1369.
- Douek, D.C., Picker, L.J., Koup, R.A., 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 21, 265-304.
- Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., Shaw, A.S., 2010. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002311.
- Feinerman, O., Veiga, J., Dorfman, J.R., Germain, R.N., Altan-Bonnet, G., 2008. Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science* 321, 1081-1084.
- Fife, B.T., Pauken, K.E., 2011. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1217, 45-59.
- Finger, L.R., Pu, J., Wasserman, R., Vibhakar, R., Louie, E., Hardy, R.R., Burrows, P.D., Billips, L.G., 1997. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene* 197, 177-187.
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., Cavallo, M.C., Silini, E.M., Andreone, P., Missale, G., Ferrari, C., 2010. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 138, 682-693, 693 e681-684.
- Forsman, A., Weiss, R.A., 2008. Why is HIV a pathogen? *Trends Microbiol* 16, 555-560.
- Francisco, L.M., Sage, P.T., Sharpe, A.H., 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236, 219-242.
- Frankel, A.D., Young, J.A., 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67, 1-25.
- Frederick, M.J., Clayman, G.L., 2001. Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* 3, 1-18.
- Freel, S.A., Saunders, K.O., Tomaras, G.D., 2011. CD8(+)T-cell-mediated control of HIV-1 and SIV infection. *Immunol Res* 49, 135-146.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034.
- Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R., Sharpe, A.H., 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203, 2223-2227.
- Fuss, I. J., M. E. Kanof, P. D. Smith y H. Zola (2009). Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 7, Unit7 1.
- Gandhi, R.T., Walker, B.D., 2002. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 53, 149-172.
- Gao, Y., I. Nankya, A. Abraha, R. M. Troyer, K. N. Nelson, A. Rubio y E. J. Arts (2009). Calculating HIV-1 infectious titre using a virtual TCID₅₀ method. *Methods Mol Biol*, 485, 27-35.
- Gorry, P.R., Ancuta, P., 2011. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 8, 45-53.
- Gougeon, M.L., Laurent-Crawford, A.G., Hovanessian, A.G., Montagnier, L., 1993. Direct and indirect mechanisms mediating apoptosis during HIV infection: contribution to in vivo CD4 T cell depletion. *Semin Immunol* 5, 187-194.
- Greene, W.C., Peterlin, B.M., 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8, 673-680.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-548.

- Harman, A.N., Lai, J., Turville, S., Samarajiwa, S., Gray, L., Marsden, V., Mercier, S., Jones, K., Nasr, N., Cumming, H., Donaghy, H., Mak, J., Churchill, M., Hertzog, P., Cunningham, A.L., 2011. HIV infection of dendritic cells subverts the interferon induction pathway via IRF1 and inhibits type 1 interferon production. *Blood*.
- Hazenberg, M.D., Otto, S.A., van Benthem, B.H., Roos, M.T., Coutinho, R.A., Lange, J.M., Hamann, D., Prins, M., Miedema, F., 2003. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 17, 1881-1888.
- He, X.H., Liu, Y., Xu, L.H., Zeng, Y.Y., 2004. Cloning and identification of two novel splice variants of human PD-L2. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36, 284-289.
- He, X.H., Xu, L.H., Liu, Y., 2005. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking IgV-like domain. *Acta Pharmacol Sin* 26, 462-468.
- Huang, X., Venet, F., Wang, Y.L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., Swan, R., Kherouf, H., Monneret, G., Chung, C.S., Ayala, A., 2009. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6303-6308.
- Hughes, A., Nelson, M., 2009. HIV entry: new insights and implications for patient management. *Curr Opin Infect Dis* 22, 35-42.
- Ishida, M., Iwai, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Freeman, G.J., Minato, N., Honjo, T., 2002. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 84, 57-62.
- Jin, H.T., Ahmed, R., Okazaki, T., 2010. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*.
- Jin, H.T., Jeong, Y.H., Park, H.J., Ha, S.J., 2011. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Rep* 44, 217-231.
- Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L.G., Zhang, L., Perelson, A.S., Ho, D.D., 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189, 991-998.
- Jin, H.T., Anderson, A.C., Tan, W.G., West, E.E., Ha, S.J., Araki, K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., Ahmed, R., 2010. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14733-14738.
- Khaitan, A., Unutmaz, D., 2011. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 8, 4-11.
- Kabelitz, D., Wesch, D., 2001. Role of gamma delta T-lymphocytes in HIV infection. *Eur J Med Res* 6, 169-174.
- Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., Wherry, E.J., 2011. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8(+) T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* 12, 663-671.
- Kaufmann, D.E., Walker, B.D., 2009. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* 182, 5891-5897.
- Kaufmann, D.E., Walker, B.D., 2008. Programmed death-1 as a factor in immune exhaustion and activation in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 3, 362-367.
- Kaul, R., MacDonald, K.S., Nagelkerke, N.J., Kimani, J., Fowke, K., Ball, T.B., Luo, M., Kariri, A., Jaoko, W., Moses, S., Rowland-Jones, S., Plummer, F.A., 2010. HIV viral set point and host immune control in individuals with HIV-specific CD8+ T-cell responses prior to HIV acquisition. *AIDS* 24, 1449-1454.
- Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J.L., Gao, F., Anderson, J.A., Ping, L.H., Swanstrom, R., Tomaras, G.D., Blattner, W.A., Goepfert, P.A., Kilby, J.M., Saag, M.S., Delwart, E.L., Busch, M.P., Cohen, M.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Gaschen, B., Athreya, G.S., Lee, H.Y., Wood, N., Seoghe, C., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7552-7557.
- Khaitan, A., Unutmaz, D., 2011. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep* 8, 4-11.

- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., Ho, D.D., 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68, 4650-4655.
- Kushnir, V.A., Lewis, W., 2011. Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and infertility: emerging problems in the era of highly active antiretrovirals. *Fertil Steril*.
- Lafferty, K.J., Cunningham, A.J., 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53, 27-42.
- Landay, A., Benning, L., Bremer, J., Weiser, B., Burger, H., Nowicki, M., Kovacs, A., 2003. Correlates of immune activation marker changes in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIV-seronegative women who use illicit drugs. *J Infect Dis* 188, 209-218.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Bousiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-268.
- Laurent-Crawford, A.G., Hovanessian, A.G., 1992. Characterization of the Nef protein in HIV1-infected CEM cells. *Res Virol* 143, 59-62.
- Laurent-Crawford, A.G., Krust, B., Muller, S., Riviere, Y., Rey-Cuille, M.A., Bechet, J.M., Montagnier, L., Hovanessian, A.G., 1991. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 185, 829-839.
- Lehner, T., Wang, Y., Pido-Lopez, J., Whittall, T., Bergmeier, L.A., Babaahmady, K., 2008. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine* 26, 2997-3001.
- Leslie, A.J., Pfaffert, K.J., Chetty, P., Draenert, R., Addo, M.M., Feeney, M., Tang, Y., Holmes, E.C., Allen, T., Prado, J.G., Altfeld, M., Brander, C., Dixon, C., Ramduth, D., Jeena, P., Thomas, S.A., St John, A., Roach, T.A., Kupfer, B., Luzzi, G., Edwards, A., Taylor, G., Lyall, H., Tudor-Williams, G., Novelli, V., Martinez-Picado, J., Kiepiela, P., Walker, B.D., Goulder, P.J., 2004. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 10, 282-289.
- Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., Reilly, C., Carlis, J., Miller, C.J., Haase, A.T., 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 434, 1148-1152.
- Liang, S.C., Latchman, Y.E., Buhlmann, J.E., Tomczak, M.F., Horwitz, B.H., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 33, 2706-2716.
- Lindwasser, O.W., Chaudhuri, R., Bonifacio, J.S., 2007. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med* 7, 171-184.
- Liu, X.Y., Shi, F., Zhao, H., Wang, H.F., 2010. [Research of PD-1 expression in CD8+ T cell of peripheral blood with HBV-associated acute-on-chronic liver failure]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 24, 125-127.
- Lombardi, V., Singh, A.K., Akbari, O., 2010. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 151, 179-189.
- Lutz, M.B., Kurts, C., 2009. Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *Eur J Immunol* 39, 2325-2330.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., Cullen, B.R., 1989. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.
- Marchetti, G., Cozzi-Lepri, A., Merlini, E., Bellistri, G.M., Castagna, A., Galli, M., Verucchi, G., Antinori, A., Costantini, A., Giacometti, A., di Caro, A., D'Arminio Monforte, A., 2011.
- Meier, A., Bagchi, A., Sidhu, H.K., Alter, G., Suscovich, T.J., Kavanagh, D.G., Streeck, H., Brockman, M.A., LeGall, S., Hellman, J., Altfeld, M., 2008. Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS* 22, 655-658.
- Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count. *AIDS*.

- Mariani, S.A., Vicenzi, E., Poli, G., 2011. Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4(+) T lymphocytes. *J Transl Med* 9 Suppl 1, S8.
- McCutchan, F.E., 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 14 Suppl 3, S31-44.
- McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., 2001. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410, 980-987.
- McMichael, A.J., Borrow, P., Tomaras, G.D., Goonetilleke, N., Haynes, B.F., 2010. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 10, 11-23.
- Mercenne, G., Bernacchi, S., Richer, D., Bec, G., Henriot, S., Paillart, J.C., Marquet, R., 2010. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res* 38, 633-646.
- Mild, M., Kvist, A., Esbjornsson, J., Karlsson, I., Fenyo, E.M., Medstrand, P., 2010. Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infect Genet Evol* 10, 356-364.
- Moore, J.P., 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 276, 51-52.
- Muthumani, K., Choo, A.Y., Shedlock, D.J., Laddy, D.J., Sundaram, S.G., Hirao, L., Wu, L., Thieu, K.P., Chung, C.W., Lankaraman, K.M., Tebas, P., Silvestri, G., Weiner, D.B., 2008.
- Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces programmed death 1 expression through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Virol* 82, 11536-11544.
- Nelson, P.W., Mittler, J.E., Perelson, A.S., 2001. Effect of drug efficacy and the eclipse phase of the viral life cycle on estimates of HIV viral dynamic parameters. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26, 405-412.
- Nielsen, C., Ohm-Laursen, L., Barington, T., Husby, S., Lillevang, S.T., 2005. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol* 235, 109-116.
- Nurieva, R., Thomas, S., Nguyen, T., Martin-Orozco, N., Wang, Y., Kaja, M.K., Yu, X.Z., Dong, C., 2006. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J* 25, 2623-2633.
- Okazaki, T., Honjo, T., 2006. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 27, 195-201.
- P Quigley, M., Pereyra, F., Nilsson, B., Porichis, F., Fonseca, C., Eichbaum, Q., Julg, B., Jesneck, J.L., Brosnahan, K., Imam, S., Russell, K., Toth, I., Piechocka-Trocha, A., Dolfi, D., Angelosanto, J., Crawford, A., Shin, H., Kwon, D.S., Zupkosky, J., Francisco, L., Freeman, G.J., Wherry, E.J., Kaufmann, D.E., Walker, B.D., Ebert, B., Haining, W.N., 2010. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 16, 1147-1151.
- arry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., Riley, J.L., 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25, 9543-9553.
- Peterlin, B.M., Trono, D., 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3, 97-107.
- Petroff, M.G., Perchet, A., 2010. B7 family molecules as regulators of the maternal immune system in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63, 506-519.
- Petrovas, C., Casazza, J.P., Brenchley, J.M., Price, D.A., Gostick, E., Adams, W.C., Precopio, M.L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D.C., Koup, R.A., 2006. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 203, 2281-2292.
- Pilcher, C.D., Eron, J.J., Jr., Galvin, S., Gay, C., Cohen, M.S., 2004. Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J Clin Invest* 113, 937-945.
- Ponce de Leon Rosales, S., Rodriguez-Alvarez, M., 2010. [Current situation of HIV/AIDS in the world]. *Gac Med Mex* 146, 408-410.
- Porichis, F., Kaufmann, D.E., 2011. HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Curr Opin HIV AIDS* 6, 174-180.
- Porichis, F., Kwon, D.S., Zupkosky, J., Tighe, D.P., McMullen, A., Brockman, M.A., Pavlik, D.F., Rodriguez-Garcia, M., Pereyra, F., Freeman, G.J., Kavanagh, D.G.,

- Kaufmann, D.E., 2011. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood*.
- Radziewicz, H., Ibegbu, C.C., Fernandez, M.L., Workowski, K.A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H.L., Steinberg, J.P., Masopust, D., Wherry, E.J., Altman, J.D., Rouse, B.T., Freeman, G.J., Ahmed, R., Grakoui, A., 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 81, 2545-2553.
 - Riley, J.L., 2009. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 229, 114-125.
 - Rodriguez-Garcia, M., Porichis, F., de Jong, O.G., Levi, K., Diefenbach, T.J., Lifson, J.D., Freeman, G.J., Walker, B.D., Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., 2011. Expression of PD-L1 and PD-L2 on human macrophages is up-regulated by HIV-1 and differentially modulated by IL-10. *J Leukoc Biol* 89, 507-515.
 - Roizman B, P.P., 1996. Multiplication of virus: an overview. *Virology* Lippincott-Raven Publishers, 59-99.
 - Ro Rosignoli, G., Cranage, A., Burton, C., Nelson, M., Steel, A., Gazzard, B., Gotch, F., Imami, N., 2007. Expression of PD-L1, a marker of disease status, is not reduced by HAART in aviraemic patients. *AIDS* 21, 1379-1381.
 - ssouw, T., Richter, K., Martin, D., Avenant, T., Spencer, D., 2011. The 2010 South African guidelines for the management of HIV and AIDS: a review. *S Afr Med J* 101, 237-240.
 - Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A., Rosen, C.A., 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63, 1-8.
 - Salisch, N.C., Kaufmann, D.E., Awad, A.S., Reeves, R.K., Tighe, D.P., Li, Y., Piatak, M., Jr., Lifson, J.D., Evans, D.T., Pereyra, F., Freeman, G.J., Johnson, R.P., 2010. Inhibitory TCR coreceptor PD-1 is a sensitive indicator of low-level replication of SIV and HIV-1. *J Immunol* 184, 476-487.
 - Shankar, E.M., Che, K.F., Messmer, D., Lifson, J.D., Larsson, M., 2011. Expression of a broad array of negative costimulatory molecules and Blimp-1 in T cells following priming by HIV-1 pulsed dendritic cells. *Mol Med* 17, 229-240.
 - Sakaguchi, S., 2011. Regulatory T cells: history and perspective. *Methods Mol Biol* 707, 3-17.
 - Schacker, T.W., Hughes, J.P., Shea, T., Coombs, R.W., Corey, L., 1998. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 128, 613-620.
 - Schubert, U., Bour, S., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., Maldarell, F., Strebel, K., 1996. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* 70, 809-819.
 - Seliger, B., Marincola, F.M., Ferrone, S., Abken, H., 2008. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* 14, 550-559.
 - Shan, L., Yang, H.C., Rabi, S.A., Bravo, H.C., Irizarry, R.A., Zhang, H., Margolick, J.B., Siliciano, J.D., Siliciano, R.F., 2011. Influence of host gene transcription level and orientation on HIV-1 latency in a primary cell model. *J Virol*.
 - Shen, T., Zheng, J., Liang, H., Xu, C., Chen, X., Zhang, T., Xu, Q., Lu, F., 2011. Phenotypic Characteristics and PD-1 Expression of Peripheral CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi}FoxP3⁺ Treg Cells in Chronic HCV infected-Patients. *Virol J* 8, 279.
 - Shin, H., Blackburn, S.D., Blattman, J.N., Wherry, E.J., 2007. Viral antigen and extensive division maintain virus-specific CD8 T cells during chronic infection. *J Exp Med* 204, 941-949.
 - Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M., Honjo, T., 1994. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23, 704-706.
 - Silvestri, G., Feinberg, M.B., 2003. Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* 112, 821-824.
 - Soto, M.J., Pena, A., Vallejo, F.G., 2010. A Genomic and Bioinformatics Analysis of the Integration of HIV in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
 - Sudharshan, S., Biswas, J., 2008. Introduction and immunopathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *Indian J Ophthalmol* 56, 357-362.

- Terai, C., Kornbluth, R.S., Pauza, C.D., Richman, D.D., Carson, D.A., 1991. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest* 87, 1710-1715.
- Thangavelu, G., Parkman, J.C., Ewen, C.L., Uwiera, R.R., Baldwin, T.A., Anderson, C.C., 2011. Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis. *J Autoimmun* 36, 301-312.
- Thompson, R.H., Kwon, E.D., Allison, J.P., 2009. Inhibitors of B7-CD28 costimulation in urologic malignancies. *Immunotherapy* 1, 129-139.
- Thoulouze, M.I., Sol-Foulon, N., Blanchet, F., Dautry-Varsat, A., Schwartz, O., Alcover, A., 2006. Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24, 547-561.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., Routy, J.P., Haddad, E.K., Sekaly, R.P., 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12, 1198-1202.
- Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., Tsuchiya, H., 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839-846.
- UNAIDS, 2011. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2011.
- Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., Marmon, S., Littman, D.R., 1999. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med* 189, 1735-1746.
- Veazey, R.S., DeMaria, M., Chalifoux, L.V., Shvetz, D.E., Pauley, D.R., Knight, H.L., Rosenzweig, M., Johnson, R.P., Desrosiers, R.C., Lackner, A.A., 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280, 427-431.
- Venkatachari, N.J., Buchanan, W.G., Ayyavoo, V., 2008. Human immunodeficiency virus (HIV-1) infection selectively downregulates PD-1 expression in infected cells and protects the cells from early apoptosis in vitro and in vivo. *Virology* 376, 140-153.
- Wang, S., Bajorath, J., Flies, D.B., Dong, H., Honjo, T., Chen, L., 2003. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 197, 1083-1091.
- Watanabe, T., Bertoletti, A., Tanoto, T.A., 2010. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepat* 17, 453-458.
- Wong, R.M., Smith, K.A., Tam, V.L., Pagarigan, R.R., Meisenburg, B.L., Quach, A.M., Carrillo, M.A., Qiu, Z., Bot, A.I., 2009. TLR-9 signaling and TCR stimulation co-regulate CD8(+) T cell-associated PD-1 expression. *Immunol Lett* 127, 60-67.
- Yabar, C., 2003. Eventos Moleculares, Geneticos e inmunologicos durante la infeccion VIH-Hombre. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 20, 9.
- Yamamoto, T., Price, D.A., Casazza, J.P., Ferrari, G., Nason, M., Chattopadhyay, P.K., Roederer, M., Gostick, E., Katsikis, P.D., Douek, D.C., Haubrich, R., Petrovas, C., Koup, R.A., 2011. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T cell exhaustion in HIV infection. *Blood*.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., Azuma, M., Yagita, H., 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169, 5538-5545.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Koyanagi, A., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., 2005. Blockade of B7-H1 on macrophages suppresses CD4+ T cell proliferation by augmenting IFN-gamma-induced nitric oxide production. *J Immunol* 175, 1586-1592.
- Yao, S., Wang, S., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., Flies, S., Xu, H., Ruff, W., Broadwater, M., Choi, I.H., Tamada, K., Chen, L., 2009. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* 113, 5811-5818.
- Yuan, Y., Maeda, Y., Terasawa, H., Monde, K., Harada, S., Yusa, K., 2011. A combination of polymorphic mutations in V3 loop of HIV-1 gp120 can confer noncompetitive resistance to maraviroc. *Virology* 413, 293-299.
- Zhan, P., Liu, X., De Clercq, E., 2010. Blocking nuclear import of pre-integration complex: an emerging anti-HIV-1 drug discovery paradigm. *Curr Med Chem* 17, 495-503.

- Zhang, J.Y., Zhang, Z., Wang, X., Fu, J.L., Yao, J., Jiao, Y., Chen, L., Zhang, H., Wei, J., Jin, L., Shi, M., Gao, G.F., Wu, H., Wang, F.S., 2007. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood* 109, 4671-4678.
- Zimmerman, E.S., Chen, J., Andersen, J.L., Ardon, O., Dehart, J.L., Blackett, J., Choudhary, S.K., Camerini, D., Nghiem, P., Planelles, V., 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G2 arrest requires Rad17 and Hus1 and induces nuclear BRCA1 and gamma-H2AX focus formation. *Mol Cell Biol* 24, 9286-9294.