



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPORTANCIA DE LA CANTIDAD DE LINFOCITOS T CD4 AL INICIO DEL
TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES
DE ACTIVACIÓN EN PERSONAS INFECTADAS CON EL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

RICARDO EMMANUEL VILLARRUEL VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Importancia de la cantidad de linfocitos T CD4 al inicio del tratamiento
antirretroviral en la expresión de marcadores de activación en personas infectadas
por el virus de inmunodeficiencia humana.

| Tabla de contenido | Pág. |
|---|------|
| 1. Resumen. | 1 |
| 2. Justificación. | 3 |
| 3. Marco teórico. | 6 |
| 3.1 El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). | 6 |
| 3.1.1 Ciclo de replicación. | 6 |
| 3.2 Historia Natural de la infección por el VIH y marcadores de progresión. | 9 |
| 3.2.1 Carga Viral y cuenta de linfocitos T CD4. | 11 |
| 3.2.2 Marcadores de activación y su importancia. | 13 |
| 3.3 Importancia de Linfocitos T y células NK en la infección por VIH. | 15 |
| 3.3.1 Células NK como primera línea de defensa contra la infección. | 16 |
| 3.3.2 Cambios en las células NK en el transcurso de la infección por el VIH. | 18 |
| 3.3.3 Activación de células NK. | 20 |
| 3.3.4 Función de los linfocitos T CD4 y T CD8. | 21 |
| 3.3.5 Cambios en las subpoblaciones de linfocitos T durante la infección por el VIH. | 23 |
| 3.3.6 Expresión de marcadores de activación en las subpoblaciones de linfocitos T. | 25 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Tratamiento antirretroviral. | 26 |
| 3.4.1 Fármacos usados en el tratamiento antirretroviral. | 28 |
| 3.4.2 Factores a considerar para iniciar el TARc. | 30 |
| 3.4.3 Importancia de la cantidad de linfocitos T CD4 al inicio del TARc. | 32 |
| 3.4.4 Reconstitución inmune. | 34 |
| 4. Objetivos. | 35 |
| 4.1 Objetivo general. | 35 |
| 4.2 Objetivos particulares. | 35 |
| 5. Hipótesis | 35 |
| 6. Métodos y Materiales. | 36 |
| 6.1 Muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de personas VIH positivas. | 37 |
| 6.2 Grupos de estudio. | 38 |
| 6.3 Descongelación de CMSP. | 38 |
| 6.4 Panel de activación de linfocitos T y células NK. | 38 |
| 6.5 Tinción celular con anticuerpos acoplados a fluorocromos. | 39 |
| 6.6 Análisis inmunofenotípico en el citómetro LSR Fortessa. | 41 |
| 6.7 Análisis en Flow Jo. | 42 |
| 7. Resultados | 46 |
| 7.1 Efecto del TARc en la recuperación de linfocitos T CD4 y CV | 46 |
| 7.2 Reconstitución de linfocitos T y células NK | 47 |
| 7.2.1 Reconstitución de linfocitos T CD4 y sus subpoblaciones | |

| | |
|--|----|
| después del inicio del TARc. | 48 |
| 7.2.2 Reconstitución de linfocitos T CD8 y sus subpoblaciones después del inicio del TARc. | 51 |
| 7.2.3 Reconstitución de células NK y sus subpoblaciones después del inicio del TARc. | 54 |
| 7.3 Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4+ después del inicio del TARc. | 55 |
| 7.4 Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8+ después del inicio del TARc. | 58 |
| 7.5 Expresión de marcadores de activación en subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+ después del inicio del TARc. | 60 |
| 7.6 Expresión de marcadores de activación en células NK después del inicio del TARc. | 65 |
| 8.0 Discusión de Resultados. | 70 |
| 8.1 Reconstitución de linfocitos T y células NK | 71 |
| 8.1.1 La reconstitución de linfocitos T CD4+ después del inicio del TARc depende del número de linfocitos T CD4+ con el que se haya iniciado el tratamiento. | 71 |
| 8.1.2 Las infecciones oportunistas pueden contribuir al aumento de linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH. | 73 |
| 8.1.3 El porcentaje de linfocitos T CD8+ totales no disminuye | |

| | |
|---|----|
| después del inicio del TARc. | 75 |
| 8.1.4 Las células NK CD56 ⁻ /CD16 ⁺ aumentan conforme progresa la infección por el VIH. | 75 |
| 8.2 Efecto del TARc en la activación crónica | 77 |
| 8.2.1 Los linfocitos T CD4 ⁺ CD38 ⁺ no disminuyen después del inicio del TARc pero si los linfocitos T CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ . | 77 |
| 8.2.2 El porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ disminuye al igual que en las subpoblaciones. | 79 |
| 8.2.3 El momento en el que se inicie el TARc no afecta la expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4 ⁺ . | 80 |
| 9.0 Conclusión | 81 |
| 10.0 Referencias. | 82 |

1. Resumen

Las muertes relacionadas con la infección por el VIH estaban aumentando en la última década, por lo que los criterios de inicio del tratamiento antirretroviral se han estado modificando con base en los hallazgos que surgen en torno a sus beneficios y efectos adversos. El inicio oportuno del tratamiento antirretroviral combinado (TARc) ha disminuido la tasa de mortalidad y morbilidad causada por el VIH/SIDA, debido a la reconstitución de los linfocitos T CD4, la disminución de la replicación viral y al evitar la hiper-activación o bien al disminuirla.

La hiper-activación de las células del sistema inmune provoca una pérdida de funcionalidad de dichas células, por ésta razón es de importancia iniciar el TARc oportunamente para evitar la pérdida de funcionalidad, que se refleja en la calidad de la respuesta inmune del organismo.

En el presente trabajo se estudio si la disminución en la activación de linfocitos T y células NK después de iniciar el TARc en personas con VIH, depende del número de linfocitos T CD4 con la que se contaba antes de iniciar dicho tratamiento.

Para este fin se realizó un estudio de la expresión de marcadores de activación como CD38 y HLA-DR en dos grupos de estudio: personas con VIH que iniciaron TARc con un conteo de linfocitos T CD4 menor a 350 células por μL de sangre (grupo 1) y las personas con VIH que iniciaron TARc con un conteo de linfocitos T CD4 mayor a 350 células por μL de sangre (grupo 2).

Para demostrar si hay diferencias entre estos dos grupos, se determinó el porcentaje de células positivas para CD38 y HLA-DR en linfocitos T, sus

subpoblaciones y células NK por citometría de flujo multiparamétrica, para muestras tomadas en un seguimiento de 4 años.

Los resultados mostraron que no hay diferencia entre los grupos de estudio en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4+CD38+, T CD4+HLA-DR+, T CD8+CD38+, T CD8+HLA-DR+ y células NK CD38+ y HLA-DR+.

Con estos resultados concluimos que sin importar el momento en el que se inicie el TARc, los cambios en la activación celular se presentan de la misma forma en ambos grupos de estudio.

2. Justificación

La descripción del primer caso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) reportado en 1981, así como la identificación y descripción del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en 1983, marca el inicio de una pandemia, que ha provocado aproximadamente 28 millones de muertes alrededor del mundo (UNAIDS, 2010). Las infecciones oportunistas relacionadas con el SIDA (que se produce en la etapa final de la infección), son una de las principales causas de mortalidad y se estima que lo seguirán siendo en los próximos años (OMS, 2009). Sin embargo la mortalidad por ésta causa ha disminuido con la aplicación oportuna de un tratamiento adecuado.

El control de la pandemia es una prioridad sanitaria. A pesar de los avances que se han logrado en la prevención de nuevas infecciones y en la disminución de las defunciones relacionadas con la enfermedad, el número de personas infectadas sigue aumentando (OMS, 2009). De acuerdo a los reportes mundiales se sabe que aproximadamente 34 millones de personas alrededor del mundo viven con VIH (UNAIDS, 2010). Por este motivo se ha vuelto necesario el desarrollo de terapias efectivas y, más aún, de una vacuna capaz de controlar o evitar la infección (Girard, et. al., 2011).

La terapia antirretroviral combinada (TARc) es ampliamente utilizada y tiene efectos significativos en la reducción de la carga viral (cantidad de virus en sangre) y al retardar la progresión de la infección hacia la etapa de SIDA (Kaufmann y Cooper, 2000). La disponibilidad de estos fármacos alrededor del mundo ha

mejorado considerablemente, por lo que la morbilidad y mortalidad han disminuido en los últimos años.

Se ha mostrado que iniciar el TARc en personas con VIH, produce el aumento de la cantidad de linfocitos T CD4, la disminución en la carga viral y la disminución en la expresión de ciertas moléculas relacionadas con la hiper-activación celular. La hiper-activación está definida por el aumento en la expresión de proteínas como HLA-DR y CD38 que son proteínas de membrana que se expresan en diferentes células (Sodora y Silvestri, 2008). En linfocitos T se ha reportado un aumento en la expresión de estas proteínas conforme a la progresión de la infección, y se han relacionado con el desarrollo de SIDA (Nakanjako et al, 2011).

Una de las finalidades de iniciar el TARc es disminuir la hiper-activación de las distintas células del sistema inmune, que es inducida entre otros factores por la propia infección. Debido a que la activación es uno de los marcadores de progresión de la infección, se ha vuelto de gran importancia monitorear los cambios que presentan los marcadores de activación que expresan diferentes poblaciones celulares del sistema inmune después del inicio del TARc, para determinar el éxito o la falla de la terapia (Ramzaoui, et. al., 1995). Sin embargo, la aplicación de éstos fármacos viene acompañado de efectos adversos, como la toxicidad secundaria y la resistencia a éstos (Society–USA Panel, 2010).

El conteo de linfocitos T CD4 ha sido uno de los parámetros utilizado durante los últimos años para determinar el inicio del TARc. Iniciar el TARc con un conteo de linfocitos T CD4 arriba de 350 cél/ μ L, tiene la ventaja de prevenir enfermedades y complicaciones asociadas con el VIH y disminuir el riesgo de transmisión del virus.

Las desventajas de esto son los efectos adversos que se presentan a corto y a largo plazo por el uso continuo de los fármacos, la posibilidad de que se genere resistencia del virus al fármaco y la inconveniencia de estar tomando la medicación desde el inicio de la infección, aunque algunas de estas desventajas también se presentan al iniciar el TARc con menos de 350 cél/ μ L (RPHI, 2011).

En contraste, iniciar TARc con un conteo de linfocitos T CD4 debajo de 350 cél/ μ L, tiene la ventaja de retardar los efectos adversos de los fármacos y no estar tomando medicación desde el inicio de la infección. Sin embargo, las desventajas son, el mantenerse por largos periodos con conteos bajos de linfocitos T CD4 y carga viral alta, así como la posibilidad de desarrollar SIDA y enfermedades relacionadas con la infección (START, 2011).

Hasta el año 2010 se recomendaba iniciar el TARc cuando la cuenta de linfocitos T CD4 estuviera por debajo de las 350 cél/ μ L de sangre o bien cuando se observaran los primeros síntomas de SIDA (BHIVA, 2008), así como cuando hubiera co-infecciones con otros virus como el virus de la hepatitis B y/o C, en mujeres embarazadas, en personas con nefropatías o cardiopatías asociadas al VIH y en personas con VIH mayores de 50 años (OARAC, 2011).

Las células NK y los linfocitos T son de gran importancia para de la respuesta inmune y se ven afectadas en el transcurso de la infección por el VIH, por lo que se ha vuelto importante el estudio de ambas poblaciones y el impacto del momento en el que se inicia TARc para la restauración del número y funcionalidad de estas poblaciones celulares.

3. Marco teórico

3.1 El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El VIH pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Se han descrito dos tipos de VIH: VIH tipo 1 (VIH-1) y VIH tipo 2 (VIH-2); este último presenta una menor virulencia y está geográficamente limitado al oeste del continente africano (Levy, 2009).

Las infecciones causadas por lentivirus comúnmente muestran un curso crónico, con un largo periodo de latencia, en el que no hay síntomas clínicos pero la replicación viral es persistente (Schochetman, 1992).

El virus en su estadio maduro presenta un núcleo cónico que contiene el genoma viral, que consta de dos cadenas simples de ARN. Éstas contienen 9 genes, tres de ellos estructurales (*env*, *gag* y *pol*), que codifican para glicoproteínas de envoltura (gp120/gp41), proteínas de la nucleocápside (p24) y enzimas como la transcriptasa reversa, proteasa e integrasa (Wilk y Fuller, 1999). Los seis genes restantes, son genes accesorios, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*, que codifican para proteínas reguladoras que son las responsables de la virulencia del VIH. El virus se encuentra protegido por una doble membrana externa de fosfolípidos derivados de la célula hospedera, que además contiene copias de p17 y de gp120/gp41 (Ostrowski, 2009; Girard, et.al., 2011).

3.1.1 Ciclo de replicación.

La entrada del VIH a la célula hospedera puede dividirse en dos eventos principales: el reconocimiento de la célula por el virus y la fusión entre la

membrana viral y la celular. Como se muestra en la figura 1, el primer evento es el reconocimiento entre la glicoproteína de envoltura gp120 y el receptor CD4 (Fanales, et.al., 2010). La unión de la proteína gp120 al receptor CD4 provoca un cambio conformacional en la superficie viral que facilita la exposición de un dominio protéico específico, el cual es capaz de unirse a los receptores de quimiocinas que se encuentran en la membrana celular (Knyzs, et.al., 2007). Los receptores de quimiocinas reconocidos por el virus son CCR5 y CXCR4. El receptor CCR5 está presente en monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T activados, mientras que el receptor CXCR4 es expresado en una gran cantidad de células, incluidos los linfocitos T. (Bleul, et.al., 1997).

La doble unión de gp120 al receptor CD4 y al receptor de quimiocinas, hace que la interacción virus-célula sea más fuerte, permitiendo que el péptido fusogénico hidrofóbico presente en gp41, penetre en la membrana celular y se produzca la fusión entre membranas (viral y celular). Posteriormente se genera la entrada de la cápside viral a la célula.

Una vez que se ha llevado a cabo la fusión de membranas, el complejo de la transcripción reversa (el núcleo, la cápside, la nucleocápside, la transcriptasa reversa, la integrasa, el genoma y proteínas accesorias) que ha llegado al citoplasma unido a actina, desencadena la transcripción reversa del ARN viral a ADN proviral, llevada a cabo por la enzima transcriptasa reversa y se crea el complejo de preintegración. Este complejo es transportado por el retículo endoplásmico hacia el núcleo y entra a éste vía poro nuclear (Bukrinski, 2004). Al llegar al núcleo el ADN proviral es insertado en el ADN genómico de la célula

hospedera por medio de la integrasa. La integración del ADN viral y la transcripción del mismo requieren de factores como el factor nuclear (NF)- κ B que se encuentra en el núcleo solo si la célula esta activada (Metz, 2005).

Durante la replicación viral, el ADN proviral se transcribe a ARNm (Bohne, et.al., 2005). En la fase temprana de la transcripción, se transcriben proteínas regulatorias como *tat* y *rev*. *Tat* estimula la transcripción y formación de ARN transcrito mientras que *rev* facilita la expresión de genes estructurales y enzimáticos, suprime la degradación del ARN viral y transporta el ARNm maduro hacia el citoplasma. El ARNm maduro que migra hacia el citoplasma, es traducido a proteínas y enzimas.

Los productos codificados por el gen *env* forman las glicoproteínas de envoltura, gp120 y gp41. Las proteínas codificadas por los genes *pol* y *gag* darán forma el núcleo de partícula de VIH. Además las proteínas codificadas por *gag* y *pol* provienen de una molécula precursora la cual es escindida por la proteasa viral y da lugar a las proteínas p24, p17, p9, y p7. La escisión de la molécula precursora es fundamental para la generación de partículas virales (Dorfman, et.al., 1994).

Una vez sintetizados todos los componentes, el ensamblaje final se produce. Dos cadenas de ARN viral se asocian con las enzimas de replicación y son encapsuladas por las proteínas que componen el núcleo formando la cápside. Esta partícula inmadura migra hacia la superficie celular, donde madura y adquiere la membrana viral. La membrana viral puede incorporar algunas proteínas de la célula hospedera como moléculas del MHC, moléculas de adhesión e inhibidores del complemento (Fortin, et.al., 2000). Por último si una gran cantidad de viriones

se han ensamblado en la célula, se produce la muerte celular (Ivanchenko, et.al, 2009).

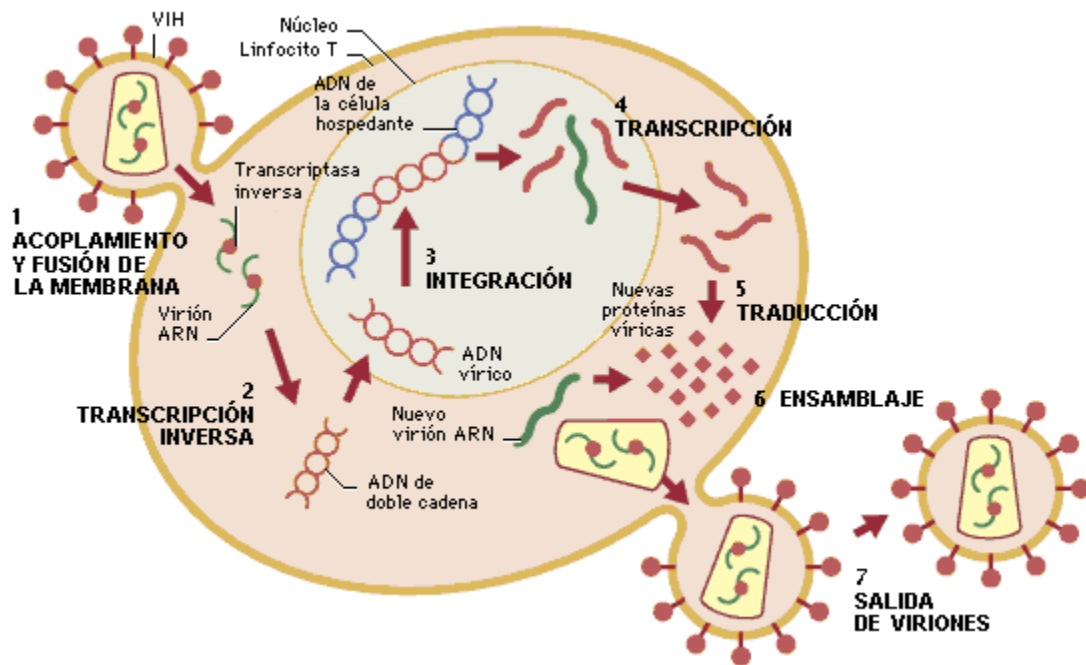


Figura 1. Ciclo de replicación del VIH (Modificado de: <http://cnho.files.wordpress.com/2011/02/ciclosida>, 2011).

3.2 Historia Natural de la infección por el VIH y marcadores de progresión.

La infección por el VIH se diagnostica, en muchos casos, años después del contagio, debido a que los síntomas que se presentan durante los días posteriores a la infección suelen pasar desapercibidos. La progresión de la infección se divide en tres etapas. La etapa aguda, que dura semanas; la etapa crónica, que dura de meses a años y la etapa tardía o fase de SIDA en la cual el deterioro del sistema inmune hace inevitable la muerte del individuo, en caso de no existir un tratamiento antirretroviral oportuno (Gurunathan, et.al., 2009).

En la etapa aguda se presentan manifestaciones clínicas como, fiebre, fatiga, salpullidos y linfadenopatias; estos síntomas desaparecen aproximadamente dos

semanas después del contagio (Vergis y Mellors, 2000). Esta etapa se caracteriza por una alta tasa de replicación viral así como por un alto grado de diseminación hacia todo el organismo, hecho por el cual se encuentran altas concentraciones de ARN viral en el plasma (carga viral: CV) de las personas infectadas. La CV más alta se determina entre las 2 y las 4 semanas posteriores a la primoinfección y va de las 100,000 a 10,000,000 de copias de ARN viral /mL de plasma (Al-Harthi, et.al., 2007). Este aumento correlaciona con la disminución de los linfocitos T CD4 en sangre periférica. Sin embargo la CV encontrada en plasma, decae entre los 4 a 6 meses de la infección lo que indica el comienzo del largo periodo de latencia. La caída de la CV se ha relacionado con la aparición de linfocitos T CD8 virus-específicos, encargados de eliminar a las células infectadas (citotoxicidad), iniciando así el control parcial de la progresión de la enfermedad (Borrow, et.al., 1997). La citotoxicidad ejercida por linfocitos T CD8 y por células NK sobre linfocitos T CD4 contribuye en gran medida a la disminución en el conteo de éstos, aunque posterior a la etapa aguda el conteo aumenta, sin llegar a niveles basales. De 2 a 4 semanas posteriores al inicio de la infección se producen anticuerpos no neutralizantes, que pueden servir como medio de diagnóstico, sin embargo, carecen de un gran efecto antiviral (Lewthwaite, 2009). Los anticuerpos neutralizantes aparecen a las 8 semanas aproximadamente y son los responsables de inhibir la infectividad de los viriones libres, aunque no se ha demostrado una correlación entre la cantidad de anticuerpos neutralizantes y la disminución de la CV en plasma (Wei, et.al., 2003).

Posterior a la etapa aguda se lleva a cabo un largo periodo de latencia, llamado etapa crónica, en la que generalmente no se presentan síntomas y que en ausencia de tratamiento tiene una duración promedio de diez años (Pantaleo, et.al., 1993). Durante esta fase se muestra un deterioro del sistema inmune, principalmente por la disminución de linfocitos T CD4, que no tiene la capacidad de regenerarse con la misma rapidez ni remplazar a los que se han perdido, así como la disminución de la función de los mismos debido a la activación sostenida, que conduce hacia fallas en la respuesta inmune (Lyles, et.al., 2000). Se ha mostrado que durante este periodo los niveles de CV aumentan continuamente y hay disminución de linfocitos T CD4. Dependiendo del grado con el que aumente la CV y disminuyan los linfocitos T CD4, será la velocidad con que progresa la infección (Henrad, et.al, 1995).

Cuando finalmente el conteo de linfocitos T CD4 ha disminuido drásticamente, comúnmente por debajo de las 200 células por μL de sangre, comienza la etapa tardía o fase de SIDA, en esta etapa se observa una clara disminución de la función en algunas poblaciones celulares como los linfocitos T CD8, una disminución en el número de células dendríticas, pero sobre todo, la aparición de enfermedades oportunistas, que tienen como consecuencia la muerte del individuo (Kaplan, et.al., 2000).

3.2.1 Carga Viral y cuenta de linfocitos T CD4

Dado que la progresión de la infección por el VIH está determinada por una combinación de factores, dependientes o independientes, muchos marcadores

han sido propuestos para predecir la evolución de la infección. Estos marcadores son importantes porque ofrecen información durante el periodo de la infección subclínica, además de que presentan variaciones a corto plazo que permiten darle un seguimiento preciso al curso de la infección sin necesidad de esperar a que aparezcan síntomas clínicos. Los más usados son el conteo de linfocitos T CD4 y la CV (Feinberg, 1996).

El conteo de linfocitos T CD4 fue el primer indicador utilizado para el seguimiento de progresión de la infección, así como indicativo del riesgo de que enfermedades oportunistas se desarrollen, por lo que se ha usado como criterio para determinar la inmunocompetencia y el inicio del tratamiento antirretroviral. Desafortunadamente el conteo de linfocitos T CD4 muestra variaciones biológicas que limitan el poder predictivo de este parámetro (Mellors, et.al., 1997). Esto hace indispensable la determinación de otros parámetros.

La progresión de la infección generalmente se caracteriza por una disminución de 50 a 75 linfocitos T CD4 por μL de sangre por año y por el incremento de la viremia (Alcibes, et.al., 1993). De acuerdo al conteo de linfocitos T CD4 las etapas de la infección se pueden dividir en: etapa temprana ($\text{CD4}^+ >500 \text{ cél/ } \mu\text{L}$), etapa crónica ($\text{CD4}^+ 200 \text{ a } 500 \text{ cél/ } \mu\text{L}$), etapa tardía ($\text{CD4}^+ 50 \text{ a } 200 \text{ cél/ } \mu\text{L}$) y la etapa tardía final ($\text{CD4}^+ <50 \text{ cél/ } \mu\text{L}$) (Wannamethee, et.al., 1998). En cuanto a la CV no se han definido grupos como tal, sin embargo se han hecho grupos de mayor y menor riesgo de progresión. Se ha observado que las personas con VIH que mantienen altos niveles de ARN viral en plasma tienden a progresar más rápido que los que mantienen niveles bajos (Jurriaans, et.al., 1994).

3.2.2 Marcadores de activación y su importancia

La infección por el VIH no solo está caracterizada por el desarrollo de inmunodeficiencia, sino que también produce un estado de hiperactivación generalizada y sostenida, que contribuye a la pérdida de función en células del sistema inmune. Actualmente se conoce que esta hiperactivación del sistema inmune en la infección por el VIH se produce por diversos motivos, entre los cuales está el hecho de tratarse de una infección crónica que mantiene al sistema inmune en contacto con el virus durante un largo periodo de tiempo así como con productos del virus como la proteína gp120 están estimulando células continuamente (Sodora y Silvestri, 2008). Otro factor que puede estar contribuyendo a la hiperactivación es la translocación de productos bacterianos a través de la mucosa intestinal debido al daño causado durante la infección por el VIH (Lee, et.al., 2009). La activación inespecífica de células que se encuentran alrededor de células infectadas, y las co-infecciones con otros virus son otras de las causas del estado de hiperactivación (Doisne, et.al., 2004). La hiperactivación se manifiesta por la expresión de marcadores de activación en diferentes poblaciones celulares y por el aumento de citocinas proinflamatorias en plasma (Nakayama, et.al., 2012). Los marcadores de activación por lo tanto son clasificados en solubles y celulares.

Dentro de los solubles se conocen una gran cantidad de citocinas que aumentan su concentración en plasma, por ejemplo interferon- γ (INF- γ), IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Than, et.al., 1996).

En linfocitos T los marcadores de activación son por excelencia CD38 y HLA DR. Estos marcadores se encuentran elevados en proporción a la magnitud de la replicación viral (Boasso y Shearer, 2008). Principalmente en células T CD8, pues son las células que aumentan durante el transcurso de la infección. Se ha mostrado que la expresión de CD38 en linfocitos T CD8 es uno de los marcadores de progresión más precisos en las últimas etapas de la infección, por encima de la CV (Coetzee, et.al., 2009).

En personas sin tratamiento se ha visto un aumento del porcentaje de células CD4+ y CD8+ con fenotipo activado (HLA DR+CD38+) conforme a la progresión de la enfermedad por lo que la cuantificación de estos marcadores se ha vuelto de gran importancia.

Por otro lado estos marcadores que nos hablan del grado de activación también nos hablan del deterioro del sistema inmune pues se ha asociado el aumento de en la expresión de estos marcadores con la disminución de linfocitos T CD4 en sangre periférica y con la pérdida de funcionalidad de poblaciones como linfocitos T CD8 (Hunt, et.al., 2007).

El inicio del TARc marca un importante cambio en la expresión de éstos marcadores, mostrando una disminución en los marcadores de activación desde el inicio de éste. La disminución de la expresión de marcadores de activación no depende directamente del TARc o del momento en el que se inicio. Sin embargo el efecto del TARc sobre la replicación viral y la cantidad de virus en sangre contribuye a la disminución de la expresión de éstos marcadores (Evans, et.al., 1998).

Por otro lado, se ha propuesto que la activación causada por la translocación de productos bacterianos, en la cual, moléculas como el lipopolisacárido (LPS) pasan a través de la pared intestinal provocando la activación de células del sistema inmune, se podría evitar al iniciar TARc, pues se ha sugerido que se logra el restablecimiento del tejido mucoso del intestino, por la redistribución y reconstitución de las células T de memoria (Downs, 2010).

En algunos casos se ha mostrado que cuando se han usado fármacos antagonistas del receptor CCR5 en la terapia, tienen efecto en la disminución de la activación y por tanto de la expresión de marcadores como HLA-DR y CD38 (Westrop, et.al., 2012).

En contraste, a pesar de que en gran medida, la activación inmunológica y la expresión de marcadores de activación disminuye después del inicio de TARc, existen estímulos que continúan con la activación de las células del sistema inmune. Dentro de éstos se encuentra la replicación viral residual, que se refiere a la cantidad de virus que continúan con la replicación viral a pesar del uso de TAR (Ferguson, et.al. 1999).

3.3 Importancia de Linfocitos T y células NK en la infección por VIH.

Todas las infecciones que se manifiestan en el organismo son combatidas por el sistema inmune, que genera una respuesta para el control de la infección, dicha respuesta se divide en; respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. Cada una de ellas caracterizada por la participación de células y factores solubles específicos (Abbas, et.al., 2010). Las principales células de la respuesta inmune

innata, son las células dendríticas, las células NK y células fagocíticas, entre otras (Levy, 2001). Las células NK juegan un papel central en el desarrollo y calidad de la respuesta inmune innata, debido a que son la primera línea de defensa ante las infecciones generadas principalmente por virus. Producen factores que favorecen la maduración de las células dendríticas, las cuales al madurar presentan antígenos a linfocitos T CD4 en los nódulos linfáticos, siendo así mediadoras entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Hamerman, et.al., 2005).

Los linfocitos T y B son las células que desencadenan la respuesta inmune adaptativa. Después que se ha dado la presentación de antígeno en los nódulos linfáticos, las células T y B se activan y se produce una expansión clonal que tiene como fin generar una gran cantidad de células T y B antígeno-específicas que favorecen el control de la infección (Alam y Gorska, 2003). Los linfocitos T CD8 tienen la capacidad de matar células infectadas, función conocida como citotoxicidad; las células B generan una gran cantidad de anticuerpos y los linfocitos T CD4 favorecen la activación y la expansión celular por el contacto célula-célula y la producción de factores solubles como las citocinas (Wei, et.al., 2003; Marodon, 2001).

3.3.1 Células NK como primera línea de defensa contra la infección.

Las células NK representan la población de células efectoras con mayor poder antiviral del sistema inmune innato. Tienen un papel importante en el control de la replicación viral en los estadios tempranos de la infección y en el desencadenamiento de la respuesta inmune adaptativa por su interacción con

otras células como las células dendríticas y los linfocitos T CD4 (Valentin, et.al., 2012).

En las infecciones virales, las células NK controlan la progresión de la infección al identificar células infectadas para eliminarlas y evitar que la infección se disemine. Las células NK pueden eliminar las células infectadas por tres mecanismos, el primero y el más estudiado, es la citotoxicidad de células infectadas; en éste la célula NK libera el contenido de gránulos citotóxicos que la célula almacena en su interior. Estos gránulos contienen enzimas como la perforina y granzima B que son liberadas al exterior y que tienen un efecto en la célula infectada. La perforina facilita la entrada de la granzima B al citoplasma de la célula infectada, formando poros en la membrana celular. La granzima B inicia una serie de eventos de señalización que culminan en la muerte de la célula (Le Bouteiller, et.al., 2011).

Los otros dos mecanismos para eliminar células infectadas son: la citotoxicidad mediada por anticuerpos que depende del reconocimiento de la fracción constante de los anticuerpos través del receptor CD16 de la célula NK y es conocida como, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Isitman, et.al., 2012); y la mediación de apoptosis de la célula infectada por la vía de FAS/FASL (fragmento estimulante de la apoptosis y su ligando) (Kaplan y Sieg, 1998). En el caso de los linfocitos, al estar infectados, expresan una gran cantidad de FASL en su superficie, al unirse con FAS que se expresa en células citotóxicas como NK o linfocitos T CD8, se produce la activación de la señalización que conduce a la muerte del linfocito infectad (Medvedev, et.al., 1997).

La citotoxicidad de las células NK se encuentra regulada por un balance entre los receptores membranales inhibidores o activadores, si hay una mayor señalización por parte de receptores activadores entonces se ejerce citotoxicidad sobre la célula infectada (Verneris, et.al., 2004). La activación de las células NK induce la expresión de receptores activadores por lo que disminuye el umbral para ejercer citotoxicidad sobre una célula (López-Botet, et.al., 1999).

La producción de factores solubles por parte de las células NK, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el interferón- γ (INF- γ), contribuyen de forma importante a la maduración de las CD que, en respuesta, producen IL-15 e IL-12 que, a su vez, sirven como estímulo para las células NK. El TNF- α e INF- γ favorecen la activación de otras células del sistema inmune e inducen la secreción de otras citocinas (Funke, et.al., 2011).

3.3.2 Cambios en las células NK en el transcurso de la infección por el VIH

Las células NK corresponden al 15% de los linfocitos circulantes en sangre periférica. Son células que no expresan TCR y por tanto, son CD3 negativas. Se han subdividido en dos poblaciones principales, caracterizadas por la expresión de las moléculas, CD56 y CD16 (Johansson et.al., 2005; Orange y Ballas, 2006, Jonges et.al., 2001; Bryceson et.al., 2006). Las células con expresión media de CD56 y que son CD16 positivas ($CD56^{dim}CD16^{pos}$), son las células en mayor proporción y forman aproximadamente el 90% de las células NK circulantes, son las células con mayor capacidad citotóxica y tienen una expresión alta de receptores activadores y de CD16 (Fan, et.al., 2008). Las células que tienen una

mayor expresión de CD56 y son CD16 negativas ($CD56^{bright}CD16^{neg}$), se encuentran en menor proporción en circulación y son consideradas células inmunomoduladoras, porque tienen una mayor producción y secreción de citocinas (Jost y Atfeld, 2012). Producen principalmente TNF- α e INF- γ , factores importantes en la respuesta inflamatoria y en la activación celular así como en la maduración de CD. Producen también IL-10, que tiene función reguladora al disminuir la síntesis de citocinas proinflamatorias, y el factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) ,que como su nombre lo indica estimula la producción de células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocitos (Giavedoni, et.al., 2000).

Durante las infecciones virales crónicas, como la producida por el VIH, se genera una población de células NK cuyo fenotipo es $CD56^{neg}CD16^{pos}$ relacionada con anergia. Esta población posiblemente es generada por la presencia constante de antígenos durante infecciones crónicas (Mavillo, et.al., 2005).

En la infección por VIH se han mostrado cambios importantes en las subpoblaciones de células NK. Durante la fase aguda no hay cambios aparentes, sin embargo en la fase crónica, se generan células NK anérgicas ($CD56^{neg}CD16^{pos}$). Las células $CD56^{neg}CD16^{pos}$ pueden llegar a constituir del 20% al 40% de las células NK totales o el 3% de linfocitos totales durante esta fase (Alter, et.al., 2005). Se ha mostrado que conforme avanza la infección, se observa una disminución de las células $CD56^{dim}CD16^{pos}$ que correlaciona con el aumento de células $CD56^{neg}CD16^{pos}$, por lo que se ha propuesto que las células que pierden funcionalidad son principalmente $CD56^{dim}CD16^{pos}$, mientras que las

células CD56^{brigh}CD16^{neg} se mantienen intactas en cantidad y función (Brunetta, et.al., 2010).

3.3.3 Activación de células NK.

La activación en células NK está caracterizada por un aumento en la expresión de moléculas como HLA-DR y CD69. Sin embargo otras moléculas como CD38 también se han utilizado para determinar el estado de activación de las células NK, a pesar de que las células NK tienen una cantidad basal considerable de CD38, lo que hace difícil el reconocimiento de cambios en el grado de expresión de esta molécula. (Benlahrech, et.al., 2009). En su estado basal el fenotipo de las células NK es HLA-DR^{neg}, CD69^{neg} y CD38^{pos} (Sconocchia, et.al., 2012).

Durante la fase aguda de las infecciones virales, el fenotipo de estas células cambia drásticamente y se observa un aumento en la expresión de moléculas de activación como HLA-DR, CD69 y un aumento apreciable en la expresión de CD38. Durante la fase aguda de una infección viral, es común encontrar un aumento en la expresión de CD69, que es una glicoproteína cuya expresión esta favorecida debido a que desempeña un papel importante en la proliferación y señalización de las células NK (Werfel, et.al., 1997).

En la fase crónica de una infección, la expresión de CD69 disminuye, conjuntamente con el aumento en la expresión de moléculas de HLA-DR y de CD38, que conduce a la hiperactivación de las células NK (Sauce, et.al., 2013). La hiperactivación se refiere al aumento progresivo y descontrolado de la

señalización que conduce a la activación de las células. Se puede observar por el aumento en la expresión de moléculas como CD38 y HLA-DR principalmente (Cohen, et.al., 2000). Se ha propuesto que, una de las causas de la hiperactivación durante la fase crónica de infecciones virales, es el propio virus o los productos virales (ya que éstos continúan estimulando las células), así como la producción de citocinas que también contribuyen con la hiperactivación. Se piensa que durante la fase crónica, el estado hiperactivo de las NK es el causante de la generación de células NK anérgicas. (Lima, et.al., 2001).

Finalmente, las células NK anérgicas, muestran un fenotipo de activación diferente a las otras dos subpoblaciones. Como ya se mencionó, hay un aumento de éstas células durante la fase crónica de la infección. Expresan bajas cantidades de CD38, grandes cantidades de HLA-DR en su membrana y son incapaces de ejercer acción citotóxica (Björkström, et.al., 2010).

3.3.4 Función de los linfocitos T CD4 y T CD8

La respuesta inmune adaptativa depende de la colaboración entre linfocitos T, B y algunos factores solubles. En el caso de los linfocitos T existen dos poblaciones principales reconocidas por sus funciones; los linfocitos T CD4+ o cooperadores y los linfocitos T CD8+ o citotóxicos. La respuesta inmune adaptativa es antígeno específica, lo que quiere decir que requiere de una clona de linfocitos que reconozca un antígeno específico (Von Andrian y Sallusto, 2007). Al inicio de la respuesta inmune adaptativa los linfocitos T CD4 vírgenes (que no han sido expuestos a antígenos), migran a los nódulos linfáticos donde las CD maduras

presentan el antígeno (Bradley, 2003). Al darse la presentación de antígeno, los linfocitos T CD4 vírgenes maduran, y producen células efectoras. Algunas células que se produjeron durante este periodo se mantienen en un estado de reposo y son conocidas como células de memoria, cuya función es desencadenar la respuesta inmune con mayor velocidad cuando se tiene una segunda exposición posterior al mismo antígeno (Kaech, et.al., 2002).

La participación de linfocitos T CD4 es importante para la activación de los linfocitos T citotóxicos (Kitchen, et.al., 2004).

Dentro de los linfocitos T CD4 efectoras existen subpoblaciones que se han denominado *helper 1* (h_1) y *helper 2* (h_2). Los linfocitos Th_1 se encargan principalmente de la activación de macrófagos y células T CD8; además sintetizan una gran cantidad de IFN γ , relacionado con la respuesta contra infecciones virales y contra microorganismos intracelulares. Los linfocitos Th_2 están asociados a la activación de eosinófilos, importantes en la respuesta contra parásitos y en reacciones de hipersensibilidad (Abbas, et.al., 1996).

Además de los linfocitos Th_1 y Th_2 , se han caracterizados dos poblaciones más, conocidas como Th_{17} y T reguladoras (Tregs). Los linfocitos Th_{17} producen IL-17, que favorece la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β e TNF- α . Además ayudan en el reclutamiento de neutrófilos a la zona de inflamación. Las células Tregs se encargan de regular la activación de células del sistema inmune, por lo que son importantes en las infecciones que tienen un curso crónico o para evitar una activación descontrolada en el sistema inmune (Vernal y García, 2008).

Los linfocitos T CD8 reconocen los antígenos intracelulares que son presentados en las moléculas del MHC de clase I requieren de la señalización que le proveen los linfocitos T CD4 para su activación (Masopust, Ahmed, 2004). Los linfocitos T CD8 tienen como característica principal matar células infectadas y esto es posible debido a que contienen gránulos con granzima B y perforina, entre otras enzimas citolíticas, que liberan durante el proceso citotóxico. Además producen moléculas como FasL que está relacionado con la muerte apoptótica de las células (Janeway, et.al., 2001).

Los linfocitos T CD8 vírgenes, como en el caso de los linfocitos T CD4, al activarse se pueden diferenciar en células de memoria y células efectoras.

Los linfocitos de memoria tienen una vida más larga que los linfocitos efectoras, ya que sintetizan una gran cantidad de moléculas anti-apoptóticas que favorecen la supervivencia por un largo tiempo, por si llegase a darse una reinfección con el mismo antígeno (Tanel, et.al., 2009), a diferencia de los linfocitos efectoras, que al perder la estimulación antigénica cuando la infección ha terminado, mueren (Obhrai, et.al. 2006).

3.3.5 Cambios en las subpoblaciones de linfocitos T durante la infección por el VIH.

El VIH infecta células que expresan la molécula CD4, principalmente linfocitos T CD4+. La infección *per se* provoca su muerte después de que el VIH se ha replicado dentro de éstos, sin embargo no es la principal causa de su muerte. Fallas en la señalización durante la activación de los linfocitos T, disminución de

moléculas estimuladoras como IL-2, y la muerte de células no infectadas también conducen a la disminución de linfocitos T CD4 (Alimonti, et.al., 2003).

La infección por el VIH, inicia infectando a las células T CD4 de memoria, que principalmente se encuentran en tejido linfoide asociado a mucosas (Gebhardt, et.al., 2013). Se ha mostrado que esta población de linfocitos es la más susceptible a ser infectada debido a su alta expresión del receptor de quimiocinas CCR5, que es uno de los co-receptores del VIH (Douek, et.al., 2002).

Posterior a la detección de la infección por el organismo, se produce una gran cantidad de células T naive (Brenchley, et.al., 2002). Esta población que se encuentra en un estado aún indiferenciado, tiene una gran cantidad de CCR5 y CD27 en su membrana, además de otras moléculas como CD28 que facilitan la adhesión a células presentadoras de antígeno, favoreciendo la diferenciación de los linfocitos T vírgenes (Meditz, et.al., 2011). Se ha propuesto que las grandes cantidades de CCR5 predisponen a las células T CD4 vírgenes a ser infectada por el VIH, por lo que presenta una disminución desde el inicio de la infección (Nicholson, et.al., 2001).

La pérdida de células T CD4 vírgenes podría estar provocando que también se produzca una disminución de linfocitos T CD4 efectores y de memoria. Esta disminución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 genera alteraciones en la respuesta inmune (Appay, et.al., 2008).

Por otro lado los linfocitos T CD8 vírgenes y efectores tienden a aumentar durante la etapa aguda de la infección por el VIH en respuesta a la gran cantidad de virus libre. Durante la fase crónica los linfocitos T CD8 se mantienen, sin embargo en la

fase tardía o de SIDA disminuyen por fallas en la homeostasis de producción de células del sistema inmune y por el deterioro del mismo.

En las infecciones crónicas, como la producida por el VIH, algunas células del sistema inmune incluidos los linfocitos T, han mostrado pérdida de funcionalidad, situación que se ha propuesto contribuye al desarrollo de SIDA (Yi y Zajac, 2010).

3.3.6 Expresión de marcadores de activación en las subpoblaciones de linfocitos T.

La hiper-activación de los linfocitos T es un factor más a considerar como causa de la disminución de los linfocitos T CD4 y de la falla del sistema inmune. Se ha mostrado que los linfocitos activados son más susceptibles a ser infectados por el VIH, por lo que se ha propuesto que la activación contribuye con la progresión de la infección (Hunt, et.al. 2008).

Al día de hoy, se desconoce con exactitud la causa de la hiperactivación de los linfocitos T. Se sabe que ésta no es provocada principalmente solo por la presencia del virus en el organismo, sino que también existen otros mecanismos que contribuyen a la exacerbación de la activación, como la producción de citocinas pro-inflamatorias y la activación “*bystander*”, que se refiere a la activación independiente del receptor de linfocitos T, en el caso de los linfocitos T. Este estímulo, causado por el efecto de ciertas citocinas u otras moléculas en el linfocito, favorece la activación de la célula y se han asociado con un estado hiper-activado y con la progresión de la infección (Bangs, et.al., 2009).

Durante la etapa aguda de la infección por el VIH, se muestra un incremento en la expresión de marcadores de activación, causado por la activación de las células del sistema inmune en respuesta a la infección. Al tratarse de una infección crónica, la expresión de éstos marcadores no disminuye, por el contrario continua aumentando, generando un estado de hiperactivación celular.

La hiperactivación en las células del sistema inmune, puede evidenciarse por un incremento de varios marcadores, entre ellos CD38 y HLA-DR, dicha expresión sigue aumentando en ausencia de TAR y contribuye a la pérdida de función de las células efectoras durante la fase crónica y tardía (Leng y Bentwich, 2002).

En las subpoblaciones de linfocitos T se ha mostrado que el incremento en la expresión de CD38 y HLA-DR correlaciona con la progresión de la infección. Sin embargo, la población de los linfocitos T CD8 que expresan CD38, ha mostrado ser la población que tiene la mejor correlación con la progresión, con la CV y con el conteo de CD4 (Coetzee, et.al., 2009).

3.4 Tratamiento antirretroviral

A partir del descubrimiento del VIH en 1983, el desarrollo de fármacos que controlen la progresión de la enfermedad ha sido una prioridad. A mediados de la década de 1980, se produjeron los primeros fármacos antirretrovirales, con los cuales dió inicio la era de la terapia antirretroviral (Arts y Hazuda, 2012).

Durante estos años, solo se contaba con los llamados inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR). Estos fármacos actúan evitando que la transcripción inversa se lleve a cabo. Sin embargo, presentaban desventajas

importantes como los efectos adversos y el bajo impacto en la disminución de CV en plasma (Justice, et.al., 2004). Además se genera con facilidad resistencia a estos fármacos y la progresión de la infección era inevitable (Kramer, 1996).

En los años 90s se desarrollaron nuevos fármacos llamados inhibidores de proteasa (IP), los cuales evitan la formación de las proteínas de *gag* y *pol*, durante la fase de producción de proteínas virales, por lo que no se generan partículas virales maduras. Estos fármacos tuvieron una amplia aceptación, tenían un gran impacto en la disminución de la CV en plasma, y en el aumento del conteo de linfocitos T CD4 (Phillips, 1996).

A partir de ese momento se usaron combinaciones de fármacos de ambos tipos de antirretrovirales, pues se mostró que la administración conjunta, aumentaba la eficacia de éstos y el desarrollo de la infección se controlaba mejor que con la monoterapia con alguno de los dos tipos de antirretrovirales. El efecto mostrado por la combinación de tres de estos fármacos, fue uno de los descubrimientos más importantes para el control de la infección y a esta combinación se le acuñó el término de terapia antirretroviral altamente activa (TAAA) (Jevtovic, et.al., 2010). Ésta mostro una disminución en la morbilidad y la mortalidad asociadas al VIH y SIDA. Dicha terapia disminuye la replicación viral, en consecuencia reduce la CV en plasma por debajo de los límites de detección más sensibles (<40 copias de ARN/mL) y, resulta en una mejor reconstitución inmunológica (Widdrington, et.al., 2011). Se sabe que el TARc no solo disminuye significativamente la carga viral circulante, sino que también aumenta el conteo de linfocitos T CD4 y disminuye la hiperactivación de las células del sistema inmune (Evans, et.al., 1998).

El TARc es exitoso debido a varios factores: el uso de tres diferentes fármacos antirretrovirales disminuye la posibilidad de que se genere resistencia, y el uso de fármacos que tienen diferente mecanismo de acción produce un ataque más efectivo contra el virus (Vella y Palmisano, 2000).

Hasta el día de hoy se sigue utilizando la combinación de fármacos antirretrovirales, aunque las combinaciones son variadas, pues se han desarrollado otros tipos de antirretrovirales con diferente mecanismo de acción.

3.4.1 Fármacos usados en el tratamiento antirretroviral.

Los fármacos que se han desarrollado al día de hoy y han sido aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) se han dividido en 5 grupos dependiendo su mecanismo de acción: los fármacos que actúan a nivel de la transcriptasa reversa, los inhibidores de proteasas, los inhibidores de la fusión, los inhibidores de la entrada del virus a la célula y los inhibidores de la integrasa (<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDS/Activities/ucm118915.htm>, 2012).

En el primer grupo de fármacos están los inhibidores de nucleósidos de la transcriptasa reversa como el *Abacavir*, *Zidovudine*, *Tenofovir* entre los más importantes. Su función es a nivel de la síntesis de ADN viral, pues impiden la formación de éste al unirse a la cadena y evitar la unión del siguiente nucleótido, evitando que la cadena de ADN viral se genere (Gallant, 2002). El siguiente subtipo son los inhibidores no nucleósídicos de la transcriptasa reversa como el *Efavirenz* y la *Nevirapina*, estos fármacos son sustratos de la transcriptasa reversa

y se unen a ella disminuyendo su actividad, evitando la generación de ADN viral (Volberding y Deeks, 2010).

En el siguiente grupo se encuentran los inhibidores de la proteasa como el *Atazanavir*, *Fosamprenavir*, *Retonavir*, entre los más importantes. Éstos se unen específicamente a la proteasa viral, cuya función es la escisión de un precursor protéico de donde provienen las proteínas virales de *gag* y *pol* durante la maduración viral. Al no generarse estas proteínas, no se produce una partícula viral madura (Wensing, et.al., 2010).

Dentro de los inhibidores de la fusión se encuentra el *Enfuvirtide*, que emplea una molécula que se une a la glicoproteína gp41, evitando que genere la fusión de la membrana del virus y de la célula, previniendo la entrada de la partícula viral (Fung, et.al., 2004).

Dentro de los fármacos que evitan la entrada del virus a la célula, se encuentran los fármacos que se unen al receptor CCR5 como el *Maraviroc*. Éste es de los primeros desarrollados de ésta clase, es un antagonista del receptor CCR5 que, al unirse a éste, impiden que el virus lo reconozca, sin embargo la célula puede perder la función asociada a estos receptores (Buontempo, et.al., 2009).

Por último está el grupo conformado por los inhibidores de la integrasa, en el que se encuentra el *Raltegravir* (Cocohoba y Dong, 2008). En un primer paso, interviene en el complejo que se forma entre la integrasa y el ADN, desestabilizándolo y, en el segundo paso, se une a los iones magnesio que se encuentran en el sitio activo de la integrasa, disminuyendo su actividad (Mouscadet, et.al., 2010).

3.4.2 Factores a considerar para iniciar el TARc.

Los factores principales a considerar para iniciar el TARc son la CV y el conteo de linfocitos T CD4. La interpretación conjunta de estos dos parámetros es una de las formas más usadas para conocer la etapa de la infección en la que se encuentra la persona y el momento adecuado para iniciar TARc (Korenromp, et.al., 2009). Sin embargo, al día de hoy existen otros factores a considerar para el inicio del TARc.

Las guías internacionales han cambiado y cambian constantemente según avanza el conocimiento de los efectos adversos y eficacia de los antirretrovirales, así como el lanzamiento al mercado de nuevos fármacos. En general, se considera que personas sintomáticas, que presentan enfermedades oportunistas o que tienen conteo de linfocitos T CD4 por debajo de 200 células/ μ L de sangre deben iniciar TARc tan pronto como sea posible. Para personas asintomáticas, el tratamiento es recomendado si el conteo de linfocitos T CD4 se encuentra entre 350-500 células/ μ L de sangre. Cuando se tiene conteo de linfocitos T CD4 por debajo de 350 células/ μ L de sangre se debe iniciar TARc. En casos especiales como: co-infecciones con otros virus, como el virus de la hepatitis B ó C, enfermedades que comprometen al sistema inmune, edad avanzada o el embarazo, el TARc debe iniciarse inmediatamente (BHIVA, 2008; Fix, et.al., 2007; Verma, 2006).

En las mujeres embarazadas el uso de TARc reduce la transmisión del VIH al bebé, porque la CV disminuye a niveles indetectables (Melekhin, et.al., 2009). También se ha sugerido iniciar TARc en personas mayores de 50 años, ya que

tienen un sistema inmune deteriorado y en estos casos la infección por VIH progresa más rápido y aumenta el riesgo de mortalidad (Grabar, et.al., 2006).

Se debe considerar el inicio del TARc cuando la CV es mayor a 100,000 copias de ARN viral/mL de plasma y el conteo de linfocitos T CD4 está por debajo del número antes descrito.

Cuando el conteo de linfocitos T CD4 es mayor a las 500 células/ μ L de sangre, se recomienda el uso de TARc si se presenta cualquiera de las co-morbilidades mencionadas anteriormente. También ha sido propuesto el inicio de TARc arriba de éste número de linfocitos TCD4 para evitar nuevos contagios en parejas sero-discordantes (uno de ellos con VIH, el otro sin VIH).

Otros factores a considerar para el inicio del TARc son: presencia de enfermedades cardiovasculares debida al VIH y nefropatía debida al VIH. Durante la nefropatía asociada a VIH los productos virales y la liberación exacerbada de citocinas durante la infección tienen un efecto negativo sobre las células renales disminuyendo la filtración glomerular, por lo que se ha tratado de evitar este trastorno iniciando de manera temprana el TARc. Los fármacos usados tienen que ser dosificados en función de la filtración glomerular, pues de ella depende su desecho y la disminución de toxicidad (Daugas, et.al., 2005).

Recientemente se ha observado que las personas con VIH tienen hasta cuatro veces más proteína C reactiva, un marcador predictivo de infarto al miocardio. El inicio de TARc, disminuye la expresión de esta proteína y se ha mostrado una disminución en la mortalidad asociada a enfermedades cardiovasculares en personas infectadas con el VIH (Sterne, et.al., 2007).

3.4.3 Importancia de la cantidad de linfocitos T CD4 al inicio del TARc.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, la cantidad de linfocitos T CD4 disminuye progresivamente a lo largo de la infección por VIH. Esta disminución correlaciona con la progresión a SIDA y es uno de los parámetros clínicos más importantes para determinar el momento en el que se inicia TARc. Hoy se sabe que, el inicio temprano del TARc impacta directamente en la función y restablecimiento de esta población.

Años atrás se iniciaba TARc cuando la linfopenia estaba muy avanzada, comúnmente por debajo de las 200 células/ μ L, la razón principal era porque los fármacos con los que se contaba en ese momento presentaban una gran cantidad de efectos secundarios y se generaba resistencia con facilidad (Hogg, et.al., 2001; Departamento Nacional de Salud, Sudáfrica, 2004).

Hasta hace dos años, se iniciaba TARc cuando el conteo de linfocitos T CD4 se encontraba cercano a las 350 células/ μ L de sangre, pues se mostró que, las personas que empezaban TARc por debajo de este número, desarrollaban SIDA con mayor frecuencia y se incrementaba la mortalidad (Sabin y Phillips, 2009).

Las nuevas guías internacionales que establecen el momento del inicio de TARc, indican que éste se debe iniciar cuando el conteo de linfocitos T CD4 se encuentra por arriba de las 500 células/ μ L, debido a que los fármacos usados en nuestros días tienen menos efectos adversos, además de que contamos con una gran variedad de fármacos para hacer diferentes combinaciones, con el fin de disminuir la posibilidad de generar resistencia y a que éstos pueden usarse por largos periodos de tiempo (EACS, 2011; OARAC, 2012).

Iniciar el TARc con un conteo de linfocitos por debajo de 350 $\text{cél}/\mu\text{L}$, implica mantener al individuo en condiciones que pueden favorecer el establecimiento de infecciones oportunistas y el desarrollo de SIDA. Además, se ha visto que la reconstitución de esta población celular es mucho más lenta que en personas que empezaron TARc con conteo de linfocitos T CD4 por arriba de éste número. (Johansson, et.al., 2010).

En la actualidad, el TARc se empieza con conteo de linfocitos T CD4 por arriba de las 500 $\text{cél}/\mu\text{L}$ lo cual se ha relacionado con algunas ventajas que sustentan el inicio del TARc con esta cantidad de linfocitos T CD4. Dentro de las ventajas observadas está el hecho que las personas mantienen conteos altos de linfocitos T CD4 por largos periodos, lo que favorece la calidad de la respuesta inmune (Kitahata, et.al., 2009). Hay menor riesgo de desarrollar SIDA y del establecimiento de enfermedades oportunistas, además disminuye la probabilidad de nuevos contagios (Cohen, et.al., 2011).

Desafortunadamente también tiene desventajas, como los efectos secundarios a corto o largo plazo y el desarrollo de resistencia viral, por el largo periodo de su uso.

La disminución de la mortalidad en las personas infectadas que iniciaron tratamiento con conteo de linfocitos T CD4 arriba de 500 $\text{cél}/\mu\text{L}$ en comparación con las que iniciaron tratamiento con 350 $\text{cél}/\mu\text{L}$, es una de las principales razones para que se diera el cambio en el momento para iniciar TARc. (Kitahata, 2010).

3.4.4 Reconstitución inmune.

A pesar de que la reconstitución de las células T CD4 difiere mucho entre las personas que inician el TARc ya que ésta depende de varios factores, hay varios datos relevantes que se discutirán en esta sección. Algunos reportes indican que la reconstitución inmune suele darse en tres fases, independientemente del régimen que se use. En la primera fase, que ocurre en los seis meses posteriores al inicio de TARc, algunos autores han observado que en promedio se aumentan entre 20 a 30 células T CD4/ μ L por mes (Bosch, et.al., 2006). Algunos autores sugieren que la mayor parte de esta reconstitución es debida a la redistribución de las células T CD4 de memoria, que de estar en tejido linfoide, pasan a la sangre (Lange y Lederman, 2003).

En la fase de reconstitución, que generalmente se produce entre los 6 meses y dos años del inicio del TARc, los linfocitos T CD4 aumentan, entre 5-10 cél/ μ L por mes. Finalmente, en la fase tres, la recuperación de linfocitos T CD4, se encuentra entre 2-5 cél/ μ L por mes, y dura del año dos hasta al menos el año siete (Corbeau y Reynes, 2011).

Se ha observado que en las últimas dos fases de reconstitución, la principal subpoblación de linfocitos T CD4 que se reconstituye es la de los linfocitos TCD4 vírgenes. Esta reconstitución es generada principalmente por la producción de éstas células en el timo y por la proliferación de linfocitos T CD4 residuales, que se refiere a la proliferación por el estímulo de citocinas como IL-2, independiente de la producción de células en el timo (Autran, et.al., 2011).

Sin embargo, el aumento en el número de linfocitos T CD4+ en sangre periférica no implica que también exista reconstitución de la función de éstos.

4. Objetivos.

4.1. Objetivos generales.

Determinar si el número de linfocitos T CD4 antes de iniciar el TARc está asociado con una disminución mayor de la hiper-activación en linfocitos T, sus subpoblaciones y células NK.

4.2. Objetivos particulares.

- Establecer qué poblaciones de linfocitos T y células NK tienen una mayor expresión de marcadores de activación y como disminuye esta expresión después del inicio de TARc durante el seguimiento de cuatro años.
- Monitorear la reconstitución de linfocitos T y células NK en el transcurso de 4 años de seguimiento, posteriores al inicio de tratamiento y determinar si la cantidad de linfocitos T CD4 al inicio del tratamiento influye en los cambios observados en estas poblaciones.

5. Hipótesis

En el estudio a realizar se espera que después del inicio del TARc las personas del grupo con más de 350 linfocitos T CD4, tengan una disminución más rápida de células positivas para CD38 o HLA-DR, así como una mejor reconstitución de las poblaciones celulares (linfocitos T, sus subpoblaciones y células NK), al compararlo con el grupo con menos de 350 linfocitos T CD4.

6. Métodos y Materiales

El proyecto del cual se derivó esta tesis fue aprobado por el Comité de Ciencia y Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (clave asignada B10-06 ó B22-10). Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado, previo a la donación de sangre.

6.1 Muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de personas con VIH.

Las muestras utilizadas en este estudio fueron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de personas con VIH que pertenecen a un estudio longitudinal de una cohorte controlada de personas que asisten al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) ubicado dentro del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). Las personas que por voluntad propia participaron en este estudio fueron citadas para la donación de sangre antes del inicio del tratamiento (toma basal), así como a los 3, 6 y 12 meses después del inicio del tratamiento. Posteriormente donaron sangre para este protocolo una vez cada año por un periodo de 4 años. A partir de la sangre obtenida de los donadores, se realizaron las cuantificaciones de la carga viral y conteo de poblaciones linfocitarias y se separaron las CMSP. Las CMSP se congelaron para su posterior análisis por citometría de flujo multiparamétrica.

Se hicieron 2 grupos de análisis dependiendo del número de linfocitos T CD4 circulantes que tenían las personas antes de iniciar el tratamiento. Adicionalmente se usaron CMSP de donadores sin VIH como controles.

6.2 Grupos de estudio.

Se hicieron dos grupos de estudio de personas con VIH, dependiendo de su conteo de linfocitos T CD4 antes de iniciar tratamiento según lo establecido en las guías internacionales para el tratamiento de la infección por el VIH (AIDSTAR-one, 2010, WHO, 2010). El grupo 1 está conformado por 16 personas con VIH que iniciaron TARc con un conteo de linfocitos T CD4 por abajo de 350 linfocitos T CD4. El grupo 2 incluye 9 personas con VIH que iniciaron TARc con un conteo de linfocitos T CD4 por arriba de 350 linfocitos T CD4/ μ L (tabla 1).

Tabla No.1 Características de los individuos que forman parte del estudio.

| Datos | Grupo 1 | Grupo 2 |
|---|------------------------------|-----------------------------|
| Número de personas reclutadas | 16 | 9 |
| Sexo | Masculino: 14 Femenino: 2 | Masculino: 8 Femenino: 1 |
| Edad (años) | 41.8 (25-70) | 35.5 (24-55) |
| Carga Viral al inicio del TARc (copias de ARN viral/mL de plasma) | 220,377 (1,480-8,864,111) | 226,309 (336- 1,000,000) |
| Conteo de linfocitos T CD4 al inicio del TARc (células/uL) | 228.3 (19-342) | 540.4 (412-961) |

El esquema del tratamiento seguido por las personas reclutadas en el grupo 1 es el siguiente: el 62.0% de las personas toman Truvada y Efavirenz, el 12.5% toman Combivir y Efavirenz y tan solo el 6.3% Kaletra y AZT. Por otro lado en el grupo 2 el esquema del tratamiento es: el 44% de las personas toman Truvada y Efavirenz, el resto se desconoce el dato del esquema del TARc que siguen.

6.3 Descongelación de CMSP.

Las muestras que se encontraban en tanques con nitrógeno líquido fueron recuperadas y descongeladas. Para esto fueron colocadas a baño maría por 3 minutos o hasta ver un pequeño hielo flotando. Previamente se habían preparado tubos de polipropileno de 15mL con 8mL de medio HUT (RPMI suplementado con 10% SBF, L-glutamina (5mM) y Penicilina (100U/mL) /Streptomycin (100µg/mL)). Después de que las muestras se descongelaron, el contenido de cada vial fue resuspendido en los tubos con medio HUT. Las muestras se centrifugaron a 1500rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 5mL de medio HUT. De la suspensión anterior se tomaron 20µL para hacer el conteo celular. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 1500rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 5mL de medio HUT y se hizo un último lavado para eliminar las células muertas a 1200rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el volumen adecuado para que cada muestra tuviera una densidad de 3 millones de células por mililitro de medio. Previamente a la determinación de la expresión de las proteínas de activación, las células se incubaron por 6 horas a 37°C, 5% CO₂. Como control positivo algunas células se estimularon con SEB (2µg/mL) por 18 horas y se tiñeron como se describe posteriormente.

6.4 Panel de activación de linfocitos T y células NK.

Para observar las poblaciones de linfocitos T y células NK, así como los marcadores de activación de éstas se diseñó un panel con los siguientes

anticuerpos acoplados a fluorocromos: anti-CD3 Alexa Fluor 700, anti-CD4 PECy5, anti-CD8 APCCy7, anti-CD16 V450, anti-CD38 PerCp, anti-CD45RA APC, anti-CD56 biotina, anti-CCR7 PECy7, anti-CD69 PE, anti-HLA-DR FITC, Estreptavidina PE-TexRed (todos los anticuerpos de la marca Becton Dickinson). Todos los anticuerpos fueron titulados antes de ser utilizados en los paneles. Como marcador de viabilidad se utilizó Aqua Dye-AmCyan (InVitroGen), el cual es un compuesto fluorescente que se une a las aminos libres de la superficie de las células y del interior de éstas. En las células vivas el compuesto solo marca las aminos libres que quedan restringidas a la superficie celular, mientras que en las células muertas, el compuesto también tiene acceso a aminos del interior ya que las células muertas tienen dañada su membrana plasmática. Así, se puede detectar una mayor intensidad de fluorescencia en las células muertas, en comparación con las células vivas. Este hecho hace posible diferenciarlas de las células vivas. Para poder delimitar la población negativa, se utilizaron controles llamados FMO (fluorescencia menos uno), que son células incubadas con todos los anticuerpos del panel de anticuerpos menos el anticuerpo para el que se determinará la población positiva. Se hicieron FMOs para CD38, HLA-DR, CCR7, CD45RA, CD69, además de uno para diferenciar células vivas de muertas.

6.5 Tinción celular con anticuerpos acoplados a fluorocromos.

Para el reconocimiento de las poblaciones celulares de interés y la determinación de la expresión de los marcadores de activación, las muestras se analizaron por

citometría de flujo multiparamétrica. Para esto, se usaron anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos para las tinciones celulares.

Antes de la tinción se hizo la mezcla de anticuerpos extracelulares de la siguiente manera. Esta mezcla se colocó en un tubo eppendorf, completando el volumen a 50 μ L con PBA, considerando que las células a teñir se encuentran resuspendidas en 50 μ L y el volumen final requerido es de 100 μ L.

Para la tinción se utilizaron 1 millón de células previamente descongeladas y cultivadas, que se colocaron en tubos falcón de 5mL. Las células fueron lavadas dos veces con 2mL de PBS, (1500 rpm por 10 minutos). Las células se incubaron con el marcador de viabilidad Aqua Dye-AmCyan (InVitroGen), por 20min a 4°C, protegido de la luz. Posteriormente, las células se lavaron con 2mL de PBS, seguido de un segundo lavado con 2mL de PBA (PBS + BSA al 5%). Las células se incubaron con anti-CD56 biotinado, a 4°C por 20min y se lavaron 2 veces con 2mL de PBA. Por último se tiñeron las células con la mezcla de anticuerpos previamente descrita. Las células fueron incubadas a 4°C por 20min y se lavaron 2 veces con 2mL de PBA y se fijaron con 500 μ L de formalina (PBS con 3% formaldehído). Las muestras teñidas fueron analizadas en un citómetro LSR Fortessa (BD Bioscience). Se adquirieron al menos 20000 linfocitos T CD4+. Los datos provenientes del citómetro se analizaron con el programa FLOWJo 7.6.4 (Treestar). Los análisis, gráficos y estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.

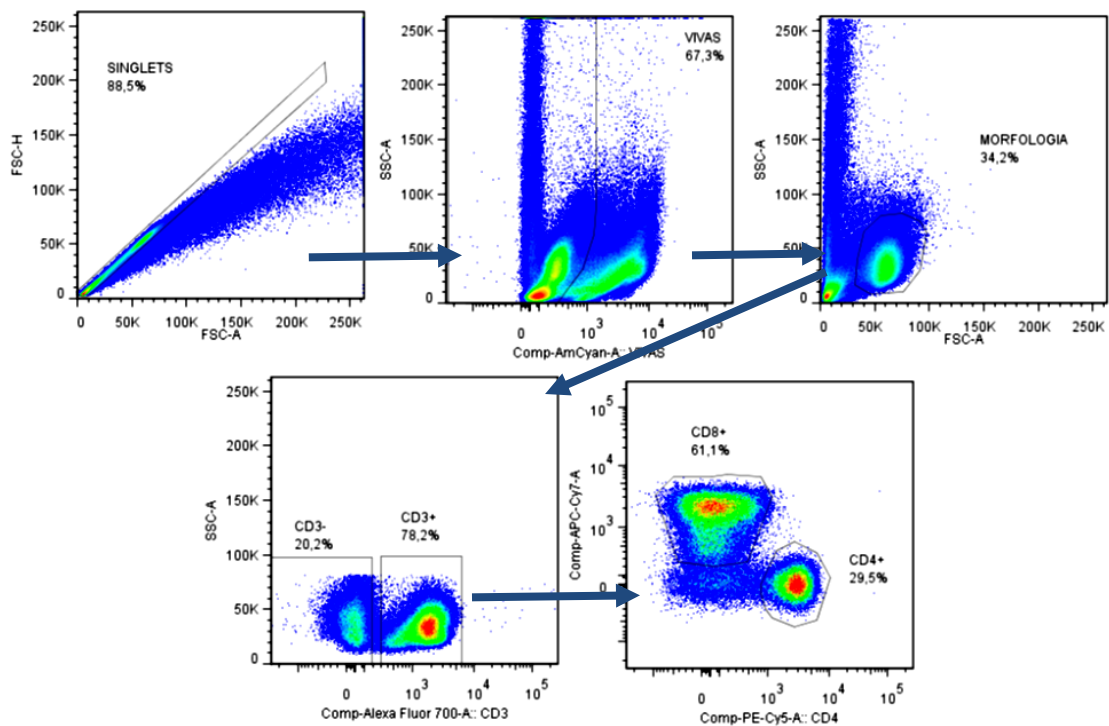
6.6 Análisis inmunofenotípico en el citómetro LSR Fortessa.

Se hicieron gráficas para observar la expresión de cada proteína. Primeramente se identificaron células únicas con una gráfica de FSC-A (área) contra FSC-H (altura), para diferenciarlas de cúmulos de células. A partir de ésta se hizo una gráfica usando el marcador de viabilidad, de donde se seleccionaron las células vivas, posteriormente se hizo una gráfica de morfología, en la que se seleccionaron los linfocitos por sus características de tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). Para diferenciar los linfocitos T de las células NK, se hizo una gráfica usando CD3, las células que expresan CD3, son linfocitos T y dentro de las que carecen de la expresión de CD3, se encuentran las células NK. Para los linfocitos T se hizo una gráfica para diferenciar linfocitos T CD4 y T CD8. Para ambas poblaciones de linfocitos T se hicieron gráficas para mostrar las subpoblaciones usando como marcadores la expresión de CCR7 y CD45RA. También se hicieron subpoblaciones para células NK usando como marcadores la expresión de CD16 y CD56. Para cada población y subpoblación, se hicieron gráficas para observar la expresión de CD38, HLA-DR y, adicionalmente, CD69 para células NK.

6.7 Análisis en Flow Jo

Para el análisis de Flow Jo, se hicieron las mismas gráficas que en el análisis en el citómetro, a partir de los datos obtenidos en éste. Las gráficas de puntos muestran todas las células adquiridas. En la figura 2A se muestra la estrategia de análisis para la selección de linfocitos T. En la figura 2B se muestra la estrategia de análisis para la selección de subpoblaciones de linfocitos T.

A



B

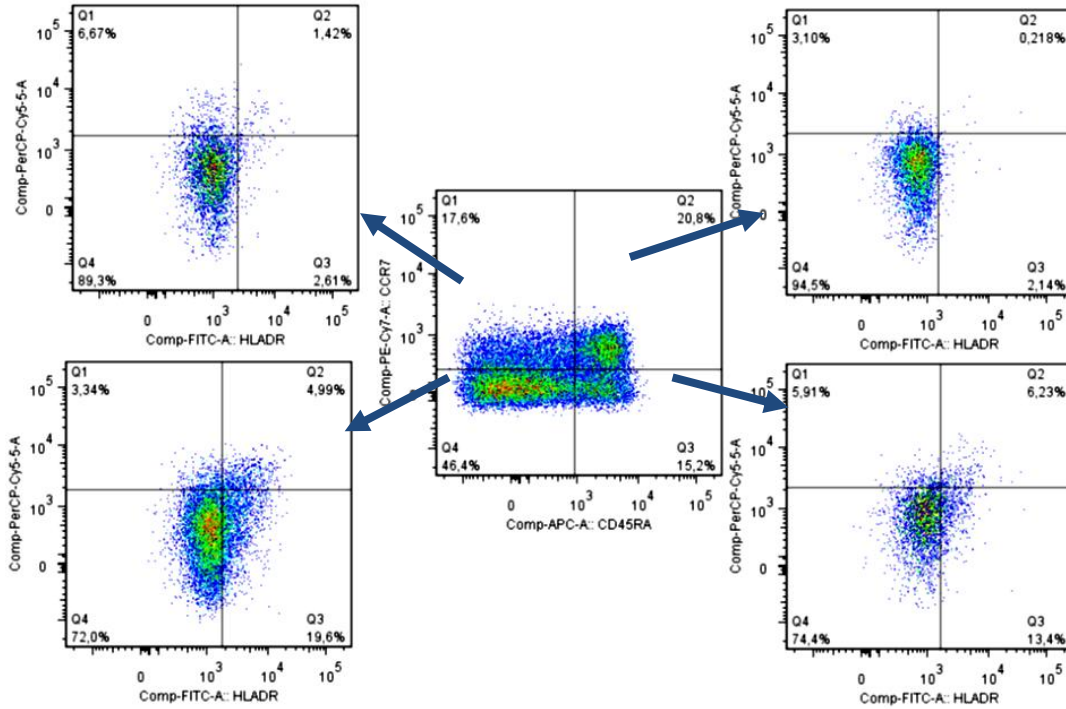
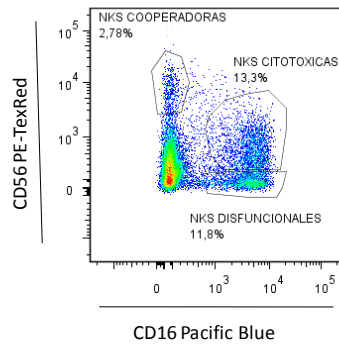


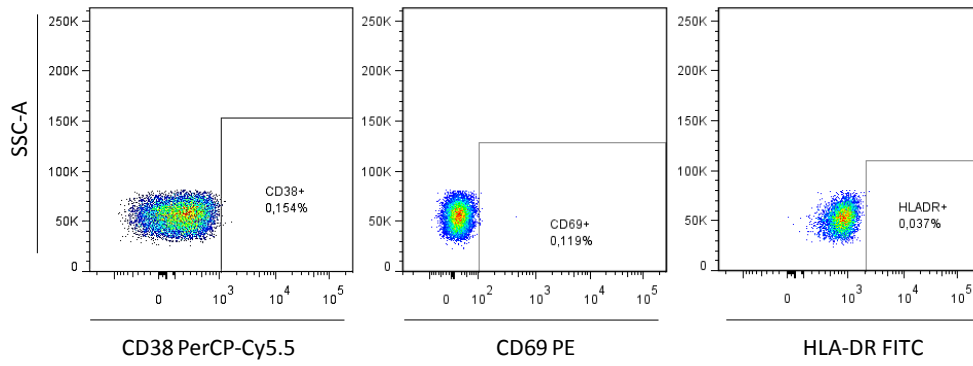
Fig.2 Estrategia de análisis de poblaciones linfocitarias a partir de CMSP. A) Selección de células únicas a partir de la correlación área contra altura, selección de células vivas y selección de linfocitos en base a su tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). Las células T analizadas expresan CD3 (CD3). De las células CD3+ obtenemos linfocitos CD4+ y CD8+. B) Se muestra la estrategia para reconocer las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, ejemplo a partir de linfocitos CD4+. Las células vírgenes son CCR7+ CD45RA+, las células de memoria efectora son CCR7+CD45-, las células de memoria central son CCR7-CD45RA- y las células terminalmente diferenciadas son CCR7-CD45RA+.

En la figura 3 se muestra la estrategia de análisis para la selección de las poblaciones de células NK, así como de las gráficas de activación que se hicieron para cada población.

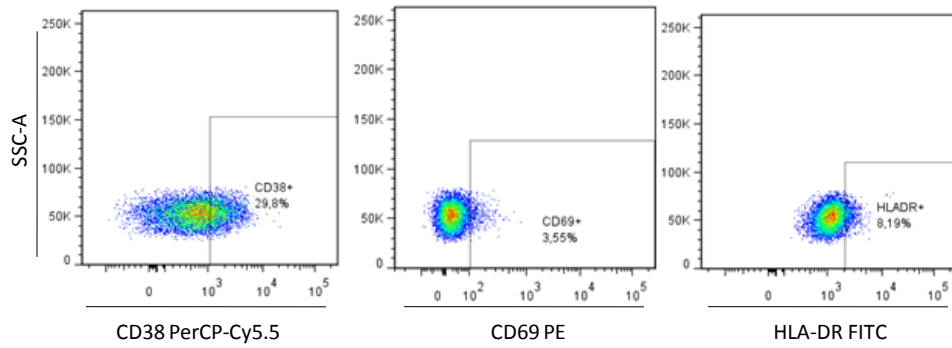
A)



B)



C)



D)

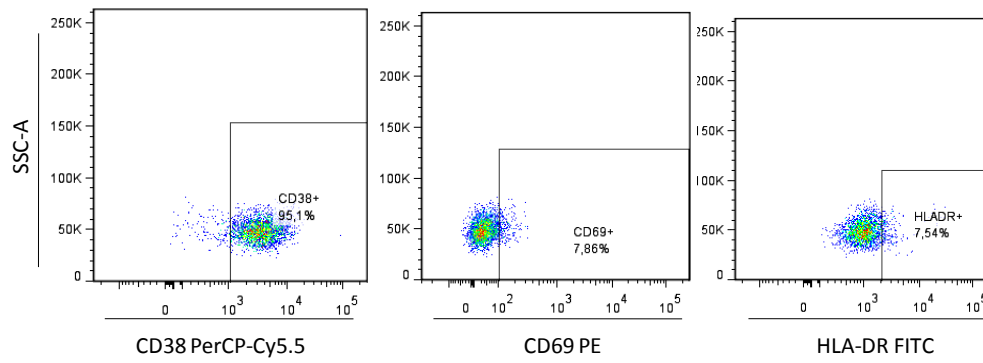


Fig. 3 Estrategia para el reconocimiento de las células NK y subpoblaciones. A) Las células NK se analizaron a partir de las células CD3 negativas y se reconocieron las diferentes poblaciones por la expresión de las moléculas CD56 y/o CD16. B) Se usaron FMOs para la selección de las poblaciones positivas para CD38, CD69 y HLA-DR. C) A partir de la selección se determinó el porcentaje de células positivas a CD69, CD38 y HLADR como marcador de células NK activadas en personas sin VIH. D) Determinación de las células CD38+, CD69+ y HLA-DR+ en personas con VIH.

Finalmente en la figura 4 se muestran las gráficas de los marcadores de activación analizados para los linfocitos T.

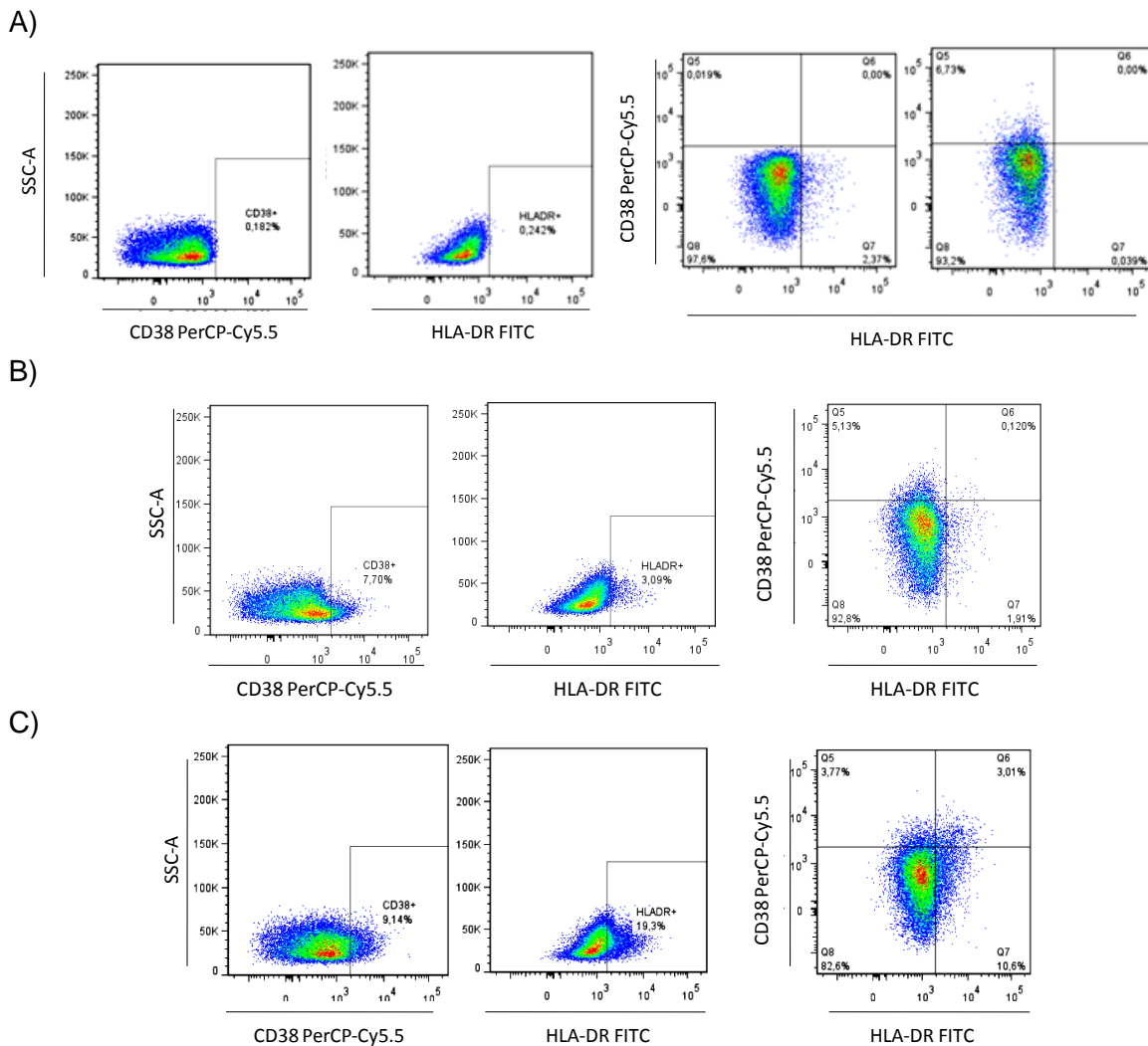


Fig. 4 Estrategia para el reconocimiento de células T (CD4 ó CD8) que expresan los marcadores de activación CD38 y HLADR. A) Las células CD38+, CD69+ y HLA-DR+ se determinaron utilizando FMOs. B) Determinación de células CD38+, CD69+ y HLA-DR+ en personas sin VIH. C) Determinación de células CD38+, CD69+ y HLA-DR+ en personas con VIH

7. Resultados

7.1 Efecto del TARc en la recuperación de linfocitos T CD4 y CV

El TARc ha mostrado un efecto importante no solo en la disminución de la replicación viral, sino también en la restauración de la cantidad de los linfocitos T CD4+ circulantes. Los resultados de esta tesis muestran que, según lo esperado, el TARc disminuye rápidamente la CV en plasma de las personas con VIH, independientemente de la cantidad de linfocitos T CD4+ con la que iniciaron el tratamiento. La CV en plasma permanece indetectable durante los 4 años de estudio (Fig. 5A). Para conocer si existe una diferencia en la recuperación de los linfocitos T CD4+ de sangre periférica en las personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4+, en comparación con las que iniciaron tratamiento con menos de 350 CD4+, se determinó el número absoluto de linfocitos T CD4+ en sangre periférica a diferentes tiempos después del inicio del tratamiento, y en el transcurso de 4 años posteriores al inicio de TARc. Los datos mostraron que la recuperación de linfocitos T CD4+ es mayor en las personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4+, en comparación con las personas que iniciaron tratamiento con menos de 350 CD4+. La recuperación en el número de linfocitos T CD4+ es evidente a partir de los tres meses del inicio del TARc (Fig. 5B).

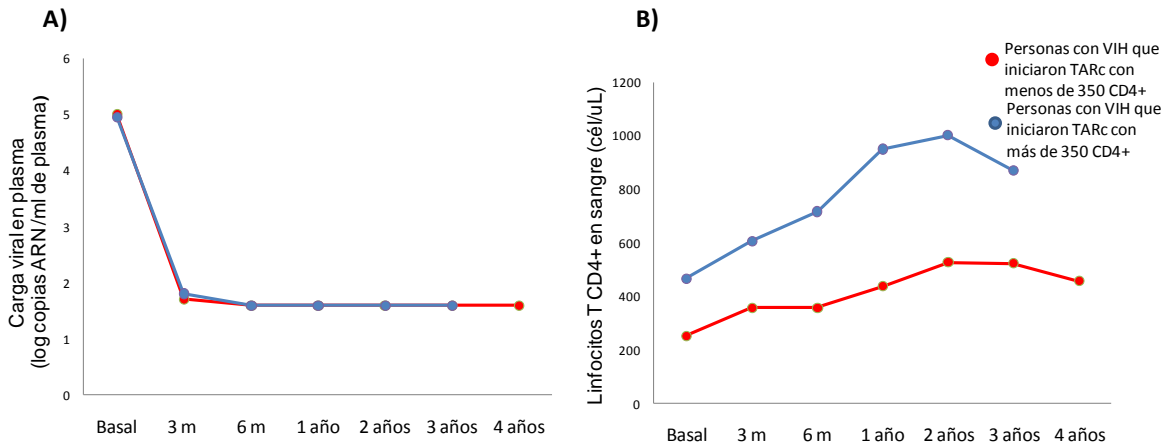


Fig 5. Efecto del TARc en la CV en plasma y en el número de linfocitos T CD4+ de sangre periférica. **A)** La CV se muestra como el logaritmo de las copias de ARN viral por mL de plasma antes del inicio de tratamiento (toma basal) y posterior al inicio del tratamiento en los tiempos indicados en la gráfica. **B)** Las determinaciones del conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica se realizaron en los tiempos indicados en la gráfica. Los puntos rojos representan al grupo 1, personas con VIH que iniciaron tratamiento con conteo de linfocitos T CD4 por abajo de 350 céls/ μ L (n=16) y los puntos azules representan al grupo 2, personas con VIH que iniciaron tratamiento con conteo de linfocitos T CD4 por arriba de 350 céls/ μ L (n=9).

7.2 Reconstitución de linfocitos T y células NK

La reconstitución de las poblaciones de linfocitos T y células NK, es un paso importante para restablecer una buena respuesta inmunológica. Para saber si el TARc favorece la reconstitución de las poblaciones celulares, se determinó el porcentaje de estas poblaciones celulares antes y después del inicio del TARc, con el fin de observar el comportamiento de cada población.

7.2.1 Reconstitución de linfocitos T CD4 y sus subpoblaciones después del inicio del TARc.

Primeramente se determinaron los porcentajes de linfocitos T CD4+ después del inicio del TARc. Los resultados mostraron un claro aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ en ambos grupos de estudio (Fig. 6). Los porcentajes de células CD4+ a los tres años de tratamiento son mayores que los porcentajes de células CD4+ al inicio del tratamiento en el grupo con menos de 350 CD4+. El grupo con más de 350 CD4+ sigue la misma tendencia, aunque la comparación solo se hizo hasta el año de haber iniciado el TARc. [Para el grupo 1: basal 19.1 % céls. CD4+ (2.91% – 43.2%) – 39.0% céls CD4+ a los tres años (17.7% – 76.7%); para el grupo 2: basal 40.3% céls. CD4+ (22.2% – 63.3%) – 52.2 % céls CD4+ al año (39.9%–66.1%)]. Interessantemente, la diferencia significativa en el porcentaje de células CD4+ entre los grupos de estudio se pierde al año de haber iniciado el TARc (Fig. 6A). Esto puede significar que aunque la reconstitución de linfocitos T CD4+ ocurre independientemente del número de linfocitos CD4+ con que inician el TARc, es más evidente después del año de haber iniciado el TARc, para las personas que lo iniciaron con menos de 350 linfocitos T CD4+.

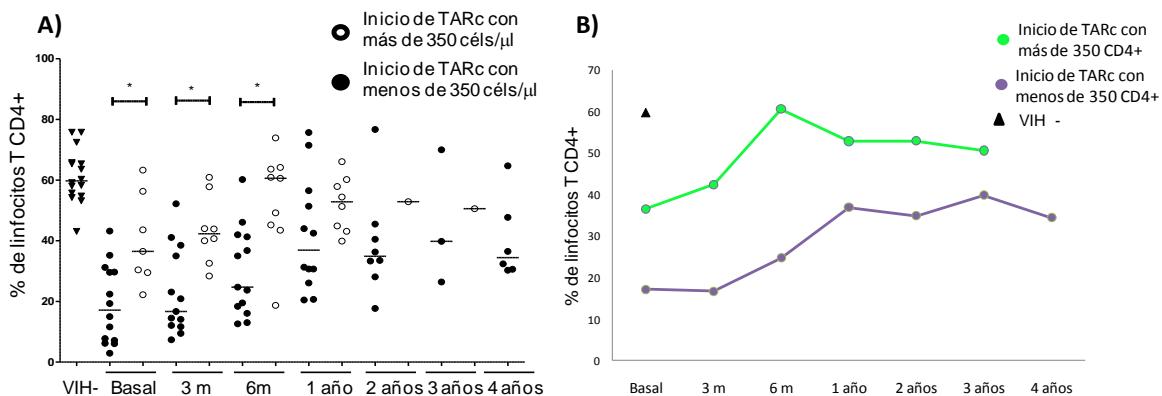


Fig. 6 Efecto del TARc en la reconstitución de linfocitos T CD4+. **A)** Porcentaje de linfocitos T CD4+ antes del inicio de TARc y en el transcurso de cuatro años de seguimiento posteriores al inicio de TARc. **B)** Gráfica de la mediana del porcentaje de linfocitos T CD4+ en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica. * $p < 0.05$.

Se realizó también la determinación de la reconstitución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ después del inicio del TARc, hasta los cuatro años en el caso del grupo con menos de 350 CD4+ y hasta el año en el grupo con más de 350 CD4+. Las subpoblaciones fueron reconocidas por la presencia o ausencia de los marcadores CCR7 y CD45RA como se describió en la metodología.

Los resultados muestran que el grupo de personas que inició el TARc con más de 350 CD4+ tienen un mayor porcentaje de células T CD4 vírgenes (Tabla 2). No se encontraron diferencias en los porcentajes de células de memoria central, memoria efectora y terminalmente diferenciadas en la toma basal de los grupos de estudio (Tabla 2). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ durante el primer año de TARc. Sin embargo, en el grupo de personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+, se observó una tendencia a incrementar el porcentaje de células T CD4 vírgenes y una reducción del porcentaje de células de memoria efectora. Así mismo un aumento de las células T CD4 de memoria central, a los 4 años del inicio del TARc.

Los resultados muestran que la reconstitución en las subpoblaciones de linfocitos T CD4 después de iniciar el TARc es lenta por lo que se requieren de varios años

de tratamiento para observar un cambio evidente en la redistribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+.

Tabla 2. Cambios en las subpoblaciones de linfocitos T CD4 en personas con TARc.

| % de células T CD4 vírgenes | | | | | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------|--------|--------|--------|
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 17.1 | 21.9 | 15.8 | 32.1 | 21.8 | 22.1 | 23.6 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 31.5 [#] | 32.6 [#] | 32.4 [#] | 33.6 | N.D. | N.D. | N.D. |
| %de células T CD4 memoria central | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 14.5 | 14.8 | 13.0 | 15.4 | 17.5 | 18.0 | 19.1* |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 13.7 | 15.5 | 16.1 | 17.5 | N.D. | N.D. | N.D. |
| % de células T CD4 memoria efectora | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 45.5 | 42.4 | 36.2 | 22.8 | 33.0 | 40.5 | 34.5 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 34.4 | 32.0 | 30.1 | 28.4 | N.D. | N.D. | N.D. |
| % de células T CD4 terminalmente diferenciadas | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 13.1 | 12.6 | 13.1 | 14.7 | 14.2 | 15.9 | 10.8 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 16.4 | 17.3 | 17.4 | 15.4 | N.D. | N.D. | N.D. |

*p<0.05 con respecto a la toma basal. [#]p <0.05 entre los dos grupos de estudio. N.D. No Determinado.

7.2.2 Reconstitución de linfocitos T CD8 y sus subpoblaciones después del inicio del TARc.

El porcentaje de linfocitos T CD8 en sangre periférica se puede afectar dependiendo de la presencia o ausencia de un antígeno, por ejemplo, éstos aumentan durante la fase aguda de la infección por VIH (tiempo en el que la CV es muy alta) y disminuyen después del inicio del TARc debido a la inminente disminución del antígeno y al control de la replicación viral. Los resultados de esta tesis muestran que el porcentaje de linfocitos T CD8 es menor antes del inicio del TARc en las personas con más de 350 CD4+ (Fig. 7).

Los datos mostraron que el porcentaje de linfocitos T CD8+ del grupo de personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4 disminuye significativamente a los 6 meses de haber iniciado el tratamiento (Fig. 7) lo que puede relacionarse con la disminución de la CV. El porcentaje de linfocitos T CD8+ en el grupo de personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4+ permanece sin cambios con respecto a la toma basal (Fig.7)

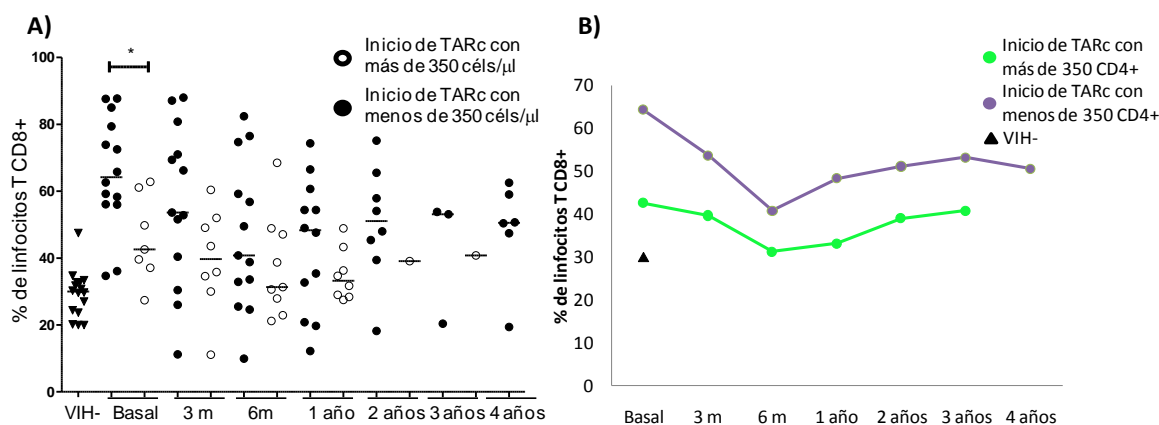


Fig. 7 Efecto del TARc en la reconstitución de linfocitos T CD8+. **A)** Porcentaje de linfocitos T CD8+ antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **B)** Gráfica de la mediana del porcentaje de linfocitos T CD8+ en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica. * $p < 0.05$. # $p < 0.05$ con respecto a la toma basal.

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ no mostró diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones analizadas en la toma basal de los dos grupos. Los resultados fueron similares a lo reportado por otros grupos, un mayor porcentaje de células T CD8 de memoria efectora y terminalmente diferenciadas y un menor porcentaje de células de memoria central. No se observaron cambios en la distribución y porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ de memoria central y terminalmente diferenciadas después del inicio del TARc en ninguno de los grupos estudiados (Tabla 3). En cambio, el análisis de la población de células vírgenes mostró un aumento significativo en el porcentaje de éstas células al año de haber iniciado TARc en ambos grupos de estudio (Tabla 3). El aumento en el porcentaje de células vírgenes en el grupo de personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4 es significativo desde el tercer mes y continúa aumentando hasta el año después de haber iniciado el tratamiento (Tabla 3). Aunado a esto también se observó que el porcentaje de células de memoria efectora, disminuye significativamente a los 6 meses después del inicio del TARc en las personas con más de 350 CD4+ (Tabla 3).

Tabla 3. Cambios en las subpoblaciones de linfocitos T CD8 en personas con TARc

| % de células T CD8 vírgenes | | | | | | | |
|--|-------|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 13.3 | 18.8 | 25.1 | 31.7* | 22.2 | 16.4 | 35.4 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 16.4 | 23.4* | 32.0* | 33.4* | N.D. | N.D. | N.D. |
| % de Células T CD8 memoria central | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 3.0 | 3.8 | 3.2 | 3.8 | 3.7 | 8.1 | 5.3 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 5.4 | 5.3 | 4.4 | 6.7 | N.D. | N.D. | N.D. |
| % de células T CD8 memoria efectora | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 37.9 | 32.1 | 30.4 | 25.3 | 29.0 | 33.6 | 22.3 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 47.3 | 30.3 | 19.2* | 30.5 | N.D. | N.D. | N.D. |
| % de células T CD8 terminalmente diferenciadas | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD4) | 37.4 | 32.0 | 35.7 | 31.9 | 42.4 | 32.9 | 37.8 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 30.9 | 37.0 | 31.6 | 27.5 | N.D. | N.D. | N.D. |

*p<0.05 con respecto a la toma basal. N.D. No determinado

7.2.3 Reconstitución de células NK y sus subpoblaciones después del inicio del TARc.

Las células NK tienen un papel importante en la inmunidad innata ya que pueden eliminar células infectadas. En este trabajo también evaluamos los cambios en el porcentaje de las células NK y sus subpoblaciones después del inicio del TARc. Los resultados no mostraron diferencias en el porcentaje de células NK en la toma basal de los dos grupos estudiados (datos no mostrados). Como se mencionó en la introducción, existen tres subpoblaciones de células NK bien caracterizadas durante la infección por VIH: las células NK citotóxicas, NK inmunomoduladoras y NK disfuncionales (Mavillo, et.al., 2005). De estas tres subpoblaciones estudiadas solo encontramos diferencias en la subpoblación de células disfuncionales, las subpoblaciones de células NK citotóxicas e inmunomoduladoras permanecen sin cambios después del inicio del TARc. Según lo esperado, se observó un mayor porcentaje de células NK disfuncionales en la toma basal de las personas con VIH, en comparación con las personas sin VIH (Fig. 8A). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células NK disfuncionales entre la toma basal de ambos grupos de estudio. El porcentaje de células NK disfuncionales en las personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4 tiende a disminuir desde el tercer mes después de haber iniciado el tratamiento (Fig 8).

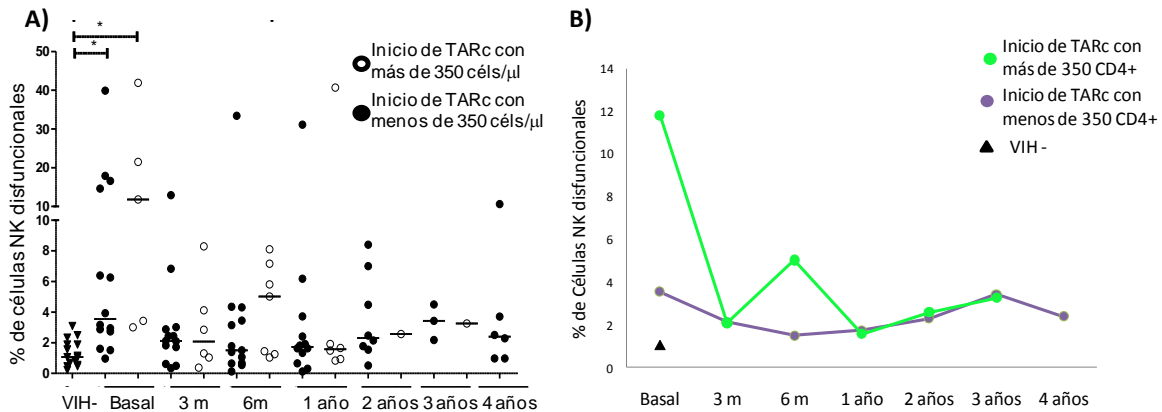


Fig. 8 Efecto del TARc en la reconstitución de células NK. A) Porcentaje de células NK disfuncionales antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. B) Gráfica de la mediana del porcentaje de células NK disfuncionales en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica.

7.3 Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4+ después del inicio del TARc.

Como se mencionó en la introducción, la expresión de marcadores de activación en linfocitos T, especialmente en linfocitos T CD8+, es un buen marcador de la progresión de la infección por VIH. Sin embargo, no se conoce con exactitud el cambio en la expresión de estos marcadores en las diferentes poblaciones de leucocitos y si la disminución en la expresión de estos marcadores se asocia con una mejor reconstitución inmunológica. En este trabajo se evaluó la influencia del TARc en la expresión de marcadores de activación crónica, como las proteínas CD38 y HLA-DR en linfocitos T CD4, T CD8 y células NK. Para esto se determinó el porcentaje de células positivas a CD38, HLA-DR o la expresión conjunta de las dos proteínas.

Contrario a lo esperado, el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CD38 no disminuye con el TARc, los resultados no muestran diferencias significativas entre

los grupos de estudio y tampoco al comparar los datos de los tiempos del estudio con la toma basal de cada grupo (Fig. 9).

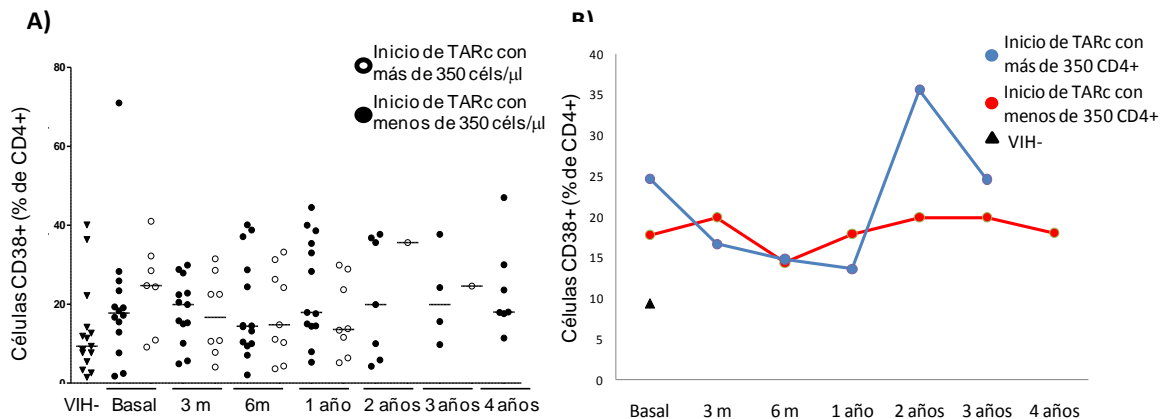


Fig. 9 Efecto del TARc en el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CD38. A) Porcentaje de células CD4+ que expresan CD38 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **B)** Gráfica de la mediana del porcentaje de células CD4+ que expresan CD38 en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica.

Los resultados relacionados con la expresión de HLA-DR en linfocitos TCD4+ mostraron que, en la toma basal, las personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4+ tienen un menor porcentaje de células HLA-DR+ comparado con las personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+, el porcentaje de células HLA-DR+ de este grupo de estudio permaneció sin cambios aún después de haber iniciado el TARc (Fig. 10). De manera importante, se observó una disminución en el porcentaje de células HLA-DR+ CD4+ en el grupo de personas que inició TARc con menos de 350 CD4 a partir del año de haber iniciado el tratamiento (Fig. 10).

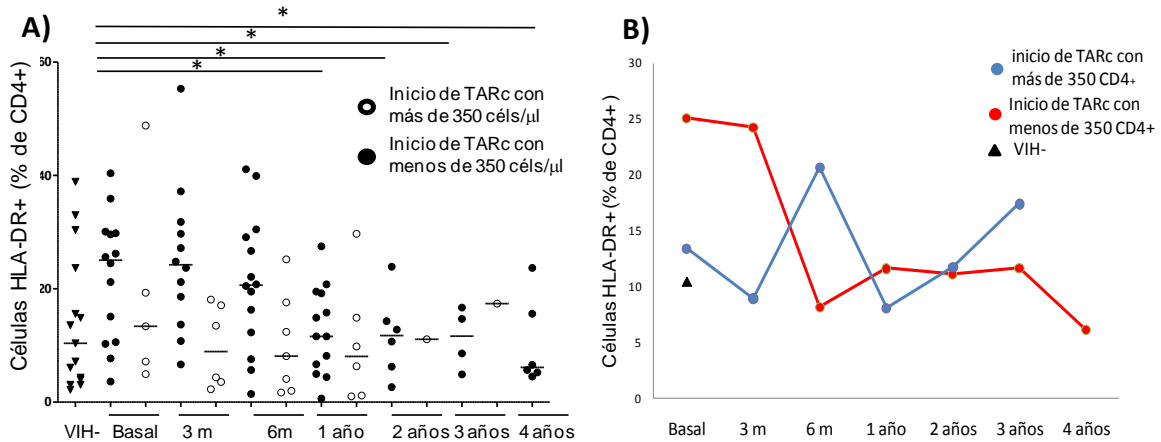


Fig. 10. Efecto del TARc en el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan HLA-DR. A) Porcentaje de células CD4+ que expresan HLA-DR antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. * $p < 0.01$ con respecto a la toma basal. **B)** Gráfica de la mediana del porcentaje de células CD4+ que expresan HLA-DR en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica.

Finalmente, el análisis del porcentaje de células CD4+ CD38+HLA-DR+ no mostró diferencia significativa al comparar los datos con la toma basal ni entre los grupos de estudio (Fig. 11).

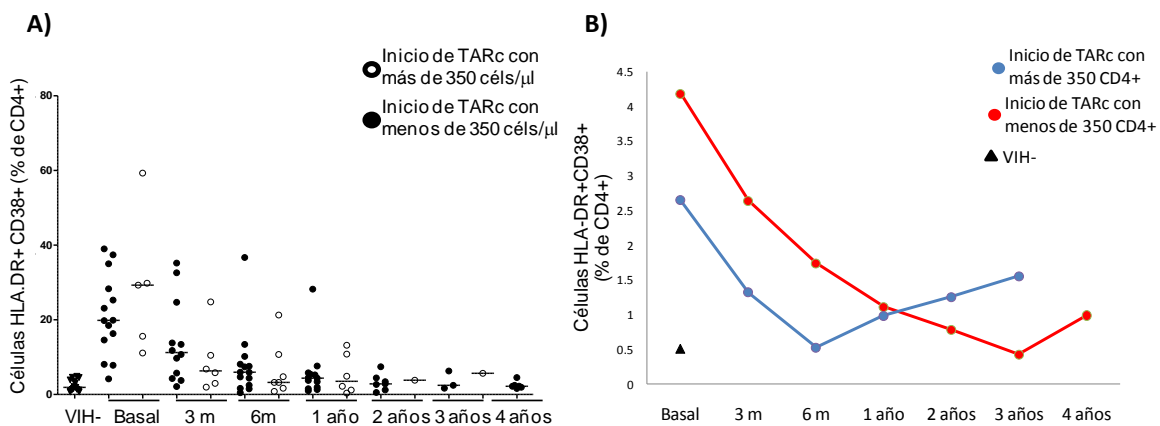


Fig. 11 Efecto del TARc en el porcentaje de linfocitos T CD4+ que co-expresan CD38 y HLA-DR. A) Porcentaje de células CD4+ que co-expresan CD38 y HLA-DR antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **B)** Gráfica de la mediana del porcentaje de células CD4+ que co-expresan CD38 y HLA-DR en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica.

7.4 Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8+ después del inicio del TARc.

Los resultados de la expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD8+ mostraron que el porcentaje de células CD8+ CD38+ es mayor al porcentaje de células CD4+CD38+ en la toma basal y a los tres meses posteriores al inicio del TARc (Fig. 12). Esta diferencia desaparece después de los 6 meses de haber iniciado el TARc (Fig. 12)

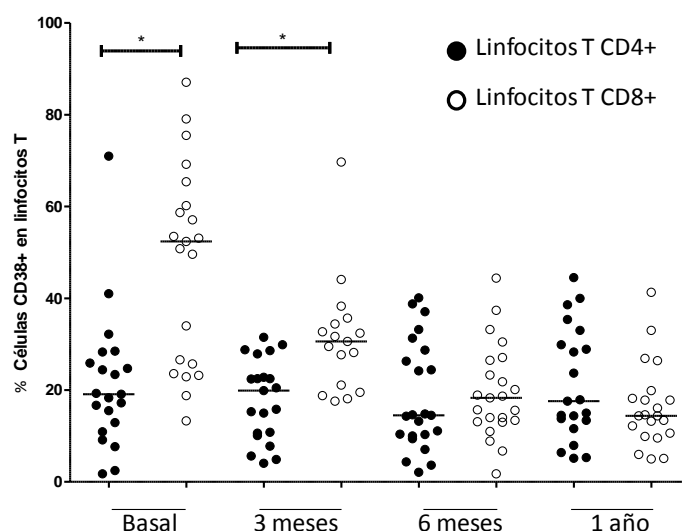


Fig. 12 Efecto del TARc en el porcentaje de linfocitos T que expresan CD38. Porcentaje de linfocitos T CD4+ ó CD8+ que expresan CD38 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de 1 año de seguimiento. *p<0.01.

No se encontraron diferencias en los porcentajes de células T CD8+ CD38+ de la toma basal entre ambos grupos estudiados (Fig. 13). De manera importante se encontró una disminución rápida en el porcentaje de células CD8+CD38+ después del inicio de TARc en ambos grupos a partir de los tres meses posteriores al inicio del TARc hasta los cuatro años de seguimiento en las personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+ y hasta el año de seguimiento en las personas que

iniciaron TARc con más de 350 CD4+, al compararlos con la toma basal ($p < 0.01$ para todos los tiempos estudiados (Fig. 13). No encontramos diferencias en el porcentaje de células CD8+ HLA-DR+ en ninguno de los tiempos estudiados (datos no mostrados).

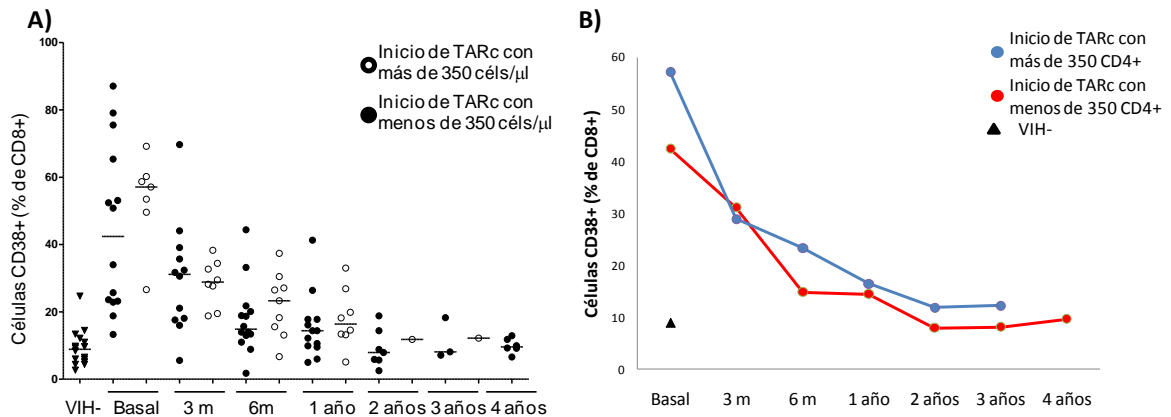


Fig. 13 Efecto del TARc en el porcentaje de linfocitos T CD8+ que expresan CD38.

A) Porcentaje de células CD8+ que expresan CD38 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. B) Gráfica de la mediana del porcentaje de células CD8+ que expresan CD38 en los grupos estudiados. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica.

Por último, se observó que el porcentaje de células CD8+CD38+HLA-DR+ disminuye en ambos grupos de estudio, a partir del sexto mes en las personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+ y desde el tercer mes en las personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4+, al compararlos con la toma basal de cada grupo ($p < 0.01$ para todos los tiempos estudiados. Fig. 14).

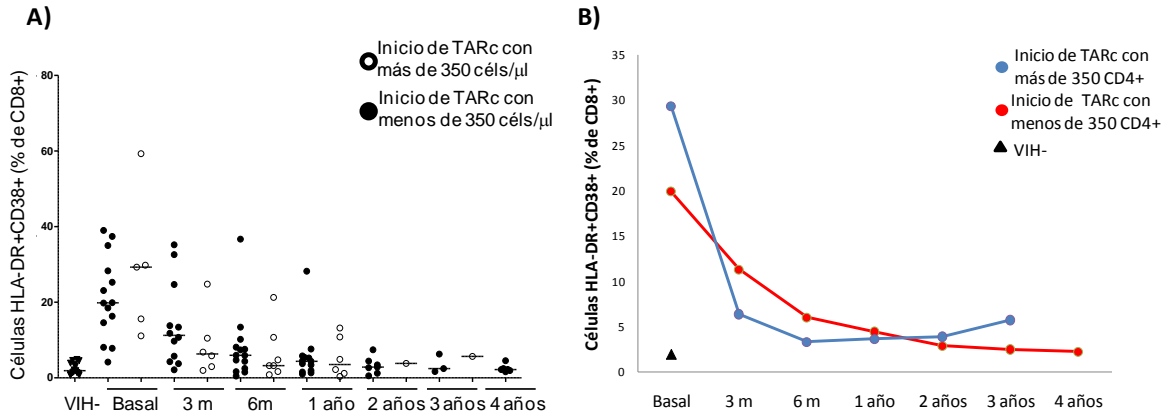


Fig. 14 Efecto del TARc en el porcentaje de linfocitos T CD8+ que co-expresan CD38 y HLA-DR. **A)** Porcentaje de células CD8+ que co-expresan CD38 y HLA-DR antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **B)** Gráfica de la mediana del porcentaje de células CD8+ que co-expresan CD38 y HLA-DR en los grupos de estudio. Los puntos representan la mediana de cada grupo en los tiempos indicados en la gráfica.

7.5 Expresión de marcadores de activación en subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+ después del inicio del TARc.

Las células CD38+ o HLA-DR+ en subpoblaciones de linfocitos T, son importantes predictores de la progresión de la infección por VIH. La disminución de estas células después del inicio del TARc, es un efecto esperado para las subpoblaciones de linfocitos. Sin embargo, nuestros resultados sólo muestran la disminución de células positivas para CD38 y HLA-DR en ciertas subpoblaciones de linfocitos T (Tablas 4-7). No se encontraron diferencias entre los porcentajes de las células CD4+ CD38+ ni de los porcentajes de las células CD4+ HLA-DR+ de la toma basal entre ambos grupos de estudio (Tabla 4 y 5, respectivamente). Interesantemente, se observó una disminución transitoria del porcentaje de células CD38+CD4+ de memoria efectora entre el sexto mes y el segundo año de TARc en las personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+ al compararlo con la

toma basal del grupo (Tabla 4). Se observó una disminución similar en el porcentaje de células CD38+ de la subpoblación de CD4 de memoria efectora al año después del inicio del TARc (Tabla 4).

Tabla No. 4. Cambios en el porcentaje de células CD38+ en las subpoblaciones de linfocitos T CD4.

| Células CD38+ (% de células T CD4 vírgenes) | | | | | | | |
|--|-------|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 22.4 | 35.7 | 32.5 | 30.9 | 40.6 | 41.5 | 46.9 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 21.8 | 18.0 | 15.5 | 21.6 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células CD38+ (% de células T CD4 memoria central) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 20.1 | 20.1 | 15.1 | 16.3 | 6.3 | 20.9 | 17.7 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 10.0 | 11.0 | 8.3 | 8.8 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células CD38+ (% de células T CD4 memoria efectora) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 14.2 | 10.1 | 6.3* | 7.3 | 3.2* | 11.5 | 10.2 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 13.2 | 7.3 | 5.1 | 4.9* | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células CD38+ (% de células T CD4 terminalmente diferenciadas) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 21.5 | 26.7 | 24.1 | 24.2 | 15.5 | 37.8 | 34.7 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 19.0 | 13.4 | 13.1 | 14.9 | N.D. | N.D. | N.D. |

*p<0.05 con respecto a la toma basal. N.D. No determinado

El análisis de la expresión de HLA-DR en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ mostró un mayor porcentaje de células HLA-DR+ en la subpoblación de células

CD4 de memoria efectora (Tabla 5). El TARc no disminuye el porcentaje de células HLA-DR+ en las células CD4 vírgenes, de memoria central ni en las terminalmente diferenciadas, únicamente se observó una tendencia a disminuir la expresión de HLA-DR en la subpoblación de células de memoria efectora a partir del año de haber iniciado el tratamiento (Tabla 5).

Tabla No. 5. Cambios en el porcentaje de células HLA-DR+ en las subpoblaciones de linfocitos T CD4

| Células HLA-DR+ (% de células T CD4 vírgenes) | | | | | | | |
|--|-------|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 6.0 | 4.3 | 4.6 | 1.6 | 6.6 | 1.5 | 3.4 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 2.8 | 2.3 | 2.2 | 3.6 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células HLA-DR+ (% de células T CD4 memoria central) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 16.6 | 14.4 | 14.2 | 9.3 | 10.2 | 4.7 | 4.5 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 10.2 | 5.2 | 4.3 | 3.7 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células HLA-DR+ (% de células T CD4 memoria efectora) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 32.3 | 34.8 | 27.9 | 16.7 | 15.3 | 12.1 | 11.85* |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 36.6 | 13.0 | 11.4 | 14.1 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células HLA-DR+ (% de células T CD4 terminalmente diferenciadas) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 16.9 | 20.6 | 9.7 | 8.0 | 9.9 | 8.7 | 5.0 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 19.7 | 5.8 | 7.3 | 4.5 | N.D. | N.D. | N.D. |

*p<0.01 con respecto a la toma basal. N.D. No determinado

El estudio de las moléculas de activación en las subpoblaciones de linfocitos T CD8 no mostró diferencias significativas al comparar los diferentes tiempos del estudio entre los grupos. Sin embargo, existen diferencias en el porcentaje de células CD38+ o HLA-DR+ de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ al comparar los diferentes tiempos del estudio con la toma basal de cada grupo, lo que hace evidente el efecto del TARc en la disminución de los marcadores de activación en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ (Tablas 6 y 7). Los resultados mostraron una disminución significativa del porcentaje de células CD38+CD8+ vírgenes después del inicio del TARc en las personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+ a partir del primer año de tratamiento ($p < 0.01$ con respecto a la basal). El análisis de las otras subpoblaciones de linfocitos T CD8+ mostró una disminución significativa de las células CD38+ CD8+ después del inicio del TARc en ambos grupos de estudio (Tabla 6).

Tabla No. 6. Cambios en el porcentaje de células CD38+ en las subpoblaciones de linfocitos T CD8.

| Células CD38+ (% de células T CD8 vírgenes) | | | | | | | |
|--|-------|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 22.8 | 22.9 | 14.3 | 12.5* | 7.8* | 13.7 | 11.5 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 24.3 | 17.3 | 14.25 | 13.4 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células CD38+ (% de células T CD8 memoria central) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 60.3 | 28.8* | 24.1* | 17.1* | 17.5* | 12.9* | 8.6* |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 61.0 | 34.7* | 19.5* | 16.1* | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células CD38+ (% de células T CD8 memoria efectora) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 57.2 | 29.6* | 19.0* | 15.2* | 14.7* | 14.3* | 10.6* |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 65.9 | 31.0* | 22.3* | 18.3* | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células CD38+ (% de células T CD8 terminalmente diferenciadas) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 41.9 | 29.9* | 17.8* | 14.6* | 5.3* | 27.6 | 12.5* |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 66.3 | 32.2* | 25.9* | 18.9* | N.D. | N.D. | N.D. |

*p<0.01 con respecto a la toma basal. N.D. No determinado

Finalmente, las células CD8+ HLA-DR+ de las subpoblaciones, no mostraron diferencias significativas al comparar los datos de la toma basal de los grupos, ni después del inicio del TARc. Interesantemente, solo se encontró una disminución significativa de las células CD8+ HLA-DR+ de memoria central, a partir de los seis meses de haber iniciado el TARc, en el grupo personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+ (p<0.01 con respecto a la toma basal, tabla 7).

Tabla 7. Cambios en los porcentajes de células HLA-DR+ en subpoblaciones de linfocitos T CD8.

| Células HLA-DR+ (% de células T CD8 vírgenes) | | | | | | | |
|--|-------|---------|---------|-------|--------|--------|--------|
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 11.3 | 7.1 | 9.8 | 5.8 | 7.6 | 4.9 | 4.0 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 7.1 | 5.4 | 4.6 | 6.2 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células HLA-DR+ (% de células T CD8 memoria central) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 45.0 | 43.6 | 28.9* | 28.0* | 23.5* | 13.6* | 19.1* |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 55.0 | 27.2 | 21.1 | 12.7 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células HLA-DR+ (% de células T CD8 memoria efectora) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 49.0 | 46.4 | 28.1 | 24.5 | 20.5 | 14.4 | 19.9 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 65.2 | 23.3 | 28.7 | 22.0 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Células HLA-DR+ (% de células T CD8 terminalmente diferenciadas) | | | | | | | |
| | Basal | 3 meses | 6 meses | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| Grupo 1 (< 350 CD 4) | 36.3 | 38.0 | 22.35 | 15.0 | 16.1 | 17.9 | 12.4 |
| Grupo 2 (>350 CD4) | 48.1 | 12.6 | 14.1 | 13.8 | N.D. | N.D. | N.D. |

*p<0.01 con respecto a la toma basal. N.D. No determinado

7.6 Expresión de marcadores de activación en células NK después del inicio del TARc.

Para determinar los cambios en la expresión de marcadores de activación en las células NK se realizaron gráficas del porcentaje de células NK que expresan marcadores de activación como CD38, CD69 y HLA-DR. En general, no se

encontró disminución o cambios en los porcentajes de las células NK que expresan marcadores de activación a ningún tiempo analizado después del inicio del TARc. No se encontraron diferencias de los porcentajes de células CD38+ de las subpoblaciones de células NK entre los grupos de estudio (Fig. 15). Se observó también que el TARc únicamente disminuye el porcentaje de células NK disfuncionales CD38+ a partir del sexto mes después de iniciar el TARc y en el grupo de personas con menos de 350 CD4, al compararlo con la toma basal (Fig. 15C). En contraste, esta disminución no se observó en el grupo de personas que iniciaron el TARc con más de 350 CD4 (Fig. 15C).

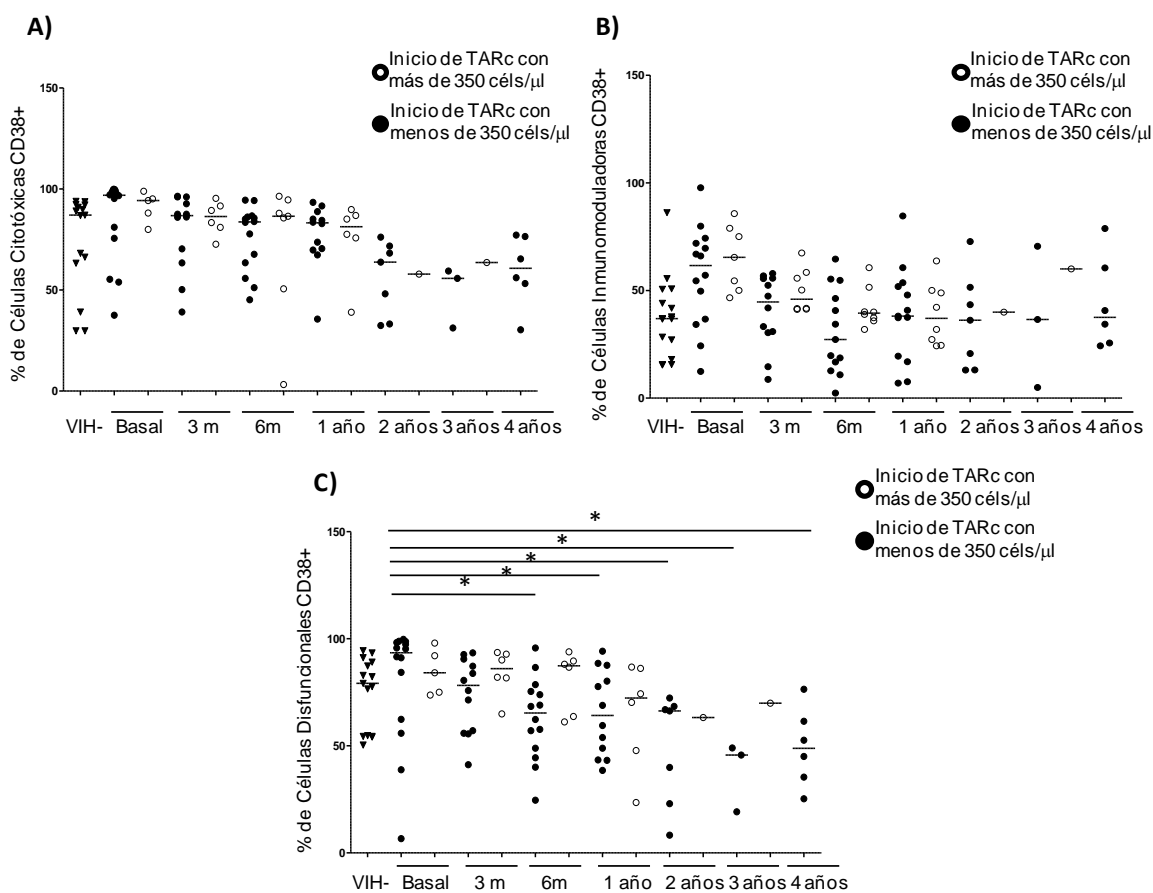


Fig. 15 Efecto del TARc en el porcentaje de células NK citotóxicas que expresan CD38. A) Porcentaje de células NK citotóxicas que expresan CD38 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **B)** Porcentaje de células NK inmunomoduladoras que expresan CD38 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **C)** Porcentaje de células NK disfuncionales que expresan CD38 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. * $p < 0.01$ con respecto a la basal. Círculos negros = grupo de personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4 céls / μ l. Círculos abiertos = grupo de personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4 céls / μ l.

El análisis del porcentaje de las células CD69+ de las subpoblaciones de células NK muestra que solo el 20% de células de cada subpoblación expresa este marcador y, a pesar de representar un bajo porcentaje de cada subpoblación se encontraron cambios importantes (Fig. 16). El porcentaje de células NK citotóxicas CD69+ de la toma basal es mayor en las personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4+ en comparación con las personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4+ (Fig.16). Sin embargo, no se encontraron cambios en el porcentaje de células NK CD69+ después del inicio del TARc (Fig.16). Tanto las células NK inmunomoduladoras CD69+ como las células NK disfuncionales CD69+, no muestran diferencias en la toma basal de los grupos de estudio y tampoco al comparar los diferentes tiempos después del inicio de TARc con la toma basal, en ambas subpoblaciones (Fig. 16).

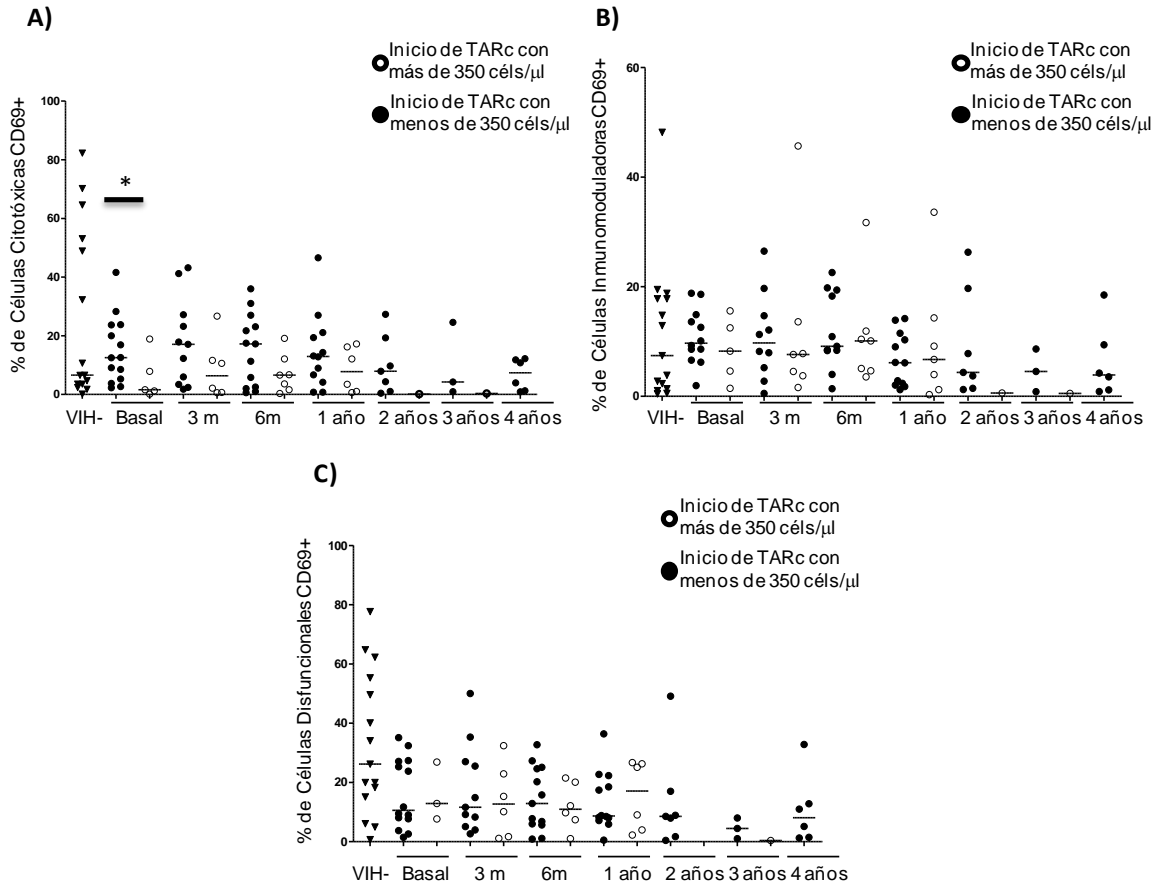


Fig. 16 Efecto del TARc en el porcentaje de células NK que expresan CD69. A) Porcentaje de células NK citotóxicas que expresan CD69 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. * $p < 0.0465$. **B)** Porcentaje de células NK inmunomoduladoras que expresan CD69 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **C)** Porcentaje de células NK disfuncionales que expresan CD69 antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. * $p < 0.01$ entre los grupos de estudio. Círculos negros = grupo de personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4 células / μ l. Círculos abiertos = grupo de personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4 células / μ l.

Finalmente el porcentaje de células HLA-DR+ de las subpoblaciones de células NK, no mostró diferencia significativa al hacer la comparación entre los grupos de estudio. Al comparar los porcentajes de células HLA-DR+ de los diferentes

tiempos después del inicio del TARc con la toma basal, tampoco se encontró diferencia significativa (Fig. 17).

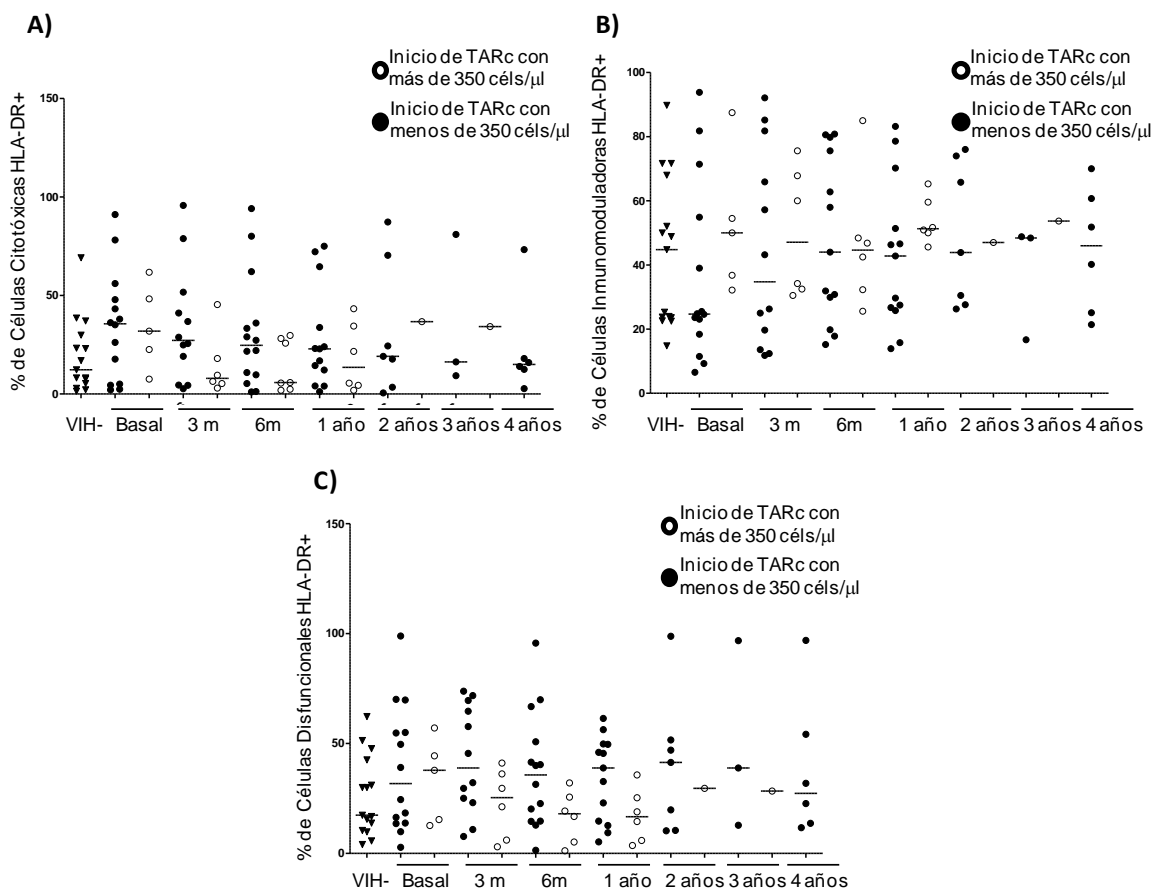


Fig. 17 Efecto del TARc en el porcentaje de células NK citotóxicas que expresan HLA-DR. **A)** Porcentaje de células NK citotóxicas que expresan HLA-DR antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **B)** Porcentaje de células NK inmunomoduladoras que expresan HLA-DR antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. **C)** Porcentaje de células NK disfuncionales que expresan HLA-DR antes del inicio de TARc y posterior al inicio de TARc en el transcurso de cuatro años de seguimiento. Círculos negros = grupo de personas que iniciaron TARc con menos de 350 CD4 céls / μ l. Círculos abiertos = grupo de personas que iniciaron TARc con más de 350 CD4 céls / μ l.

8.0 Discusión de resultados.

Con el inicio del TARc en nuestros grupos de estudio se generó la reconstitución de los linfocitos T CD4+ aunque en uno de los grupos esta reconstitución fue más apreciable, por otro lado el porcentaje de linfocitos T CD8+ y contrario a lo esperado no disminuyó significativamente incluso después de un año de haber iniciado el TARc.

En cuanto a las células NK, se observó un incremento en el porcentaje de células NK CD56⁻/CD16⁺ y que no disminuye después de varios años de uso del TARc.

No se mostró una disminución en el porcentaje de células T CD4 positivas para los marcadores de activación que estudiamos (CD38 y HLA-DR) después de la administración del TARc, ni después de varios años de uso.

Sin embargo en linfocitos T CD8 se observó una clara disminución del porcentaje de las células positivas para CD38, lo que nos estaría indicando el éxito del TARc.

Finalmente y de acuerdo a los resultados de esta tesis, al no ver una clara disminución de la activación en linfocitos T CD4, podemos decir que el conteo de linfocitos T CD4 con el que se inicie el TARc no impacta en la expresión de marcadores de activación de esta población.

8.1 Reconstitución de linfocitos T y células NK

8.1.1 La reconstitución de linfocitos T CD4+ después del inicio del TARc depende del número de linfocitos T CD4+ con el que se haya iniciado el tratamiento.

Se ha considerado que para hablar de éxito en la terapia antirretroviral, el número de linfocitos T CD4+ tiene que aumentar entre 50 y 100 células/mL por año después del inicio del TARc hasta que el número de linfocitos T CD4+ se estabiliza varios años después (WHO, 2000; OARAC, 2011). Este aumento es mucho más evidente en los primeros meses después de que se inicio el TARc por la redistribución de células T CD4+ de tejidos linfoides a sangre periférica por lo que, en promedio, durante estos meses se ve un incremento de 100 a 150 células/mL (WHO, 2000; OARAC, 2011).

Se ha mostrado que, si el inicio del TARc es en etapas tempranas de la infección, hay una mejor reconstitución de células del sistema inmune (Jhonsson et.al., 2011; Paci, et.al. 2011). En diversos estudios, se ha observado que al iniciar el tratamiento con un conteo de linfocitos T CD4+ mayor a 350cel/uL se tiene una mejor reconstitución al compararla con personas que iniciaron el tratamiento por debajo de este número (Egger, et.al., 2009; When To Start Consortium, 2009).

En esta tesis se observó una reconstitución de linfocitos T CD4 posterior al inicio del TARc en ambos grupos, sin embargo se mostró un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ en el grupo con más de 350 CD4+ a los tres meses después del inicio del TARc (44.0%; 32.6%-60.9%), esta mejor reconstitución se mantiene hasta los 6 meses después del inicio del TARc (60.9%; 18.7-73.0%). El grupo con

menos de 350 CD4+ mostró una reconstitución menor a los tres y seis meses después del inicio del TARc (20.6%; 7.5%-52.2% y 26.1%; 9.45%-60.2% respectivamente).

Esta diferencia, puede deberse a: 1) una falla en el timo, sitio donde se generan los linfocitos T. (Takahama, 2006) y 2) la activación inmunológica crónica. Por un lado, se sabe que en la infección por el VIH el timo presenta una disminución en su función, determinada por una disminución de la proliferación intratímica, así como de la liberación de células nuevas a sangre periférica; aunque no se sabe la causa exacta se piensa que la disminución de su función está asociada a la replicación del virus. (Dion, et.al., 2004). Esta disminución funcional del timo impacta directamente en la producción de linfocitos T CD4 vírgenes nuevos y, ésta a su vez, en las demás subpoblaciones de linfocitos T CD4+ (Douek, 2004).

Aunque se ha demostrado que algunas personas recuperan la función tímica después del inicio del TARc, la recuperación es progresiva por lo que, como consecuencia, puede llevar a una reconstitución más lenta a personas con infección avanzada (Benveniste, et.al., 2005).

Por otro lado, la activación inmune crónica persiste aún después del inicio del TARc y mantiene la sobreexpresión de factores de adhesión, impidiendo que los linfocitos T CD4 sean liberados de tejidos linfoides secundarios a sangre periférica (Piconi, et.al. 2010).

Cualquiera de estos factores puede interferir en la reconstitución inmunológica después del inicio del TARc, es necesario por tanto realizar experimentos específicos que ayuden a determinar cuál de estos factores tienen más peso en la

reconstitución de linfocitos T CD4, dependiendo del número de CD4 con que se inicie el TARc. Se ha mostrado que la reconstitución es mucho más apreciable años después del inicio del TARc por lo que sería necesario un seguimiento por un mayor número de años para observar como reconstituye cada grupo y si existen diferencias entre ellos, para motivos de este trabajo el seguimiento que se dio fue el adecuado.

8.1.2 Las infecciones oportunistas pueden contribuir al aumento de linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH.

En la infección por el VIH el aumento de los linfocitos T CD8 solo es apreciable durante la fase aguda de la infección, después de ésta disminuyen considerablemente y se mantienen así durante la fase crónica (Pantaleo et.al., 1997). Durante una infección en el organismo se desarrolla la respuesta inmune adaptativa, en la que los linfocitos T CD8 vírgenes se diferencian hacia células de memoria central y células efectoras (Wherry y Ahmed, 2004). Algunos de los linfocitos T CD8 de memoria central proliferan y se diferencian en linfocitos T CD8 de memoria efectora, los cuales tienen una menor capacidad proliferativa y una gran capacidad citotóxica (Kaech, et.al., 2002). Durante la fase aguda de la infección por el VIH hay una gran cantidad de linfocitos T CD8 de memoria efectora, lo cuales contribuyen importantemente con el control de la infección durante esta fase (Addo, et.al., 2007). Sin embargo, al entrar a la etapa crónica cuando se da el control parcial de la replicación viral, el número de linfocitos T CD8 de memoria efectora disminuye considerablemente, aunque hay una

regeneración constante de estos linfocitos y por este motivo se encuentran aumentados al compararlos con personas sin VIH (Kalia, et.al., 2010).

Los linfocitos T CD8 en la infección por el VIH no han sido utilizados como marcadores de progresión, ya que tienden a variar durante el transcurso de la infección, aunque se ha visto que hay un incremento comparado con las personas sin VIH, no se esperaba encontrar diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD8 totales al comparar nuestros grupos de estudio. Sin embargo, se encontró un mayor porcentaje de linfocitos T CD8 totales antes del inicio del TARc en el grupo con menos de 350 CD4+, (64.2%; 34.7-87.7%) en comparación con el grupo con más de 350 CD4+ (42.6%; 27.4- 62.8%), que no concuerda con lo esperado.

Una posible explicación a esto puede ser que, mientras más avanza la infección por el VIH, (grupo con menos de 350 CD4+), las personas son más susceptibles a que se desarrolle una co-infección. Una de las más estudiadas es la infección por CVM (Citomegalovirus) que se manifiesta en la etapa tardía de la infección por el VIH. Se estima que más del 60% de la población mundial ha estado expuesta a este virus (Rafailidis, et.al.,2008), sin embargo en personas inmunocompetentes no hay manifestaciones clínicas aparentes, por lo que regularmente pasa desapercibido (Wreghitt, et.al., 2003). Por otro lado puede haber una reactivación de la infección cuando hay alguna inmunodeficiencia, y que es característico en personas con bajo conteo de linfocitos T CD4+ (Sinclair y Sissons, 2006). El sistema inmune trata de controlar esta infección y hay un aumento de linfocitos T CD8+ virus específicos para CMV (Barret, et.al., 2012), por lo que en el grupo con menos de 350 CD4+, esta contribución por una posible infección con CMV, sería

la causa de encontrar un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+, en comparación con el grupo con menos de 350 CD4.

8.1.3 El porcentaje de linfocitos T CD8+ totales no disminuye después del inicio del TARc.

Después del inicio del TARc los linfocitos T CD8 totales tienden a disminuir rápidamente, principalmente los linfocitos T CD8 de memoria efectora (Casazza, et.al., 2001). Aunque se ha mostrado que la replicación viral residual, que es la mínima replicación viral que existe después del uso del TARc, contribuye con la estimulación de linfocitos T CD8 de memoria efectora (Benito, et.al., 2004).

Al mismo tiempo de la disminución de los linfocitos T CD8 de memoria efectora se observa la reconstitución de linfocitos T CD8 vírgenes, aunque esta reconstitución es lenta (Tiba, et.al., 2012). Estos dos sucesos, la disminución de linfocitos T CD8 de memoria efectora y la reconstitución de linfocitos T CD8 vírgenes, mantienen estable el número de linfocitos T CD8 totales después de que se inicio el TARc.

En esta tesis se observó esta tendencia, una disminución gradual del porcentaje de los linfocitos T CD8 de memoria efectora aunado a la reconstitución paulatina de linfocitos T CD8 vírgenes en ambos grupos de estudio, y no se mostraron diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD8+ totales, después de iniciar el TARc.

8.1.4 Las células NK CD56⁻/CD16⁺ aumentan conforme progresa la infección por el VIH.

Las células NK CD56⁻/CD16⁺ que se han denominado como NK disfuncionales son una población de células NK que se genera sólo en infecciones crónicas como la causada por el VIH y que se ven aumentadas durante la fase crónica de la infección (Alter, et.al., 2005). Las células NK disfuncionales tienen una menor producción de citocinas y menor capacidad citotóxica (Mavilio, et.al., 2005; Alter, et.al., 2005; Lucia, et.al., 1995).

Lo anterior concuerda con nuestros resultados ya que en nuestros grupos de estudio se observó una mayor cantidad de células NK CD56⁻/CD16⁺ comparadas con personas sin VIH, así mismo se observó una mayor cantidad de éstas células en el grupo con menos de 350 CD4, grupo en etapas avanzadas de la infección.

Después del inicio del TARc, no se mostró una disminución de células NK disfuncionales lo que nos podría indicar que, a pesar del control de la infección, las células NK tardan en recuperar su homeostasis y funcionalidad más de 4 años.

Pese a que otros estudios relacionan la pérdida de las células NK citotóxicas con el aumento de las células NK disfuncionales (De Maria, et.al., 2003), nuestros resultados no mostraron claramente esta relación. Se observó una gran variabilidad entre los datos, por lo que se ha considerado aumentar el número de personas de cada grupo, así como las personas sin VIH.

8.2 Efecto del TARc en la activación Crónica

8.2.1 Los linfocitos T CD4+CD38+ no disminuyen después del inicio del TARc pero si los linfocitos T CD4+HLA-DR+.

Como se mencionó en la introducción, la activación crónica es un marcador de la cronicidad de la infección por VIH (Boasso y Shearer, 2008). La expresión HLA-DR y de CD38 en linfocitos TCD8 y CD4 se correlaciona positivamente con la carga viral en personas sin TARc (Coetzee, et.al., 2009). Al día de hoy, también se ha propuesto que, aún en personas con TARc existe una activación crónica residual (Jain et.al., 2013). La causa y función de la expresión de HLA-DR y de CD38 en linfocitos, durante la infección por VIH es aún desconocida. Los linfocitos T CD4+ expresan transitoriamente moléculas de HLA-DR en su superficie cuando se encuentran activados. Aunque no se sabe a ciencia cierta la función de HLA-DR en los linfocitos T CD4+ (Holling, et.al., 2002). Al iniciar el TARc, hay una disminución en la expresión de HLA-DR que está asociada al control de la replicación viral (Uglietti,et.al., 2012).

Por otro lado CD38 es una ectoenzima que genera compuestos necesarios para la movilización de calcio intracelular, necesario para proceso de activación y proliferación celular. Normalmente en células en reposo expresa en muy bajas cantidades, sin embargo en linfocitos activados aumenta su expresión en membrana plasmática (Savarino, et.al., 2000). Se ha mostrado que, en infecciones crónicas como la producida por el VIH, los linfocitos T sobre-expresan CD38 y

esta expresión correlaciona positivamente con la progresión de la infección (Chun, et.al., 2003).

Existe discrepancia en cuanto a la expresión de estas moléculas, después del inicio del TARc; por un lado se ha mostrado una disminución importante en la cantidad de células positivas para esta molécula (Almeida, et.al., 2004), mientras que, por otro lado, reportes distintos han mostrado que la expresión de estas proteínas permanece aumentada después del inicio del TARc al compararse con personas sin VIH (1. Hunt, et.al., 2003; 2. Uglietti, et.al., 2012;).

Mientras que los primeros autores indican que la estimulación antigénica es la principal causa de la activación celular, y que por lo tanto el control de la viremia después del inicio del TARc logra disminuir la activación celular (James, et.al., 2000). Otros autores han mostrado que, después del inicio del TARc, hay una sobreproducción de citocinas que contribuyen con la activación celular (Brazille, et.al., 2003; Imami, et.al., 1999). Se han propuesto otros factores que contribuyen a la activación residual durante el TARc, como las co-infecciones y posiblemente la constante translocación de productos bacterianos debido a una restauración incompleta de la mucosa intestinal, (Guadalupe, et.al., 2006; Marchietti, et.al., 2008; González, et.al., 2009; Villacres, et.al., 2001).

En esta tesis pudimos observar solo la disminución de linfocitos T CD4+HLA-DR+ a diferencia de los linfocitos CD4+CD38+ que no mostraron cambios, aunque aún no encontramos una posible explicación a este fenómeno, pues la expresión de ambos marcadores es inducida prácticamente por las mismas moléculas, dentro de ellas citocinas como el Interferon-gamma (INF- γ) e Interleucina 4 (IL-4) así

como por la estimulación antigénica (Sandoval y Santos, 2005). Por lo que continuamos en la búsqueda de una explicación.

8.2.2 El porcentaje de linfocitos T CD8+CD38+ disminuye al igual que en las subpoblaciones.

Al perderse la estimulación antigénica por el uso del TARc, la disminución de la activación en las células del sistema inmune es un efecto esperado. Como se ha mostrado en otros reportes, el porcentaje de linfocitos T CD8+CD38+ y de CD38 en sus subpoblaciones después del inicio del TARc disminuye significativamente (Benito, et.al., 2005). A pesar de que la expresión de CD38 en linfocitos T CD8+ se ha asociado con el éxito o la falla del TARc (Tilling, et.al., 2002; Onlamoon, et.al., 2005), se ha mostrado que, aún después de varios años de tomar el TARc, hay un mayor porcentaje de células CD8+CD38+ en comparación con personas sin VIH (Benito, et.al., 2004).

En esta tesis pudimos observar la disminución de las células CD8+CD38+ después del inicio del TARc lo que podría deberse, como ya se mencionó, a la pérdida de la estimulación antigénica por el control de la infección derivada del TARc. Los resultados de este trabajo también muestran que hay una mayor cantidad de células T CD8+CD38+ después del inicio del TARc, en ambos grupos de estudio en comparación con personas sin VIH. Por lo que nuestros resultados concuerdan con lo ya reportado.

8.2.3 El momento en el que se inicie el TARc no afecta la expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4+.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, hemos llegado a la conclusión de que el momento en el que se inicie el TARc, no impacta de forma clara en la activación de los linfocitos T CD4, en nuestros grupos de estudio, aunque se haya visto la disminución de células HLA-DR+ de esta población. Por otro lado se vio una clara disminución en la activación de linfocitos T CD8+, relacionado con la disminución de células CD38+ de esta población. Por lo que concordando con varios estudios, la células CD8+CD38+ pueden indicarnos, antes del tratamiento la progresión de la infección por el VIH y posterior al tratamiento, el éxito o la falla del mismo.

Es importante mencionar que incluso después del uso del TARc, hay una gran cantidad de células activadas, como ya se mencionó, que pueden contribuir con la falla del TARc, afectar la reconstitución e incluso contribuir con la progresión hacia SIDA. Por lo que en años recientes se ha determinado iniciar el TARc, con un conteo de linfocitos T CD4+ por arriba de las 500 cél/ μ L, con la finalidad de evitar primero, una gran pérdida de linfocitos T CD4 y segundo la activación inmune crónica.

9.0 Conclusión

El momento en el que se inicia el TARc tiene impacto en la reconstitución de células del sistema inmune, mientras más temprano en la infección se inicie, se observa una reconstitución más rápida. Principalmente observamos un aumento de linfocitos T CD4+ totales, de linfocitos T CD4+ vírgenes y de memoria central.

Contrariamente no encontramos relación entre el momento en que se inició el TARc y una disminución más rápida de la hiper-activación celular, por lo que iniciar el TARc con más de 350 CD4+ o menos de éste número no tiene relevancia en los cambios mostrados en la activación celular.

La activación en células NK no mostró cambios incluso al compararlo con la muestra sin VIH, debido a que las células NK presentan altos niveles basales de las moléculas de activación estudiadas.

Hay un aumento de células NK disfuncionales en ambos grupos de estudio, podemos decir que la infección crónica por el VIH provoca la pérdida de funcionalidad de células NK y éstas no recuperan su funcionalidad incluso varios años después de haber iniciado el TARc.

El aumento en el número de personas reclutadas para cada grupo de años podría ayudar a disminuir la variabilidad entre los resultados. El seguimiento por un mayor número de años nos permitiría una mejor observación de los cambios mostrados tanto en la reconstitución como en la activación celular.

10.0 Bibliografía.

1. Abbas, AK., Murphy, KM., Sher, A. (1996). **Functional Diversity of Helper T lymphocytes.** Nature, 383, 787-793.
2. Abbas, AK., Lichtman, AH., Pillai, S. (2010). **Cellular and Molecular Immunology.** Saunders/Elsevier, 7th edition, 56-110.
3. Addo, MM., Draenert, R., Rathod, A., Verrill, CL., Davis, BT., Gandhi, RT., et.al. (2007). **Fully differentiated HIV-1 specific CD8+ T effector cells are more frequently detectable in controlled tan in progressive HIV-1 infection.** Plos One, 2 (3), 1-7.
4. Alam, R. y Gorska, M. **Lymphocytes.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, 111 (2), S476-485.
5. Alcabes, P., Schoenbaum, EE., Klein, RS. (1993). **CD4+ lymphocyte level and rate of decline as predictors of AIDS in intravenous drug users with HIV infection.** AIDS, 7 (4), 513-517.
6. Al-Harhi, L., MaWhinney, S., Connick, E., Schooley, RT., Foster, JE., Benson, C., et.al. (2007). **Immunophenotypic alterations in acute and early HIV infection.** Clinical Immunology, 125, 299-308.
7. Alimonti, JB., Ball, TB., Fowke, KR. (2003). **Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS.** Journal of General Virology, 84, 1649-1661.
8. Alter, G., Teigen, N., Davis, BT., Addo, MM., Suscovich, TJ., Waring, MT., et.al. (2005). **Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection.** Blood, 106 (10), 3366-3369.
9. Appay, V., Van Lier, RA., Sallusto, F., Roederer., M. (2008). **Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues.** Cytometry Part A, 73A, 975-983.
10. Arts, EJ. y Hazuda, DJ. (2012). **HIV Antiretroviral Drug Therapy.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2, 1-23.
11. Autran, B., Carcelain, G., Li, TS., Gorocho, G., Blanc C., Renaud, M. (1999). **Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy.** Immunology Letters, 66, 207-211.
12. Bangs, SC., Baban, D., Cattan, HJ., Li, C., McMichael, AJ., Xu, XN. (2009). **Human CD4+ Memory T Cells Are Preferential Targets for Bystander Activation and Apoptosis.** The Journal of Immunology, 182 (4), 1962-1971.
13. Barret, L., Fowke, KR., Grant, MD. (2012). **Cytomegalovirus, aging, and HIV: A Perfect Storm.** AIDS Reviews, 14, 159-167.
14. Benito, JM., López, M., Lozano, S., Martínez, P., González, J., Soriano, V. (2004). **CD38 Expression on CD8 T lymphocytes as a Marker of Residual Virus Replication in Chronically HIV-Infected Patients Receiving antirretroviral Therapy.** AIDS Research and Human Retroviruses, 20 (2), 227-233.
15. Benlahrech, A., Donaghy, H., Rozis, G., Goodier, M., Klavinskis, L., Gotch, F., Patterson, S. (2009). **Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon γ Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways.** Sensor, 9, 386-403.
16. Benveniste, O., Flaault, A., Rollot, F., Elbim, C., Estaquier, J., Pédrón, B., et.al. (2005). **Mechanisms Involved in the Low-Level Regeneration of CD4+ Cels in HIV-1-Infected patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy Who Have Prolonged Undetectable Plasma Viral Loads.** The Journal of Infectious Diseases, 191, 1670-1679.
17. BHIVA Treatment Guidelines Writing Group. (2008). **British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-infected adults with antiretroviral therapy 2008.** HIV Medicine, 9, 563-608.
18. Björkström, NK., Lindgren, T., Stolts, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., et.al. (2011). **Rapid expansión and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus.** Journal of Experimental Medicine, 208 (1), 13-21.
19. Bleul, CC., Wu, L., Hoxie, JA., Springer, TA., Mackay, CR. (1997). **The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes.** Immunology, 94, 1925-1930.

20. Boasso, A. y Shearer, GM. (2008). **Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis.** *Clinical Immunology*, 126 (3), 235-242.
21. Bohne, J., Wodrich, H., Kräusslich, HG. (2005). **Splicing of human immunodeficiency virus RNA is position-dependent suggesting sequential removal of introns from the 5' end.** *Nucleic Acids Research*, 33 (3), 825-837.
22. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, BH., Shaw GM., Oldstone MB. (1994). **Virus-Specific CD8+ Cytotoxic T-Lymphocyte Activity Associated with Control of Viremia in Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection.** *Journal of Virology*, 68 (9), 6103-6110.
23. Bosch, RJ., Wang, R., Vaida, F., Lederman, MM., Albrecht, MA. (2006). **Changes in the slope of the CD4 cell count increase after initiation of potent antiretroviral treatment.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 43(4), 433-435.
24. Bradley, LM. (2003). **Migration and T-lymphocyte effector function.** *Current Opinion in Immunology*, 15, 343-348.
25. Brazille, P., Dereuddre, N., Lepout, C., Clayette, P., Boyer, O., Vildé, JL., et.al. (2002). **Decrease in plasma TNF- α level and IFN- γ mRNA level in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and an increase in IL-2 mRNA level in PBMC are associated with effective highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients.** *Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 131, 304-311.
26. Brenchley, JM., Douek, DC., Ambrozak, DR., Chatterji, M., Betts, MR., Davis, LS., Koup, RA. (2002). **Expansion of activated human naïve T-cells precedes effector function.** *Clinical Experimental Immunology*, 130, 431-440.
27. Brunetta, E., Hudspeth, KL., Mavilio, D. (2010). **Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes.** *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 1119-1130.
28. Bryceson, YT., March, ME., Ljunggren, H., Long, EO. (2006). **Activation, coactivation, and coestimulation of resting human natural killer cells.** *Immunology Review*, 214, 73-91.
29. Bukrinsky, M. (2004). **A Hard Way to the Nucleus.** *Molecular Medicine*, 10, 1-6.
30. Buontempo, PJ., Wojcik, L., Buontempo, KA., Ogert, RA., Strizki, JM., Howe, JA., Ralston, R. (2009). **Quantifying the relationship between HIV-1 susceptibility to CCR5 antagonist and virus affinity for antagonist-occupied co-receptor.** *Virology*, 395, 268-279.
31. Casazza, JP., Betts, MR., Picker, LJ., Koup, RA. (2001). **Decay Kinetics of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ T Cells in Peripheral Blood after Initiation of Highly Active Antiretroviral Therapy.** *Journal of Virology*, 75 (14), 6508-6516.
32. Chun, TW., Justement, JS., Sanford, C., Hallahan, CW., Planta, MA., Loutfy, M. (2003). **Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ t cells in untreated HIV-infected individuals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (8), 2464-2469.
33. Cocohoba, J. y Dong, BJ. (2008). **Raltegravir: The First HIV Integrase Inhibitor.** *Clinical Therapeutics*, 30 (10), 1747-1765.
34. Coetzee, LM., Tay, SS., Lawrie, D., Janossy, G., Glencross, DK. (2009). **From Research Tool to Routine Test: CD38 Monitoring in HIV Patients.** *Clinical Cytometry*, 76B, 375-384.
35. Cohen J., Hazebergh, MD., Hamann, D., Otto, SA., Borleffs, JC., Miedema, F., et.al. (2000). **The Dominant Source of CD4+ and CD8+ T-Cell Activation in HIV Infection Is Antigenic Stimulation.** *Journal of AIDS*, 25, 203-211.
36. Cohen, MS., Chen, YQ., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, MC., Kumarasamy, N., et.al. (2011). **Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy.** *The New England Journal of Medicine*, 365 (6), 493-505.
37. Corbeau, P. y Reynes, J. (2011). **Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection.** *Blood*, 117, 5582-5590.
38. Daugas, E., Rougier JP., Hill G. (2005). **HAART-related nephropathies in HIV-infected patients.** *Kidney International*, 67, 393-403.
39. De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavilio, D. (2003). **The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 y NKp44).** *European Journal of Immunology*, 33, 2410-2428.
40. Dion, ML., Poulin, JF., Bordi, RB., Sylvestre, M., Corsini, R., Kettag, N., et.al. (2004). **HIV Infection Rapidly Induces and Maintains a Substantial Suppression of Thymocyte Proliferation.** *Immunity*, 21, 757-768.

41. Doisne, JN., Urrutia, A., Lacabaratz, C., Goujard, C., Meyer, L., Chaix, ML., et.al. (2004). **CD8+ T Cells specific for EBV, Cytomegalovirus, and Influenza Virus are Activated During Primary HIV Infection.** *The Journal of Immunology*, 173, 2410-2418.
42. Dorfman, T., Bukovsky, A., Ohagen, A., Høglund, S., Gottlinger, HG. (1994). **Functional Domains of the Capsid Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1.** *Journal of Virology*, 68 (12), 8180-8187.
43. Douek, D. **Thymic Output and HIV Infection: On the Right TREC.** (2004) *Immunity*, 21 (6), 744-745.
44. Douek, DC., Brenchley, JM., Betts, MR., Ambrozak, DR., Hill, BJ., Okamoto, Y., et.al. (2002). **HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells.** *Nature*, 417, 95-98.
45. Downs, JH. (2010). **The gastrointestinal tract and HIV pathogenesis.** *The South African Journal of Clinical Nutrition*, 23(1), S65-S68.
46. Egger, S., Petoumenos, K., Kamarulzaman, A., Hoy, J., Sungkanuparph, S., Chuah, J., et.al. (2009). **Long-term patterns in CD4 response is determined by an interaction between baseline CD4 cell count, viral load and time: the Asia Pacific HIV Observational Database (APHOD).** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 50 (5), 513-520.
47. European AIDS Clinical Society. (2011). **Tratamiento y Seguimiento de Adultos Infectados por el VIH en Europa.** *Guías Clínicas*, 5, 1-82.
48. Evans, TG., Bonnez, W., Soucier, HR., Fitzgerald, T., Gibbons, DC., Reichman, RC. (1998). **Highly active antiretroviral therapy results in a decrease in CD8+ T cell activation and preferential reconstitution of the peripheral CD4+ T cell population with memory rather than naive cells.** *Antiviral Research*, 39, 163-173.
49. Fan, Y., Yang, B., Wu, C. (2008). **Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs.** *Cell Biology International*, 32, 188-197.
50. Fanales, E., Raimondo, M., Suligo, B., Buttò, S. (2010). *Ann Ist Super Sanità*, 46 (1), 5-14.
51. Feinberg, MB. (1996). **Changing the Natural History of HIV Disease.** *Lancet*, 348, 239-246.
52. Ferguson, NM., De Wolf, F., Ghani, AC., Fraser, C., Donnelly CA., Reissi, P., et.al. (1999). **Antigen-driven CD4+ T cell and HIV-1 dynamics: Residual viral replication under highly active antiretroviral therapy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (26), 15167-15172.
53. Fix, OK., Locarnini, SA., Peters, MG. (2007). **Virology and Clinical Management of Hepatitis B and HIV Coinfection.** *The PRN Notebook*, 11 (4), 20-27.
54. Fortin, JF., Cantin, R., Bergeron, MG., Tremblay, MJ. (2000). **Interaction between Virion-Bound Host Intercellular Adhesion Molecule-1 and the Affinity State of Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 on Target Cells Renders R5 and X4 Isolates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 More Refractory to Neutralization.** *Virology*, 268, 493-503.
55. Fung, HB., Guo, Y. (2004). **Enfuvirtide: a fusion inhibitor for the treatment of HIV infection.** *Clinical Therapy*, 26, 352-357.
56. Funke, J., Dürr, R., Dietrich, U., Koch, J. (2011). **Natural Killer Cell in HIV infection: A Double-Edged Sword.** *AIDS*, 13, 67-76.
57. Gallant, JE. (2002). **Initial Therapy of HIV Infection.** *Journal of Clinical Virology*, 25, 317-333.
58. Gebhardt, T., Mueller, SN., Heath, WR., Carbone, FR. (2013). **Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells.** *Trends in Immunology*, 34 (1), 27-32.
59. Giavedoni, LD., Velasquillo, MC., Parodi, LM., Hubbard, GB., Hodara, VL. (2000). **Cytokine Expression, Natural Killer Cell Activation, and Phenotypic Changes in Lymphoid Cells from Rhesus Macaques during Acute Infection with Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus.** *Journal of Virology*, 74 (4), 1648-1657.
60. Girard, MP., Osmanov, S., Assossou, OM., Kiény, MP. (2011). **Human Immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review.** *Vaccine*, 29, 6191-6218.
61. González VD., Falconer, K., Blom, KG., Richard, O., Morn, B., Laursen, A., et.al. (2009). **High Levels of Chronic Immune Activation in the T-Cell Compartments of Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and Human Immunodeficiency Virus Type 1 and on Highly Active Antiretroviral Therapy Are Reverted by Alpha Interferon and Ribavirin treatment.** *Journal of Virology*, 83 (21), 1407-1411.
62. Grabar, S., Weiss, L., Costagliola, D. (2006). **HIV infection in older patients in the HAART era.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 4-7.

63. Guadalupe, M., sankaran, S., George, M., Reay, E., Verhoeven, D., Shacklett, BL., et.al. (2006). **Viral Suppression and Immune Restoration in the Gastrointestinal Mucosa of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Initiating Therapy during Primary or Chronic infection.** Journal of Virology, 80 (16), 8236-8247.
64. Gurunathan, S., El Habib, R., Meric, C., Plotkin, S., Dodet, B., Corey L., Tartaglia, J. (2009). **Use of predictive markers on HIV disease progression in vaccine trials.** Vaccine, 27, 1997-2015.
65. Hamerman, JA., Ogasawara, K., Lanier, LL. (2005). **NK cells in innate immunity.** Current Opinion in immunology, 17, 29-35.
66. Henrard, D., Phillips, JF., Muenz, LR., Blattner, WA., Wiesner, D., Eyster, ME., Goedert, JJ. (1995). **Natural History of HIV-1 Cell-Free Viremia.** Journal of the American Medical Association, 274 (7), 554-558.
67. Hogg, RS., Yip, B., Chan, KJ., Craib, KJ., O'Shaughnessy, MV., Montaner, JS. (2001). **Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy.** Journal of the American Medical Association, 286 (20), 2568-2577.
68. Holling, TM., van der Stoep, N., Quinten, E., van der Elsen, PJ. (2013). **Activated Human T Cells Accomplish MHC Class II Expression Through t Cell-Specific Occupation of Class II Transactivator Promoter III.** The Journal of Immunology, 168, 763-770.
69. <http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.htm> (Octubre 17, 2012).
70. <http://www.niaid.nih.gov/volunteer/hivandinfectious/hivstudies/Pages/RPHI.aspx> (Mayo 2012 11:23 hrs)
71. <http://www.niaid.nih.gov/volunteer/hivandinfectious/hivstudies/Pages/STARTStudy.aspx> (Mayo 2012 13:13 hrs)
72. Hunt, PW., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, JN., Roland, M., Shafer, KP., et.al. (2008). **Relationship between T Cell Activation and CD4 T Cell Count in HIV-Seropositive Individuals with Undetectable Plasma HIV RNA Levels in the Absence of Therapy.** The Journal of Infectious Disease, 197, 126-133.
73. Hunt, PW., Martin, JN., Sinclair, E., Bredt, B., Hagos, E., Lampiris, H., et.al. (2003). **T Cell Activation Is Associated with Lower CD4+ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy.** The Journal of Infectious Disease, 187, 1534-1543.
74. Imami, N., R. Antonopoulos, C., Hardy, GA., Gazzard, B., Gotch, FM. (1999). **Assessment of type 1 and type 2 cytokines in HIV type 1-infected individuals: impact of highly active antiretroviral therapy.** AIDS Research Human Retroviruses, 15 (17), 1499-1508.
75. Isitman, G., Stratov, I., Kent, SJ. (2012). **Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and NK Cell-Driven Immune Escape in HIV Infection: Implications for HIV Vaccine Development.** Advances in Virology, 2012, 1-8.
76. Ivanchenko, S., Godinez, WJ., Lampe, M., Kräusslich, HG., Eils, R., Rohr, K., et.al. (2009). **Dynamics of HIV-1 Assembly and Release.** Plos Pathogens, 5 (11), 1-12.
77. Jain, V., Hartogensis, W., Bacchetti, P., Hunt, PW., Hatano, H., Sinclair, E. (2012). **Antiretroviral therapy Initiated Within 6 months of HIV Infection Is Associated With Lower T-Cell Activation and Smaller HIV Reservoir Size.** The Journal of Infectious Diseases, 208 (8), 1202-1211.
78. James, WT., Cohen, S., Mette, H., Dorte, H., Sigrid, AO., Borleffs, JC., et.al. (2000). **The Dominant Source of CD4+ and CD8+ T-Cell Activation in HIV infection Is Antigenic Stimulation.** Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 25, 203-211
79. Janeway, CA., Travers, Paul., Walport, M., Shlomchik, MJ. (2001). **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.** Garland Science, 5th edition. 306-311.
80. Jevtovic, D., Salemovic, D., Ranin, J., Pesic, I., Korac M., Djakovic, O. (2010). **The prognosis of patients with dissociated virological and immunological responses to HAART.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 64, 692-696.
81. Johansson, KA., Robberstad, B., Norheim, OF. (2010). **Further benefits by early start of HIV treatment in low income countries: Survival estimates of early versus deferred antiretroviral therapy.** AIDS Research and Therapy, 7(3), 1-9.
82. Johansson, S., Berg, L., Hall, H., Hoglund, P. (2005). **NK cells: elusive players in autoimmunity.** Trends in immunology, 23, 613-618.

83. Jonges, LE., Albertsson, P., van Vlierberghe, RL., Ensink, NG., Johansson, BR., van de Velde, CJ. (2001). **The phenotypic heterogeneity of human Natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood.** *Scandinavian Journal of Immunology*, 53, 103-110.
84. Jonsson, M., Fusco, JS., Cole, SR., Thomas, JC., Porter, K., Kaufman, JS., et.al. (2011). **Timing of HAART Initiation and Clinical Outcomes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Seroconverters.** *Archives of Internal Medicine*, 171 (17), 1560-1569.
85. Jost, S., Altfeld, M. (2012). Evasion from NK cell-mediated immune responses by HIV-1. *Microbes and Infection*, 1-12.
86. Jurriaans, S., Van Gemen, B., Weverlig, GJ., Van Strup, D., Nara, P., Coutinho, R., et.al. (1994). **The Natural History of HIV-1 Infection: Virus Load and Virus Phenotype Independent Determinants of Clinical Course.** *Virology*, 204, 223-233.
87. Justice AC., Stein, DS., Fusco, GP., Sherril BH., Fusco, JS., Danehower, SC., et.al. (2004). **Disease progression in HIV-infected patients treated with stavudine vs. Zidovudine.** *Journal of Clinical Epidemiology*, 57, 89-97.
88. Kaech, SM., Hemby, S., Kersh, E., Ahmed, R. (2002). **Molecular and functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation.** *Cell*, 111, 837-851.
89. Kaech, SM., Wherry, EJ., Ahmed, R. **Effector and Memory T-Cell Differentiation: Implications for Vaccine Development.** *Nature Reviews*, 2, 251-262.
90. Kalia, V., Surojit, S., Ahmed, R. (2010). **CD8 T-Cell Memory Differentiation during Acute and Chronic Viral Infections.** *Advances in Experimental Medicine and biology*, 684, 79-95
91. Kaplan, D. y Sieg, S. (1998). **The role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in HIV-1 disease.** *Journal of Virology*, 72, 6279-6290.
92. Kaplan, JE., Hanson, D., Dworkin, MS., Frederick, T., Bertolli, J., Lindegren, ML., et.al. (2000). **Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-Associated Opportunistic Infections in the United States in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy.** *Clinical Infectious Disease*, 30, 5-14.
93. Kaufmann, GR. y Cooper, DA. (2000). **Antiretroviral therapy of HIV infection: established treatment strategies and new therapeutic options.** *Current Opinion in Microbiology*, 3, 508-514.
94. Kitahata, MM. (2010). **When to Start Antiretroviral Therapy.** *Topics in HIV Medicine*, 18 (3), 121-126.
95. Kitahata, MM., Gange, SG., Abraham, AG., Merriman, B., Saag, MS., Justice, AC., et.al. (2009). **Effect of Early versus Deferred Antiretroviral Therapy for HIV on Survival.** *The New England Journal of Medicine*, 360 (18), 1815-1826.
96. Kitchen, SG., Jones, NR., LaForge, S., Whitmire, JK., Vu, BA., Galic, Z., et.al. (2004). **CD4 on CD8+ T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (23), 8727-8732.
97. Knysz, B., Szetela, B., Gładysz, A. **Pathogenesis of HIV-1 infection- chosen aspects.** *HIV & AIDS review*, 6 (1), 7-11.
98. Korenromp, EL., Williams, BG., Schmid, GP., Dye, C. (2009). **Clinical Prognostic Value of RNA Viral Load and CD4 Cell Counts during Untreated HIV-1 Infection.** *HIV progression and CD4/RNA*, 4, 1-12.
99. Kramer, I. (1996). **The Impact of Zidovudine (AZT) Therapy on the Survivability of Those with Progressive HIV infección.** *Mathematical and Computer Modelling*, 23 (3), 1-14.
100. Lange, CG. y Lederman, MM. (2003). **Immune reconstitution with antiretroviral therapies in chronic HIV-1 infection.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1-4.
101. Le-Bouteiller, P., Siewiera, J., Casart, Y., Aguerre, M., El Costa, H., Berrebi, A., et.al. (2011). **The human decidual NK-cell response to virus infection: what can we learn from circulating NK lymphocytes?** *Journal of Reproductive Immunology*, 88, 170-175.
102. Lee, PI., Ciccone, EJ., Read, SW., Asher, A., Pitts, R., Douek, DC., et.al. (2009). **Evidence for Translocation of Microbial Products in Patients with Idiopathic CD4 Lymphocytopenia.** *Journal of Infectious Disease*, 199 (11), 1664-1670.
103. Leng, Q., Borkow, G., Bentwich, Z. (2002). **Attenuated signaling associated with immune activation in HIV-1-infected individuals.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298, 464-467.
104. Levy, JA. (2001) **The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease.** *Trends in immunology*, 22 (6), 312-316.

105. Levy, JA. (2009) **HIV Pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges.** AIDS, 23, 147-160.
106. Lewthwait, P. (2009). **Natural History of HIV/AIDS.** Medicine, 37 (7), 333-337.
107. Lima, M., Teixeira M., Queirós, ML., Leite, M., Santos AH., Benvindo, J., Orfão. (2001). **Immunophenotypic Characterization of Normal Blood CD56+lo versus CD56+hi NK Cells Subsets and Its Impact on the Understanding of Their Tissue Distribution and Functional Properties.** Blood Cells, Molecules and Diseases, 27 (4), 731-743.
108. López-Botet, M. y Bellón, T. (1999). **Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I.** Current Opinion in Immunology, 11, 301-307.
109. Lucia, B., Jennings, C., Cauda, R., Ortona, L., Landay A. (1995) **Evidence of a Selective Depletion of a CD16+CD56+ CD8+ Natural Killer Cell Subset During HIV Infection.** Communications in Clinical Cytometry, 22, 10-15.
110. Lyles, RH., Muñoz, A., Yamashita, TE., Bazmi, H., Detels, R., Rinaldo, CR., et.al. (2000). **Natural History of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia after Seroconversion and Proximal to AIDS in a Large Cohort of Homosexual Men.** The Journal of Infectious disease, 181, 872-880.
111. Marchetti, G., Bellistri, GM., Borhi, E., Ticanti, C., Ferramosca, S., La Francesca, M., et.al. (2008). **Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy.** AIDS, 22, 2035-2044.
112. Marodon, G. (2001). **CD4 down modulation on T-cells: an “immune” checkpoint for HIV.** Immunology Letters, 79, 165-168.
113. Masopust, D. y Ahmed, R. (2004). **Reflections on CD8 T-Cell Activation and Memory.** Immunologic Research, 29, 151-160.
114. Mavilio, D., Lombardo G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., et.al. (2005). **Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 102 (8), 2886-2891.
115. Meditz, AL., Haas, MK., Folkvord, JM., Melander, K., Young, R., McCarter, M., et.al. (2011). **HLA-DR+CD38+CD4+ T Lymphocytes Have Elevated CCR5 Expression and Produce the Majority of R5-tropic HIV-1 RNA in Vivo.** Journal of Virology, 10, 1-46.
116. Medvedev, AE., Johnsen, AC., Haux, J., Steinkjer, B., Egeberg, K., Lynch, DH., Sundan, A., Espevik, T. (1997). **Regulation of FAS and FAS-Ligand Expression in NK Cells by Cytokines and the involvement of FAS- Ligand NK/LAK Cell-Mediate Cytotoxicity.** Cytokine, 9 (6), 394-404.
117. Melekhin, VV., Shepherd, BE., Stinnette, SE., Rebeiro, PF., Barkanic, G., Raffanti, SP., et.al. (2009). **Antiretroviral Therapy Initiation Before, During, or After Pregnancy in HIV-1-Infected Women: Maternal Virologic, Immunologic, and Clinical Response.** PLoS ONE, 4 (9), 1-11.
118. Mellors, JW., Muñoz, A., Giorgi, JV., Margolick, JB., Tassoni, CJ., Gupta, P. (1997). **Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection.** Annals of Internal Medicine, 126 (12), 946-954.
119. Metz, C. (2005). Factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y autoinmunidad. Reumatología, 21 (2), 70-71.
120. Mouscadet, JF., Delelis, O., Marcelin, AG., Tchertanov, L. (2010). **Resistance to HIV integrase inhibitors: A structural perspective.** Drug Resistance Updates, 13, 139-150.
121. Nakanjako, D., Ssewanyana, I., Kizza HM., Kiragga, A., Colebunders, R., Manabe YC., et.al. (2011). **High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort.** BMC Infectious Disease, 11 (43), 1-9.
122. Nakayama, K., Nakamura, H., Koga, M., Koibuchi, T., Fujii, T., Miura, T. (2012). **Imbalanced Production of Cytokines by T Cells Associates with the Activation/Exhaustion Status of Memory T Cells in Chronic HIV Type 1 Infection.** Aids Research and Human Retroviruses, 28 (7), 702-714.
123. National Department of Health South Africa. (2004). National Antiretroviral Treatment Guideline. 1-56.
124. Nicholson, JK., Browning, SW., Hengel, RL., Lew, E., Gallagher, LE., Rimland, D., McDougal, S. (2001). **CCR5 and CXR4 Expression on Memory and Naive T Cells in HIV-1 Infection and Response to Highly Active Antiretroviral Therapy.** Journal of AIDS, 27, 105-115.

125. Obhrai, JS., Oberbarnscheidt, MH., Hand, TW., Diggs, L., Chalasani, G., Lakkis, FG. (2006). **Effector T Cell Differentiation and Memory T Cell Maintenance Outside Secondary Lymphoid Organs.** *The Journal of Immunology*, 176, 4051-4058.
126. OMS (2011). *Reporte Anual Epidemiológico VIH.*
127. Onlamoon, N., Tabprasit, S., Suwanagool, S., Louisirirotchanakul, S., Ansari, AA., Pattanapayasat, K. (2005). **Studies on the potential use of CD38 expression as a marker for the efficacy of anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients en Thailand.** *Virology*, 341, 238-247.
128. Orange, JS., Ballas, ZK. (2006). **Natural killer in human health and disease.** *Clinical Immunology*, 118 (1), 1-10.
129. Ostrowski, SR. (2010). **Immune activation in chronic HIV infection.** *Danish Medical Bulletin*, 57, 1-48.
130. Paci, P., Martini, F., Bernaschi, M., D' Offizi, G., Castiglione, F. (2011). **Timely HAART initiation may pave the way for a better viral control.** *BioMed Central*, 56 (11), 1-9.
131. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, JF., Butini, L., Montroni, M., Fox, CH. (1993). **HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease.** *Nature*, 362, 355-358.
132. Pantaleo, G., Soudeyns, H., Graziosi, C., Paolucci, S., Daucher, M., Cohen, OJ., et.al. (1997). **Accumulation of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes away from the predominant site of virus replication during primary infection.** *European Journal of Immunology*, 27 (12), 3166-3173.
133. Phillips, KD. (1996). **Protease Inhibitors: A New Weapon and a New Strategy Against HIV.** *Journal of the Association of Nurses in AIDS Care*, 7 (5), 57-71.
134. Piconi, S., Trabattoni, D., Gori, A., Parisotto, s., Magni, c., Meraviglia, P., et.al. (2010). **Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduce CD4+ T-cell counts during antirretroviral therapy.** *AIDS*, 24, 1991-2000.
135. Rafailidis, P., Mourtzoukou, EG., Varbobitis, IC., Falagas, ME. (2008) **Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review.** *Journal of Virology*, 47 (5), 1-7.
136. Ramzaoui, S., Jouen, F., Gilbert, D., Borsa, F., Michel, Y., Humbert, G., Tron, F. (1995). **During HIV Infection, CD4+ CD38+ T-Cells Are the Predominant Circulating CD4+ Subset Whose HLA-DR Positivity Increases with Disease Progression and Whose Vβ Repertoire Is Similar to That of CD4+ CD38- T-Cells.** *Clinical immunology and immunopathology*, 77 (1), 33-41.
137. Saag, MS., Holodniy, M., Kuritzkes, DR., O'Brien, WA., Coombs, RW., Poscher, ME. (1996). **HIV viral load markers in clinical practice.** *Nature medicine*, 2 (6), 625-629.
138. Sabin, CA., Phillips, AN. (2009). **Should HIV therapy be started at a CD4 cell count above 350 cells/ μl in asymptomatic HIV-1-infected patients?** *Current Opinion in infectious Diseases*, 22(2), 191-197.
139. Sandoval, C., Santos, L. (2005). **CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines.** *Journal of Leukocyte Biology*, 77, 513-521.
140. Sauce, D., Elbime, C., Appay, V. (2013). **Monitoring celular immune markers in HIV infection: from activation to exhaustion.** *Current Opinion in HIV/AIDS*, 8, 125-131.
141. Savarino, A., Bottare, F., Malavasi, F., Dianzani, U. (2000). **Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation ora n active player in virus/host interactions?** *AIDS*, 14, 1079-1089.
142. Schochetman, G. (1992). **Diagnosis of HIV infection.** *Clinica Chimica Acta*, 211, 1-26.
143. Sconocchia, G., Titus, JA., Mazzoni, A., Visintin, A., Pericle, F., Hicks, SW, et.al. (1999). **CD38 Triggers Cytotoxic Responses in Activated Human Natural Killer Cells.** *Blood*, 94 (11), 3864-3871.
144. Sinclair, J., Sissons, P. (2006). **Latency and reactivation of human cytomegalovirus.** *Journal of General Virology*, 87, 1763-1779.
145. Sadora, DL. y Silvestri, G. (2008). **Immune activation and AIDS pathogenesis.** *AIDS*, 22, 239-246.
146. Sterne, JA., May, M., Bucher, HC., Ledergerber, B., Furrer, H., Cavassini, M., et.al. (2007). **HAART and the heart: changes in coronary risk factors and implications for coronary risk in men starting antiretroviral therapy.** *Journal of Internal Medicine*, 261, 255-267.

147. Takahama, Y. (2006). **Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection.** *Nature Reviews*, 6, 127-135.
148. Tanel, A., Fonseca, SG., Yassine, B., Bordi R., Zeidan, J., Shi, Y., et.al. (2009). **Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival.** *Expert Review of Vaccines*, 8 (3), 299-312.
149. Than, S., Hu, R., Oyaizu, N., Romano, J., Wang, P., Sheikh, S., Pahwa, S. (1996). **Cytokine Pattern in Relation to Disease Progression in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children.** *The Journal of Infectious Disease*, 175, 47-56.
150. Thompson, MA., Aberg, JA., Cahn, P., Montaner, JS., Rizzardini, G., Telenti, A., et.al. (2010). **Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection. Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel.** *Journal of the American Medical Association*, 304 (3), 321-333.
151. Tiba, F., Nauwelaers, F., Traoré, s., Coulibaly, B., Ouedraogo, T., Compaoré, A. (2012). **Immune Reconstitution During the First Year of antiretroviral therapy of HIV-1-Infected Adults in Rural Burkina Faso.** *The Open AIDS Journal*, 6, 16-25.
152. Tilling, R., Kinloch, S., Goh, L., Cooper, D., Perrin, L., Lampe, F., et.al. (2002). **Parallel decline of CD8+/CD38++ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection.** *AIDS*, 16, 589-596.
153. Uglietti, A., Lo Caputo, S., Lauriola, M., DeGennaro, M., Chiesa, E., Coen, M., et.al. (2012). **Immune Activation in HIV-infected Patients Treated with Different ARV Regimens.** *World Journal of AIDS*, 2, 97-102.
154. UNAIDS (2010). *Report On The Global AIDS Epidemic.*
155. Valentin, A., Ramírez, CM., Haller, HS., Bernstein, HB. (2012). **Bidirectional NK/DC interaction promote CD4 expression on NK cells, DC maturation, and HIV infection.** *Virology*, 433, 203-215.
156. Vella, S., Palmisano, L. (2000). **Antiretroviral therapy: state of the HAART.** *Antiviral Research*, 45, 1-7.
157. Vergis, EN., Mellors, JW. N. **Natural History of HIV-1 Infection.** *HIV/AIDS*, 14 (4), 809-825
158. Verma, S. (2006). **HAART attenuates liver fibrosis in patients with HIV/HCV co-infection: fact or fiction?** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 496-501.
159. Vernal, R., García, JA. (2008). **Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection.** *Infectious Disorder Drug Target*, 8, 207-220.
160. Verneris, MR., Karami, M., Baker, J., Jayaswal A., Negrin, RS. (2004). **Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells.** *Blood*, 103 (8), 3065, 3072.
161. Villacres, MC., Lacey, S., La Rosa, C., Krishnan, R., Krishnan, R., Auge, C., et.al. (2001). **Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral therapy Maintain Activated CD8+ T Cell Subset as a Strong Adaptive Immune Response to Cytomegalovirus.** *The Journal of Infectious Diseases*, 184, 256-267.
162. Volberding, PA., Deeks, SG. (2010). **Antiretroviral therapy and management of HIV infection.** *Lancet*, 376, 49-62.
163. Von Adrian, UH., Sallustro, F. (2007). **Lymphocyte activation.** *Current Opinion in Immunology*, 19, 247-248.
164. Wannamethee, SG., Sirivichayakul, S., Phillips, AN., Ubolyam, S., Ruxrungtham, K., Hanvanich, M. (1998). **Clinical and immunological features of human immunodeficiency virus infection in patients from Bangkok, Thailand.** *International Journal of Epidemiology*, 27, 289-295.
165. Wei, X., Decker, JM., Wang, J., Hui, H., Kappes, JC., Wu, X., et.al. (2003). **Antibody neutralization and escape by HIV-1.** *Nature*, 422, 307-312.
166. Wensing, AM., van Maarseveen, NM., Nijhuis. (2010). **Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance.** *Antiviral Research*, 85, 59-74.
167. Werfel, T., Boeker, M., Kapp, A. (1997). **Rapid expression of the CD69 antigen on T cells and Natural killer cells upon antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cells suspensions.** *Allergy*, 52, 465-469.
168. Westrop, SJ., Moyle, G., Jackson, A., Nelson, M., Mandalia, S., Imami, N. (2012). **CCR5 Antagonism Impacts Vaccination Response and Immune Profile in HIV-1 Infection.** *Molecular Medicine*, 18, 1240-1248.

169. Wherry, E.J., Ahmed, R. (2004). **Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection.** Journal of Virology, 78 (11), 5535-5545.
170. WHO. (2000). **Clinical and Laboratory Monitoring of Antiretroviral Therapy in resource-Limited and Unlimited Settings.** HIV/AIDS Antiretroviral Newsletter, 4, 1-4.
171. Widdrington, J., Payme, B., Medhi, M., Valappil, M., Schmid, ML. (2011). **The significance of very low-level viraemia detected by sensitive viral load assays in HIV infected patients on HAART.** Journal of Infection, 62, 87-92.
172. Wilk, T. y Fuller, SD. (1999). **Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer?** Current Opinion in Structural Biology, 9, 231-243.
173. Working Group of the Office of AIDS Research Advisory Council. (2011). **Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents.**
174. Wreghitt, TG., Teare, EL., Sule, O., Devi, R., Rice, P. (2003). **Cytomegalovirus Infection in immunocompetent Patients.** Journal of Clinical Infectious Diseases, 37, 1603-1606.
175. Yi, JS., Cox, MA., Zajac, AJ. (2010). **T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversión.** Immunology, 129, 474-481.