



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

**Relación entre el porcentaje de células Th17 con “homing” al  
intestino en la sangre periférica, la composición de la microbiota  
intestinal y la activación del sistema inmune en la infección por  
VIH**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**CLAUDIA NATALY RODRÍGUEZ BERNABE**



**MÉXICO, D.F. 2015**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: ROCÍO GABRIELA TIRADO MENDOZA**

**VOCAL: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

**SECRETARIO: SANDRA MARÍA PINTO CARDOSO**

**1er. SUPLENTE: JAVIER FERNÁNDEZ TORRES**

**2° SUPLENTE: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CIENI), INSTITUTO  
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS (INER)**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. SANDRA MARÍA PINTO CARDOSO** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**DRA. LETICIA KURI CERVANTES** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**CLAUDIA NATALY RODRÍGUEZ BERNABE** \_\_\_\_\_

## ÍNDICE

- Índice de abreviaturas	v
- Índice de figuras	vi
- Índice de tablas	viii
1. Introducción	
1.1 Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	1
1.2 Vías de transmisión del VIH	3
2. La historia natural de la infección por VIH	
2.1 Etapa aguda	3
2.2 Etapa crónica	7
2.3 Etapa de SIDA	7
3. Curso de la infección por el VIH en presencia del tratamiento antirretroviral (TAR)	
3.1 TAR	9
3.2 La infección por VIH en presencia del TAR	9
4. Anatomía del intestino delgado	11
4.1 Componentes celulares de la barrera epitelial intestinal	12
4.2 Componentes del GALT	13
5. Linfocitos Th17	
5.1 Generalidades	15
5.2 La expresión de las moléculas que proporcionan el “homing” al intestino en los linfocitos Th17	17
6. Alteraciones del GALT en presencia del VIH	
6.1 Cambios anatómicos en el intestino delgado y el GALT en presencia del VIH	19
6.2 Translocación de productos bacterianos durante la infección por el VIH y la activación del sistema inmune	22

6.3	Translocación de productos bacterianos durante el uso del TAR en la infección por el VIH	25
6.4	Variaciones en la frecuencia de linfocitos Th17 con “homing” al intestino en sangre periférica en presencia del TAR	26
7.	Justificación	28
8.	Objetivos	
8.1	Objetivos generales	29
8.2	Objetivos particulares	29
9.	Hipótesis	29
10.	Metodología	
10.1	Cohorte de estudio	30
10.2	Separación de PBMC	31
10.3	Descongelación de PBMC	31
10.4	Fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino	32
10.4.1	Titulación de anticuerpos	34
10.4.2	Tinción de linfocitos Th17 con “homing” al intestino	35
11.	Resultados	
11.1	Características de los grupos de estudio	39
11.2	Titulación de anticuerpos para citometría de flujo en PBMC y linfocitos T purificados	40
11.3	Selección del panel de tinción para la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino	43
11.4	Selección del panel para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino	46
11.5	Comparación entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas y PBMC congeladas	49
11.6	Comparación entre la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada a partir de PBMC y de linfocitos T purificados	50

11.7 Identificación de cambios en la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino de pendientes del número de P BMC separadas	51
11.8 Frecuencia y activación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y activación de los linfocitos T CD8+ en las muestras de estudio	52
12. Discusión	57
13. Conclusiones	73
14. Perspectivas	75
15. Referencias	76

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN, ácido desoxirribonucleico

APC, células presentadoras de antígeno

ARN, ácido ribonucleico

CD, célula dendrítica

CV, carga viral

FMO, fluorescencia menos uno

GALT, tejido linfoide asociado al intestino

gp, glicoproteína

Ig, inmunoglobulina

IL, interleucina

LPS, lipopolisacárido

MFI, intensidad media de fluorescencia

PBMC, células mononucleares de sangre periférica

SIDA, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TAR, tratamiento antirretroviral

TI, transcriptasa inversa

VIH, Virus de Inmunodeficiencia Humana

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Estructura del virus de inmunodeficiencia humana	2
2	La historia natural de la infección por VIH	4
3	La historia natural de la infección por VIH en el GALT	5
4	La historia natural de la infección por VIH, activación inmunológica	6
5	La historia natural de la infección por VIH, etapa crónica y de SIDA	8
6	La infección por VIH en presencia de TAR	10
7	Anatomía del intestino delgado y localización de las placas de Peyer	11
8	Componentes celulares de la barrera epitelial intestinal y del GALT	13
9	Linfocitos Th17 en el GALT	14
10	Proceso de diferenciación de los linfocitos Th17	15
11	Funciones de las citocinas secretadas por los linfocitos Th17	17
12	Inducción de la expresión de CCR9 y $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos Th17	19
13	Enteropatía asociada al VIH	20
14	Perdida de las placas de Peyer durante la infección por VIH	21
15	Concentración de I-FABP en plasma en individuos sin VIH e individuos con VIH	22
16	Concentración de LPS en plasma en las distintas etapas de la infección por VIH	23
17	Correlación entre el LPS en plasma y el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados	24
18	Cantidad de LPS en plasma durante el uso del TAR	25
19	Correlación entre los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en sangre periférica y en GALT en individuos sin VIH y con VIH	26



<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
20	Estrategia de análisis para la selección de los anticuerpos	41
21	Titulación del anticuerpo $\alpha 4$ FITC	42
22	Estrategia de análisis para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino con la expresión del co-receptor CCR5 y el grado de activación de esta población y de los linfocitos T CD8+	44
23	Pruebas del panel para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria e fectora, con expresión del co-receptor CCR5 y el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+	45
24	Estrategia de análisis para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, de los linfocitos T CD8+ y el grado de activación en ambas poblaciones	47
25	Pruebas de panel para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino	48
26	Comparación entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino determinada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas y congeladas	50
27	Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en PBMC y linfocitos T purificados	51
28	Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificadas a partir de $10 \times 10^6$ , $25 \times 10^6$ y $50 \times 10^6$ de PBMC congeladas	52
29	Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+ en los distintos grupos de estudio	54
30	Correlaciones entre las distintas frecuencias determinadas, el conteo de linfocitos T CD4+ y la CV en individuos con VIH sin TAR	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Marcadores utilizados para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora con expresión del co-receptor CCR5 y su grado de activación	32
2	Paneles de tinción probados para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora con la expresión de co-receptor CCR5 y de los linfocitos T CD8+	33
3	Preparación de la primera mezcla de anticuerpos	36
4	Preparación de la segunda mezcla de anticuerpos	37
5	Preparación de la tercera mezcla de anticuerpos	37
6	Características demográficas de nuestra cohorte	39
7	Características clínicas de la población de estudio	40
8	Títulos seleccionados para cada anticuerpo en PBMC y linfocitos T purificados	43
9	Paneles de tinción probados para la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, de los linfocitos T CD8+ y el grado de activación en ambas poblaciones	46
10	Frecuencias de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y su grado de activación	53

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)**

El virus de inmunodeficiencia humana o VIH-1 mide cerca de 100 a 120 nm de diámetro, se encuentra formado por dos cadenas idénticas de ácido ribonucleico (ARN), cubiertas por una proteína de nucleocápside (NC o p7, por convención la proteína viral “p” se señala con un número que corresponde al tamaño de la proteína x 1000). Ambas se localizan dentro de un núcleo cónico de proteínas víricas o cápside (CA o p24) (Turner and Summers 1999; Ambrose and Aiken 2014) rodeadas de una bicapa fosfolipídica derivada de la membrana de la célula infectada. Esta bicapa incluye las glicoproteínas (gp) 120 y gp41 (proteínas superficiales y transmembranales respectivamente, como se muestra en la Figura 1) (Wilens, Tilton et al. 2012). Entre la cápside y la envoltura, se encuentra la proteína de matriz (MA o p17) que da estructura al virus (Piller, Caly et al. 2003).

Dentro del núcleo viral se encuentran tres enzimas esenciales para la replicación del virus, la primera es la transcriptasa inversa (TI) que permite la transcripción del ARN viral en ácido desoxirribonucleico (ADN) viral. La segunda es la integrasa (IN) importante para la unión entre el ADN viral y el ADN de la célula infectada. La última enzima es la proteasa (PR) que interviene en el proceso de corte y empalme del ARN mensajero viral para la traducción de las proteínas virales (Craigie and Bushman 2012; Sundquist and Krausslich 2012). En la Figura 1 se muestra la estructura general del VIH, en donde se representan las estructuras mencionadas previamente.

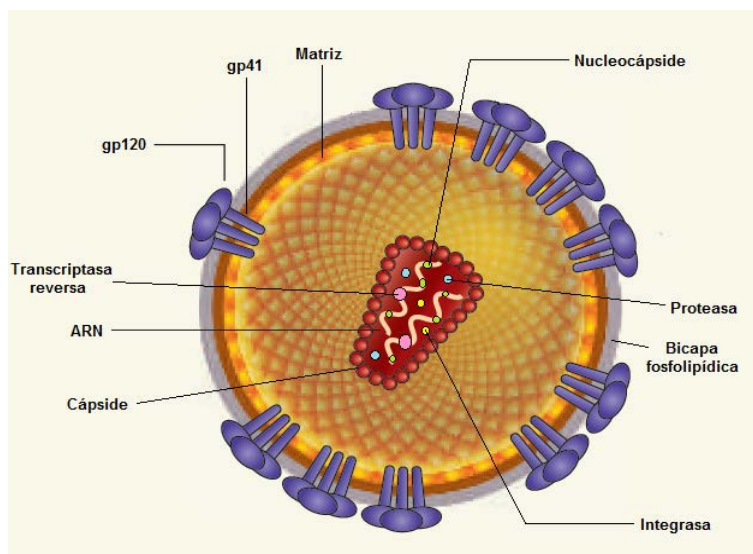


Figura 1. Estructura del virus de inmunodeficiencia humana. Se muestran las distintas proteínas que proporcionan su estructura al VIH y las enzimas que intervienen en su proceso de replicación (Burton 2006).

El VIH infecta diversas células del sistema inmunológico, las principales células infectadas son los linfocitos T CD4+, monocitos/macrófagos y células dendríticas (CD) las cuales expresan en su superficie la glicoproteína CD4, que se une a la proteína gp120 viral. Esta unión permite la interacción inicial de la célula del hospedero con el virus e iniciar el proceso de infección (Douek, Picker et al. 2003; Wilen, Tilton et al. 2012).

Además de CD4, el virus requiere de un co-receptor que le permite la entrada a la célula del hospedero. Los dos principales co-receptores usados por el virus son los receptores de quimiocinas CCR5, expresado principalmente por los monocitos/macrófagos y CXCR4 expresado en linfocitos T (Douek, Picker et al. 2003; Wilen, Tilton et al. 2012; Martínez, Barroso et al. 2014). Los virus que utilizan el co-receptor CCR5 se denominan macrófago-trópicos o con tropismo a R5 y los que usan CXCR4 son linfotrópicos o con tropismo a X4 (Kalinina, Pfeifer et al. 2013). Tanto el receptor CD4 y los co-receptores son expresados en la superficie de los linfocitos T CD4+, los monocitos/macrófagos y las CD y por lo tanto estas poblaciones pueden ser infectadas por el VIH.

## **1.2 Vías de transmisión del VIH**

El virus se transmite de un individuo a otro principalmente por cuatro vías (Shaw and Hunter 2012). La primera de ellas es mediante contacto sexual. En México, hasta el año 2013 esta vía de transmisión representó aproximadamente el 94% de los casos en hombres y el 80% en mujeres (CENSIDA 2014). La transmisión del VIH por vía materno-fetal hasta el mismo año en hombres fue alrededor del 1% y en las mujeres del 5% (CENSIDA 2014). La infección por la inoculación en un receptor de sangre o hemoderivados infectados hasta el mismo año representó aproximadamente el 1% en los hombres y el 4% en mujeres (CENSIDA 2014). La última vía de transmisión es la inoculación percutánea, para hombres y mujeres de la población mexicana la infección a través de esta vía representó aproximadamente el 1% hasta el año 2013 (CENSIDA 2014).

Después de la exposición y transmisión, el VIH se replica en los linfocitos T CD4+, CD y monocitos/macrófagos que se localizan en la mucosa y submucosa del sitio en donde ocurrió la exposición. Estas células infectadas migran hacia los distintos tejidos linfoides como el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) y en este sitio continúa la diseminación de la infección (Douek, Picker et al. 2003; McMichael, Borrow et al. 2010; Cohen, Shaw et al. 2011).

## **2. LA HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR VIH**

La infección por VIH se caracteriza por tres etapas: aguda, crónica y de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) que pueden ser seguidas por dos parámetros clínicos, el conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (células/ $\mu$ l) y la carga viral (CV, copias ARN viral/ml plasma) (Douek, Picker et al. 2003; Langford, Ananworanich et al. 2007).

### **2.1 Etapa aguda**

Esta etapa tiene una duración aproximada de 10 -12 semanas posteriores a la infección, en algunos casos se puede prolongar hasta las 20 semanas (Vergis and

Mellors 2000; Zetola and Pilcher 2007; McMichael, Borrow et al. 2010). Durante este periodo de tiempo el virus rápidamente se replica y, como se observa en la Figura 2 la CV en plasma (representada por la curva en color rojo) se incrementa de manera exponencial. Después de 3-4 semanas posteriores a la infección se llega a un nivel máximo de CV o pico de viremia, en este punto se pueden detectar más de  $10^6$  copias ARN viral/ml plasma (Vergis and Mellors 2000; McMichael, Borrow et al. 2010). En la Figura 2 se observa una reducción en el conteo de linfocitos T CD4+ en la sangre periférica (representado por la curva en color azul) (Vergis and Mellors 2000; Douek, Picker et al. 2003; Brenchley, Price et al. 2006).

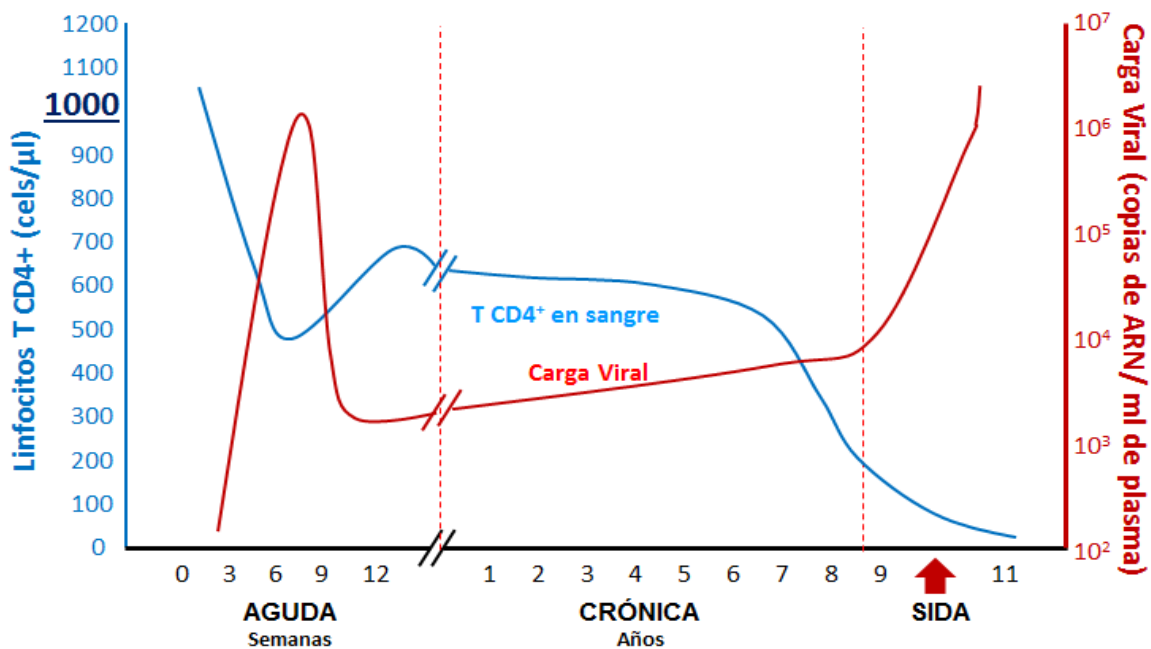


Figura 2. La historia natural de la infección por VIH. Se muestra en la curva de color rojo la carga viral (copias de ARN/ml de plasma) y en color azul el conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (células/ $\mu$ l de sangre) en las distintas etapas de la infección por VIH. Durante la etapa aguda con una duración de 10-12 semanas, hay un incremento en la CV y una disminución simultánea de los linfocitos T CD4+. Se llega al pico de viremia aproximadamente entre 3-4 semanas posteriores a la infección, después de este punto hay una disminución en la CV y un incremento en el conteo de los linfocitos T CD4+ (Adaptado de Brenchley, Price et al. 2006)

En el GALT se encuentran alrededor del 80% de los linfocitos T CD4+ del organismo, esta población tiene un fenotipo de memoria efectora y por lo tanto expresan el co-receptor CCR5 (Costiniuk and Angel 2012). Las características fenotípicas de esta población linfocitaria, las convierten en el blanco principal de la

infección por el VIH y a I G ALT en el sitio más importante de replicación viral (McMichael, Borrow et al. 2010). Durante las tres primeras semanas de infección, en el G ALT se pierde aproximadamente el 80% de los linfocitos T CD4+ (Brenchley, Price et al. 2006; McMichael, Borrow et al. 2010; Marchetti, Tincati et al. 2013). En la Figura 3 se hace una comparación entre la disminución de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica (curva azul) y del G ALT (curva verde) mientras que la CV se incrementa. Se puede observar que la disminución de linfocitos T CD4+ en G ALT es más rápida (2-3 semanas) y más drástica (aproximadamente el 80% de la población de este sitio), comparada con la pérdida de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica. Esta disminución en el G ALT es debida a que en este sitio se encuentra alrededor del 80% de los linfocitos T CD4+ del organismo, mientras que en sangre periférica los linfocitos T CD4+ circulantes corresponden aproximadamente al 2% de la población total linfocitaria (Butler, Valdez et al. 2011).

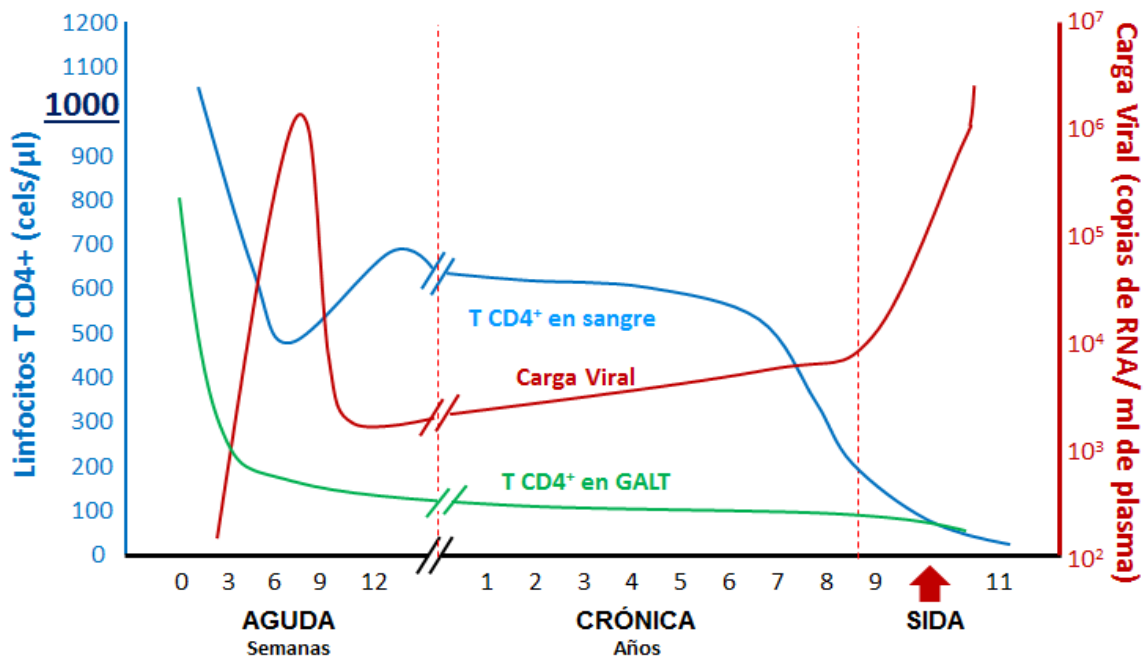


Figura 3. La historia natural de la infección por VIH en el GALT. Durante la etapa aguda de la infección la disminución de los linfocitos T CD4+ en el GALT (representada por la curva en color verde) es aproximadamente del 80% en un periodo de 2-3 semanas. Esta disminución es mayor que en sangre periférica donde la disminución es aproximadamente del 50% en 3-4 semanas. De manera simultánea incrementa la CV (Adaptado de Brenchley, Price et al. 2006 )

Durante esta etapa de la infección se observa un aumento en la secreción de distintas citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias e interferones (McMichael, Borrow et al. 2010). La presencia de estas moléculas se acompaña de una activación crónica del sistema inmunológico y la depleción de distintas poblaciones celulares. Dicha activación se mantiene durante la infección por VIH (Vergis and Mellors 2000; Hunt, Martin et al. 2003; Hunt 2007; Klatt, Funderburg et al. 2013). En la Figura 4 siguiendo la curva en color morado se observa el incremento de la activación del sistema inmunológico a lo largo de la infección.

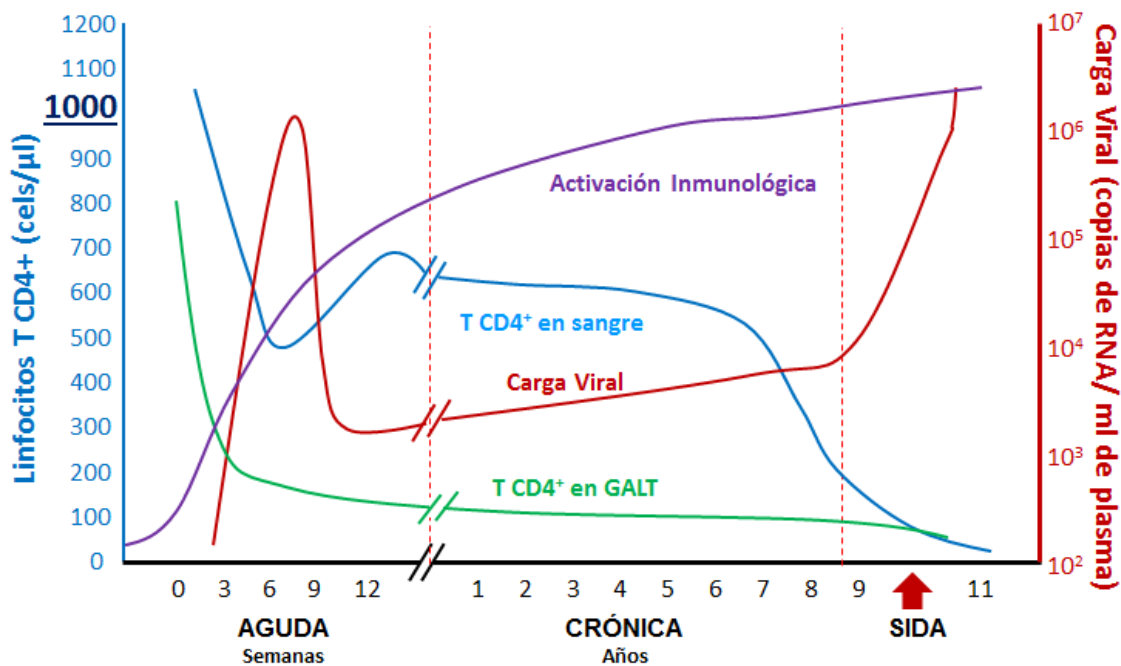


Figura 4. La historia natural de la infección por VIH, activación inmunológica. Se observa que la activación inmunológica (curva en color morado) a lo largo de la infección se incrementa. En la etapa aguda el incremento es más rápido, mientras que el conteo de linfocitos T CD4+ disminuye tanto en sangre periférica como en el GALT y la CV se eleva (Adaptado de Brechley, Price et al. 2006)

La etapa aguda finaliza con un incremento parcial en el conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica y una disminución en la CV (McMichael, Borrow et al. 2010). Durante la etapa aguda se presentan diversas manifestaciones clínicas, las cuales incluyen dolor de cabeza, dolor retro-orbital, dolores musculares, dolor de garganta, fiebre, nodos linfáticos inflamados, dolores articulares y desórdenes en el sistema nervioso central (Vergis and Mellors 2000). Asimismo, se presenta una enteropatía que incluye diarrea, inflamación del tracto gastrointestinal, aumento en



la permeabilidad intestinal, alteración en la absorción de nutrientes como las vitaminas, daño a la barrera epitelial y atrofia de las vellosidades (Dandekar 2007; Brenchley and Douek 2008).

## 2.2 Etapa crónica

Para el 90% de la población con VIH esta etapa tiene una duración aproximada de 10 años (Butler, Valdez et al. 2011). La pérdida de linfocitos T CD4+ continúa y la CV en plasma se incrementa de manera progresiva (Ford, Puroonen et al. 2009). Durante este periodo de la infección por el VIH, el sistema inmunológico controla la infección principalmente por la secreción de anticuerpos contra proteínas del virus como la CA y la MA y la producción de linfocitos T CD8+ específicos contra el VIH. Se controlan las infecciones oportunistas y existen pocas o ninguna manifestaciones clínicas de la infección, por lo tanto a esta fase se denomina periodo de latencia o asintomática (Douek, Picker et al. 2003; Ford, Puroonen et al. 2009; McMichael, Borrow et al. 2010).

En la Figura 5 en el periodo correspondiente a la etapa crónica de la infección (sección en color verde) se puede observar que la pérdida de los linfocitos T CD4+ en el GALT y en sangre periférica es progresiva. Durante esta etapa el organismo continúa produciendo linfocitos T CD4+ nuevos y también redistribuye los linfocitos T CD4+ en los órganos linfoides. Por lo tanto las células pueden reponerse casi con la misma rapidez con que se destruyen lo cual en la Figura 5 se observa como un mantenimiento del conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (Douek, Picker et al. 2003). Finalmente, a lo largo de un periodo de años, el ciclo continuo de infección vírica, la muerte de los linfocitos T y el constante estado de activación del sistema inmunológico, lleva a una reducción del número de linfocitos T CD4+ tanto en los tejidos linfoides como en circulación sistémica y un incremento de la CV.

## 2.3 Etapa de SIDA

Cuando el conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica disminuye por debajo de 200 células/ $\mu$ l de sangre, se llega a la etapa final de la infección por VIH

denominada SIDA que se muestra en la Figura 5 (sección en color anaranjado). Por convención la etapa de SIDA se define por la aparición de infecciones oportunistas, las cuales no pueden ser controladas por el sistema inmunológico que se encuentra agotado.

Las distintas enfermedades oportunistas que se pueden presentar en la etapa de SIDA son la tuberculosis generada por *Mycobacterium tuberculosis*, neumonía principalmente por *Pneumocystis jiroveci* y *Streptococcus pneumoniae*, enfermedades gastrointestinales, retinitis y en algunos casos neumonía por citomegalovirus (Hunt 2012 ; Pawlowski, Jansson et al. 2012). En combinación pueden presentarse neoplasias, caquexia, insuficiencia renal y degeneración del sistema nervioso central (Douek, Picker et al. 2003; Benito, Moreno et al. 2012; Pawlowski, Jansson et al. 2012; Chang, Crane et al. 2013).

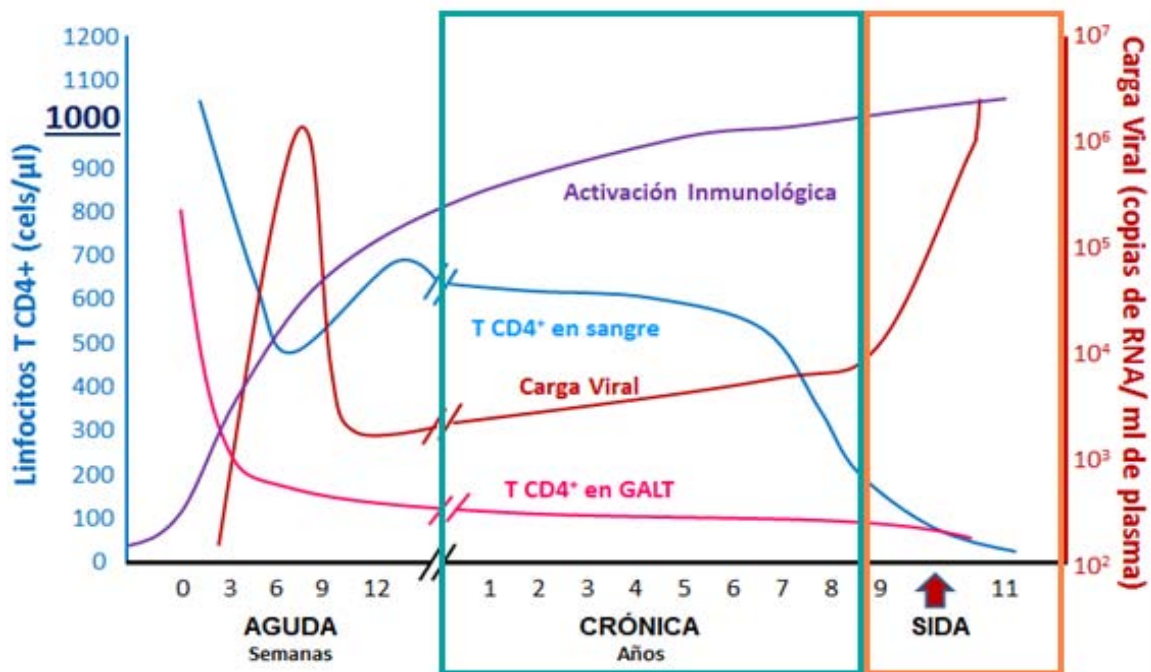


Figura 5. La historia natural de la infección por VIH, etapa crónica y de SIDA. La etapa crónica (sección de color verde) puede durar hasta 10 años, la pérdida de linfocitos T CD4+ continúa en sangre periférica y GALT. La etapa de SIDA (sección en color naranja) se inicia con un conteo de linfocitos T CD4+ menor a 200 células/μl y la aparición de enfermedades oportunistas. Se observa que el conteo de linfocitos T CD4+ disminuye tanto en sangre periférica como en GALT y la CV se vuelve a incrementar mientras que la activación inmunológica continúa incrementando. (Adaptado de Brenchley, Price et al. 2006 )

### **3. CURSO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH EN PRESENCIA DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (TAR)**

#### **3.1 TAR**

El uso del TAR ha sido de gran relevancia para cambiar la historia natural de la infección por VIH. El TAR tiene como objetivo disminuir la CV a niveles indetectables (<20-75 copias ARN/ml plasma dependiendo de la técnica de detección) y evitar la aparición de infecciones oportunistas. Permite un mejoramiento parcial del sistema inmunológico, evidenciado por el aumento en el conteo de linfocitos T CD4+ (Afani and Gallardo 2011; Arts and Hazuda 2012). De acuerdo a las recomendaciones emitidas por Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2013, el TAR se debe iniciar en personas que presentan un conteo de linfocitos T CD4+  $\leq 500$  células/ $\mu$ l sangre periférica (OMS 2013).

Las clases de antirretrovirales con las que se cuenta en la actualidad son (Afani and Gallardo 2011; Arts and Hazuda 2012):

- Inhibidores análogos de nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR)
- Inhibidores no análogos de nucleósidos de la TR (INNTR)
- Inhibidores de la proteasa (IP)
- Inhibidores de entrada
- Inhibidores de la integrasa (IIN)

El TAR se compone de 3 o más antirretrovirales, dos de ellos preferentemente de la clase INTR y un tercero, que puede ser seleccionado entre INNTR, IP o IIN. Estas combinaciones han demostrado una capacidad máxima para el control de la replicación viral a largo plazo y efectos secundarios menores (Arts and Hazuda 2012; CENSIDA 2012).

#### **3.2 La infección por VIH en presencia del TAR**

El uso del TAR cambia la historia natural de la infección por el VIH interfiriendo en su ciclo de replicación (Arts and Hazuda 2012). El uso del TAR se acompaña de una disminución de la CV (curva en color rojo) hasta niveles indetectables (menos

de 20-75 copias ARN/ml plasma). Sin embargo esta disminución no implica la eliminación del virus (Figura 6). El uso del TAR también está asociado a un incremento parcial en el conteo de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica (curva en color azul), sin llegar a los niveles de una persona sin VIH (aproximadamente 1000 células/μl). Siguiendo la curva en color rosa de la Figura 6, se puede observar que a pesar del uso del TAR la recuperación de los linfocitos T CD4+ en GALT, es menor al 50% (Guadalupe, Reay et al. 2003).

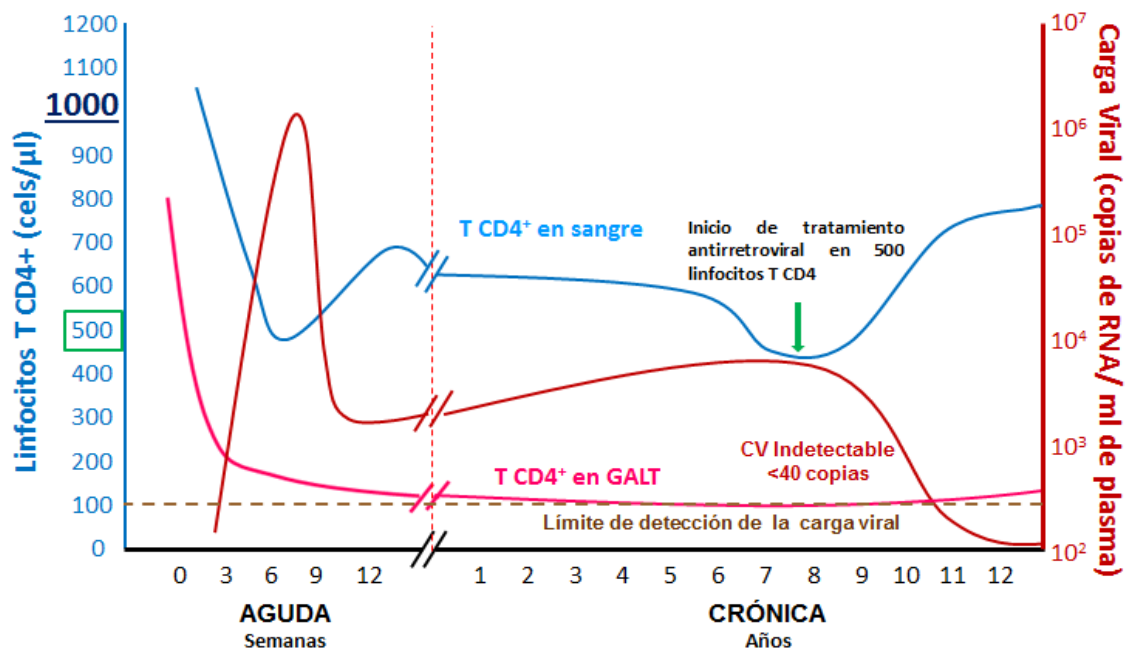


Figura 6. La infección por VIH en presencia de TAR. Se recomienda el inicio del uso de TAR cuando el conteo de linfocitos T CD4+ es menor a 500 células/μl, el uso de TAR disminuye la CV a <40 copias ARN/ml de plasma o niveles indetectables (curva en color rojo) y contribuye al incremento en el conteo de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica. A pesar de su uso, el conteo de los linfocitos T CD4+ en GALT se incrementa como máximo en un 50% (Adaptado de Brenchley, Price et al. 2006).

El estudio del GALT en la infección por el VIH es de gran importancia (Maynard, Elson et al. 2012). Sin embargo como ya fue mencionado, durante la infección por el VIH se pierde aproximadamente el 80% de los linfocitos T CD4+ que se encuentran en el GALT durante la etapa aguda (McMichael, Borrow et al. 2010). A pesar del uso del TAR la recuperación de esta población linfocitaria es menor al 50% (Guadalupe, Reay et al. 2003). Esta pérdida de linfocitos T CD4+ altera la

función de barrera física del intestino y contribuye a la patogénesis de la infección por el VIH (Marchetti, Tincati et al. 2013).

#### 4. ANATOMÍA DEL INTESTINO DELGADO

El intestino delgado se encuentra constituido por el duodeno, yeyuno y el íleon, es el principal sitio de absorción de nutrientes obtenidos de los alimentos a través de las vellosidades. A lo largo del intestino delgado se encuentran aproximadamente  $10^{11}$  a  $10^{14}$  de microorganismos, que se denominan microbiota intestinal (ver Figura 7) (Neish 2009; Fujimura, S lusher et al. 2010). En el intestino la barrera epitelial y el sistema inmune del GALT han desarrollado distintos mecanismos para mantener a la microbiota intestinal en el lumen del intestino (Hill and Artis 2010). Las placas de Peyer mostradas en la Figura 7 son estructuras importantes para la inducción de la respuesta inmune en el GALT y se localizan principalmente en el íleon distal (Neish 2009).

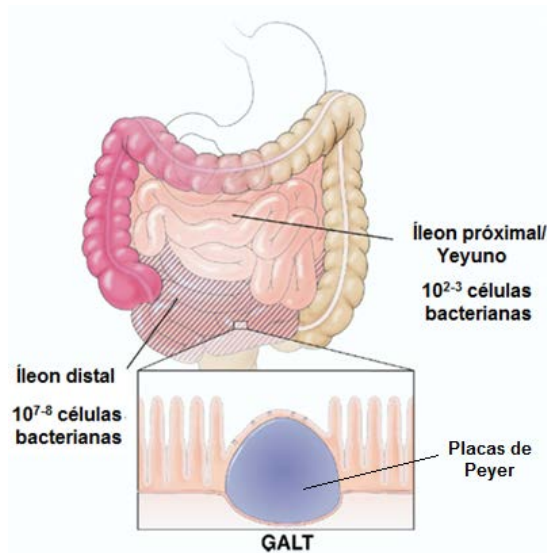


Figura 7. Anatomía del intestino delgado y localización de las placas de Peyer. En el intestino delgado se encuentran distribuidos aproximadamente  $10^{11}$  microorganismos que viven de forma comensal en el organismo. En el intestino delgado se encuentra el GALT y las estructuras que ayudan al mantenimiento de la respuesta inmunológica son las placas de Peyer (Neish 2009).

#### 4.1 Componentes celulares de la barrera epitelial intestinal

El principal componente de esta barrera es una capa continua de células epiteliales, denominados enterocitos, que se mantiene unida por proteínas denominadas claudinas que forman las uniones intercelulares herméticas (Brenchley and Douek 2008; Neish 2009; Capaldo, Farkas et al. 2014). Esta capa continua de células funciona como barrera física contra los microorganismos que se encuentran en el intestino. En la Figura 8 se muestra que entre las células epiteliales se encuentran intercalados distintos tipos de células que contribuyen a la función de barrera, entre los distintos tipos de células se encuentran:

- ❖ Células calciformes: Secretoras de moco, el cual se encuentra formado por proteínas muy glucosiladas, llamadas mucinas. Las mucinas forman un gel hidratado que recubre a las células epiteliales, contiene a las sustancias antimicrobianas e impide el contacto de los microorganismos con ellas (Pelaseyed, Bergstrom et al. 2014).
- ❖ Células microplegadas o células M: Este tipo de células captan los antígenos y los transporta desde el lumen intestinal hacia la lámina propia. Estos antígenos son captados por las células del sistema inmunológico y llevados a las placas de Peyer para generar una respuesta inmunológica (Kurashima, Goto et al. 2013).
- ❖ Células de Paneth: Son secretoras de péptidos antimicrobianos como defensinas, las cuales ejercen efectos tóxicos sobre los microbios al insertarse sobre ellos y provocar una pérdida de la integridad de sus membranas (Kurashima, Goto et al. 2013).

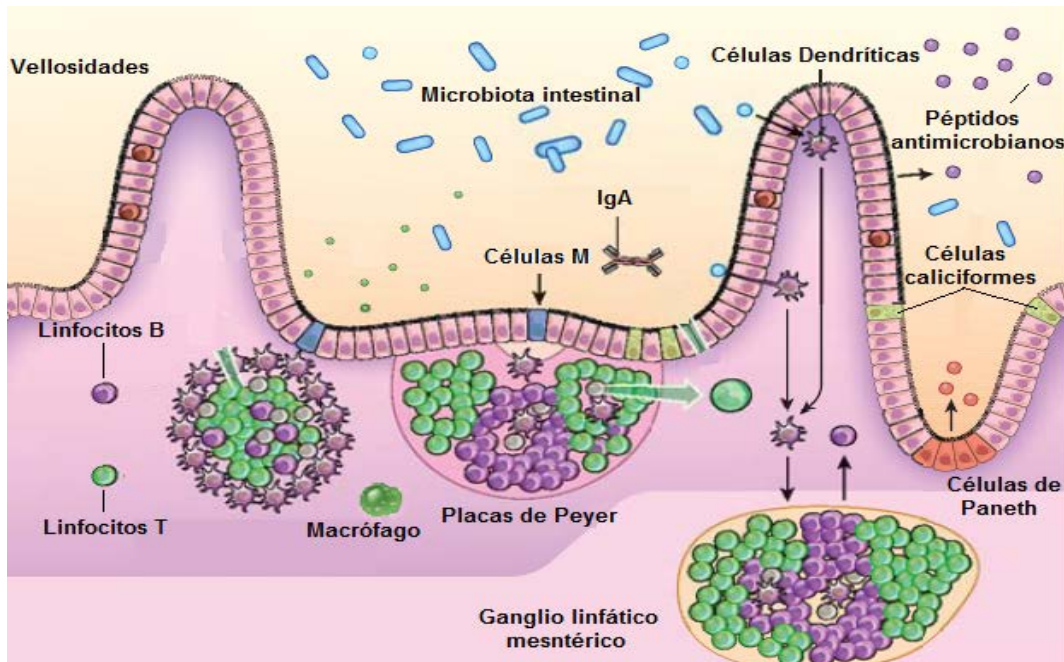


Figura 8. Componentes celulares de la barrera epitelial intestinal y del GALT. Se muestra que la barrera epitelial intestinal funciona como barrera física para mantener a los microorganismos intestinales en el lumen del intestino. En esta barrera se encuentran las células caliciformes, células M y las células de Paneth. Bajo la barrera epitelial se localiza la lámina propia que contiene las distintas poblaciones celulares del sistema inmunológico y las placas de Peyer uno de los principales sitios de inducción de respuestas inmunes, esta última función también es ejercida por los ganglios linfáticos mesentéricos (Maynard, Elson et al. 2012).

#### 4.2 Componentes del GALT

El GALT es un tejido conjuntivo que se localiza de manera subyacente a la barrera epitelial que contiene numerosas poblaciones celulares incluyendo linfocitos T CD4+ y T CD8+, células dendríticas, macrófagos y mastocitos (Shale, Schiering et al. 2013). Estas poblaciones celulares median las respuestas inmunitarias innatas y son el brazo efector de las respuestas inmunitarias adaptativas (Shale, Schiering et al. 2013). Estas poblaciones se localizan principalmente en la región distal del íleon y se encuentran constituidas por linfocitos B y T naïve, células dendríticas y macrófagos (Mowat 2003).

El epitelio intestinal localizado sobre las placas de Peyer contiene un número importante de células M, las cuales captan antígenos que son tomados por células dendríticas,

monocitos/macrófagos o linfocitos B (células presentadoras de antígeno o APC por sus siglas en inglés) de las placas de Peyer. Las APC que hayan captado algún antígeno activan a los linfocitos mediante la interacción entre el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) de las APC y el TCR de los linfocitos T naïve, esta activación induce la diferenciación de los linfocitos T en los distintos subtipos (Vyas, Veen et al. 2008; Leitner, Steinberger et al. 2010). Esta activación de los linfocitos T puede llevarse a cabo en las placas de Peyer y en los ganglios linfáticos mesentéricos.

Otro componente del GALT mostrado en la Figura 8 son, las células plasmáticas que secretan principalmente inmunoglobulina (Ig) A y en cantidades menores IgG e IgM. Estas inmunoglobulinas se unen a los microorganismos y toxinas para neutralizarlas e impedir su unión a las células epiteliales del intestino (Kurashima, Goto et al. 2013).

Como ya fue mencionado el GALT alberga la mayor población de linfocitos T CD4+ del cuerpo, aproximadamente el 80% y dentro de esta población se encuentra de manera dominante los linfocitos T helper 17 (linfocitos Th17, ver Figura 9).

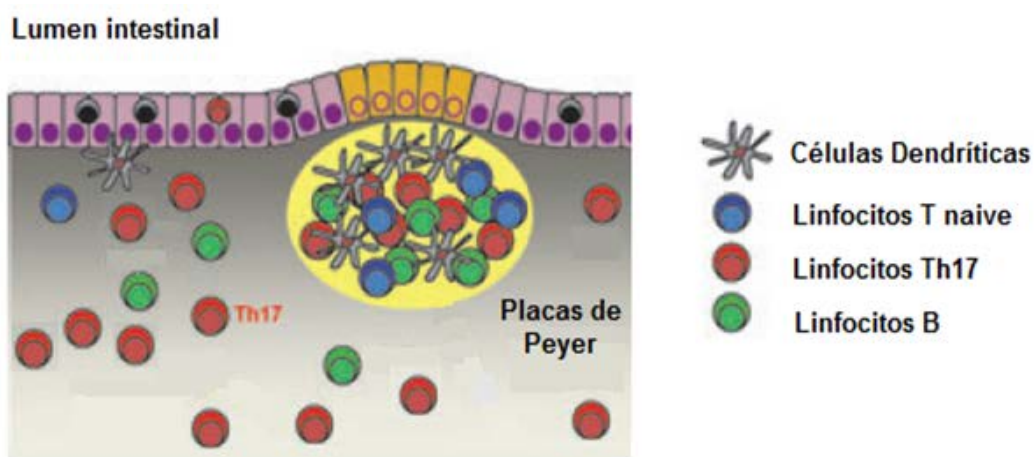


Figura 9. Linfocitos Th17 en el GALT. Se muestra que en el GALT hay diferentes poblaciones celulares, la mayor frecuencia (aproximadamente el 80%) son linfocitos T CD4+ y de manera dominante los linfocitos Th17 (Adaptado de Shale, Schiering et al. 2013).



## 5. LINFOCITOS Th17

### 5.1 Generalidades

Dentro de los subgrupos de linfocitos T CD4+ e factores se encuentran los linfocitos Th17. Esta subpoblación secreta como citoquina característica la interleucina (IL) 17 y ejerce principalmente funciones en la inmunidad adaptativa contra bacterias extracelulares y hongos (Klatt and Brenchley 2010).

El proceso de diferenciación de los linfocitos Th17 se muestra en la Figura 10, estos linfocitos se diferencian a partir de linfocitos T naïve. Las citoquinas IL-1, IL-6 y la IL-23 secretadas principalmente por las CD son necesarias a la diferenciación del los Th17, ya que se unen a sus receptores en la superficie del linfocito T naïve e inducen la activación de los factores de transcripción retinoid-related orphan receptor- $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) y signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Esto conlleva a la diferenciación hacia linfocitos Th17 (McGeachy and Cua 2008; Annunziato, Cosmi et al. 2012; Shale, Schiering et al. 2013).

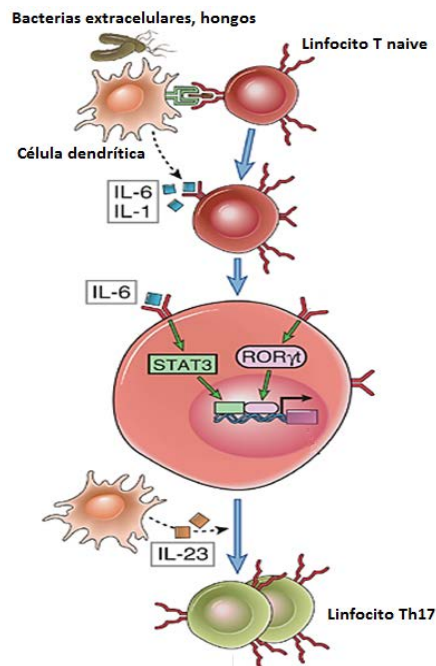


Figura 10. Proceso de diferenciación de los linfocitos Th17. Los linfocitos T naïve se diferencian en el subtipo Th17 cuando la IL-1, IL-6 y la IL-23 secretadas por CD se unen a sus receptores e inducen la activación de factores de transcripción como ROR $\gamma$ t y STAT3. (Abbas, Lichtman et al. 2012)

Este subtipo de linfocitos secretan distintas citocinas que ejercen efectos sobre otras poblaciones celulares (ver Figura 11). La citocina IL-17 permite el reclutamiento de neutrófilos, estimula la renovación de la barrera epitelial intestinal y la síntesis de las claudinas en las uniones herméticas (Dandekar, George et al. 2010; Kolls and Khader 2010; Shale, Schiering et al. 2013).

La citocina IL-21 activa otras poblaciones celulares, incrementa la diferenciación hacia el fenotipo Th17 y regula de forma positiva su propia expansión (Annunziato, Cosmi et al. 2012). La citocina IL-22 junto con la IL-17 estimula la expresión de CCL20 en tejidos con inflamación. El receptor de esta CCL20 es CCR6 que se encuentra altamente expresado en linfocitos Th17 permitiendo el reclutamiento de esta población en el sitio de inflamación (Dandekar, George et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2012). El Factor de necrosis tumoral ( $TNF\alpha$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) contribuyen a la activación, sobrevivencia y reclutamiento de los neutrófilos (Dandekar, George et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2012).

Los linfocitos Th17 expresan en su superficie diversas moléculas o marcadores que permiten su identificación fenotípica. Entre estos marcadores se encuentra CCR6, el receptor de la quimiocina CCL20 expresada en las células epiteliales. El segundo marcador que permite la fenotipificación es CD161, una lectina (proteína que se une a azúcares) que se expresa en la superficie de los linfocitos Th17 y tiene como ligando oligosacáridos de la superficie de células endoteliales. Se ha propuesto que CD161 ayuda en la migración transendotelial de los linfocitos Th17. En combinación ambos marcadores permiten la identificación fenotípica de los linfocitos Th17 (Kleinschek, Boniface et al. 2009; Ancuta, Monteiro et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2012).

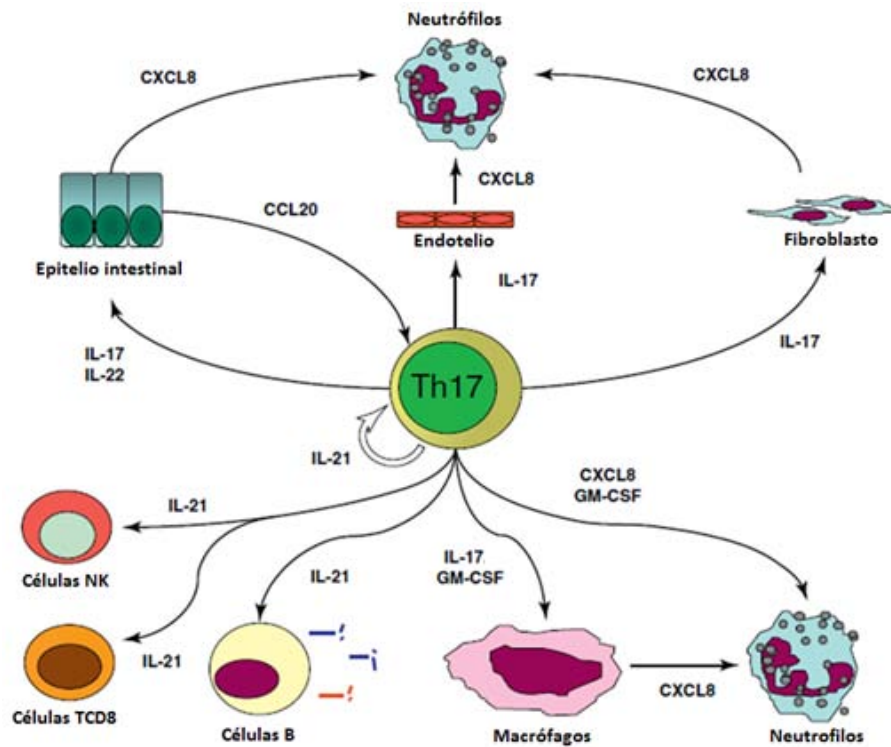


Figura 11. Funciones de las citocinas secretadas por los linfocitos Th17. Los linfocitos Th17 secretan principalmente la IL-17 que estimula la secreción de la quimiocina CXCL8 en las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y macrófagos, esta quimiocina permite el reclutamiento de los neutrófilos. La secreción de IL-21 estimula la diferenciación hacia el subtipo Th17, activa a células NK y linfocitos T CD8+ y en los linfocitos B la IL-21 estimula la secreción de los anticuerpos. Los linfocitos Th17 secretan el GM-CSF que actúa sobre los macrófagos para contribuir al reclutamiento de los neutrófilos, el GM-CSF puede actuar directamente en los neutrófilos ayudando a su sobrevivencia y activación (Annunziato, Cosmi et al. 2012).

## 5.2 La expresión de las moléculas que proporcionan el “homing” al intestino en los linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 contribuyen al mantenimiento de la barrera epitelial del intestino. Para ejercer esta función los linfocitos Th17 deben migrar al GALT y mantenerse en este sitio después del proceso de diferenciación ocurrido en los ganglios linfáticos mesentéricos o en las placas de Peyer. Se requiere de la expresión de diversas moléculas en la superficie de los linfocitos Th17 para su migración o “homing” al intestino. Las moléculas de superficie que dan esta

característica a los linfocitos Th17 son el correceptor de quimiocinas CCR9 y la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (Gorfu, Nieves et al. 2009).

El ligando de CCR9 es la quimiocina CCL25, la cual es expresada principalmente por células epiteliales del intestino delgado (Kunkel, Campbell et al. 2000). Mientras que el ligando para la integrina  $\alpha 4\beta 7$  es la molécula de adhesión MadCAM-1, expresada por las células endoteliales de la lámina propia y está asociada al tejido linfoide a lo largo de todo el intestino. La expresión combinada de CCR9 y  $\alpha 4\beta 7$  proporciona el “homing” al intestino a los linfocitos Th17 (Lindbom and Agace 2007; Mavigner, Cazabat et al. 2012).

Este fenotipo de alojamiento es inducido por las CD de los ganglios linfáticos mesenterios y las placas de Peyer. Esto ocurre durante el proceso de diferenciación de los linfocitos T naïve en linfocitos Th17. La inducción de CCR9 y  $\alpha 4\beta 7$  depende de la presencia de ácido retinoico secretado por las CD. En la Figura 12 se muestra que las CD del GALT se exponen a la vitamina A de la dieta, la cual es procesada por las células dendríticas de las placas de Peyer y de los ganglios linfáticos mesentéricos. Estas CD expresan la retinal deshidrogenasa (RALDH), enzima necesaria para sintetizar el ácido retinoico a partir de la vitamina A y proporcionar el “homing” al intestino los linfocitos Th17 (Wang, Kang et al. 2010; Shale, Schiering et al. 2013).

El linfocito Th17 con “homing” al intestino sale de los ganglios linfáticos mesentéricos o de las placas de Peyer, pasa a la circulación sistémica y se mantiene en este sitio hasta llegar al intestino atraído por CCL25 y MadCAM-1 (Gorfu, Nieves et al. 2009). Como ya fue mencionado, los linfocitos Th17 con “homing” al intestino representan alrededor del 70% de la población linfocitaria en el GALT. Solo una fracción aproximada al 2% de estos linfocitos puede encontrarse en circulación sistémica, correspondientes a la población que después de su diferenciación en linfocitos Th17 se dirigen al GALT (Mavigner, Cazabat et al. 2012).

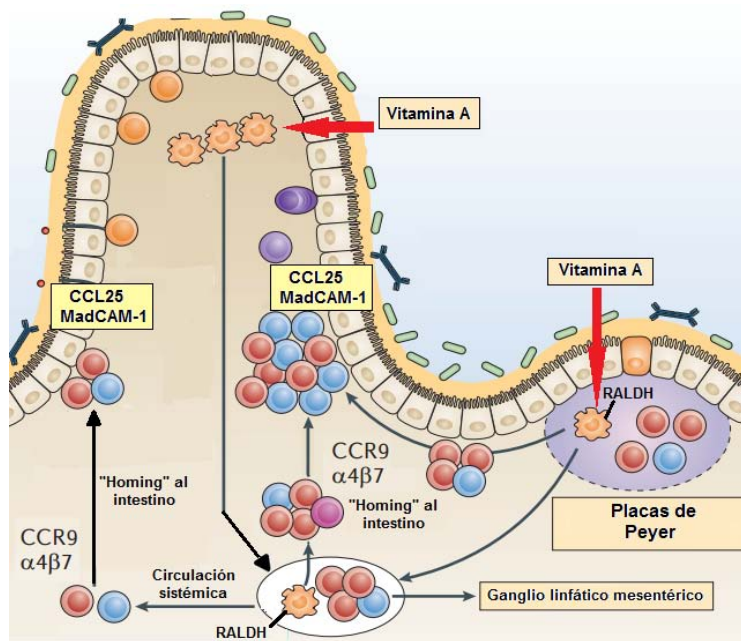


Figura 12. Inducción de la expresión de CCR9 y  $\alpha4\beta7$  en los linfocitos Th17. Las CD de los ganglios linfáticos mesentéricos y las placas de Peyer degradan la vitamina A en el ácido retinoico mediante la enzima RALDH. El ácido retinoico estimula la expresión de CCR9 y  $\alpha4\beta7$  en la superficie de los linfocitos Th17. Estos linfocitos con "homing" al intestino pasan a circulación sistémica para llegar al GALT atraído por CCL25 y MadCAM-1 (Adaptado de Veldhoen and Waldert 2012).

## 6. ALTERACIONES DEL GALT EN PRESENCIA DEL VIH

### 6.1 Cambios anatómicos en el intestino delgado y el GALT en presencia del VIH

Durante la infección por VIH se presentan diversas enteropatías que inician desde la etapa aguda y se mantienen durante toda la infección. En la Figura 13 se muestra que la enteropatía asociada al VIH que incluye diarreas, inflamación y aumento de la permeabilidad del tracto gastrointestinal, disminución en la absorción de vitaminas y la atrofia y alisamiento de las vellosidades. En la barrera epitelial hay disminución en los componentes de las uniones estrechas, en la secreción de las defensinas y en la producción de las mucinas. Estas alteraciones en la barrera epitelial permiten que las bacterias o productos bacterianos que se encuentran en el lumen del intestino pasen a la circulación periférica (Brenchley and Douek 2008; Marchetti, Tincati et al. 2013).

Ocurren alteraciones en las diversas poblaciones celulares, entre ellas: apoptosis, alteraciones en el ciclo celular y en la funcionalidad de linfocitos T CD8+, linfocitos B y células NK. Las CD y macrófagos presentan disminución en su capacidad de fagocitosis y hay un incremento de la producción de citocinas pro-inflamatorias (McMichael, Borrow et al. 2010; Altfeld, Fadda et al. 2011; Klatt, Funderburg et al. 2013).

Sin embargo, la alteración más importante en las poblaciones celulares es la depleción de aproximadamente el 80% de los linfocitos T CD4+, incluyendo los linfocitos Th17 con "homing" al intestino. Aproximadamente la pérdida del 20% de estos linfocitos es debida a la infección directa del virus y alrededor del 60% es por una activación indirecta (McMichael, Borrow et al. 2010).

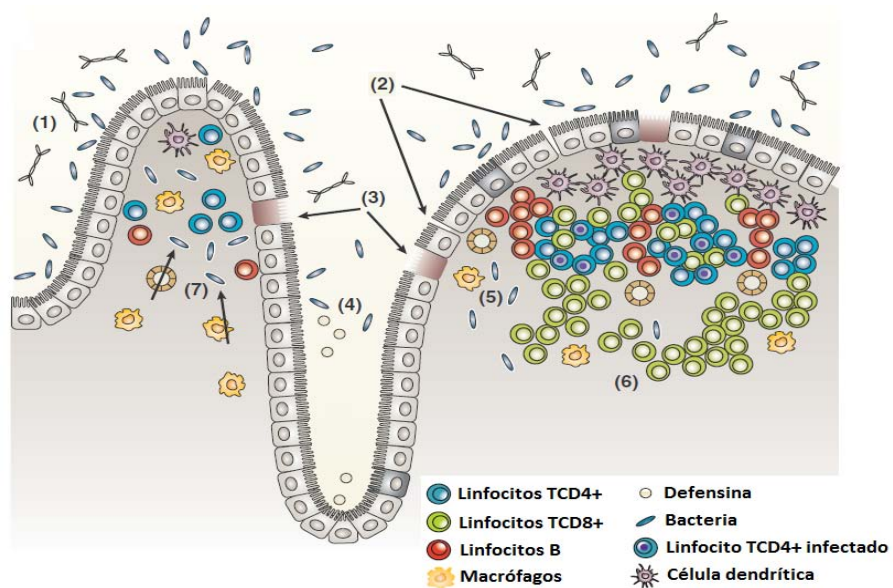


Figura 13. Enteropatía asociada al VIH. Se muestran las distintas alteraciones en el GALT: (1) Alisamiento de las vellosidades, (2) Aumento en la permeabilidad y alteraciones en las uniones estrechas, (3) Daño a la barrera epitelial, apoptosis de los enterocitos, (4) Disminución de las defensinas, (5) Depleción masiva de los linfocitos T CD4+, (6) Linfocitos T CD4+ infectados por VIH y (7) Translocación de productos bacterianos (Adaptado de Brenchley and Douek 2008).

En el GALT una de las alteraciones más importantes es la pérdida de las placas de Peyer y por tanto la pérdida de uno de los principales sitios de inducción de la respuesta inmunológica (ver Figura 14) (Brenchley, Schacker et al. 2004).

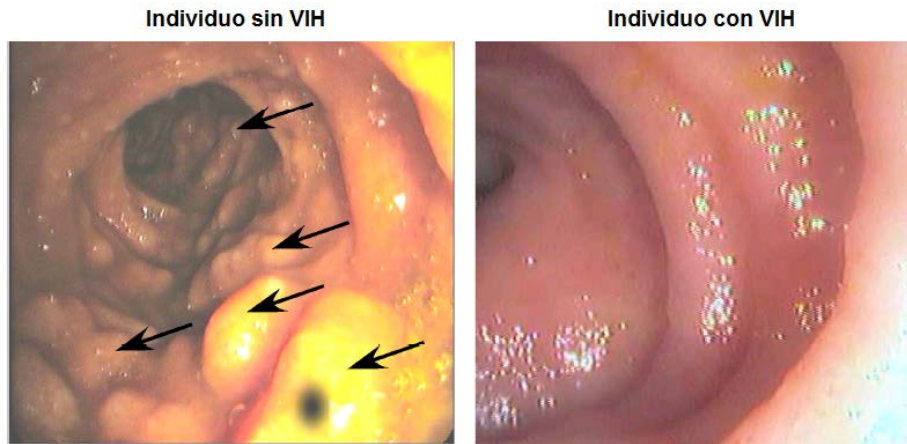


Figura 14. Pérdida de las placas de Peyer durante la infección por VIH. En un individuo sin VIH (figura de la izquierda) se observan las placas de Peyer que se encuentran en el intestino delgado (señaladas por flechas). Mientras que en un individuo con VIH las placas de Peyer se pierden y por lo tanto también se pierde uno de los principales sitios de inducción de la respuesta inmunológica (Brenchley, Schacker et al. 2004).

En la barrera epitelial intestinal de individuos con VIH se ha observado que hay muerte de los enterocitos y se han propuesto algunas causas para la pérdida de estas células. Entre ellas se encuentran que la presencia de la proteína viral Tat tiene efectos inhibitorios en la entrada de glucosa a los enterocitos. Adicionalmente gp120 genera un aumento en la concentración de calcio provocando cambios en el balance iónico. Finalmente se ha postulado que la infección por VIH resulta en anomalías en la diferenciación de los enterocitos. Sin embargo los mecanismos por los cuales ocurren estas alteraciones no han sido completamente definidos. (Brenchley and Douek 2008)

La muerte de los enterocitos ha sido medida a través de la concentración plasmática de la proteína de unión a ácido graso intestinal (I-FABP). Esta proteína se encuentra en el interior de los enterocitos que al morir la liberan y puede ser detectada en el plasma (Mavigner, Cazabat et al. 2012; Chevalier, Petitjean et al. 2013). En la Figura 15 se muestra la comparación de la cantidad de I-FABP en plasma entre individuos sin VIH y con VIH, donde se observa una elevación de esta proteína en el plasma de individuos con VIH indicando que hay un incremento en la muerte de los enterocitos de individuos infectados.

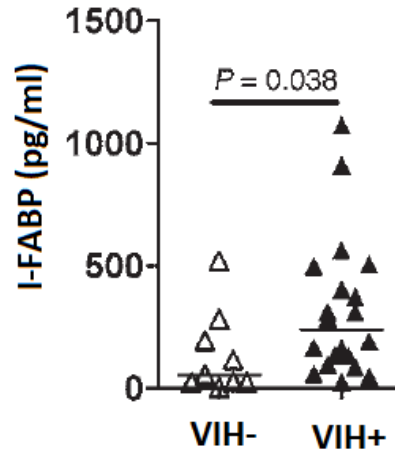


Figura 15. Concentración de I-FABP en plasma en individuos sin VIH (△) e individuos con VIH (▲). Se muestra que en individuos con VIH hay un incremento de la proteína I-FABP en plasma (proteína liberada por los enterocitos cuando mueren) indicando un incremento en la muerte en los enterocitos (Mavigner, Cazabat et al. 2012).

## 6.2 Translocación de productos bacterianos durante la infección por el VIH y la activación del sistema inmune

Durante la infección por VIH se presentan daños estructurales e inmunológicos. Entre estas alteraciones se encuentran la ruptura de la barrera epitelial y la disminución de la frecuencia de los linfocitos Th17 con "homing" al intestino (Sandler and Douek 2012). Estos cambios se acompañan de la translocación de productos bacterianos desde el lumen intestinal hacia la circulación periférica. Este proceso se denomina translocación bacteriana (Brenchley, Price et al. 2006; Marchetti, Tincati et al. 2013).

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, un inductor del proceso inflamatorio y es el producto de translocación bacteriana más estudiado. Sin embargo otros productos que se han encontrado translocados en el plasma son el ácido teicoico, el ADN ribosomal, la flagelina, el ADN CpG y el ARN 16S (Brenchley, Price et al. 2006; Kramski, Gaeguta et al. 2011; Sandler and Douek 2012; Marchetti, Tincati et al. 2013). En la Figura 16 se muestra una comparación entre la cantidad de LPS en plasma en las distintas etapas de la infección. Se observa que a partir de la etapa crónica se



puede medir el LPS en plasma y se incrementa en la etapa de SIDA. Esto indica que la translocación del LPS aumenta con la infección por VIH. (Brenchley, Price et al. 2006; Marchetti, Tincati et al. 2013).

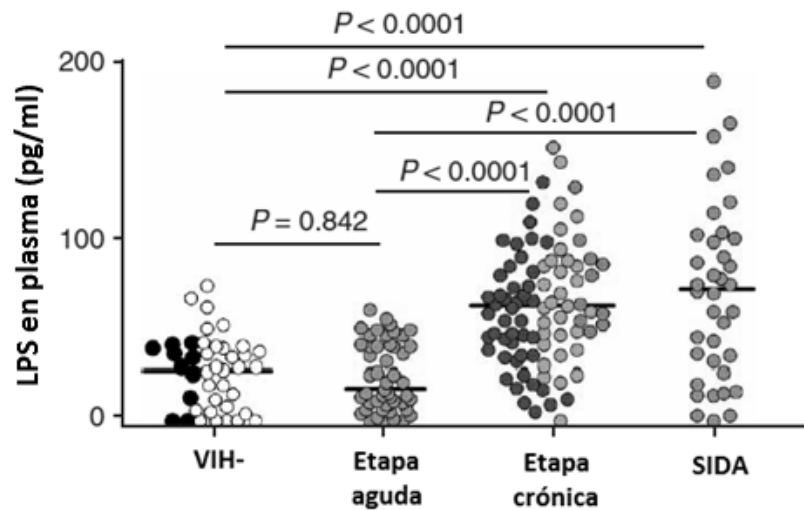


Figura 16. Concentración de LPS en plasma en las distintas etapas de la infección por VIH. (Adaptado de Brenchley, Price et al. 2006).

La translocación de los productos bacterianos contribuye a la activación de las distintas poblaciones celulares del sistema inmunológico como los linfocitos T CD4+ y T CD8+ (Butler, Valdez et al. 2011). La activación inmunológica es característica de la infección por VIH y está asociada con un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1, IL-6 y el TNF $\alpha$  (Brenchley, Price et al. 2006; Chevalier, Petitjean et al. 2013; Klatt, Funderburg et al. 2013). Se ha observado la elevación de la proteína C reactiva, un incremento del dímero D, el desarrollo de fibrosis en los tejidos linfáticos y deposición de colágeno en GALT (Butler, Valdez et al. 2011; Sandler and Douek 2012).

Otros eventos que probablemente se encuentran relacionados a la activación inmunológica incluyen la infección viral residual y la activación directa o indirecta de otras células que puede derivar en apoptosis (McMichael, Borrow et al. 2010). Se ha observado que la replicación residual y las co-infecciones (hepatitis B y C) contribuyen a la activación inmunológica (Butler, Valdez et al. 2011).

Adicionalmente se ha observado en personas con VIH un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, trastornos neurocognitivos y fibrosis en tejidos linfoides e hígado (Butler, Valdez et al. 2011; Hunt 2012; Sandler and Douek 2012; Marchetti, Tincati et al. 2013).

El grado de activación del sistema inmunológico puede ser medido a través de la expresión de CD38 y HLA-DR en la superficie de los linfocitos T CD8. Ambos marcadores pueden ser identificados en otras poblaciones celulares activadas como los linfocitos T CD4+ (Hunt 2007; Langford, Ananworanich et al. 2007; Butler, Valdez et al. 2011). En la Figura 17 se muestra la correlación entre la activación del sistema inmunológico de individuos con VIH a través de la expresión de CD38 y HLA-DR en los linfocitos T CD8+ y los niveles de LPS en plasma. Se observa que a mayor cantidad de LPS en plasma hay una mayor activación del sistema inmunológico (Brenchley, Price et al. 2006). Considerando esta correlación y que la cantidad de LPS en plasma se incrementa en las distintas etapas de la infección, podría haber una correlación entre la translocación bacteriana y la progresión de la infección por VIH.

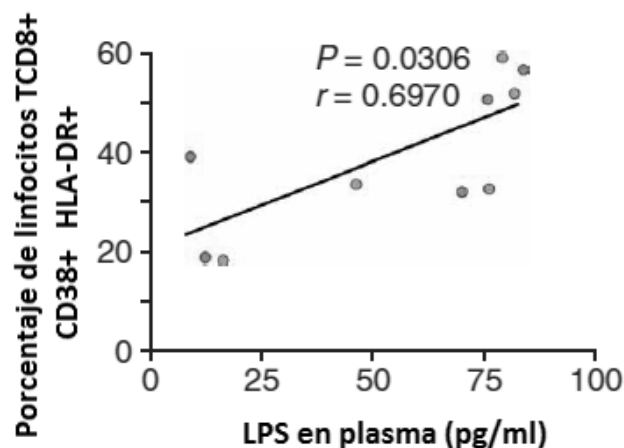


Figura 17. Correlación entre el LPS en plasma y el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados. Se muestra que a mayor cantidad de LPS en plasma mayor es el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados (Brenchley, Price et al. 2006).

Como ya fue mencionado el uso del TAR permite una recuperación en el conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica y una recuperación parcial en el GALT (Costiniuk and Angel 2012; Jain, Hartogensis et al. 2013). Adicionalmente se ha

reportado que el uso del TAR disminuye el grado de activación del sistema inmunológico, estos factores podrían relacionarse con una disminución en la translocación microbiana (Brenchley, Price et al. 2006; Sandler and Douek 2012).

### 6.3 Translocación de productos bacterianos durante el uso del TAR en la infección por el VIH

Durante el uso de TAR hay una reducción de la replicación viral. Esta reducción podría permitir la reconstitución de las barreras estructurales e inmunológicas que permitan la prevención de la translocación microbiana (Sandler and Douek 2012). En la Figura 18 se muestra la cantidad de LPS en plasma de individuos con VIH sin TAR y la cantidad de LPS después de 48 semanas de TAR. Se observa que la cantidad de LPS en plasma después de 48 semanas de TAR disminuye respecto a la cantidad de LPS en ausencia de TAR. Sin embargo a pesar del uso del TAR el nivel de LPS continua siendo mayor que en individuos sin VIH (Brenchley, Price et al. 2006).

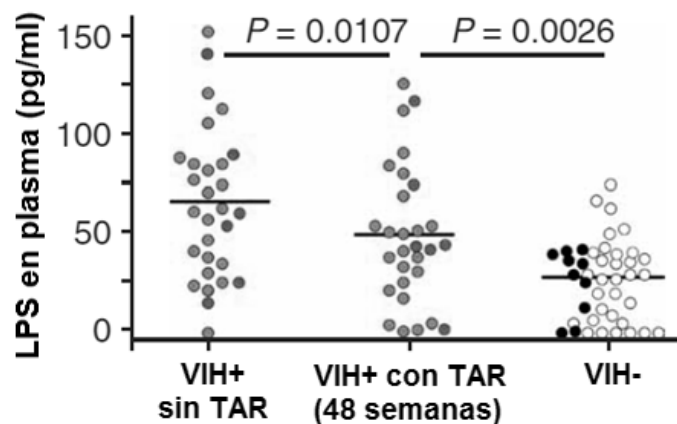


Figura 18. Cantidad de LPS en plasma durante el uso del TAR. Se muestra que la translocación del LPS en plasma en individuos con VIH sin TAR y después de 48 semanas de TAR. Se observa que hay una disminución de LPS en plasma en presencia de TAR, sin embargo la cantidad de LPS en plasma sigue siendo mayor comparado con individuos sin infección (Brenchley, Price et al. 2006).

Esta disminución en la cantidad de LPS en plasma permite considerar que existe una recuperación parcial de la barrera epitelial y de los linfocitos T CD4 + incluyendo los linfocitos Th17 (Bixler and Mattapallil 2013). En los estudios

realizados se ha observado que la recuperación de los linfocitos T CD4+ en el GALT es parcial, en algunos individuos la recuperación es menor al 50% y en algunos casos puede ser mayor sin llegar a niveles de un individuo sin VIH (Costiniuk and Angel 2012; Sandler and Douek 2012; Jain, Hartogensis et al. 2013). Este aumento en los linfocitos T CD4+ podría contribuir a una recuperación del GALT y a una disminución de la translocación bacteriana y de la activación del sistema inmunológico.

#### 6.4 Variaciones en la frecuencia de linfocitos Th17 con “homing” al intestino en sangre periférica en presencia del TAR

La población de linfocitos Th17 con “homing” al intestino de individuos sin VIH, se encuentra en una proporción cercana al 70% en el intestino y solo una frecuencia alrededor del 2% se encuentra en sangre periférica (Macal, Sankaran et al. 2008; Mavigner, Cazabat et al. 2012). Como se muestra en la Figura 19A existe una correlación negativa entre frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en GALT y la frecuencia de esta misma población en sangre periférica. Esta misma asociación se ha descrito en individuos con VIH (Figura 19B) (Mavigner, Cazabat et al. 2012).

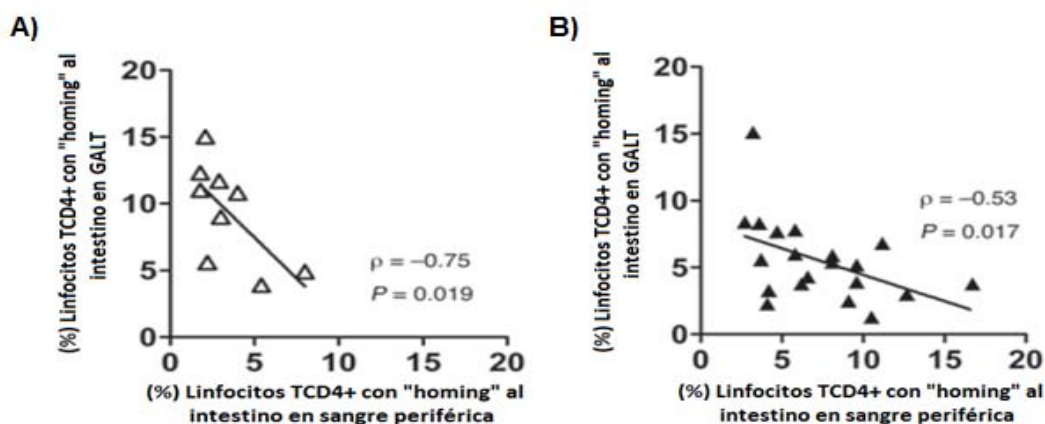


Figura 19. Correlación entre los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en sangre periférica y en GALT en individuos sin VIH y con VIH. A) Se muestra que hay una correlación negativa entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en GALT y la frecuencia de esta población en sangre periférica. B) Entre la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en GALT y sangre periférica de individuos con VIH hay una correlación negativa (Mavigner, Cazabat et al. 2012).

En individuos sin VIH no hay alteraciones en el epitelio intestinal y la expresión de las moléculas CCL25 y MadCAM-1 es normal. Debido a esto los linfocitos son atraídos y mantenidos en el GALT y solo aquellos que van del sitio inductor hacia el efector se pueden detectar en sangre periférica (Kunkel, Campbell et al. 2000; Gorfu, Nieves et al. 2009). Sin embargo como ya se ha mencionado, durante la infección por VIH se presenta la muerte de las células epiteliales y su regeneración se encuentra alterada por la depleción de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino. En conjunto ambos factores influyen en una disminución en la expresión de CCL25 y MadCAM-1 (Mavigner, Cazabat et al. 2012).

La baja expresión de CCL25 continúa a pesar del uso de TAR evitando que los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino que se hayan recuperado lleguen al GALT y se mantengan en sangre periférica (Mavigner, Cazabat et al. 2012). (Macal, Sankaran et al. 2008; Mavigner, Cazabat et al. 2012; Jain, Hartogensis et al. 2013).

## **7. JUSTIFICACIÓN**

Durante las 3 primeras semanas de infección por el VIH, hay una depleción aproximadamente del 80% de los linfocitos T CD4+ en el GALT (Brenchley, Price et al. 2006; McMichael, Borrow et al. 2010; Butler, Valdez et al. 2011). Entre ellos los linfocitos Th17 que contribuyen al mantenimiento de la barrera intestinal (Annunziato, Cosmi et al. 2012). Se han realizado investigaciones previas en las cuales se ha propuesto que la depleción de esta población contribuye a las alteraciones de la barrera epitelial intestinal (Chenge, Sheth et al. 2011; Mavigner, Cazabat et al. 2012). Estas alteraciones permiten la translocación de productos bacterianos (principalmente el LPS) desde el lumen intestinal hacia la sangre periférica, contribuyendo a la activación del sistema inmunológico y finalmente a una progresión más rápida hacia la etapa de SIDA (Brenchley, Price et al. 2006; Mavigner, Cazabat et al. 2012).

Los dos parámetros seguidos clínicamente para conocer la progresión de la infección son el conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica y la CV. Sin embargo la depleción de los linfocitos T CD4+ en circulación y en GALT es distinta (Brenchley, Price et al. 2006). Por ello este trabajo propuso determinar la frecuencia de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino en muestras de sangre periférica y determinar su posible empleo como un marcador indirecto de la reconstitución del GALT. Adicionalmente se pretende identificar si esta frecuencia puede ser empleada de manera complementaria al conteo de linfocitos T CD4+ y la CV para conocer la progresión de la infección.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1 Objetivos generales**

1. Identificar y cuantificar la frecuencia de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino a partir de muestras de sangre periférica.
2. Identificar el grado de activación en los linfocitos Th17 con “homing” al intestino
3. Identificar el grado de activación del sistema inmunológico con medición de CD38 y HLA-DR en linfocitos T CD8
4. Determinar si la frecuencia de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino en sangre periférica pueden ser empleados como marcador complementario al conteo de linfocitos T CD4+ y la CV.

### **8.2 Objetivos particulares**

- Determinar el título adecuado para cada anticuerpo.
- Seleccionar una estrategia de análisis para la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino.
- Identificar mediante citometría de flujo multiparamétrica la frecuencia de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino a partir de muestras de sangre periférica
- Determinar el grado de activación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino y en los linfocitos T CD8+.

## **9. HIPÓTESIS**

- Las frecuencias de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino determinadas en sangre periférica, serán distintas dependiendo del grupo de estudio.
- Los linfocitos Th17 con “homing” al intestino presentarán distintos grados de activación dependiendo del grupo de estudio.
- El grado de activación del sistema inmunológico dependerá del grupo de estudio y de sus características clínicas.

## **10. METODOLOGÍA**

### **10.1 Cohorte de estudio**

El estudio se realizó en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las muestras procesadas corresponden a 13 individuos mexicanos que firmaron un consentimiento informado para formar parte de este protocolo de investigación aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

Los criterios de inclusión considerados para el reclutamiento de los individuos de este protocolo fue la ausencia del uso de antibióticos por lo menos dos semanas y de preferencia 1 mes previo a la toma de muestra. Para individuos bajo TAR tener una CV indetectable ( $<40$  copias ARN/ml) y como tratamiento el uso de Tenofovir/Emtricitabina/Efavirenz. Siguiendo estos criterios de inclusión se formaron tres grupos de estudio: sin VIH, con VIH sin TAR y con VIH bajo TAR. Para cada individuo se realizó una toma de muestra de sangre que consistía en la extracción de aproximadamente 50 ml de sangre periférica mediante punción venosa en 8 tubos vacutainer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) de 6 ml con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y 1 tubo de 4 ml con EDTA.

De la muestra obtenida 2 tubos de 6 ml y 1 tubo de 4 ml con EDTA fueron enviados al laboratorio de diagnóstico virológico (LDV) del CIENI para el conteo de linfocitos T CD4+ en las muestras de todos los individuos y estudios de CV para las muestras de los individuos con VIH con y sin TAR. La sangre periférica de los 6 tubos restantes fue utilizada para la separación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para las muestras de individuos sin VIH se hizo una prueba de ELISA para confirmar la ausencia de infección por VIH al momento de la toma de muestra.



## 10.2 Separación de PBMC

A partir de las muestras de sangre periférica se separaron las PBMC mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep (Axis-Shield, Norton, MA, USA). Las PBMC fueron lavadas con medio de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA) y contabilizadas en una cámara de Neubauer empleando azul de tripano para discriminar viabilidad. Las PBMC fueron congeladas en una concentración aproximada de  $20 \times 10^6$  células/ml de medio de congelación preparado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en Suero Fetal Bovino (SFB, Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA). La temperatura de congelación fue de  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y fueron almacenadas en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-150^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 10.3 Descongelación de PBMC

Las PBMC separadas de las muestras de estudio se mantuvieron en nitrógeno líquido y fueron descongeladas el día de su uso. Los crioviales que contenían las PBMC congeladas se colocaron en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al descongelarse, las PBMC fueron adicionadas a un tubo con 8.5 ml de medio Hut ((Medio RPMI 1640 Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA), 1% L-Glutamina, 1% Penicilina/Estreptomina y 10% SFB (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA)) a  $37^{\circ}\text{C}$  y 500  $\mu\text{l}$  de DNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una concentración de 10  $\text{u}/\mu\text{l}$  y fueron centrifugadas 8 minutos a 1500 rpm. Las PBMC fueron lavadas con 9.5 ml de medio Hut y 500  $\mu\text{l}$  de DNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en una concentración de 10  $\text{u}/\mu\text{l}$  en las mismas condiciones y fueron contabilizadas con azul de tripano en una cámara de Neubauer. Estas PBMC descongeladas fueron purificadas y teñidas con el panel de tinción seleccionado.

## 10.4 Fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino

Mediante la técnica de citometría de flujo multiparamétrica los linfocitos T CD4+ Th17 se identificaron con base en su expresión de CD3+, CD4+, CCR6+, CD161+ y CXCR3- (Kleinschek, Boniface et al. 2009; Ancuta, Monteiro et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2012), con “homing” al intestino por su expresión de CCR9+,  $\alpha 4+$  y  $\beta 7+$  (Gorfu, Nieves et al. 2009; Mavigner, Cazabat et al. 2012), la subpoblación de memoria efectora CCR7- y CD45RO+ (Macal, Sankaran et al. 2008), se cuantificó la expresión de los marcadores de activación HLA-DR y CD38 (Brenchley, Price et al. 2006) y CCR5+ como correceptor de entrada para el VIH y marcador de activación (Wilens, Tilton et al. 2012; Martínez, Barrosoa et al. 2014). Este fenotipo se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Marcadores utilizados para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora con expresión del co-receptor CCR5 y su grado de activación.

PROTEÍNA	TIPO DE MARCADOR	EXPRESIÓN
CD3	Linfocitos T	+
CD4	Linfocitos T CD4	+
CCR6	Linfocitos Th17	+
CD161		+
CXCR3		-
CCR7		-
CD45RO	Linfocitos T memoria efectora	+
CCR9	Homing al intestino	+
$\alpha 4$		+
$\beta 7$		+
HLA-DR	Activación	/
CD38		
CCR5	Co-receptor de entrada del VIH	+

Para la fenotipificación de estos linfocitos se probaron dos paneles de tinción con la finalidad de seleccionar aquel que permitiera la mejor identificación de la población de estudio. Cada panel contenía 14 anticuerpos acoplados a distintos fluorocromos como se muestra en la Tabla 2. Ambos paneles incluían un anticuerpo para la identificación de los linfocitos T CD8+ (en los cuales también se

identificó el grado de activación) y el marcador de viabilidad Live/Dead fixable aqua dead cell stain kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Los anticuerpos utilizados fueron:  $\alpha 4$  BV711, CCR5 PECy5, CD3 Alexa Fluor 700, CD38 Alexa Fluor 700, CD4 Pacific Blue, CD4 PECy5.5 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA),  $\alpha 4$  FITC (MACS Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA),  $\beta 7$  PE, CCR6 PECy7, CCR7 APCy7, CCR7 BV711, CCR9 PerCP Cy 5.5, CD3 BV570, CD8 BV605, CD8 BV650, CD38 BV605, CD45RO BV570, CD45RO BV650, CD161 APC, HLA-DR BV711, HLA-DR BV785 (BioLegend, San Diego, CA, USA), CCR9 Alexa Fluor 488, CXCR3 PECF594 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cada uno de estos anticuerpos fue titulado para seleccionar la dilución adecuada.

Tabla 2. Paneles de tinción probados para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora con la expresión de co-receptor CCR5 y de los linfocitos T CD8+.

MARCADOR	PANEL DE TINCIÓN 1	PANEL DE TINCIÓN 2
CD4	Pacific Blue	PECy5.5
CD8	BV650	BV605
CD3	AlexaFluor 700	BV570
CCR6	PECy7	PECy7
CD161	APC	APC
CXCR3	PECF594	PECF594
CCR7	APC Cy7	APC Cy7
CD45RO	BV570	BV650
CCR5	PE Cy5	PE Cy5
CCR9	PerCPCy5.5	AlexaFluor488
$\alpha 4$	FITC	BV711
$\beta 7$	PE	PE
HLA-DR	BV711	BV785
CD38	BV605	AlexaFluor 700
VIABILIDAD	Aqua Dye	Aqua Dye

#### 10.4.1 Titulación de anticuerpos

El uso de una concentración inadecuada de anticuerpo provoca que la fluorescencia detectada y asociada a un marcador por el equipo sea incorrecta. Por ello fue realizada la titulación de los anticuerpos para seleccionar la concentración adecuada que se utilizaría en los paneles de tinción. La titulación fue realizada en PBMC frescas de individuos sin VIH (muestras obtenidas a partir de paquete globular del Banco de Sangre del INER).

Se ha reportado que la frecuencia de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino en sangre periférica es aproximadamente del 2% (Macal, Sankaran et al. 2008; Mavigner, Cazabat et al. 2012). Por ello se realizó la purificación de linfocitos T a partir de las PBMC para facilitar la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino en sangre periférica, al descartar las poblaciones celulares que no eran de interés.

La purificación de los linfocitos T a partir de PBMC se realizó utilizando el kit de separación magnética negativa EasySep Human T Cell Enrichment (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) que contiene anticuerpos que se unen a los siguientes marcadores: CD14 (en monocitos/macrófagos), CD16 (en células CD, NK y monocitos/macrófagos), CD19 (en linfocitos B y CD), CD20 (en linfocitos B), CD36 (CD, monocitos y macrófagos), CD56 (en NK), CD66b (en granulocitos), CD123 (CD y granulocitos) y Glicoforina A (expresada en eritrocitos).

La purificación se realizó a partir de  $50 \times 10^6$  de PBMC contenidas en un volumen de 1 ml de medio Stem Cell (500 mL de solución de Phosphate Buffered Saline o PBS (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA), 1 mL de EDTA y 10% SFB (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA)). Brevemente, se adicionaron 50  $\mu$ l del cocktail de anticuerpos a las PBMC y se incubó durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación se adicionaron 50  $\mu$ l de la suspensión de perlas magnéticas a las PBMC con anticuerpos y se incubó en movimiento durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó medio Stem Cell hasta alcanzar un volumen final de 5 ml y se colocó dentro de un imán

durante 10 minutos. Por decantación se recuperó el volumen que contenía únicamente linfocitos T los cuales fueron contabilizados con azul de tripano en una cámara de Neubauer.

La titulación en PBMC y linfocitos T purificados se hizo de simultáneamente utilizando células frescas provenientes del mismo paquete globular de individuos sin VIH para evitar variaciones debidas al uso de células de distintos individuos y obtener resultados comparables.

Iniciando con la dilución recomendada por el proveedor para cada anticuerpo se realizaron diluciones seriadas en medio Stem Cell en un volumen final de 50  $\mu$ l. Estos fueron adicionados a un tubo de citometría que contenía  $1 \times 10^6$  células (PBMC o linfocitos T purificados) en aproximadamente 50  $\mu$ l de medio Stem Cell, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Después de esta incubación se adicionó a cada tubo 50  $\mu$ l del anticuerpo CD4 Pacific Blue (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) en una concentración 1:300 y se incubó durante 10 minutos en las mismas condiciones.

Las células fueron lavadas con 2 ml de medio Stem Cell y centrifugadas durante 5 minutos a 2000 revoluciones por minuto (rpm). Finalmente las células fueron fijadas con 350  $\mu$ l de formaldehído al 1% en PBS (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA). Las células se mantuvieron a 4 ° C en ausencia de luz hasta su adquisición en el citómetro de flujo LSRII Fortessa (BD Biosciences). Los datos fueron analizados con el software FlowJo 7.6.5. La concentración seleccionada para cada anticuerpo fue utilizada en los dos paneles de tinción para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino a partir de muestras de sangre periférica.

#### 10.4.2 Tinción de linfocitos Th17 con “homing” al intestino

Para seleccionar el panel óptimo se realizaron pruebas de tinción en PBMC de individuos sin VIH (PBMC separadas a partir de paquete globular del Banco de Sangre del INER). Las PBMC se incubaron durante 24 h en medio Hut (Medio

RPMI 1640 (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA), 1% L-Glutamina, 1% Penicilina/Estreptomicina y 10% SFB (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA) y LPS para estimular la expresión de los marcadores de activación.

*Preparación de mezclas de anticuerpos.* Para identificar las poblaciones positivas y negativas se utilizaron controles de tinción de fluorescencia menos uno (fluorescence minus one o FMO). Para cada panel de tinción se emplearon los siguientes tubos: FMO Viabilidad, FMO CCR9, FMO  $\alpha$ 4, FMO  $\beta$ 7, FMO CXCR3, FMO CCR6, FMO CD161, FMO CCR7, FMO CD45RO, FMO CCR5, FMO HLA-DR, FMO CD38, un tubo de células teñidas con todos los anticuerpos acoplados a fluorocromos (All colors) y uno sin teñir.

La tinción se realizó en tres etapas sucesivas, iniciando con la tinción para el marcador CCR7, seguido por los marcadores CCR6, CXCR3, CCR5 y CCR9. Finalmente se realizó la tinción de CD3, CD4, CD8, CD45RO,  $\alpha$ 4,  $\beta$ 7, CD161, HLA-DR y CD38.

Se prepararon tres mezclas de anticuerpos, considerando un volumen final de 100  $\mu$ l y los títulos elegidos para cada uno de ellos. La primer mezcla solo contenía el anticuerpo para CCR7, como se muestra en la Tabla 3 este anticuerpo se agregó a los tubos all colors y FMO's excepto para el FMO de CCR7.

Tabla 3. Preparación de la primera mezcla de anticuerpos.

	ANTICUERPO	
	CCR7	PBA
FMO Viabilidad	+	+
FMO CCR9	+	+
FMO $\alpha$ 4	+	+
FMO $\beta$ 7	+	+
FMO CXCR3	+	+
FMO CCR6	+	+
FMO CD161	+	+
FMO CCR7		
FMO CD45RO	+	+
FMO CCR5	+	+
FMO HLA-DR	+	+
FMO CD38	+	+
All Colors	+	+

(+) Tubo al que se adiciona CCR7

Como se muestra en la Tabla 4 la segunda mezcla contenía los anticuerpos acoplados a fluorocromos para CCR6, CXCR3, CCR5 y CCR9. En la mezcla correspondiente al FMO de cada anticuerpo, éste no se adicionó.

Tabla 4. Preparación de la segunda mezcla de anticuerpos.

	ANTICUERPOS					PBA
	CCR9	CXCR3	CCR6	CCR7	CCR5	
FMO Viabilidad	+	+	+	+	+	+
FMO CCR9		+	+	+	+	+
FMO $\alpha 4$	+	+	+	+	+	+
FMO $\beta 7$	+	+	+	+	+	+
FMO CXCR3	+		+	+	+	+
FMO CCR6	+	+		+	+	+
FMO CD161	+	+	+	+	+	+
FMO CCR7	+	+	+		+	+
FMO CD45RO	+	+	+	+	+	+
FMO CCR5	+	+	+	+		+
FMO HLA-DR	+	+	+	+	+	+
FMO CD38	+	+	+	+	+	+
All Colors	+	+	+	+	+	+

(+) Tubo al que se adiciona el anticuerpo indicado

En la Tabla 5 se muestra la preparación de la tercera mezcla que contenía los anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD45RO,  $\alpha 4$ ,  $\beta 7$ , CD161, HLA-DR y CD38. En la mezcla correspondiente al FMO de cada anticuerpo, éste no se agregó.

Tabla 5. Preparación de la tercera mezcla de anticuerpos

	ANTICUERPOS									PBA
	CD45RO	$\alpha 4$	$\beta 7$	CD161	HLA-DR	CD38	CD3	CD4	CD8	
FMO Viabilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO CCR9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO $\alpha 4$	+		+	+	+	+	+	+	+	+
FMO $\beta 7$	+	+		+	+	+	+	+	+	+
FMO CXCR3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO CCR6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO CD161	+	+	+		+	+	+	+	+	+
FMO CCR7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO CD45RO		+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO CCR5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMO HLA-DR	+	+	+	+		+	+	+	+	+
FMO CD38	+	+	+	+	+		+	+	+	+
All Colors	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Tubo al que se adiciona el anticuerpo indicado

*Tinción.* A partir de  $1 \times 10^6$  de PBMC se hizo un lavado inicial con 2 ml de PBS a todos los tubos con células excepto el sin teñir y se centrifugaron durante 5 minutos a 200 rpm. Se adicionaron 50  $\mu$ l del marcador de viabilidad (concentración 1:500 en PBS (Lonza BioWhittaker, Visalia, CA, USA)) a cada tubo con células excepto al FMO de viabilidad y se incubó durante 10 minutos en ausencia de luz.

Las células se lavaron con 2 ml de medio Stem Cell y se adicionó la primera mezcla de anticuerpos a los tubos de FMO correspondientes y al all colors, se dejó incubar durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Sin hacer lavado se adicionó la segunda mezcla de anticuerpos y se incubó en las mismas condiciones. Finalmente se adicionó la última mezcla de anticuerpos y se incubó 40 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Las células fueron lavadas con 2 ml de medio Stem Cell y fijadas con 350  $\mu$ l de formaldehído al 1% en PBS.

*Controles de compensación.* Se prepararon controles de compensación para cada anticuerpo utilizando perlas de compensación positivas y negativas (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a las cuales se adicionó 1  $\mu$ l del anticuerpo correspondiente. El control de compensación para el marcador de viabilidad se preparó con perlas de compensación positivas y negativas (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) adicionando 1  $\mu$ l del marcador. Los controles de compensación fueron lavados con 2 ml de medio Stem Cell y fijados con 350  $\mu$ l de formaldehído al 1% en PBS. Las PBMC teñidas y los controles de compensación se mantuvieron a 4°C en ausencia de luz y fueron adquiridos en el citómetro de flujo LSR II Fortessa 24 horas después de la tinción. Los resultados obtenidos fueron analizados en el software FlowJo 7.6.5.



## **11. RESULTADOS**

### **11.1 Características de los grupos de estudio**

Nuestra cohorte se compone de 13 individuos, en tres grupos de estudio descritos en la metodología (sección 11.1): 4 muestras fueron de individuos con VIH sin TAR, 4 de individuos con VIH bajo TAR y 5 de individuos sin VIH. Para cada individuo, se muestran las características demográficas en la Tabla 6 y las características clínicas en la Tabla 7.

Tabla 6. Características demográficas de nuestra cohorte

<b>Individuo</b>	<b>Género</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Lugar de residencia</b>
<b>VIH+ TAR-</b>			
1	H	28	Distrito Federal
2	H	35	Hidalgo
3	H	20	Distrito Federal
4	H	35	Estado de México
<b>VIH+ TAR+</b>			
5	H	34	Distrito Federal
6	H	59	Estado de México
7	M	52	Distrito Federal
8	H	45	Estado de México
<b>VIH-</b>			
9	H	41	Distrito Federal
10	M	33	Morelia
11	H	31	Distrito Federal
12	M	42	Distrito Federal
13	M	35	Hidalgo

H, hombre; M, mujer

Tabla 7. Características clínicas de la población de estudio

	Individuo	Tiempo de infección (años)	T CD4+ (cel/ $\mu$ l)	CV (copias/ml)	TAR	Tiempo con TAR (años)
<b>VIH+ TAR-</b>						
	1	6	821	24309	NA	NA
	2	1	750	43918	NA	NA
	3	2	681	97441	NA	NA
	4	1	488	9576	NA	NA
	<b>Mediana</b>	1.5 (1-6)	715.5 (488-821)	34113.5 (9576-97441)	NA	NA
<b>VIH+ TAR+</b>						
	5	6	486	<40	+	5
	6	7	374	<40	+	5
	7	13	808	<40	+	7
	8	8	509	<40	+	7
	<b>Mediana</b>	7.5 (6-13)	497.5 (374-808)	<40	NA	6 (5-7)
<b>VIH-</b>						
	9	NA	1025	NA	NA	NA
	10	NA	1242	NA	NA	NA
	11	NA	915	NA	NA	NA
	12	NA	889	NA	NA	NA
	13	NA	617	NA	NA	NA
	<b>Mediana</b>	NA	915 (617-1242)	NA	NA	NA

El TAR corresponde al uso de Tenofovir/Emtricitabina/Efavirenz; NA, no aplica. Se muestra la mediana de cada parámetro y se indica el valor mínimo y máximo entre paréntesis.

## 11.2 Titulación de anticuerpos para citometría de flujo en PBMC y linfocitos T purificados

Se titularon 23 anticuerpos, la tinción se realizó en PBMC y linfocitos T purificados para identificar posibles variaciones en el título dependientes de la población según la metodología indicada en la sección 11.4.1. Para la selección del título adecuado se siguió la estrategia de análisis que se muestra en la Figura 20

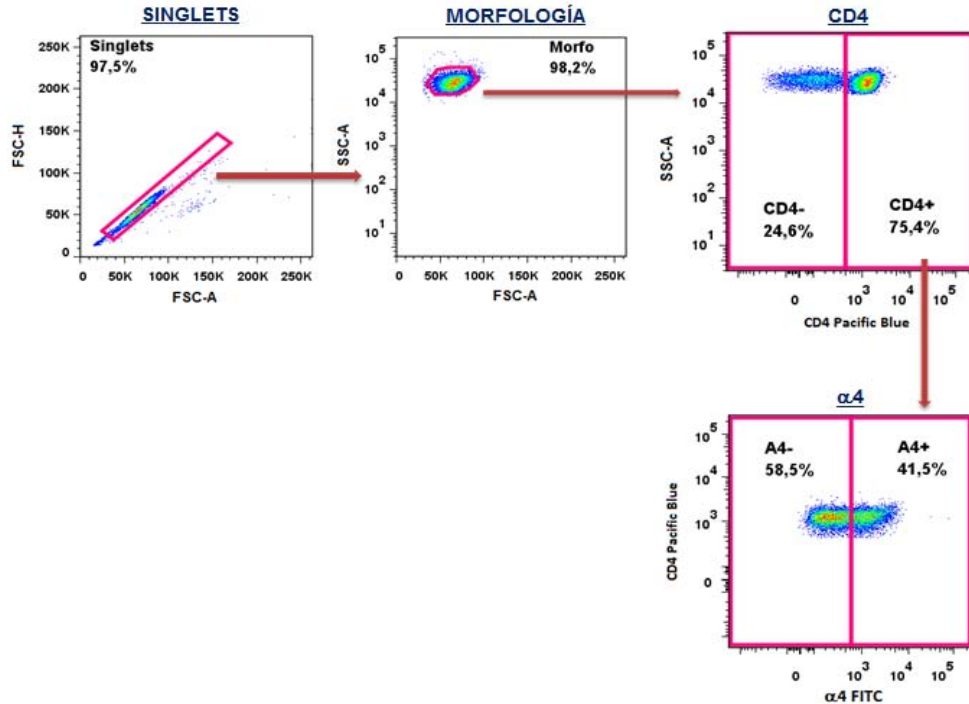


Figura 20. Estrategia de análisis para la selección del título de los anticuerpos. Se muestra un ejemplo representativo. Se inicia con la selección de células no agregadas (singlets) y de los linfocitos por morfología. Utilizando el marcador CD4 Pacific Blue se eligieron los linfocitos T CD4+ y a partir de ellos se identificó la población positiva para el anticuerpo titulado (en este ejemplo corresponde a  $\alpha 4$  FITC).

Para seleccionar la dilución adecuada para cada anticuerpo se consideró la combinación de tres criterios. El primero de ellos fue comparar los dot plots correspondientes a la población del anticuerpo que se tituló. Se seleccionó la dilución en donde se presentó una separación adecuada entre la población positiva y negativa del anticuerpo titulado. El segundo criterio consistió en comparar de manera gráfica el porcentaje de células positivas para el anticuerpo en cada dilución. Se seleccionó la mayor dilución que presentó la menor pérdida en el porcentaje de células positivas comparada con la menor dilución. Finalmente de manera gráfica se comparó la intensidad media de fluorescencia (MFI por sus siglas en inglés) entre las distintas diluciones. Se seleccionó la dilución en la cual el valor del MFI presentó la menor variación respecto a la menor dilución. En la Figura 21 se muestra un ejemplo representativo de la selección del título para el anticuerpo  $\alpha 4$  FITC.

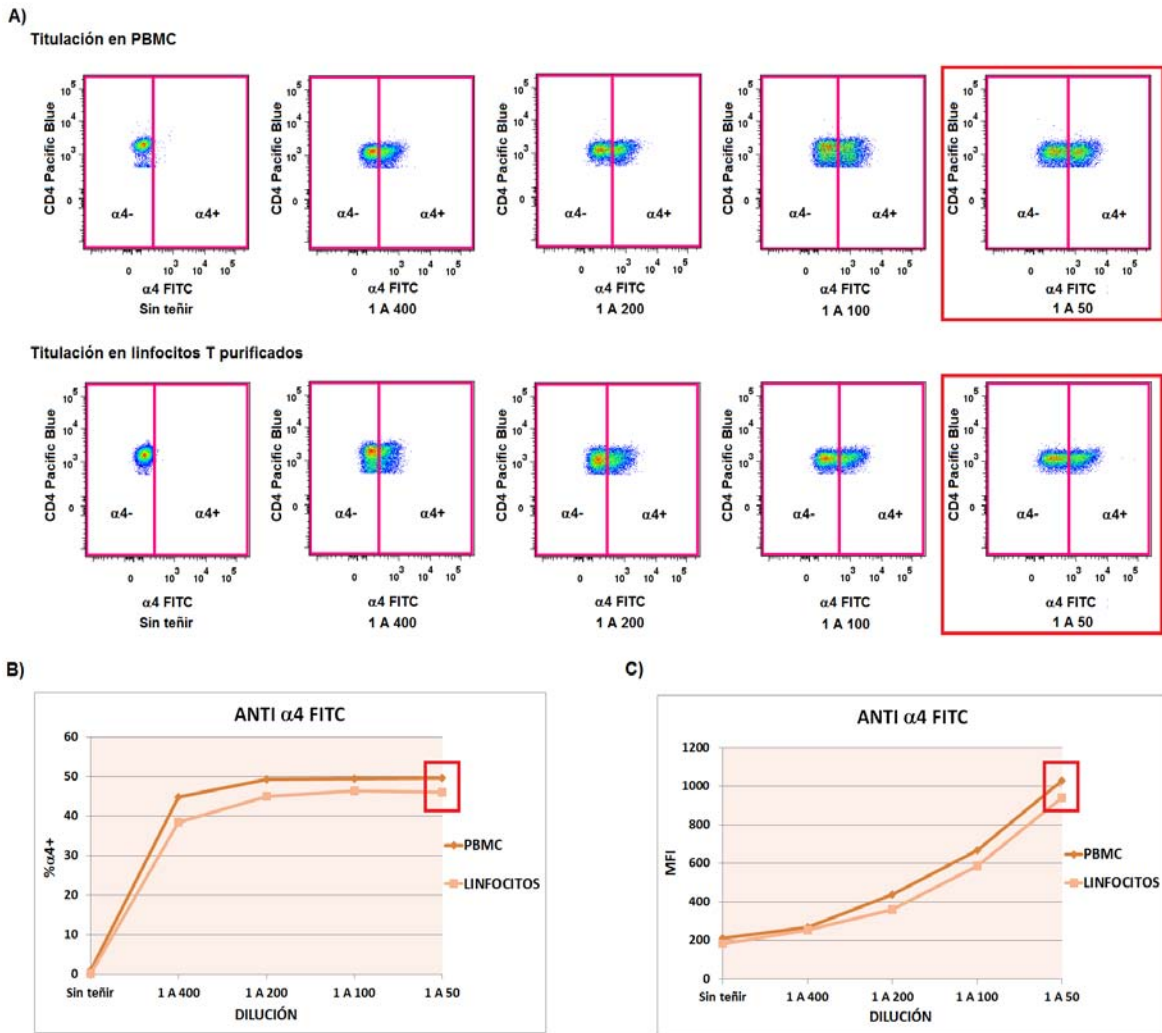


Figura 21. Titulación del anticuerpo  $\alpha 4$  FITC. A) Comparación entre los dot plots de las distintas diluciones realizadas para este anticuerpo. En cada uno de ellos se observa la separación entre la población positiva y negativa que cambia dependiendo de la dilución. B) Gráfica que muestra el porcentaje identificado de células positivas que expresan  $\alpha 4$  FITC en cada dilución. El porcentaje disminuye en menos del 5% entre la menor y mayor dilución. C) Gráfica que muestra el MFI en cada una de las diluciones, se observa en este caso que a mayor dilución el MFI disminuye. Considerando los tres criterios fue seleccionada la dilución 1:50 tanto en PBMC y en Linfocitos purificados.

Este método fue empleado para los 23 anticuerpos que forman los dos paneles que se probaron en este trabajo (Tabla 2, sección 11.4). Los títulos seleccionados en PBMC y Linfocitos T purificados se muestran en la Tabla 9. Los títulos seleccionados para cada anticuerpo fueron utilizados en las pruebas de los paneles diseñados para la fenotipificación de los Linfocitos Th17 con “homing” al intestino.

Tabla 8. Títulos seleccionados para cada anticuerpo en PBMC y linfocitos T purificados

MARCADOR	FLUOROCROMO	TÍTULO SELECCIONADO	
		PBMC	LINFOCITOS T PURIFICADOS
CD4	Pacific Blue	1:300	1:300
CD8	BV650	1:500	1:500
CD8	BV605	1:400	1:400
CD3	Alexa Fluor 700	1:600	1:600
CD3	BV570	1:400	1:400
CCR6	PECy7	1:400	1:400
CD161	APC	1:300	1:300
CXCR3	PECF594	1:200	1:200
CCR7	BV711	1:200	1:200
CCR7	APC Cy7	1:200	1:200
CD45RO	BV570	1:400	1:400
CD45RO	BV650	1:400	1:400
CCR5	FITC	1:10	1:10
CCR5	PECy5	1:10	1:10
CCR9	Alexa Fluor 488	1:100	1:100
CCR9	PerCPCy5.5	1:50	1:50
$\alpha 4$	FITC	1:50	1:50
$\alpha 4$	BV711	1:100	1:100
$\beta 7$	PE	1:100	1:100
HLA-DR	BV711	1:200	1:200
HLA-DR	BV785	1:400	1:400
CD38	Alexa Fluor 700	1:200	1:200
CD38	BV605	1:100	1:100

### 11.3 Selección del panel de tinción para la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino

Los dos paneles indicados en la Tabla 2 (sección 11.4) fueron probados en linfocitos T purificados de un individuo sin VIH estimulados con LPS. La estrategia de análisis para la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora con la expresión del co-receptor CCR5 y el grado de activación medido por la expresión de CD38 y HLA-DR y de los linfocitos T CD8+ se muestra en la Figura 22. La estrategia de análisis mostrada en esta figura fue utilizada para los dos paneles de tinción.

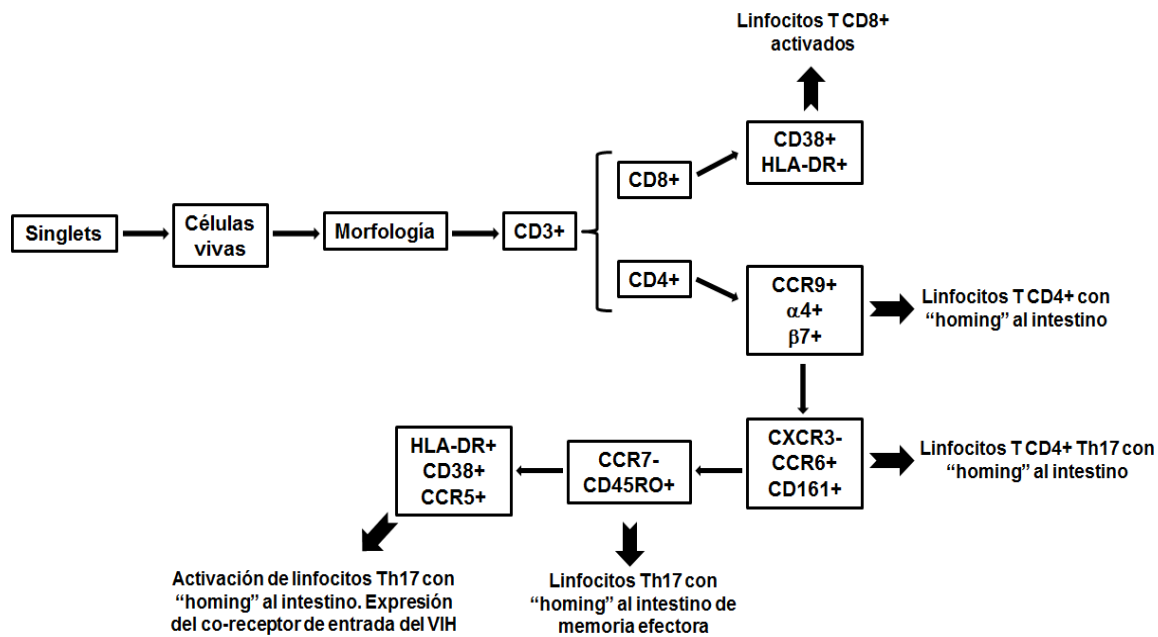


Figura 22. Estrategia de análisis para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino con la expresión del co-receptor CCR5 y el grado de activación de esta población y de los linfocitos T CD8+. Se inició con la selección de los singlets, seguido por la identificación de las células vivas y por morfología se identificaron los linfocitos. A partir de esta última población se seleccionaron los linfocitos T CD3+ y se diferenciaron los linfocitos T CD4+ y T CD8+. En los linfocitos T CD4+ se identificó el “homing” al intestino, seguido por la selección de linfocitos Th17 con memoria efectora y finalmente la expresión del co-receptor CCR5 y el grado de activación. A partir de los linfocitos T CD8+ se identificó el grado de activación.

En la Figura 23A se muestra la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino empleando el panel de tinción 1. La cantidad de linfocitos T CD4+, CCR9+, α4+ y β7+ correspondiente a los linfocitos Th17 con “homing” al intestino fue muy baja (aproximadamente 10 células) por lo que no fue posible continuar el análisis para identificar al fenotipo de interés. Utilizando el panel de tinción 1 fue posible identificar los linfocitos T CD8+ y su grado de activación.

En la Figura 23B se observa la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino empleando el panel de tinción 2. De manera similar a los resultados obtenidos con el panel 1, la cantidad de linfocitos Th17 con “homing” al intestino identificados con el panel de tinción 2 fue aproximadamente de 8 células. Debido a esta baja cantidad de células no se pudo continuar con el análisis para la identificación del fenotipo deseado. Con el panel de tinción 2 se identificaron los linfocitos T CD8+ y su grado de activación.

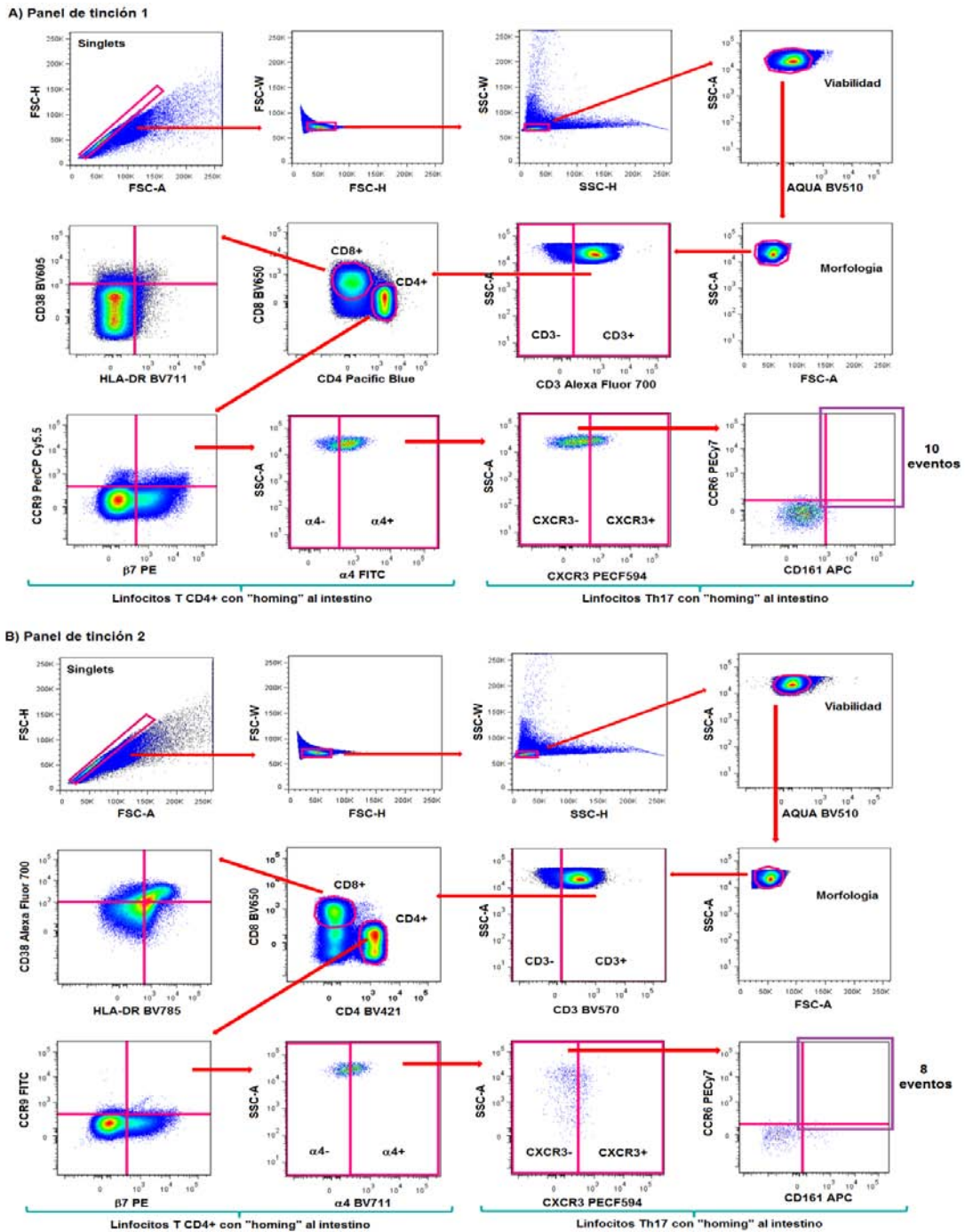


Figura 23. Pruebas del panel para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora, con expresión de I c o-receptor C CR5 y el grado de a ctivación e n es ta población y en los linfocitos T CD8+. A) Se muestra el panel de tinción 1, siguiendo la estrategia de análisis al llegar al fenotipo de linfocitos Th17 con “homing” al intestino (señalado por el cuadro en color morado), solo se identificaron 10 células (eventos). B) Se muestra el panel de tinción 2, solo se i dentificaron 8 eventos c orrespondientes a l os linfocitos T h17 c on “ homing” al i ntestino (señalado por el cuadro en color morado). En ambos paneles se identificó el grado de activación en los linfocitos T CD8+.

Como se muestra en las Figuras 23A y 23B, en ninguno de los dos paneles se logró la identificación adecuada de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora, con expresión del co-receptor CCR5 y su grado de activación. Debido a esto se decidió realizar únicamente la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+, que fue posible identificar adecuadamente en ambos paneles.

#### 11.4 Selección del panel para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino

Para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino se emplearon dos paneles de tinción (Tabla 9) que fueron probados en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas de individuos sin VIH. La tinción se realizó siguiendo la metodología explicada previamente para la fenotipificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino empleando únicamente los anticuerpos mostrados en la Tabla 10.

Tabla 9. Paneles de tinción probados para la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, de los linfocitos T CD8+ y el grado de activación en ambas poblaciones.

MARCADOR	PANEL DE TINCIÓN 1	PANEL DE TINCIÓN 2
CD4	Pacific Blue	PECy5.5
CD8	BV650	BV605
CD3	Alexa Fluor 700	BV570
CCR9	PerCP Cy5.5	Alexa Fluor 488
$\alpha 4$	FITC	BV711
$\beta 7$	PE	PE
HLA-DR	BV711	BV785
CD38	BV650	Alexa Fluor 700
VIABILIDAD	Aqua Dye	Aqua Dye

Los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino se identificaron por la expresión de CD3+, CD4+, CCR9+,  $\alpha 4+$  y la elevada expresión de  $\beta 7+$  ( $\beta 7^{high}$ ) (Gorfu, Nieves et al. 2009; Mavigner, Cazabat et al. 2012). La frecuencia de esta población en



sangre periférica es aproximadamente del 2% (Mavigner, Cazabat et al. 2012). Se continuó con el trabajo experimental considerando como población de interés a los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. La estrategia de análisis mostrada en la Figura 24 fue aplicada para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, de los linfocitos T CD8+ y el grado de activación en ambas poblaciones.

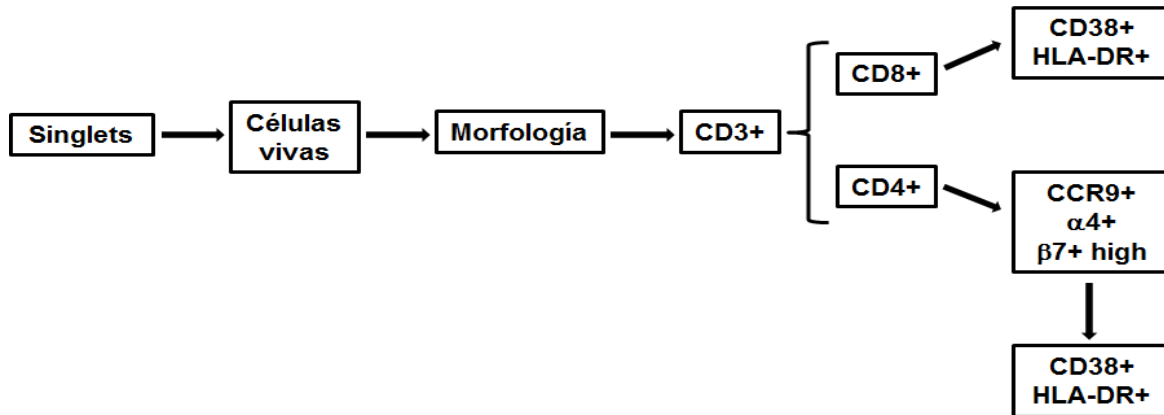
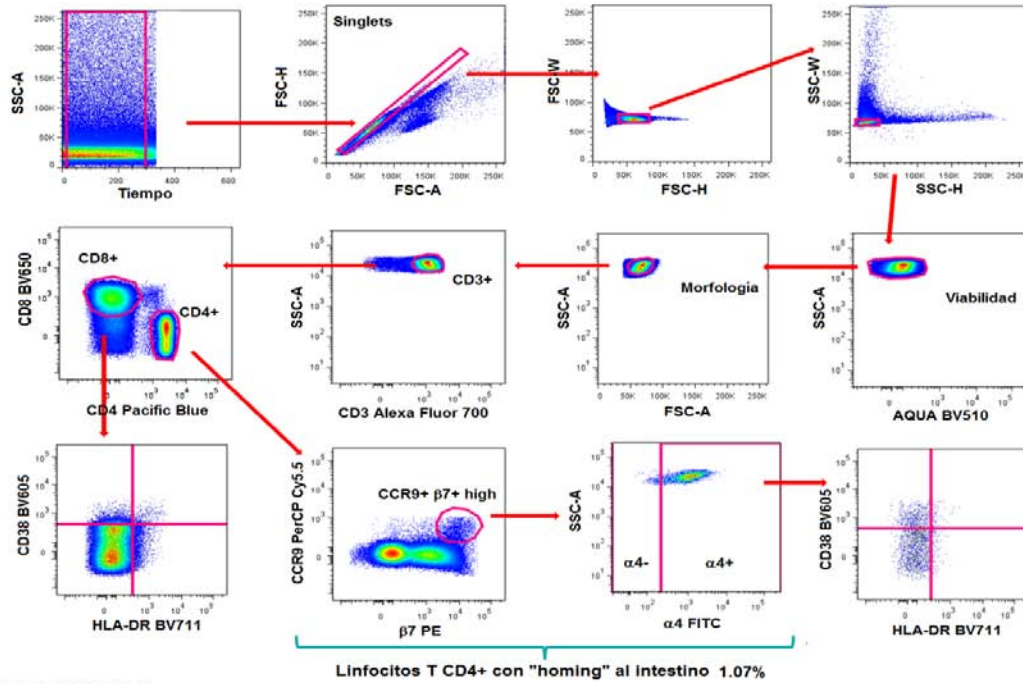


Figura 24. Estrategia de análisis para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, de los linfocitos T CD8+ y el grado de activación en ambas poblaciones. Selección de singlets seguida por la identificación de las células vivas. A partir de esta población se seleccionaron los linfocitos T CD3+ y se diferenciaron las poblaciones CD4+ y CD8+. Dentro de la población de linfocitos T CD4+ se eligió la población con “homing” al intestino. En esta población y en los linfocitos T CD8+ se identificó el grado de activación.

En la Figura 25A se muestra la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, utilizando el panel de tinción 1 (Tabla 9) y la estrategia de análisis mostrada en la Figura 24. Con este panel fue posible la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en una frecuencia de 1.07% de los linfocitos T CD4+. Adicionalmente fue posible identificar el grado de activación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y en los linfocitos T CD8+. En la Figura 25B se muestra la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino empleando el panel de tinción 2 (Tabla 9). La frecuencia de la población de interés fue del 0.316% de los linfocitos T CD4+. Sin embargo el grado de activación solo fue identificado en los linfocitos T CD8+.

A) Panel de tinción 1



B) Panel de tinción 2

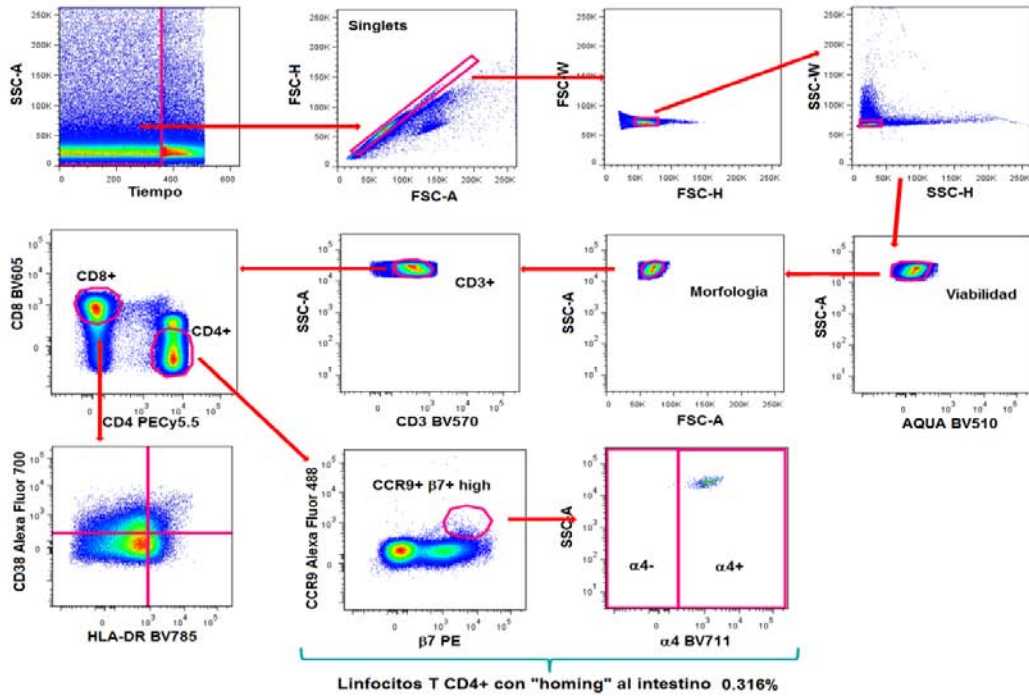


Figura 25. Pruebas de panel para la identificación de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino. A) Se muestra el panel de tinción 1, siguiendo la estrategia de análisis la frecuencia identificada de la población de interés fue de 1.07%. B) Se observa el panel de tinción 2, la frecuencia identificada de la población de interés fue del 0.316%. La frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino es relativa al total de linfocitos T CD4+ totales. En ambos paneles se logró la identificar el grado de activación en la población de interés y en los linfocitos T CD8+.

Comparando la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada en el panel de tinción 1 (1.07%) y en el 2 (0.316%) con la frecuencia de esta población reportada en la bibliografía, que es aproximadamente del 2% (Mavigner, Cazabat et al. 2012), fue seleccionado el panel de tinción 1. Adicionalmente con este panel de tinción se pudo observar de manera adecuada la distribución de las poblaciones en los dot plots. Las siguientes pruebas y las tinciones de las muestras de estudio fueron realizadas empleando el panel de tinción 1.

#### 11.5 Comparación entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas y PBMC congeladas

Las PBMC obtenidas de las muestras de los individuos de estudio fueron congeladas como se indicó en la metodología (sección 11.2). A partir de las PBMC se purificaron los linfocitos T con el fin de identificar posibles variaciones en la frecuencia de la población de interés dependiendo si la purificación se realizaba a partir de PBMC frescas o congeladas. Para ello, se determinó la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas y congeladas. En la Figura 26 se muestra la comparación entre las frecuencias obtenidas en cada experimento.

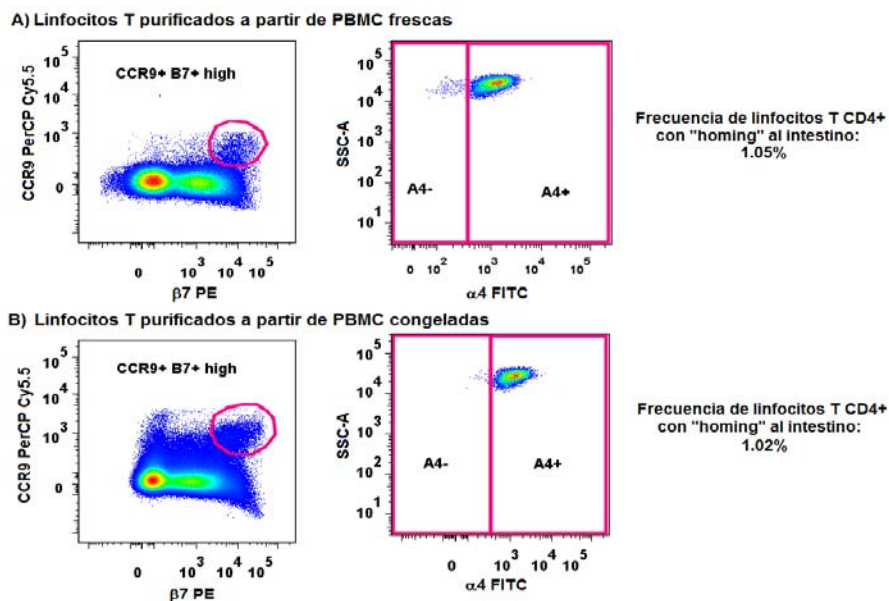


Figura 26. Comparación entre la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> c on “homing” al intestino determinada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas y congeladas. A) La purificación de los linfocitos T se realizó a partir de PBMC frescas. La frecuencia identificada de los linfocitos T con “homing” al intestino fue del 1.95%. B) La purificación de los linfocitos T se realizó a partir de PBMC congeladas. La frecuencia de la población de interés fue del 1.02%.

La frecuencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con “homing” al intestino determinada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas fue del 1.05%, mientras que a partir de PBMC c ongeladas fue d el 1.07% (Figura 26). Las P BMC c ongeladas empleadas tuvieron un periodo de congelación de 6 meses. Este tiempo es similar al periodo de congelación que tuvieron las muestras de estudio.

### 11.6 Comparación en tre la f recuencia de linfocitos T C D4+ c on “ homing” al intestino identificada a partir de PBMC y de linfocitos T purificados

Como se mencionó en la metodología (sección 11.4.1) a p artir de l as P BMC se purificaron los linfocitos T . E n al gunas m uestras de es tudio se s epararon aproximadamente de  $12 \times 10^6$  de PBMC, cantidad i nsuficiente para la purificación de linfocitos T. Debido a esto se realizó una comparación entre la frecuencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con “homing” al intestino identificada a partir de P BMC y de linfocitos T purificados. En este experimento se utilizaron células congeladas de individuos sin VIH (ver Figura 27).

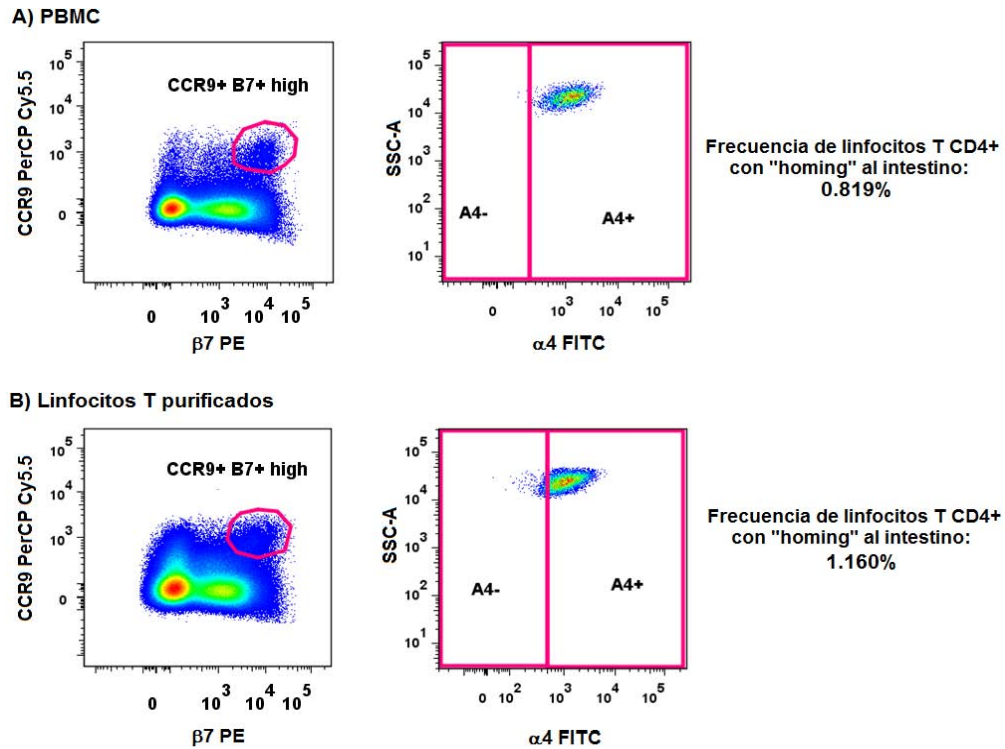


Figura 27. Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino en PBMC y linfocitos T purificados. A) Se observa que la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino identificada a partir de PBMC fue de 0.819%. B) La frecuencia de la población de interés identificada a partir de linfocitos T purificados fue de 1.160%. Ambas frecuencias son relativas al total de linfocitos T CD4+ de cada individuo.

Debido a que la frecuencia de los linfocitos T CD4+ no se observó alterada por el uso de PBMC o linfocitos T purificados, se realizó la purificación en las muestras de los individuos de estudio. Sin embargo en aquellas muestras con células insuficientes para realizar la purificación se utilizaron las PBMC totales.

### 11.7 Identificación de cambios en la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino dependientes del número de PBMC separadas

El número de PBMC separadas en las muestras de estudio fue variable. Para descartar variaciones en la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino debidas al número de PBMC, se separaron PBMC de un individuo sin VIH y se congelaron en viales con  $10 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  y  $50 \times 10^6$  células. A partir de ellas se identificó la frecuencia de la población de interés (Figura 28). Las PBMC

se mantuvieron almacenadas durante un periodo de 6 meses, tiempo similar al de las muestras de estudio.

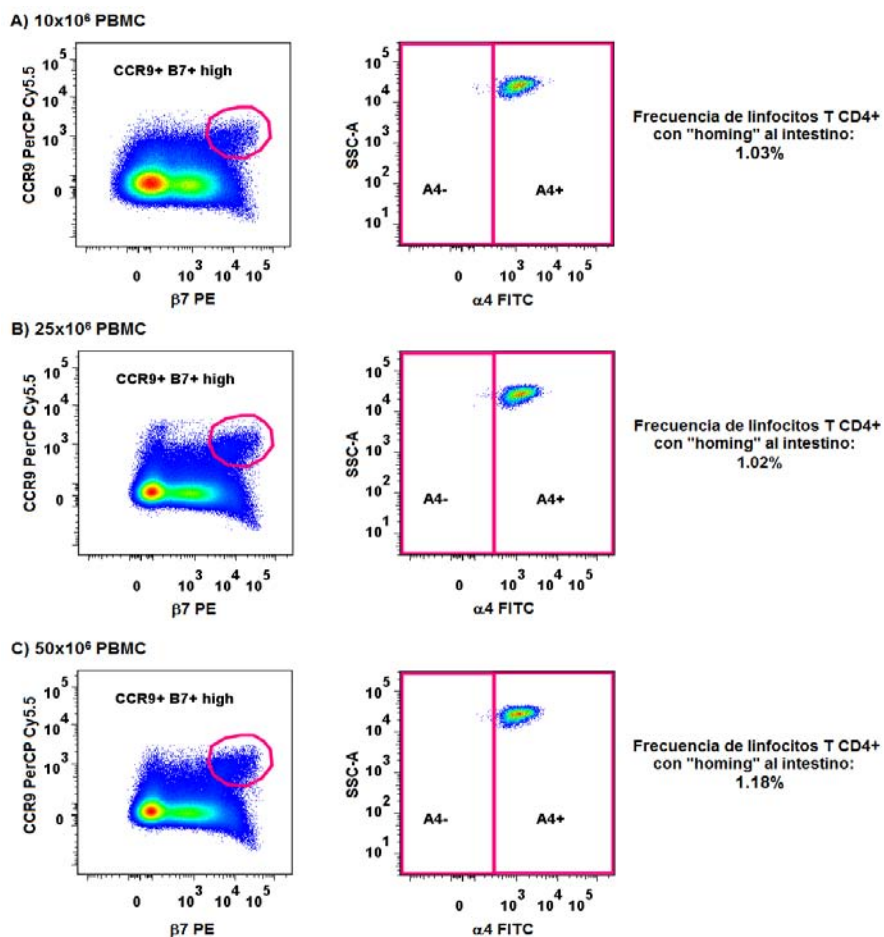


Figura 28. Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino identificadas a partir de  $10 \times 10^6$  (A),  $25 \times 10^6$  (B) y  $50 \times 10^6$  (C) de PBMC congeladas.

### 11.8 Frecuencia y activación de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino y activación de linfocitos T CD8+ en las muestras de estudio

Empleando el panel estandarizado para la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino, se procesaron las muestras de los 13 individuos pertenecientes a los 3 grupos de estudio. En la Tabla 10 se muestran las frecuencias de linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino, el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+ de cada individuo.

Tabla 10. Frecuencias de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y su grado de activación

Individuo	Frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino (%)	Grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino (%)	Grado de activación en los linfocitos T CD8+ (%)
<b>VIH+ TAR-</b>			
1	0.595	7.840	1.890
2	0.826	6.120	2.610
3	0.915	7.500	3.840
4	1.30	1.770	5.230
<b>Mediana</b>	0.871 (0.595-1.30)	6.810 (1.770-7.840)	3.225 (1.890-5.230)
<b>VIH+ TAR+</b>			
5	2.870	1.800	0.346
6	2.580	12.400	0.659
7	1.800	2.760	0.819
8	1.540	2.350	0.665
<b>Mediana</b>	2.190 (1.540-2.870)	2.555 (1.800-12.400)	0.662 (0.346-0.819)
<b>VIH-</b>			
9	1.100	0.539	0.156
10	1.160	3.970	0.962
11	1.010	4.910	0.290
12	0.708	2.120	0.216
13	0.819	1.180	0.321
<b>Mediana</b>	1.010 (0.708-1.160)	2.120 (0.539-4.970)	0.290 (0.156-0.962)

La frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en cada grupo de estudio reportada es relativa al conteo total de los linfocitos T CD4+ para cada individuo. Se muestra la mediana de cada parámetro y se indica el valor mínimo y máximo entre paréntesis.

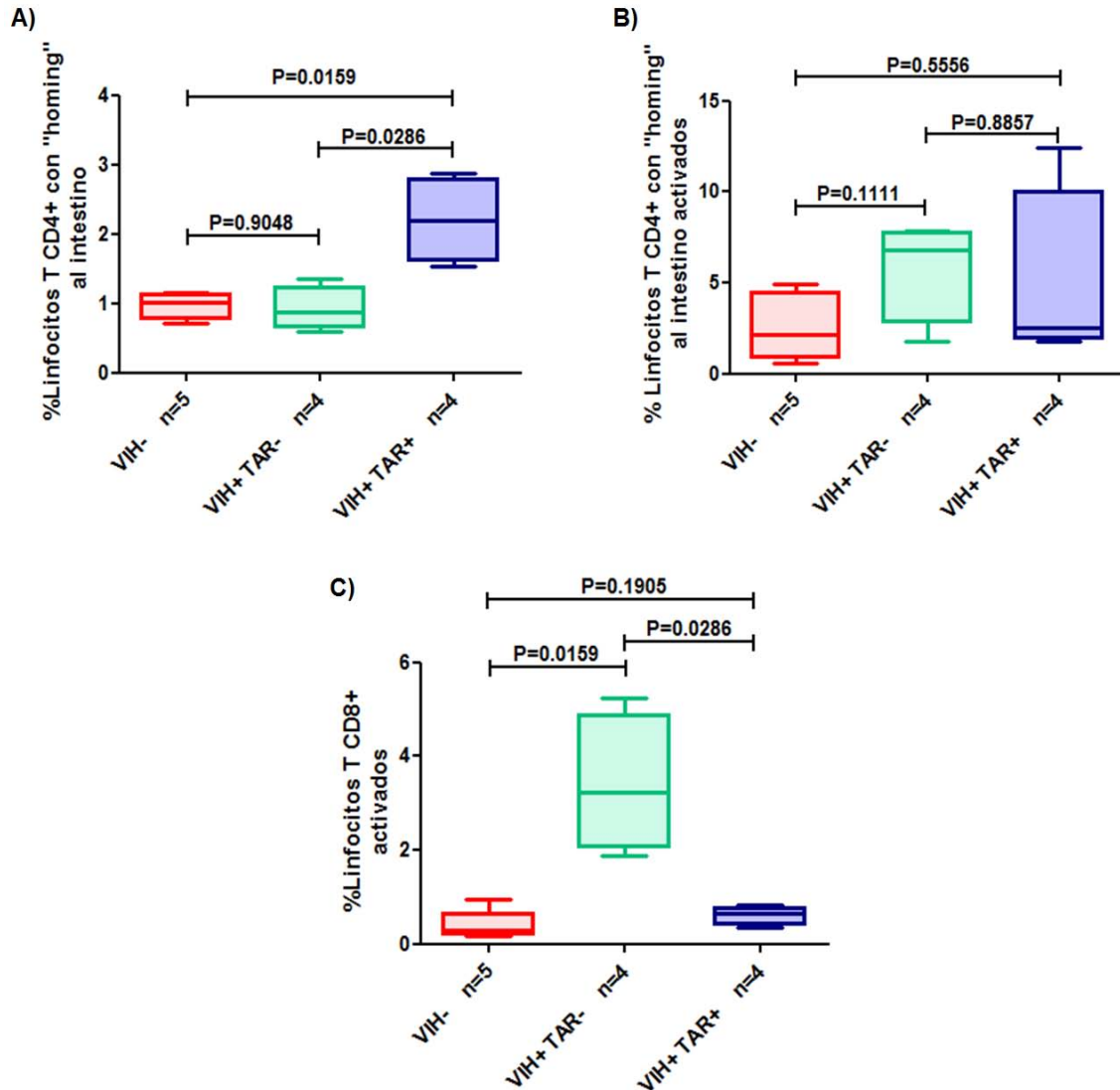


Figura 29. Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino, el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+ en los distintos grupos de estudio. A) Frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino. B) Grado de activación en los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino. C) Grado de activación en los linfocitos T CD8+. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de U de Mann-Whitney. Para una diferencia estadísticamente significativa se consideró  $p < 0.05$ . La línea indica la mediana del grupo. Las cajas muestran el primer y tercer intercuartil (percentiles 25 y 75 respectivamente). Los bigotes señalan el valor mínimo y máximo de cada grupo.

En la Figura 29A se observa que entre las frecuencias de los linfocitos TCD4+ con "homing" al intestino de los individuos sin VIH y con VIH sin TAR (mediana 1.010 y 0.871 respectivamente) la diferencia no es significativa ( $p=0.9048$ ). Entre las frecuencias de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino de individuos sin VIH (mediana de 1.010) y con VIH bajo TAR (mediana de 2.190) hay una diferencia



significativa ( $p=0.0159$ ), es decir, en individuos bajo TAR hay una mayor frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en sangre periférica comparados con individuos sin VIH.

Finalmente, entre la frecuencia de los linfocitos TCD4+ con “homing” al intestino en individuos con VIH sin TAR (mediana de 0.871) e individuos con VIH bajo TAR (mediana de 2.190) se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0286$ ). Esto indica que en sangre periférica hay una mayor frecuencia de linfocitos TCD4+ con “homing” al intestino en individuos con VIH bajo TAR.

En la Figura 29B se muestra que entre el grado de activación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino de los distintos grupos de estudio no hay diferencia significativa ( $p>0.05$ ). En individuos sin VIH la mediana fue de 2.120, con VIH sin TAR el valor de la mediana fue de 6.810 y en individuos con VIH bajo TAR la mediana correspondiente fue de 2.555.

El grado de activación inmunológica de los linfocitos T CD8+ se muestra en la Figura 29C. Entre el grupo de individuos sin VIH (mediana de 0.290) y con VIH sin TAR (mediana de 3.225) se encontró una diferencia significativa en el grado de activación ( $p=0.0159$ ). Entre el grupo de individuos con VIH sin TAR (mediana de 3.225) y de individuos con VIH bajo TAR (mediana de 0.662) se observó una diferencia significativa ( $p=0.0286$ ). Esto indica que en individuos sin TAR es mayor la activación inmune, mientras que el uso del TAR permite una disminución en el grado de activación. En la comparación entre el grupo de individuos sin VIH (mediana de 0.290) y el correspondiente a individuos con VIH bajo TAR (mediana 0.662) no hay diferencia significativa en la expresión de los marcadores de activación ( $p=0.1905$ ).

Se realizaron correlaciones con los datos clínicos de cada individuo y las frecuencias determinadas para los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+ por grupo de estudio (Figura 30). Sin embargo en los individuos con VIH bajo TAR no se observaron correlaciones entre los distintos datos.

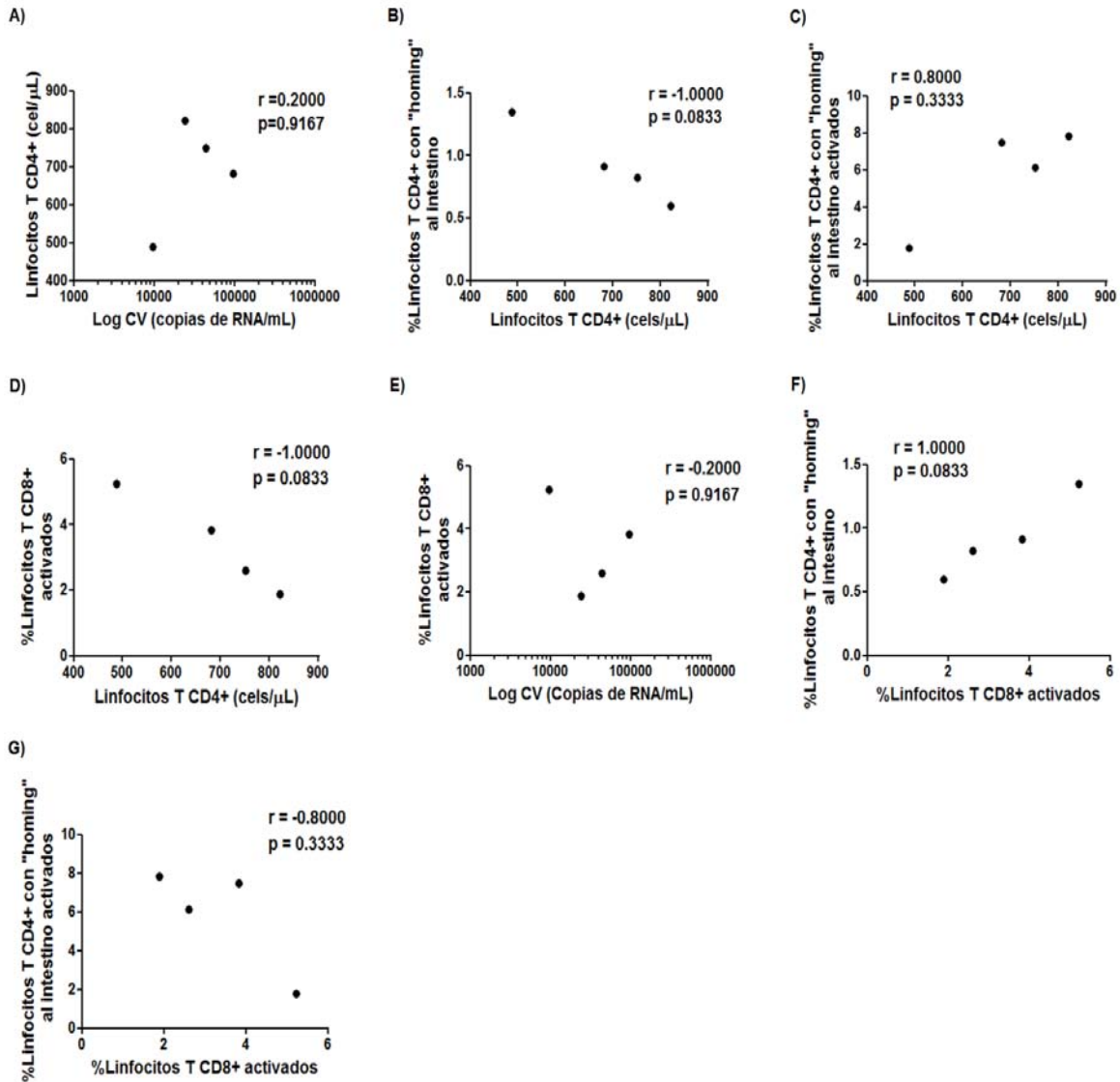


Figura 30. Correlaciones entre las distintas frecuencias determinadas, el conteo de linfocitos T CD4+ y la CV en individuos con VIH sin TAR. A) Correlación de la CV y el conteo de linfocitos T CD4+. B) Correlación entre el conteo de linfocitos T CD4+ y la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino. C) Se muestra la correlación entre el conteo de linfocitos T CD4+ y la frecuencia de linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino. D) Se muestra la correlación entre el conteo de linfocitos T CD4+ y el porcentaje de linfocitos T CD8+ activados. E) Correlación entre la CV y el porcentaje de los linfocitos T CD8+ activados. F) Se observa la correlación entre el porcentaje de los linfocitos T CD8+ activados y los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino y G) Muestra la correlación entre el porcentaje de los linfocitos T CD8+ activados y de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino. Las gráficas presentadas corresponden a correlaciones de Spearman.

## **12. DISCUSIÓN**

### *Grupos de estudio*

Como se muestra en la Tabla 6 (Resultados, sección 12.1) las muestras empleadas corresponden a 13 individuos mexicanos, de los cuales 9 son hombres y 4 mujeres con una mediana de 35 años de edad. En la Tabla 7 (Resultados, sección 12.1) se muestra que el grupo de individuos con VIH sin TAR tiene una mediana de 1.5 años a partir de la detección de la infección, una mediana en el conteo de linfocitos T CD4+ de 715.5 cel/ $\mu$ l y en la CV de 34113.5 copias/ml. El conteo de linfocitos T CD4+ en este grupo de estudio es elevado considerando que un individuo sin VIH presenta un conteo aproximado de 1000 cel/ $\mu$ l (Macal, Sankaran et al. 2008; Chevalier, Petitjean et al. 2013). En otros estudios relacionados a linfocitos T CD4+ y Th17 con “homing” al intestino se ha reportado un conteo de linfocitos T CD4+ en individuos con VIH sin TAR desde 325 cel/ $\mu$ l y una CV de 48000 copias/ml (Chenge, Sheth et al. 2011) hasta 490 cel/ $\mu$ l con una CV de 37000 copias/ml (Chevalier, Petitjean et al. 2013).

Los individuos pertenecientes al grupo con VIH bajo TAR presentaron una mediana de 7.5 años a partir de la detección de la infección y 6 años con uso del TAR (Tabla 6 Resultados, sección 12.1). La mediana del conteo de linfocitos T CD4+ fue de 497.5 cel/ $\mu$ l y una CV indetectable (Tabla 7 Resultados, sección 12.1). El grupo de individuos sin VIH presentó una mediana de 915 cel/ $\mu$ l (Tabla 6 Resultados, sección 12.1) valor similar al reportado en la bibliografía (Macal, Sankaran et al. 2008; Chevalier, Petitjean et al. 2013).

### *Selección del panel de tinción para la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino*

Para la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora y el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+, se diseñaron dos paneles de tinción mostrados en la Tabla 2 (Metodología, sección

11.4). La estrategia de análisis mostrada en la Figura 22 (Resultados, sección 12.3) y los paneles de tinción fueron propuestos considerando marcadores que han sido reportados previamente para la identificación independiente de los linfocitos Th17 (Kleinschek, Boniface et al. 2009; Ancuta, Monteiro et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2010; Annunziato, Cosmi et al. 2012), con “homing” al intestino (Gorfu, Nieves et al. 2009; Mavigner, Cazabat et al. 2012). Marcadores empleados para la identificación de la subpoblación de células de memoria efectora (Macal, Sankaran et al. 2008). Marcadores usados en la identificación del grado de activación (Brenchley, Price et al. 2006) y CCR5 como co-receptor de entrada para el VIH y marcador de activación (Wilén, Tilton et al. 2012; Martínez, Barrosoa et al. 2014).

En este proyecto se diseñó un panel y una estrategia de análisis que permitieron la identificación de la población que presentara de manera simultánea los marcadores mencionados. Sin embargo el uso de varios anticuerpos puede generar interacciones entre ellos. Adicionalmente el uso de distintos fluorocromos acoplados al mismo anticuerpo puede permitir una visualización distinta de la misma población. Por ello se probaron dos paneles con distintas combinaciones de anticuerpos.

En la Figura 23A (Resultados, sección 12.3) se muestra la estrategia de análisis en el panel de tinción 1. En este panel se pudo identificar de manera adecuada a los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Como se puede observar en la Figura 23A las poblaciones positivas y negativas en cada dot plot fueron diferenciadas de manera adecuada. Sin embargo al identificar el fenotipo de linfocitos Th17 con “homing” al intestino (linfocitos T CD3+, CD4+, CCR9+,  $\beta$ 7+,  $\alpha$ 4+, CXCR3-, CCR6+, CD161+) correspondiente al último dot plot mostrado, únicamente 10 eventos presentaron este fenotipo. Debido al escaso número de eventos el análisis no fue continuado.

Considerando que la población de linfocitos Th17 con “homing” al intestino en sangre periférica es aproximadamente del 2% (Mavigner, Cazabat et al. 2012), al realizar el análisis para la identificación de las subpoblaciones el número de

eventos disminuyó hasta ser insuficientes para continuar con la estrategia de análisis.

En la Figura 23B (Resultados, sección 12.3) se muestra el panel de tinción 2. Con el uso de este panel las poblaciones positivas y negativas pudieron ser identificadas de manera adecuada. Sin embargo en la identificación de los linfocitos Th17 con “homing” al intestino (linfocitos T CD3+, CD4+, CCR9+,  $\beta$ 7+,  $\alpha$ 4+, CXCR3-, CCR6+, CD161+) solo 8 eventos cumplieron con este fenotipo, por lo cual no se pudo continuar con el análisis propuesto.

Estas pruebas de panel fueron realizadas en linfocitos T purificados de individuos sin VIH. Empleando estas células en ambos paneles se identificó un escaso número de eventos (8 y 10 eventos) correspondientes a linfocitos Th17 con “homing” al intestino. Como ya fue mencionado durante la infección por VIH hay una depleción de los linfocitos T CD4+ tanto en sangre periférica como en GALT (Brenchley, Price et al. 2006; Langford, Ananworanich et al. 2007). Por lo cual se esperaba que la cantidad de linfocitos Th17 con “homing” al intestino de memoria efectora, en las muestras de individuos con VIH fuera menor. Debido a esto se puede explicar por qué no logramos identificar la población de interés a partir de muestras con VIH empleando los paneles y la estrategia de análisis propuestos.

Tomando en cuenta estos criterios se optó por la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Para ellos se realizaron nuevamente pruebas de paneles para la identificación de esta población.

#### *Selección del panel para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino*

Fueron probados dos paneles de tinción, mostrados en la Tabla 9 (Resultados, sección 12.4) para la fenotipificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Para la identificación de la población de interés se siguió la estrategia de análisis mostrada en la Figura 24 (Resultados, sección 12.4). El panel se

seleccionó en base a dos criterios, el primero de ellos fue que mostrara una distribución adecuada de las poblaciones positivas y negativas en los dot plots. El segundo criterio considerado fue la frecuencia de linfocitos T CD4+ que fue identificada por cada panel. La frecuencia determinada fue comparada con la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en sangre periférica que ha sido reportada previamente. Se han reportado frecuencias del 1% (Chenge, Sheth et al. 2011) y del 2% aproximadamente (Mavigner, Cazabat et al. 2012)

La Figura 25A (Resultados, sección 12.4) muestra el panel de tinción 1. Empleando este panel las poblaciones positivas y negativas fueron identificadas adecuadamente en cada dot plot. La frecuencia de linfocitos T CD4+ identificados en este panel fue del 1.07%. Adicionalmente se pudo identificar el grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y en los linfocitos T CD8+.

En la Figura 25B (Resultados, sección 12.4) correspondiente al panel de tinción 2, se observa que las poblaciones positivas y negativas pueden ser identificadas en cada dot plot. Con el empleo de este panel solo se determinó una frecuencia de 0.314% correspondiente a linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Debido a la baja frecuencia de esta población el grado de activación no pudo ser identificado. Mientras que en los linfocitos T CD8+ el grado de activación sí pudo ser determinado.

Comparando ambos paneles, se observa una diferencia importante en el dot plot correspondiente a la población positiva para los marcadores CCR9+ y  $\beta 7^{high}$ . Considerando que en ambos paneles se emplearon las células del mismo individuo sin VIH, de manera visual en el panel de tinción 1 hay una mayor cantidad de células que presentan ambos marcadores comparadas con las observadas en el panel 2. Lo cual se comprueba con las frecuencias identificadas de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, siendo mayor en el panel de tinción 1 (1.07%) que en el panel de tinción 2 (0.314%).

Esta variación en las frecuencias puede ser debida al uso de distintos anticuerpos en cada panel. Como se puede observar en ambas figuras (Figura 25A y B) el uso de diferentes anticuerpos genera que la distribución de las poblaciones sea distinta en cada dot plot e incluso que se identifique una menor frecuencia en alguna población.

La frecuencia identificada de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en el panel 1 ( 1.07%) es similar a la reportada previamente. Se han reportado frecuencias del 1% (Chenge, Sheth et al. 2011) hasta del 2% aproximadamente (Mavigner, Cazabat et al. 2012) en sangre periférica. Adicionalmente con el primer panel se logró la identificación del grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y en los linfocitos T CD8+. Con estos resultados obtenidos se eligió el panel de tinción 1 para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en sangre periférica.

*Comparación entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas y PBMC congeladas*

En la Figura 26A (Resultados, sección 12.5) se muestran los dot plots y la frecuencia correspondiente a los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Esta frecuencia fue del 1.05% y se determinó en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas. Mientras que en la Figura 26B se muestran los dot plots y la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada en linfocitos T purificados a partir de PBMC congeladas (el tiempo de congelación fue de 6 meses). La frecuencia en esta población correspondió al 1.02%.

En ambas figuras (Figura 26A y B) se observa que se logró identificar la población CCR9+ y  $\beta 7^{high}$ . Mientras que la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, determinada en linfocitos T purificados a partir de PBMC frescas (1.05%) y congeladas (1.02%) fue similar. Con esta prueba se determinó que la frecuencia de la población de interés no fue alterada por el empleo de linfocitos T

purificados a partir de PBMC frescas o congeladas. Es decir, de acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento el almacenamiento de las PBMC a una temperatura de  $-150^{\circ}$  en nitrógeno líquido, no alteró la expresión de los marcadores que proporcionan el “homing” al intestino (CCR9+,  $\beta 7^{\text{high}}$  y  $\alpha 4+$ ).

*Comparación entre la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada a partir de PBMC y de linfocitos T purificados*

En la Figura 27A (Resultados, sección 12.6) se muestran los dot plots y la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino determinada a partir de PBMC congeladas. La frecuencia de la población de interés a partir de PBMC fue del 0.819%. Mientras que en la Figura 27B se muestran los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificados a partir de linfocitos T purificados. La frecuencia identificada de la población de interés fue del 1.160%.

Al comparar los dot plots correspondientes al experimento realizado a partir de PBMC y linfocitos T purificados (Figura 27A y B respectivamente), en ambos casos se identificó de manera adecuada a los linfocitos con fenotipo CCR9+,  $\beta 7^{\text{high}}$  y  $\alpha 4+$ . Respecto a las frecuencias determinadas en cada prueba (0.819% a partir de PBMC y 1.160 en linfocitos T purificados) existe una variación entre ambos valores. Esta variación puede deberse a que las muestras empleadas en estos experimentos pertenecen a dos individuos diferentes sin VIH. Debido a esto se esperaba encontrar alguna variación entre las frecuencias de la población de interés. Sin embargo, los valores identificados a partir de PBMC y linfocitos T purificados son similares a los reportados que van desde el 1% (Chenge, Sheth et al. 2011) hasta del 2% aproximadamente (Mavigner, Cazabat et al. 2012).

Debido a que se demostró que el uso de PBMC o linfocitos T purificados no altera la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, se determinó que en las muestras con PBMC insuficientes para la purificación se emplearían las PBMC totales.



### *Identificación de cambios en la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino dependientes del número de PBMC separadas*

Fueron descartadas posibles variaciones en la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino de acuerdo al número de PBMC separadas. Para ello se hizo una comparación entre los dot plots y las frecuencias de la población de interés a partir de  $10 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  y  $50 \times 10^6$  de PBMC congeladas. Comparando los dot plots que se muestran en la Figura 28 (Resultados, sección 12.7) de manera visual se puede observar que en los tres casos se puede identificar claramente la población de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino.

Las PBMC empleadas en este experimento pertenecen al mismo individuo, por lo cual se esperaba que las frecuencias de la población de interés fueran similares. La frecuencia a partir de  $10 \times 10^6$  de PBMC fue del 1.03%, en  $25 \times 10^6$  fue del 1.02% y en  $50 \times 10^6$  de PBMC la frecuencia corresponde al 1.18%. Entre las frecuencias no hay una variación que indique que la cantidad de PBMC a partir de las cuales se hizo el análisis, interfiera en la cantidad identificada de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Debido a que en las muestras de estudio el número de PBMC separadas fue variable (desde  $12 \times 10^6$  hasta  $60 \times 10^6$  de PBMC), con estos resultados se descartó alguna posible interferencia en la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, debidas al número de PBMC separadas.

### *Frecuencia y activación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino*

En la Tabla 10 (Resultados, sección 12.8) se muestran las frecuencias de linfocitos T CD4+ con “homing” de cada una de las muestras de estudio de los diferentes grupos. Esta información se muestra de manera gráfica en la Figura 29A (resultados, sección 12.8), en la cual se muestra la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en cada grupo de estudio.

El primer grupo de estudio mostrado en esta gráfica (Figura 29A) corresponde a los individuos sin VIH. Este grupo presentó una mediana en la frecuencia de la población de interés del 1.01. Este es un valor similar al reportado previamente que comprende desde el 1% al 2% aproximadamente (Chenge, Sheth et al. 2011; Mavigner, Cazabat et al. 2012). Se observa que las frecuencias de la población de interés comprendidas entre el 25% y el 50% de la población se encuentran más dispersas que entre el 50% y 75%. El segundo grupo de estudio corresponde a los individuos con VIH sin TAR. En este grupo se identificó una mediana del 0.871 (la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en individuos con VIH sin TAR no ha sido reportada previamente). Se puede observar que la distribución de las frecuencias es mayor entre el 50% y el 75% de los datos. El último grupo de estudio corresponde a individuos con VIH bajo TAR, el cual presentó una mediana de 2.190. En este grupo se observa que la mediana se encuentra al centro de la caja, indicando que la distribución de las frecuencias de la población de interés es homogénea.

Comparando las medianas del grupo de individuos sin VIH y con VIH sin TAR no se encontró diferencia entre ellas. Como y a ha sido mencionado durante la infección por el VIH hay una disminución en la cantidad de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (Langford, Ananworanich et al. 2007) y en GALT (Brenchley, Price et al. 2006; McMichael, Borrow et al. 2010; Marchetti, Tincati et al. 2013). Debido a esto, se esperaba encontrar una disminución en la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino de individuos con VIH sin TAR comparada con la de individuos sin VIH. Sin embargo las medianas de ambas poblaciones son similares entre sí (0.871 en individuos con VIH sin TAR y 1.010 en individuos sin VIH).

Se ha reportado una correlación positiva entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica y GALT (Mavigner, Cazabat et al. 2012). Basados en esta correlación podemos indicar que al haber una cantidad elevada de linfocitos T CD4+ en sangre periférica, en el GALT la cantidad de esta población también es elevada. Debido a esto, la cantidad de linfocitos TCD4+ con “homing” al intestino

en sangre periférica no ha sido alterada de manera considerable. Esto permite explicar que haya una frecuencia similar de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino de individuos con VIH sin TAR y sin VIH.

Comparando la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en el grupo de individuos con VIH sin TAR y el grupo con VIH bajo TAR, se encontró una diferencia entre ambas frecuencias (0.871 y 2.190 respectivamente). En Mavigner, Cazabat et al. 2012 se demostró que en individuos con VIH bajo TAR la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino se encuentra elevada en sangre periférica comparada con individuos sin VIH. En este estudio se empleó una cohorte que presentó una mediana de 5.5 años bajo TAR, un conteo de linfocitos T CD4+ de 668 cel/ $\mu$ l y una frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino del 6% aproximadamente. Mientras que en nuestro estudio la mediana del TAR corresponde a 6 años, el conteo de linfocitos T CD4+ fue de 497.5 cel/ $\mu$ l y la frecuencia de la población de interés del 2.190%.

La frecuencia de la población de interés que fue reportada en Mavigner, Cazabat et al. 2012 es mayor (6%) a la que fue determinada en este trabajo (2.190%). Considerando el conteo de los linfocitos T CD4+ se observa que en la referencia, hubo un mayor conteo de linfocitos T CD4+ en sangre periférica. Esto indica una mayor recuperación de esta población, incluyendo a los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino que se mantiene en circulación. Mientras que en nuestro grupo de estudio hay una menor recuperación de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica y de la población de interés. Sin embargo se encontró diferencia entre la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino entre los individuos con VIH sin TAR e individuos con VIH bajo TAR como se esperaba.

Se ha propuesto que en individuos con VIH bajo TAR hay una recuperación de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, sin embargo solo se mantienen en circulación y por lo tanto su frecuencia es mayor que individuos sin VIH (Mavigner, Cazabat et al. 2012). Considerando esto, se esperaba observar una elevación en la frecuencia de la población de interés en individuos con VIH bajo TAR comparada con individuos sin VIH. En individuos sin VIH se determinó una

frecuencia del 1.010% y en individuos con VIH bajo TAR fue del 2.190%. Esto indica que en los individuos sin VIH los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino se mantuvieron en GALT y en circulación solo se identificaron aquellos que se dirigían del sitio inductor hacia el GALT como ha sido reportado (Gorfu, Nieves et al. 2009; Mavigner, Cazabat et al. 2012). Y en individuos con VIH bajo TAR se observó una mayor frecuencia de la población de interés, demostrando su mantenimiento en sangre periférica como se esperaba.

#### *Grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino*

En la Figura 29B (Resultados, sección 12.8) se muestra de manera gráfica el grado de activación identificado en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. El primer grupo de estudio son los individuos sin VIH. La mediana del grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino de este grupo fue del 2.120%. Se observa que hay una menor distribución de las frecuencias en el primer cuartil comparado con el tercero. En el segundo grupo de estudio correspondiente a los individuos con VIH sin TAR se determinó una activación del 6.810%. Las frecuencias de este grupo se encuentran con una mayor dispersión en el primer cuartil mientras que en el tercero es menor. Finalmente en el tercer grupo correspondiente a los individuos con VIH bajo TAR se determinó un grado de activación del 2.555% y se muestra una mayor dispersión de los datos en tercer cuartil.

Se sabe que durante la infección por VIH distintas poblaciones celulares son alteradas y presentan distintos marcadores de activación (Langford, Ananworanich et al. 2007; McMichael, Borrow et al. 2010). Entre estas poblaciones se encuentran los linfocitos T CD4+ (Langford, Ananworanich et al. 2007). Tanto en el estudio realizado por Jain, Hartogensis et al. 2013 como en el realizado por Hunt, Martin et al. 2003 se identificó el grado de activación esta población. En individuos sin VIH se muestra un grado de activación del 4% aproximadamente, en individuos con VIH sin TAR fue del 10% y en individuos con VIH bajo TAR fue

cercana al 5% (frecuencias similares en ambos estudios). Considerando estas frecuencias, el comportamiento en el grado de activación en los linfocitos T CD4+ fue similar al mostrado por los linfocitos T CD8+ (Butler, Valdez et al. 2011; Jain, Hartogensis et al. 2013).

Sin embargo el grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, no ha sido reportado previamente. En base a lo reportado en los linfocitos T CD4+, se esperaba un comportamiento similar en nuestra población de interés. Entre individuos sin VIH e individuos con VIH sin TAR no se encontró diferencia significativa en el grado de activación de la población de interés (mediana del 2.120% y 6.810% respectivamente). De manera gráfica se puede observar que la mediana del grado de activación en los individuos con VIH sin TAR se encuentra elevada comparada con la correspondiente a los individuos sin VIH. Sin embargo al ser bajo el número de individuos en cada grupo (sin VIH n=5 y con VIH sin TAR n=4) la dispersión de un solo evento modifica el análisis estadístico. Esta dispersión evita que se identifique una diferencia significativa entre los grupos. Como ya fue mencionado en ambos grupos hay una dispersión de los datos. Considerando esta dispersión y el bajo número de individuos en cada grupo se explica la ausencia de la diferencia significativa entre ambos grupos.

Entre el grado de activación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino del grupo de individuos con VIH sin TAR y con VIH bajo TAR (6.810% y 2.555% respectivamente) no se encontró diferencia significativa. Sin embargo la mediana correspondiente al grupo de individuos con VIH sin TAR es mayor a la mediana de los individuos bajo TAR. En este último grupo se observa que hay una gran dispersión de los datos en el tercer intercuartil. De manera similar al análisis anterior, el bajo número de individuos en cada grupo (con VIH sin TAR n=4 y con VIH bajo TAR n=4) y la dispersión de los datos interfiere en la identificación de una diferencia significativa entre los grupos.

Finalmente entre el grupo de individuos sin VIH y con VIH bajo TAR no se identificó una diferencia significativa. Comparando los valores de las medianas (sin VIH 2.120% y con VIH bajo TAR 2.555%) se observa que son similares a pesar de

la amplia distribución de los datos en el grupo de individuos con VIH bajo TAR. Aunque no se logró identificar diferencias significativas entre los grupos, la comparación entre las medianas permite identificar que los individuos con VIH sin TAR presentan el mayor grado de activación. Mientras que el uso del TAR contribuye a la disminución del grado de activación sin embargo sigue siendo superior al de individuos sin VIH. Posiblemente un incremento en el número de individuos por grupo permitiría identificar la presencia de diferencias significativas.

#### *Grado de activación en los linfocitos T CD8+*

Durante la infección por VIH hay una activación crónica del sistema inmunológico (Vergis and Mellors 2000; Hunt, Martin et al. 2003; Hunt 2007; Klatt, Funderburg et al. 2013). El grado de activación del sistema inmunológico identificado a través de los linfocitos T CD8+, es empleado como un marcador de la progresión de la infección (Hunt 2007). El grado de activación en la infección por VIH ha sido ampliamente estudiado. Se sabe que en individuos con VIH sin TAR llega a presentar un grado de activación desde el 50% (Butler, Valdez et al. 2011; Jain, Hartogensis et al. 2013) hasta el 80% (Chevalier, Petitjean et al. 2013) dependiendo de las características clínicas del grupo de estudios. Mientras que el uso del TAR contribuye a la disminución del grado de activación sin llegar al de un individuo sin VIH (Hunt, Martin et al. 2003; Butler, Valdez et al. 2011; Jain, Hartogensis et al. 2013).

En la Figura 29C (Resultados, sección 12.8) se muestra el grado de activación en los individuos sin VIH. La mediana corresponde a 0.290% y los datos correspondientes al tercer intercuartil se encuentran más dispersos. La mediana del grupo de individuos con VIH sin TAR fue de 13.225% y de acuerdo a lo observado en la gráfica se presentó una baja dispersión de la población. Mientras que la mediana del grado de activación en el grupo de individuos con VIH bajo TAR fue del 0.662% y la dispersión de los datos se puede considerar homogénea.

Comparando el grado de activación en individuos sin VIH y el perteneciente a los individuos con VIH sin TAR, se encontró una diferencia significativa entre las medianas de cada grupo como se esperaba. Sin embargo el grado de activación determinado en individuos con VIH sin TAR es bajo (3.225%), considerando que se ha reportado un grado de activación aproximado del 50% en esta población (Butler, Valdez et al. 2011; Jain, Hartogensis et al. 2013). En el estudio realizado por Chevalier, Petitjean et al. 2013 presenta un grupo de estudio de individuos con VIH sin TAR con un conteo de linfocitos T CD4+ de 490 c el/ $\mu$ l (menor al conteo de nuestro grupo de estudio). En este estudio se determinó el grado de activación del sistema inmunológico y los individuos con VIH sin TAR presentaron un grado de activación desde el 2% hasta el 15%, incluyendo valores similares a los determinados en nuestro grupo de estudio.

Entre los valores del grado de activación correspondientes a los grupos de individuos con VIH sin TAR y con VIH bajo TAR se encontró una diferencia significativa. El grupo con VIH sin TAR presentó una mediana del grado de activación del 3.225% y en el grupo con VIH bajo TAR fue de 0.662%. Estos valores indican que el uso del TAR ha contribuido a la disminución del grado de activación. Retomando el estudio realizado por Chevalier, Petitjean et al. 2013 en donde se consideró un grupo de individuos con VIH bajo TAR con un conteo de linfocitos T CD4+ de 750 c el/ $\mu$ l, se determinó un grado de activación en los linfocitos T CD8+ menor al 2%, un valor similar al determinado en nuestro grupo de estudio.

Comparando las medianas del grado de activación del grupo sin VIH y del grupo con VIH bajo TAR (0.290% y 0.662% respectivamente) no se encontró alguna diferencia significativa entre ambos grupos. Esto indica que el grado de activación disminuyó en los individuos bajo TAR. Si comparamos el valor de las medianas de cada grupo podemos observar que son similares, sin embargo en los individuos con VIH bajo TAR el grado de activación continua siendo un poco mayor que en individuos sin VIH. En general el grado de activación en los tres grupos de estudio se comporta de acuerdo a lo reportado previamente. Siendo mayor en individuos

con VIH sin TAR y disminuyendo en los individuos que se encuentran bajo TAR sin llegar al nivel de los individuos sin VIH.

*Correlaciones de los datos clínicos y las frecuencias determinadas para los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino*

Empleando los datos clínicos mostrados en la Tabla 7 (Resultados, sección 12.1) y las frecuencias determinadas en cada grupo de estudio se hicieron graficas de correlaciones. En la Figura 30A (Resultados, sección 12.8) se muestra la correlación correspondiente a la CV y el conteo de linfocitos T CD4+ en el grupo de individuos con VIH sin TAR. En esta primera correlación se observa que a mayor CV el conteo de linfocitos T CD4+ es menor. Esto es debido al incremento en la replicación viral y la depleción de los linfocitos T CD4+ durante el curso de la infección (McMichael, Borrow et al. 2010; Butler, Valdez et al. 2011).

La Figura 30B (Resultados, sección 12.8) corresponde a la correlación entre el conteo de linfocitos T CD4+ y la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino (individuos con VIH sin TAR). Se muestra una correlación negativa entre ambos parámetros, la cual indica que a mayor conteo de linfocitos T CD4+ hay una menor frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Esta correlación puede interpretarse considerando que a mayor conteo de linfocitos T CD4+ hay una mayor cantidad de esta población en GALT (Mavigner, Cazabat et al. 2012). Por lo tanto si la depleción de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en el GALT es baja, la diferenciación de linfocitos con este fenotipo también lo será y por lo tanto se detectará una menor frecuencia de esta población en sangre periférica.

La correlación en la Figura 30C (Resultados, sección 12.8) muestra el conteo de los linfocitos T CD4+ y el grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en el grupo de individuos con VIH sin TAR. Como ya fue mencionado se esperaba que el grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino fuera similar al que presentan los linfocitos T CD8+. Es decir



que a mayor grado de activación menor conteo de linfocitos T CD4+ (Butler, Valdez et al. 2011; Jain, Hartogensis et al. 2013). Sin embargo se observa una correlación contraria a la esperada. Esta correlación se modifica por un solo punto (punto correspondiente al menor conteo de linfocitos T CD4+ y menor grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino), debido a esto y a que solo se están considerando cuatro valores no es posible dar una conclusión sobre la correlación entre estas poblaciones.

En la Figura 30D (Resultados, sección 12.8) se observa que la correlación entre el grado de activación en los linfocitos T CD8+ y el conteo de los linfocitos T CD4+ es negativa (en el grupo con VIH sin TAR). Esto indica que al haber un mayor grado de activación en los linfocitos T CD8+ hay una mayor progresión de la infección y por lo tanto se observa un menor conteo en los linfocitos T CD4+. Esta correlación coincide con lo reportado previamente (Hunt 2007; Butler, Valdez et al. 2011).

Se sabe que una mayor CV indica una mayor replicación viral y por lo tanto un aumento en la depleción de los linfocitos T CD4+. Esto contribuye a un incremento en el grado de activación que se ve reflejado en una mayor frecuencia de linfocitos T CD8+ que expresan CD38 y HLA-DR (Paiardini and Trutwin 2013). Esto pudo ser comprobado en nuestro grupo de estudio de individuos con VIH sin TAR como muestra la correlación de la Figura 30E (Resultados, sección 12.8).

En la Figura 30F (Resultados, sección 12.8) se muestra una correlación positiva entre el grado de activación en los linfocitos T CD8+ y la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino (individuos con VIH sin TAR). Esta correlación puede ser interpretada considerando que una mayor activación del sistema inmunológico podría indicar de forma indirecta una mayor alteración en el GALT (Brenchley, Price et al. 2006; Klatt, Funderburg et al. 2013). Debido a esto se esperaría un mayor diferenciación de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y por lo tanto una mayor frecuencia de esta población en sangre periférica. Mientras que en un menor grado de activación se esperaría una menor

diferenciación de la población de interés y por lo tanto la cantidad en sangre periférica sería menor.

En la última gráfica de correlaciones mostrada en la Figura 30G (Resultados, sección 12.8) contrario a lo que se esperaba, se observa una correlación negativa entre la cantidad de linfocitos T CD8+ activados y la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino activados (individuos con VIH sin TAR). Para la interpretación de esta correlación se propone considerar la Figura 30F. La cual indica que al haber un mayor grado de activación del sistema inmunológico, en sangre periférica hay una mayor frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Como ya ha sido mencionado estos linfocitos corresponden a la población que va desde las Placas de Peyer o los ganglios linfáticos mesentéricos, hacia el GALT después de su diferenciación (Gorfu, Nieves et al. 2009; Shale, Schiering et al. 2013). Por lo tanto se podría esperar que estos linfocitos aún no hayan sido activados debido a que fueron tomados en circulación antes de llegar al GALT.

Estas correlaciones fueron realizadas para el grupo de individuos con VIH bajo TAR. Sin embargo en este grupo no se encontraron correlaciones. Esto puede ser debido a que cada individuo muestra una recuperación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino distinta. Esta variación puede depender del momento en que inició con la TAR o de características propias del individuo bajo TAR. (Macal, Sankaran et al. 2008; Chenge, Sheth et al. 2011).

Es importante mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo experimental deben ser considerados como un primer acercamiento al comportamiento de las poblaciones. Esto es debido a que el número de individuos en cada grupo de estudio bajo (sin VIH n=5, con VIH sin TAR n=4 y con VIH bajo TAR n=4). Como ya fue mostrado la dispersión de un solo dato puede afectar la correlación entre dos poblaciones. Por lo tanto sería recomendable incrementar el número de individuos en cada grupo de estudio para identificar claramente las correlaciones existentes entre las poblaciones.

### **13. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron la estandarización de un panel de tinción para la identificación de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino, el grado de activación en esta población y en los linfocitos T CD8+. Esta identificación se logró a partir de muestras de sangre periférica de los tres grupos de estudio: individuos sin VIH, con VIH sin TAR e individuos con VIH bajo TAR.

Se demostró que distintas condiciones de la muestra como el empleo de células frescas o congeladas, el tipo de población teñida (PBMC o linfocitos T purificados), el periodo de almacenamiento y la cantidad de PBMC separadas, no altera la frecuencia de linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino identificada en cada muestra.

Las frecuencias de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino en individuos sin VIH y con VIH sin TAR fueron similares. Como fue mencionado el conteo de linfocitos T CD4+ entre ambas poblaciones también fueron similares. Estos resultados sugieren que la frecuencia de la población de interés en individuos con VIH sin TAR se encuentra relacionada con el conteo de linfocitos T CD4+. Y por lo tanto la determinación de la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino podría ser empleada en combinación con el conteo de linfocitos T CD4+ para conocer de manera indirecta el estado del GALT.

En el grupo de individuos con VIH bajo TAR se determinó una mayor frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino. Indicando de manera indirecta que el daño en el GALT se mantiene, presentándose una disminución en la expresión de CCL25 y  $\alpha 4\beta 7$ . Por lo tanto la población de interés se mantiene en circulación. Este resultado permite tomar en consideración que una mayor frecuencia de la población de interés en individuos bajo TAR indica una baja reconstitución del GALT.

En este trabajo se logró la identificación del grado de activación en los linfocitos T CD4+ “homing” al intestino, el cual no había sido reportado previamente. Se identificó que hay un mayor grado de activación en los individuos con VIH sin TAR,

el cual disminuye en individuos bajo TAR hasta valores similares al de los individuos sin VIH. Estos resultados junto a las frecuencias de la población de interés, se complementan para sugerir a los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino como un marcador complementario al conteo de linfocitos T CD4+ y la CV para tener un panorama más amplio de la progresión de la infección.

Adicionalmente se logró la identificación del grado de activación del sistema inmunológico mediante la expresión de los marcadores de activación en los linfocitos T CD8+. Los resultados obtenidos en los tres grupos de estudio coinciden con el comportamiento reportado.

Los resultados obtenidos a partir de las correlaciones entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino y los parámetros clínicos (conteo de linfocitos T CD4+ y CV) en individuos con VIH sin TAR, permiten conocer de manera indirecta el posible estado del GALT. Esto complementa y refuerza la propuesta de emplear los linfocitos T CD4+ con "homing" al intestino como un marcador complementario para conocer la progresión de la infección.

## **14. PERSPECTIVAS**

En el presente trabajo se obtuvieron resultados que permiten tomar en consideración a los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino como una población importante durante la infección por el VIH. La alteración en su frecuencia tiene distintas repercusiones que representan nuevas áreas de investigación, como pueden ser:

- Identificar alguna relación entre la frecuencia de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino y la presencia de ciertas poblaciones bacterianas en el lumen intestinal.
- Realizar estudios longitudinales que permitan identificar el comportamiento de los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino durante la infección por el VIH.
- Realizar estudios longitudinales que contemplen el grado de activación en los linfocitos T CD4+ con “homing” al intestino durante la infección por el VIH.

## **15. REFERENCIAS**

Abbas, A. K., A. Lichtman, et al. (2012). Immunología celular y molecular, Elsevier.

Afani, A. and A. Gallardo (2011). "Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana." Revista chilena de infectología **28**(5): 461-469.

Altfeld, M., L. Fadda, et al. (2011). "DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1." Nature reviews. Immunology **11**(3): 176-186.

Ambrose, Z. and C. Aiken (2014). "HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins." Virology **454-455**: 371-379.

Ancuta, P., P. Monteiro, et al. (2010). "Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis." Current opinion HIV/AIDS **5**(2): 158-165.

Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2012). "Defining the human T helper 17 cell phenotype" Trends in immunology **33**(10): 505-512.

Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2010). "Human and murine Th17." Current opinion HIV/AIDS **5**(1): 114-119.

Arts, E. and D. Hazuda (2012). "HIV-1 antiretroviral drug therapy." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**(4): 1-16.

Benito, N., A. Moreno, et al. (2012). "Pulmonary infections in HIV-infected patients: an update in the 21st century." European Respiratory Journal **39**: 730-745.

Bixler, S. L. and J. J. Mattapallil (2013). "Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infections." Clinical and developmental immunology **2013**: 1-9.

Brenchley, J. and D. Douek (2008). "HIV infection and the gastrointestinal immune system" Mucosal Immunology **1**(1): 23-30.

Brenchley, J., D. Price, et al. (2006). "HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?" Nature immunology **7**(11): 235-239.

Brenchley, J., T. Schacker, et al. (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract." The journal of experimental medicine **200**(6): 749-759.

Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." Nature medicine **12**(12): 1365-1371.

Burton, D. R. (2006). "Images from the surface of HIV." Nature immunology **441**(15): 817-818.

Butler, S. L., H. Valdez, et al. (2011). "Disease-modifying therapeutic concepts for HIV in the era of highly active antiretroviral therapy." Journal of acquired immune deficiency syndromes **58**(3): 297-303.

Capaldo, C. T., A. E. Farkas, et al. (2014). "Proinflammatory cytokine-induced tight junction remodeling through dynamic self-assembly of claudins." Molecular biology of the cell: 1-26.

CENSIDA, C. N. p. I. P. y. e. C. d. V. S. (2012). Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH: 1-286.

CENSIDA, C. N. p. I. P. y. e. C. d. V. y. e. S. (2014). Informe Nacional de avances en la respuesta al VIH y el SIDA. S. d. Salud. México: 320.

Cohen, M., G. M. Shaw, et al. (2011). "Acute HIV-1 infection." The New England journal of medicine **364**(20): 1943 - 1954.

Costiniuk, C. and J. A. Angel (2012). "Human immunodeficiency virus and the gastrointestinal immune system: does highly active antiretroviral therapy restore gut immunity?" Mucosal Immunology **5**(6): 596-604.

Craigie, R. and F. Bushman (2012). "HIV Integration." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**(7): 1-18.

Chang, C., M. Crane, et al. (2013). "HIV and co-infections." Immunological reviews **254**(1): 114-142.

Chenge, D., P. M. Sheth, et al. (2011). "Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy " AIDS **25**(6): 741-749.

Chevalier, M. F., G. Petitjean, et al. (2013). "The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation." PLoS Pathogenes **9**(6): 1-13.

Dandekar, S. (2007). "Pathogenesis of HIV in the gastrointestinal tract." Current HIV/AIDS reports **4**(1): 10-15.

Dandekar, S., M. D. George, et al. (2010). "Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier." Current opinion HIV/AIDS **5**(2): 173-178.

Douek, D., L. Picker, et al. (2003). "T cell dynamics in HIV-1 infection " Annual Review of Immunology **21**: 265-304.

Ford, E., C. Puro, et al. (2009). "Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV infection: The calm before the storm." Current opinion HIV/AIDS **4**(3): 206-214.

Fujimura, K., N. A. Slusher, et al. (2010). "Role of the gut microbiota in defining human health." Expert review of anti-infective therapy **8**(4): 435-454.

Gorfu, G., J. R. Nieves, et al. (2009). "Role of  $\beta$ 7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention." Current molecular medicine **9**(7): 836-850.

Guadalupe, M., E. Reyes, et al. (2003). "Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy." Journal of Virology **77**(21): 11708-11717.

Hill, D. and D. Artis (2010). "Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis." Annual Review of Immunology **28**: 623-627.

Hunt, P. (2007). "Role of immune activation in HIV pathogenesis." Current HIV/AIDS reports **4**(1): 47-47.



Hunt, P., J. Martin, 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 diseases **187**(10): 1534-1543.

Hunt, P. W. (2012). "HIV and inflammation: Mechanisms and consequences." Current HIV/AIDS reports **9**(2): 139-147.

Jain, V., W. Hartogensis, et al. (2013). "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.

Kalinina, O., N. Pfeifer, et al. (2013). "Modelling binding between CCR5 and CXCR4 receptors and their ligands suggests the surface electrostatic potential of the co-receptor to be a key player in the HIV-1 tropism." Retrovirology **10**: 2-11.

Klatt, N., N. Funderburg, et al. (2013). "Microbial translocation, immune activation, and HIV disease." Trends in Microbiology **21**(1): 6-13.

Klatt, N. R. and J. M. Brechley (2010). "Th17 cell dynamics in HIV infection." Current opinion HIV/AIDS **5**(2): 135-140.

Kleinschek, M. A., K. Boniface, et al. (2009). "Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation." The journal of experimental medicine **206**(3): 525-534.

Kolls, J. K. and S. A. Kherad (2010). "The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity." Cytokine & Growth factor reviews **21**(6): 443-448.

Kramski, M., A. J. Gaeguta, et al. (2011). "Novel Sensitive Real-Time PCR for Quantification of Bacterial 16S rRNA Genes in Plasma of HIV-Infected Patients as a Marker for Microbial Translocation." Journal of clinical microbiology **49**(10): 3691-3693.

Kunkel, E. J., J. J. Campbell, et al. (2000). "Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity." The journal of experimental medicine **192**(5): 761-768.

Kurashima, Y., Y. Goto, et al. (2013). "Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation." European journal of immunology **43**(12): 3108-3115.

Langford, S., J. Ananworanich, et al. (2007). "Predictors of disease progression in HIV infection: a review." AIDS Research and therapy **4**(11): 1-14.

Leitner, J., P. Steinberger, et al. (2010). "Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes." Immunology letters **128**(2): 89-97.

Lindbom, B. J. and W. W. Agace (2007). "Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa." Immunological reviews **2015**: 226-242.

Macal, M., S. Sankaran, et al. (2008). "Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses." Mucosal Immunology **1**(6): 475-488.

Marchetti, G., C. Tincati, et al. (2013). "Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS." Clinical microbiology reviews **26**(1): 2-18.

Martínez, L., R. Barroso, et al. (2014). "CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(19): 1960-1969.

Mavigner, M., M. Cazabat, et al. (2012). "Altered CD4+ T cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals." The journal of clinical investigation **122**(1).

Maynard, C. L., C. O. Elson, et al. (2012). "Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system." Nature immunology **489**(7415): 231-241.

McGeachy, M. J. and D. J. Cua (2008). "Th17 cell differentiation: The long and winding road." Immunity **28**(4): 445-453.

McMichael, A., P. Borrow, et al. (2010). "The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development." Nature reviews **10**(1): 11-23.

Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nature reviews. Immunology **3**(4): 331-341.

Neish, A. (2009). "Microbes in gastrointestinal health and disease." Gastroenterology **136**(1): 65-80.

OMS, O. M. d. I. S. (2013). Directrices unificadas sobre el uso de medicamentos antirretrovíricos para el tratamiento y la prevención de la infección por el VIH: Sinopsis de las características y recomendaciones principales: 1-16.

Paiardini, M. and M. M. Rutwin (2013). "HIV-associated chronic immune activation." Immunological reviews **254**(1): 78-101.

Pawlowski, A., M. Jansson, et al. (2012). "Tuberculosis and HIV co-infection." PLoS Pathogenes **8**(2): 1-7.

Pelaseyed, T., J. H. Bergstrom, et al. (2014). "The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system." Immunological reviews **260**(1): 8-20.

Piller, S. C., L. Caly, et al. (2003). "Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): The achilles heel of HIV?" Current Drug Targets **4**(5): 409-429.

Sandler, N. G. and D. C. Douek (2012). "Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities." Nature reviews. Microbiology **10**(9): 665-666.

Shale, M., C. Schiering, et al. (2013). "CD4+ T cell subsets in intestinal inflammation." Immunological reviews **252**(1): 164-182.

Shaw, G. and E. Hunter (2012). "HIV transmission." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**(11): 1-14.

Sundquist, W. and H.-G. Krausslich (2012). "HIV-1 Assembly, budding and maturation." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**: 1-24.

Turner, B. and M. Summers (1999). "Structural biology of HIV." Journal of Molecular Biology **285**(1): 1-32.

Veldhoen, M. and V. B. Waldert (2012). "Dietary influences on intestinal immunity." Nature Reviews. Immunology **12**(10): 696-708.

Vergis, E. and J. Mellors (2000). "Natural history of HIV-1 infection." Infectious disease clinics of North America **14**(1): 809-825.

Vyas, J. M., A. G. V. de Veen, et al. (2008). "The unknowns of antigen processing and presentation" Nature reviews. Immunology **8**(8): 607-608.

Wang, C., S. G. Kang, et al. (2010). "Retinoic acid determines the precise tissue tropism of inflammatory T<sub>H</sub>17 cells in the intestine." Journal of immunology **184**(10): 5519-5526.

Wilens, C., J. Tilton, et al. (2012). "HIV: Cell binding and entry." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **4**(8): 1-10.

Zetola, N. and C. Pilcher (2007). "Diagnosis and management of acute HIV infection." Infectious disease clinics of North America **26**(4): 995-1010.