



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio comparativo de subpoblaciones de linfocitos B en
sangre y ganglio en las diferentes etapas de la infección por
el VIH.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Andrea Montiel Armendariz



DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Perla Mariana Del Río Estrada

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Montiel

Armendariz

Andrea

55 31 30 79 61

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

312322797

2. Datos del tutor

Dra.

Perla Mariana

Del Río

Estrada

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Leonor

Huerta

Hernández

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Ismael

Mancilla

Herrera

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Héctor Enrique

Espinosa

Arciniega

6. Datos del sinodal 4

M en C.

Ángel Cuauhtémoc

León

Flores

7. Datos del trabajo escrito

Estudio comparativo de subpoblaciones de linfocitos B en sangre y ganglio en las diferentes etapas de la infección por el VIH.

76

2019

Resumen

Los linfocitos B son los productores de anticuerpos ante la infección de agentes patógenos. En la infección por VIH el estudio de la respuesta humoral se ha centrado en la producción de anticuerpos altamente neutralizantes, dejando de lado el estudio de las células que los producen. Aunado a esto, la dificultad ética y metodológica de obtener tejido linfoide ha hecho difícil la caracterización de estas células en humanos adultos. En este estudio identificamos las diferencias relacionadas a las diferentes etapas de la infección por el VIH y a la localización celular en diferentes subpoblaciones de linfocitos B en muestras de humanos adultos. De acuerdo con nuestros resultados, este cambio en los porcentajes se explica por el cambio de fenotipo de los linfocitos convencionales hacia fenotipos exhaustos y disfuncionales. No observamos cambios en el porcentaje de las subpoblaciones con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de localización en la infección por VIH, sin embargo, encontramos que la distribución de estas subpoblaciones es específica para cada tejido. En este estudio concluimos que en la infección por VIH hay un aumento en las poblaciones disfuncionales de linfocitos B, mientras que los linfocitos B naive y de memoria convencional están disminuidos. Este estudio es un aporte importante en el estudio de diversas subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide en la infección por VIH en humanos adultos.

Tabla de Abreviaturas

AGUDO: Grupo de participantes en la etapa aguda de la infección por el VIH

BCR: Receptor de antígeno de células B

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades

CG: Centro germinal

CIENI: Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas

CRÓNICO: Grupo de participantes en la etapa crónica de la infección por el VIH

Ig: Inmunoglobulina

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

LNMC: Células mononucleares de tejido linfoide secundario

MA: Linfocitos B de memoria activada

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MR: Linfocitos B de memoria en reposo

MTT: Linfocitos B de memoria tipo tejido

N: Linfocitos B naive

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

SIDA: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida

TAR: Tratamiento antirretroviral

Tfh: Linfocito T folicular cooperador

VIH NEG: Grupo de participantes sin VIH

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VIS: Virus de la Inmunodeficiencia Simiana

A mi familia y amigos, por el apoyo incondicional y las palabras de aliento.

Índice

Hoja de Datos del Jurado	ii
Resumen	iii
Tabla de Abreviaturas	iv
Índice.....	1
Introducción.....	4
1.1 Epidemiología e Historia de la infección por el VIH.....	4
1.2 Estructura del VIH.....	6
1.3 Historia natural de la infección por el VIH	7
1.4 Fase aguda de la infección por el VIH	9
1.5 Fase crónica de la infección por el VIH.....	10
1.6 Fase de SIDA.....	11
1.7 Sistema inmunológico	11
1.8 Linfocitos B	12
1.9 Linfocitos B de memoria.....	14
1.10 Tejido linfoide secundario y activación de linfocitos.....	15
1.11 Inmunoglobulinas	18
1.12 Alteraciones de la respuesta inmune por la infección por el VIH.	20
Hipótesis.....	23
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Metodología.....	24
4.1 Características de la cohorte de estudio	24

4.2 Obtención y separación de PBMC y LNMC	25
4.3 Análisis fenotípico	26
4.4 Estrategia de análisis	26
4.5 Análisis estadístico.....	28
Resultados	29
5.1 Porcentaje de linfocitos B totales en sangre y tejido en las diferentes etapas de la infección por el VIH.	29
5.2 Porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas en sangre y tejido linfoide.	30
5.3 Porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas en las diferentes etapas de la infección por VIH.	31
5.4 Niveles de expresión de CD38 y CD138 en linfocitos B totales.	31
5.5 Distribución de subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide en los grupos estudiados.	32
5.6 Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide.	34
5.7 Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B en las diferentes etapas de la infección por VIH.	36
5.8 Los linfocitos B de memoria activada y de memoria tipo tejido expresan CD20 con mayor densidad respecto a los linfocitos B naive y de memoria en reposo.	37
5.5 Expresión de receptores determinantes de alojamiento en las subpoblaciones de linfocitos B.....	40
Linfocitos B Naive	40
Linfocitos B de Memoria Activada	42
Linfocitos B de Memoria en Reposo	44
Linfocitos B de Memoria Tipo Tejido	46

Discusión.....	48
Conclusiones.....	53
Agradecimientos.....	54
Referencias	54

Introducción

1.1 Epidemiología e Historia de la infección por el VIH

Hacia el año 2018, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ha cobrado cerca de 32.0 millones de vidas a nivel mundial (UNAIDS, 2019), con cerca de 74.9 millones de personas que contrajeron la infección desde el comienzo de la epidemia (UNAIDS, 2019). Para el 2018, se reportaron 37.9 millones de personas que viven con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y 770 mil muertes asociadas al SIDA a nivel mundial (UNAIDS, 2019). La región con mayor prevalencia de adultos que viven con VIH es África del Sur con cerca del 7%, en América Latina se ha reportado una prevalencia del 0.4% (Kaiser Family Foundation, 2019). Para México (2018), se han reportado 230 mil personas que viven con VIH, 11 mil nuevas infecciones y, para 2017, se reportaron 4 mil muertes asociadas al SIDA (UNAIDS, 2017, 2018) (Fig. 1).

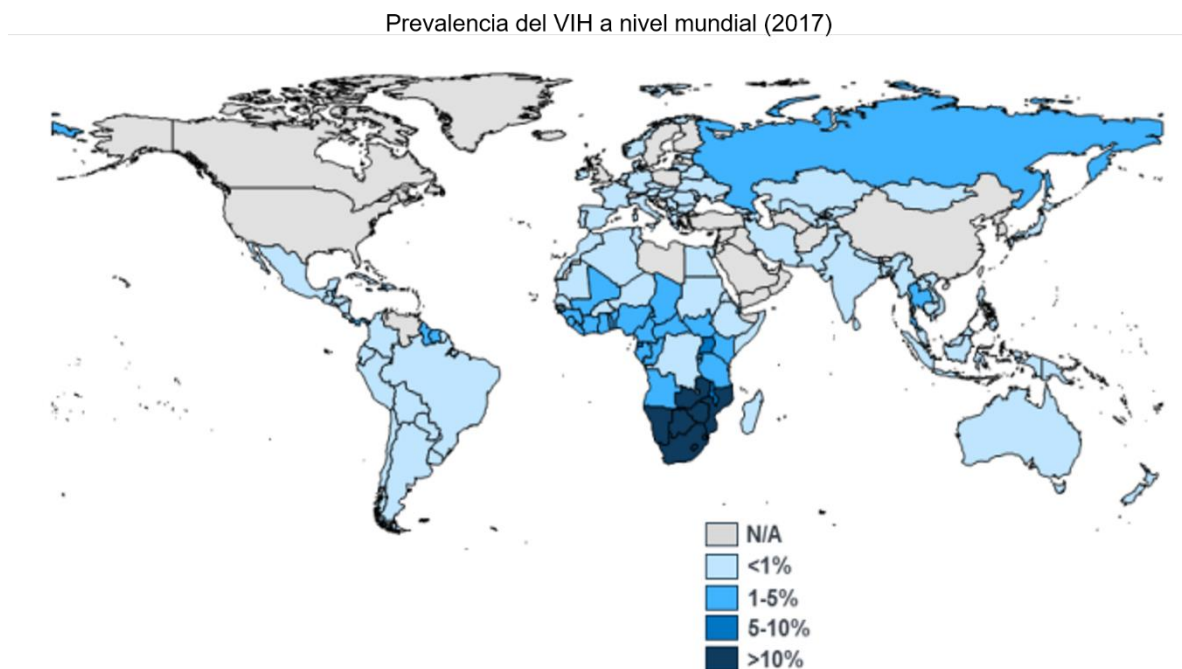


Fig. 1 **Prevalencia del VIH a nivel mundial.** Porcentaje de personas de 15 a 49 años infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana a nivel mundial. La prevalencia en América Latina es de 0.5%. Modificado de The Henry J Kaiser Family Foundation. Basado en la información de ONUSIDA de julio 2018.

En 1981 se reportaron cinco casos de inmunodeficiencia severa, caracterizada por una respuesta deficiente a mitógenos y antígenos, en hombres homosexuales

previamente sanos, infectados con *Pneumocystis carinii* en Los Ángeles, California, éste se considera el primer reporte de la epidemia, que posteriormente se nombró SIDA (CDC, 1981, 2017). En septiembre de 1983, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), reportó que existía evidencia que indicaba que el SIDA se transmitía por contacto sexual (incluyendo parejas homosexuales y heterosexuales), por transmisión perinatal, por jeringas y por sangre contaminada. Además, el reporte especificó que no había evidencia para sugerir que el SIDA se transmitía por contacto casual, incluyendo agua, comida o aire (CDC, 1983) (CDC, 1983).

Hasta ese momento no se sabía cuál era el agente causante de la enfermedad. En 1983 se aisló un nuevo retrovirus, llamado HTLV-III, en el laboratorio del Dr. Luc Montagnier (Barre-Sinoussi et al., 1983), y hasta 1984, el laboratorio de Robert Gallo estableció una relación causal del virus con el SIDA (Greene, 2007). En mayo de 1986, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus declaró que el virus causante del SIDA sería oficialmente llamado Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Greene, 2007). Dentro de los factores de riesgo de la infección se determinó que, para los grupos de población clave (ONUSIDA, 2019), la infección por el VIH es 22 veces más alta por contacto homosexual, 22 veces más alto entre personas que se inyectan drogas, 21 veces más alto para trabajadores sexuales y 12 veces más alto para personas transgénero (UNAIDS, 2019). Si bien la probabilidad de transmisión depende de varios factores, la carga viral, es decir, el número de copias de RNA del VIH por mililitro de plasma, es uno de los más relevantes. De esta manera, se ha reportado que la probabilidad de transmisión disminuye cuando la carga viral es de menos de 1500 copias de RNA del VIH por mililitro de plasma (Quinn et al., 2000).

La vida media del virus en plasma es de cerca de 2 días y la mayoría de las partículas virales infectivas son producto de ciclos de replicación constantes (replicación activa) (Wei et al., 1995). El tratamiento antirretroviral (TAR) ocasiona la supresión viral en la etapa temprana y crónica de la infección por el VIH (Hoenigl et al., 2016), disminuyendo así la probabilidad de nuevas infecciones (Revisado en: Ruelas & Greene, 2013).

Las células blanco del VIH son las células T CD4+ (Revisado en: Bour, Geleziunas, & Wainberg, 1995). Las células no activas pueden contener material genético viral integrado en su genoma, denominado provirus. Cuando la célula con el genoma integrado se activa, el provirus sigue siendo viable para ensamblar nuevas partículas virales infectivas (Revisado en: Ruelas & Greene, 2013). Esta integración da origen al reservorio viral que no es reconocido por el sistema inmunológico, y por consiguiente no es eliminado, ni por el tratamiento antirretroviral (Kirchhoff, 2013).

1.2 Estructura del VIH.

El VIH es miembro de la familia *Retroviridae*, del Género *Lentivirus*, tiene un tamaño aproximado de 100 - 130 nm (Kirchhoff, 2013). El virión está envuelto por una bicapa lipídica proveniente de la célula hospedera, que posee proteínas celulares y proteínas virales (Fig. 2). La proteína viral expresada en superficie es la proteína Env, que se compone de una proteína superficial (gp120) que interactúa con la proteína transmembranal (gp41) para formar las espículas virales. Las espículas virales son importantes en el reconocimiento y anclaje del receptor y correceptor del virus. Debajo de la bicapa lipídica, hay una matriz, conformada por cerca de 2,000 copias de la proteína p17. Como todos los retrovirus, el VIH, posee una cápside cónica (p24) que contiene dos copias de ARN viral (Kirchhoff, 2013). Ambas copias del genoma viral están asociadas en un complejo ribonucleoprotéico (p7).

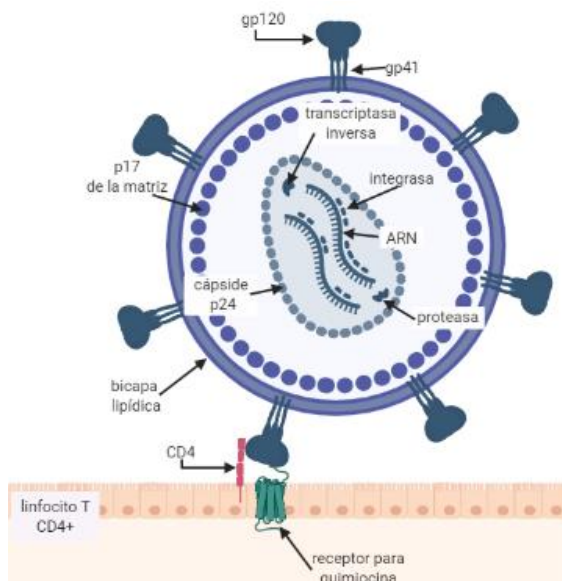


Fig 2 **Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.** La partícula viral mide aproximadamente 100 nm. La bicapa lipídica es de origen celular y contiene tanto proteínas celulares como virales. Gp120, proteína membranal viral, interactúa con la proteína CD4 en la membrana celular y con el receptor de quimiocinas CCR5 o CXCR4. BioRender.

La cápside cónica contiene a las enzimas virales necesarias para completar el ciclo de replicación del virus: proteasa, transcriptasa inversa e integrasa (German Advisory Committee Blood, 2016).

1.3 Historia natural de la infección por el VIH

La infección por VIH comienza con el contacto del virus con el epitelio mucoso, y dependiendo de la zona de transmisión, puede ser en el epitelio rectal, vaginal, bucal, entre otros. (Fig. 3). Una vez establecida esta interacción, el virus entra en contacto con linfocitos T CD4+ CCR5+ y con células dendríticas. Los linfocitos T CD4+ son infectados y en consecuencia a esto, la mayoría mueren por procesos de apoptosis (muerte programada) (Kelly & Varma, R., 2016).

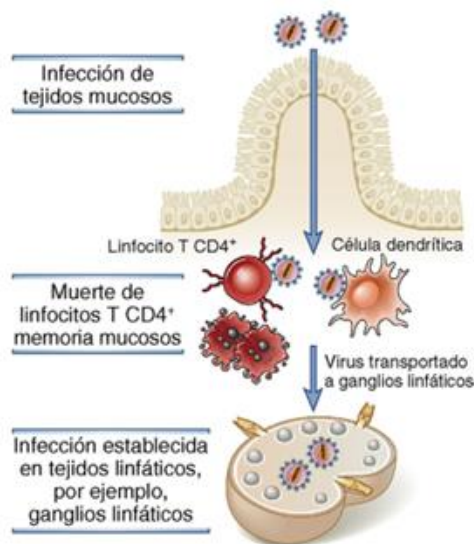


Fig. 3 **Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.** El primer contacto del virus con el epitelio mucoso propicia la interacción entre el virus, linfocitos CD4 y células dendríticas. La mayoría de los linfocitos T CD4 mueren por procesos apoptóticos, las células dendríticas migran a tejido linfoide secundario con el virus adherido a su superficie. Dentro de tejido linfoide, las células dendríticas infectan a otros linfocitos al propiciar el contacto virus-célula. Modificado de Abbas, 2012.

La interacción del virus con las células dendríticas propicia que éste se adhiera a su superficie (Abbas, Lichtman, Pillai, Baker, & Baker, 2012), después de esta interacción, las células migran a tejido linfoide secundario, con el virus adherido. En tejidos linfoides secundarios, las células dendríticas presentan antígenos a células T CD4+ naive, mientras que al mismo tiempo se favorece la infección en esta estrecha comunicación (Abbas, Lichtman, Pillai, Baker, & Baker, 2012).

En tejidos linfoides secundarios en la infección por el VIH hay una gran cantidad de replicación viral y la gran mayoría de las células blanco del virus residen dentro de estos compartimientos anatómicos, por lo que son sitios altamente comprometidos

(Estes, 2013). Desde los inicios de la epidemia, las linfadenopatias se han asociado a la infección por el VIH. Conforme avanza la investigación acerca del VIH, se ha encontrado evidencia que sugiere que el tejido linfoide es el principal sitio de replicación viral y un componente anatómico del reservorio a lo largo de la infección (Dimopoulos, Moysi, & Petrovas, 2017). La hiperplasia de los órganos linfoides secundarios se ha asociado a la infección por VIH desde la etapa aguda (Lederman & Margolis, 2008) y se ha descrito que el tejido linfoide de personas con VIH tiene una acumulación importante de componentes de la matriz extracelular (colágeno I y III y fibronectina) que propicia un estado de fibrosis que aumenta conforme la infección progresa (Estes, 2013; Lederman & Margolis, 2008). Se cree que esta fibrosis es causa importante de la disminución de la respuesta inmune, dado que impide la interacción necesaria entre células T y B y afectando la sobrevivencia de estas células (Dimopoulos et al., 2017).

La infección por el VIH se puede dividir en 3 fases: aguda, crónica y SIDA (Fig. 4). La fase de la infección se determina dependiendo del estado inmunológico, establecido por el conteo de linfocitos T CD4⁺ (células/mm³) en sangre, y de la carga viral, determinada por el número de copias de ARN viral (copias/ml) en plasma

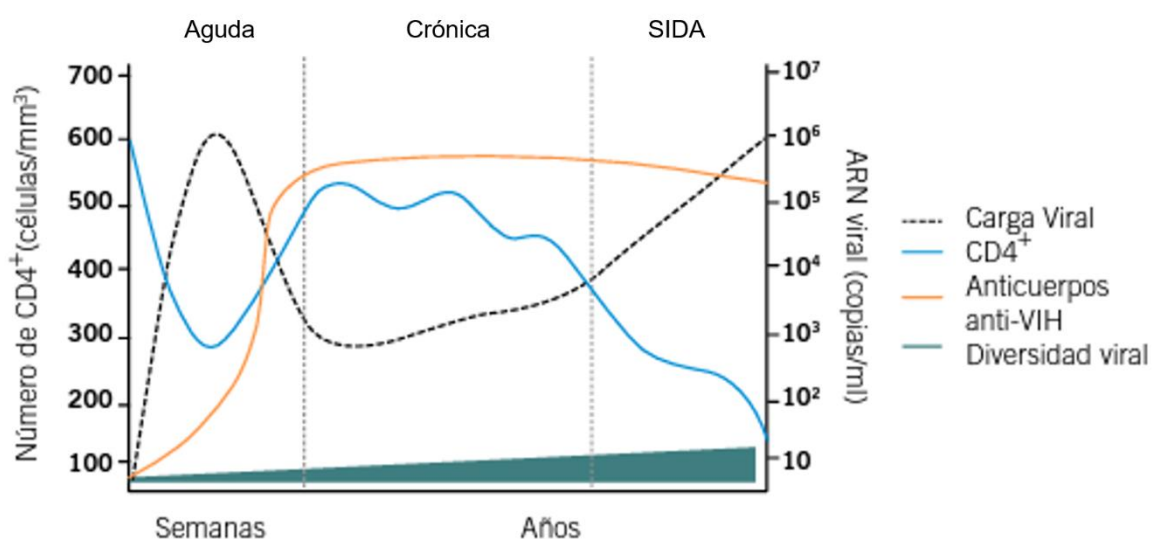


Fig. 4 **Historia natural de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.** La infección se divide en 3 etapas: Aguda, Crónica y SIDA. La carga viral (línea punteada) tiene un aumento abrupto en la fase aguda de la infección, durante la fase crónica disminuye hasta permanecer estable y en la fase de SIDA vuelve a aumentar. Los anticuerpos anti-VIH (línea amarilla) comienzan a producirse después de 12 semanas de infección. Modificado de Salazar Montes et al., 2013.

(Mindel, 2001; Salazar Montes Adriana María, Sandoval Rodríguez, & Armendáriz Borunda, 2013).

1.4 Fase aguda de la infección por el VIH

La fase aguda se refiere al periodo inicial de la infección, caracterizada por un aumento abrupto en la carga viral del individuo y una rápida y generalizada destrucción del sistema inmunológico (Ananworanich et al., 2013).

Durante los primeros 10 días de la infección no se detecta RNA viral en plasma, a esto se le conoce como fase de eclipse (McMichael, Borrow, Tomaras, Goonetilleke, & Haynes, 2010). Al final de esta fase, el virus ha llegado al tejido linfóide regional cercano al sitio de infección y entra en contacto con células blanco en donde se replica y comienza su dispersión por todo el cuerpo (McMichael et al., 2010).

Durante el periodo inicial de replicación viral, la carga viral incrementa exponencialmente dentro de los 21 a 28 días posteriores de la infección (McMichael et al., 2010). Dada la carga viral tan alta (10^7 copias por mililitro) ésta se considera la etapa más contagiosa de la infección por el VIH (Ananworanich et al., 2013; Jamjian, 2007).

En esta misma etapa aparecen los primeros anticuerpos específicos contra el VIH, ocurriendo dentro de las 2 a 12 semanas posteriores a la infección. Este evento se denomina seroconversión (Lewthwaite & Wilkins, 2009). Durante esta etapa también hay un declive importante en el conteo de células T CD4+ (menos de 350 células/ μ l), y su número se vuelve a elevar, sin llegar a niveles de preinfección (McMichael et al., 2010).

En 2003 Fiebig y colaboradores dividieron la fase aguda en 5 etapas (Eberhard W et al., 2003), basándose en la detección de RNA viral por PCR (etapa I), la detección de los antígenos virales p24 y p31 por ensayos de ELISA (etapa II), la detección de anticuerpos específicos a VIH por ELISA (etapa III), y la detección de anticuerpos específicos a VIH detectados por el aumento gradual de bandas de western blot (etapa IV – V) (Gent, s. f.; McMichael et al., 2010). Las personas con VIH progresan

de la infección aguda a la crónica al final de la etapa Fiebig-V (McMichael et al., 2010).

La determinación de la etapa de infección es importante debido a que se ha reportado que el inicio temprano del tratamiento antirretroviral disminuye los efectos adversos de la infección por el VIH (Ananworanich et al., 2013; Moir et al., 2010).

Entre el 25% y 65% de la población infectada presenta síntomas de síndrome agudo debido a la presencia del VIH y a la respuesta inmune exacerbada que se monta frente al virus. Los síntomas más comunes son: temperaturas altas, linfadenopatías, faringitis, salpullidos, mialgia o artralgia, diarrea, dolor de cabeza o náuseas. La mayoría de los síntomas se resuelven dentro de los 7-10 días siguientes (Mindel, 2001; O’Cofaigh & Lewthwaite, 2013).

1.5 Fase crónica de la infección por el VIH

Después de cerca de 12 semanas desde la infección primaria, el conteo de T CD4+ se eleva, sin llegar a los niveles previos a la infección, y la carga viral disminuye hasta llegar a un punto estable, denominado “set point” (Fig. 4). Estos eventos dan inicio a la etapa que se conoce como fase crónica que usualmente es asintomática (O’Cofaigh & Lewthwaite, 2013).

La progresión y duración de esta etapa dependerá del conteo de T CD4+ en sangre. En la mayoría de los casos, los conteos de CD4 están entre 350-800 células/mm³ y la fase asintomática puede persistir de 6-10 años en las personas que no toman tratamiento antirretroviral. En algunos casos, los conteos de T CD4+ caen abruptamente (200-350 células/mm³) en los 6-12 meses siguientes (Mindel, 2001).

El TAR ha disminuido la tasa de mortalidad a causa del VIH, pues disminuye la carga viral a niveles indetectables (<40 copias/ml), mejora en la calidad de vida y retrasa significativamente la progresión a la etapa de SIDA. Sin embargo, el desarrollo de comorbilidades no asociadas a SIDA como osteoporosis, aterosclerosis, degeneraciones neurocognitivas y cáncer son comunes en las personas con TAR (Sokoya, Steel, Nieuwoudt, & Rossouw, 2017).

Actualmente, vivir con VIH se considera una condición inflamatoria crónica. Esto debido a la presencia constante del VIH, a la translocación bacteriana del tracto gastrointestinal durante la fase aguda de la infección y a las coinfecciones con otros patógenos virales persistentes que hacen que el sistema inmunológico esté en un estado constante de activación (Brenchley et al., 2006; McMichael et al., 2010; Rajasuriar et al., 2013; Sokoya et al., 2017).

1.6 Fase de SIDA

De acuerdo la CDC, las características para determinar la fase 3, o fase de SIDA son que el conteo de T CD4+ sea de <200 células/ul y que exista una enfermedad oportunista. La pérdida del 10% del peso corporal, diarrea y fiebre persistente también se consideran como síntomas para el diagnóstico de SIDA (CDC, 2014). Usualmente, las personas con VIH buscan atención médica debido a la diarrea persistente, entre otros (Mindel, 2001; O’Cofaigh & Lewthwaite, 2013). La disminución de T CD4+ propicia las comorbilidades de agentes patógenos (Lewthwaite & Wilkins, 2009; O’Cofaigh & Lewthwaite, 2013). Las enfermedades oportunistas asociadas a SIDA más comunes son *Mycobacterium tuberculosis*, *Sterptococcus pneumoniae*, *Pneumocystis jirovecii* (antes *carinii*), *Cryptosporidium*, sarcoma de Kaposi, Citomegalovirus, Herpes zoster, candidiasis, toxoplasmosis cerebral, entre otros (Lewthwaite & Wilkins, 2009; O’Cofaigh & Lewthwaite, 2013).

1.7 Sistema inmunológico

El sistema inmunológico se divide en dos componentes principales: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La respuesta inmunológica innata está presente en todos los organismos pluricelulares, mientras que la inmunidad adaptativa es un rasgo evolutivo de los vertebrados con mandíbula (Osborne, Kuby, Goldsby, & Kindt, 2007).

La inmunidad innata consta de barreras física, químicas y celulares (McDonald & Levy, 2019). Cuando la respuesta inmune innata no puede contener la infección, los componentes de la respuesta inmune adaptativa son activados. La respuesta inmunológica adaptativa se divide en componentes celulares (linfocitos T CD4 y CD8) y componentes humorales (linfocitos B y anticuerpos). Seguido de la

eliminación del patógeno, la mayoría de las células activadas de la inmunidad adaptativa mueren, y sobreviven subpoblaciones de células de memoria preparadas para defender al organismo ante una infección subsecuente por el mismo patógeno (Portugal, Obeng-Adjei, Moir, Crompton, & Pierce, 2017).

1.8 Linfocitos B

Los linfocitos B se caracterizan por producir anticuerpos específicos y afines a diversos antígenos (Thorarinsdottir et al., 2016). Junto con los linfocitos T de memoria, los linfocitos B son los encargados de desarrollar memoria inmunológica y de conferir protección humoral al organismo ante una re-infección (Neumann, Klippert, Raue, Sopper, & Stahl-Hennig, 2015; Thorarinsdottir et al., 2016). El receptor de antígeno de las células B (BCR, por sus siglas en inglés) es un receptor de membrana de la familia de las inmunoglobulinas. Es el encargado de reconocer al antígeno, fagocitarlo y posteriormente presentarlo a linfocitos T mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II. Además, puede ser secretado y cumplir con diversas funciones como neutralización y/o eliminación del patógeno (Prieto Martín, Barbarroja Escudero, García Torrijos, & Monserrat Sanz, 2013).

El BCR, cuando está en forma membranal, está asociado a un complejo de proteínas que funcionan como correceptores. Este complejo está formado por las proteínas CD19, CD21 y CD81 (Thorarinsdottir et al., 2016). CD19 es una proteína transmembranal involucrada en la activación del BCR, que se considera marcador de linaje para identificar a las células B, ya que éstas lo expresan durante todas las etapas del desarrollo (Zou, Grimaldi, & Diamond, 2017). CD21 es un receptor del fragmento C3d del complemento y es comúnmente utilizado como marcador del estado de activación y maduración de las células B, cuya activación resulta en la disminución de la expresión de CD21 (Prieto Martín et al., 2013; Zou et al., 2017; Thorarinsdottir et al., 2016).

En 1980 se describió un marcador de superficie presente en >95% de células B en la periferia (Stashenko, Nadler, Hardy, & Schlossman, 1980). Actualmente conocido como CD20, se consideraba el marcador universal para células B, sin embargo, estudios posteriores reportaron que la expresión de CD20 se pierde durante la

diferenciación a células secretoras de anticuerpos (Marshall, Stopforth, & Cragg, 2017). La proteína CD20 se ha asociado a la activación de las células B, es parte de un complejo que regula la entrada de calcio asociado al BCR y no se conoce un ligando específico (Marshall et al., 2017; Morsy et al., 2013; Santos, 2018). Se ha reportado que la pérdida de la expresión de CD20 se asocia a la disminución de la activación de linfocitos B y a una consecuente deficiencia en la producción de anticuerpos ante un reto antigénico nuevo (Kuijpers et al., 2010; Morsy et al., 2013).

Las células B se originan en la médula ósea, después de rearrreglos en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, migran hacia periferia con un fenotipo virgen (naïve) (Perez-Andres et al., 2010). Las células B naïve conforman cerca del 60-70% de linfocitos B en sangre de personas adultas (Berrón-Ruíz et al., 2016) y se caracterizan por expresar IgD, IgM y CD21 en la superficie de la membrana, además de la ausencia de la expresión de las proteínas CD27 y CD38 (Jackson, Wilson, James, & Capra, 2008). Los linfocitos B naïve migran hacia tejido linfoide secundario donde serán activados y, dependiendo de las señales que reciban, podrán diferenciarse a células B de memoria o células secretoras de anticuerpos de vida larga o de vida corta, dependiendo de las señales que reciban dentro del tejido linfoide (Cooper et al., 2005).

Las células secretoras de anticuerpos (ASC, por sus siglas en inglés) se dividen en dos subpoblaciones: plasmablastos y células plasmáticas. Los plasmablastos son células terminalmente diferenciadas, reconocidas por la expresión alta de CD38 (CD38^{high}), son las responsables de la producción rápida y temporal de anticuerpos después de una inmunización (Kaminski, Wei, Qian, Rosenberg, & Sanz, 2012). En individuos sanos, representan del 1 al 5% del total de células B en periferia (Berrón-Ruíz et al., 2016). En homeostasis, el isotipo de anticuerpo predominante de estas células es IgA, mientras que posterior a una inmunización parenteral es IgG (Buckner et al., 2013). Dentro de las células CD38^{high} las células plasmáticas se pueden identificar por la expresión alta de la molécula de adhesión CD138 (CD138^{high}). Las células plasmáticas se caracterizan por la ausencia de inmunoglobulinas en superficie y por la baja capacidad de proliferar. Además, se

creo que estas células confieren anticuerpos de larga duración debido a que residen en médula ósea (Kaminski et al., 2012).

La señalización de la proteína CD38 está asociada a vías de activación y proliferación celular (Malavasi et al., 1992), mientras que la expresión de CD138 es necesaria para la sobrevivencia de células plasmáticas (McCarron, Park, & Fooksman, 2017).

1.9 Linfocitos B de memoria

Los linfocitos B de memoria conforman del 20-40% de los linfocitos B totales en sangre (Klein et al., 1998; Perez-Andres et al., 2010), y se caracterizan por la rápida producción de inmunoglobulinas altamente específicas y con mutaciones somáticas en la región variable de los genes Ig después de una estimulación antigénica secundaria (Cooper et al., 2005; Fecteau, Côté, & Néron, 2006; Klein et al., 1998). La proteína CD27 es un miembro de la familia de receptores de TNF y se consideró un marcador de superficie para identificar a las células B de memoria desde finales del siglo XX (Klein, Rajewsky, & Küppers, 1998). La interacción de CD27 con su ligando (CD70) presente en células T, propicia la diferenciación de células de memoria a células secretoras de anticuerpo (Nagase et al., 2001). Sin embargo, en el 2005 Cooper et al. reportó que las células CD27- FcRH4+ CD21- también son células B de memoria y representan cerca del 10% de células B totales en tejidos (Cooper et al., 2005) y aproximadamente el 5% en sangre en adultos sanos (Thorarinsdottir et al., 2016). Debido a que estas células se reportaron por primera vez en amígdalas, comúnmente se le conoce como células de memoria tipo tejido (MTT) (Cooper et al., 2005; Titanji et al., 2010).

A partir de estos descubrimientos, se propuso una clasificación de cuatro subpoblaciones de linfocitos B de memoria basada en la expresión de las proteínas CD27 y CD21: naive (N, CD21+ CD27-), memoria en reposo (MR, CD21+ CD27+), memoria activada (MA, CD21- CD27+) y memoria tipo tejido (MTT, CD21- CD27-) (Titanji et al., 2010). Inicialmente se reportó que la mayoría de linfocitos B de memoria eran de memoria en reposo en sangre periférica de adultos sanos y las subpoblaciones de linfocitos B de memoria tipo tejido y memoria activada

conformaban menos del 10% en las mismas muestras (Titanji et al., 2010). Es importante mencionar que el porcentaje de linfocitos B de memoria activada en sangre periférica de macacos está aumentada en comparación con su porcentaje en sangre de humanos (Neumann et al., 2015; Titanji et al., 2010), dado que la mayoría de los estudios son de linfocitos B se realizan en sangre o en tejidos de Macacos Rhesus, los resultados obtenidos podrían no ser extrapolables al estudio en humanos.

En 2011 Das y colaboradores realizaron una caracterización fenotípica y funcional de las subpoblaciones de memoria en muestras de sangre periférica de macacos sanos y concluyeron que los linfocitos B naive son células en estado transicional o virgen y que los linfocitos B de memoria en reposo son células de memoria, con gran capacidad proliferativa y de producción de anticuerpos provenientes de distintas clonas (Das, Xu, et al., 2011). Además, los linfocitos B de memoria en reposo son considerados como responsables de la memoria serológica producida por la vacunación de neo-antígenos (Amu et al., 2014). Estudios adicionales reportaron que los linfocitos B de memoria activada funcionan como células presentadoras de antígeno a linfocitos T naive y los linfocitos B de memoria tipo tejido expresan receptores similares al fenotipo exhausto de células T (Negera, Walker, Bekele, Dockrell, & Lockwood, 2017). También, se ha reportado que los linfocitos B de memoria tipo tejido tienen menor capacidad de proliferación (Das, Xu, et al., 2011) y diferenciación hacia células plasmáticas, mayor expresión de receptores de inhibición y su porcentaje está aumentado en sangre de pacientes con enfermedades autoinmunes (Jourdan et al., 2017; Moir et al., 2008; Negera et al., 2017).

1.10 Tejido linfoide secundario y activación de linfocitos.

Los tejidos linfoides secundarios son estructuras altamente organizadas, cuya compartimentación es necesaria para el funcionamiento correcto de la respuesta inmunológica. Estos tejidos especializados son esenciales en el mantenimiento de la homeostasis, diferenciación y sobrevivencia de los linfocitos (Dimopoulos et al., 2017; Estes, 2013).

Los linfocitos B maduros migran hacia tejido linfóide secundario donde se encontrarán con un antígeno. Durante una respuesta inicial, el linfocito B tendrá repetidas rondas de proliferación en estructuras primarias llamadas folículos. Esta respuesta inicial generará células plasmáticas de vida corta (Allen, Okada, & Cyster, 2007; Förster et al., 1996). Después de 4-5 días del encuentro inicial con el antígeno, se forma un centro germinal (CG) dentro del folículo, poblado por linfocitos B monoclonales y rodeado por una zona de linfocitos T (Fig. 5) (Allen et al., 2004; Thorbecke, Amin, & Tsiagbe, 1994). Los CG son microestructuras que se forman dentro de folículos secundarios y que permitirán la generación de linfocitos B de memoria y células plasmáticas de vida larga (Brière et al., 2001; Stebegg et al., 2018). Los centros germinales se pueden formar por linfocitos B activados en el folículo o en sitios de inflamación (Pitzalis, Jones, Bombardieri, & Jones, 2014; Thorbecke et al., 1994).

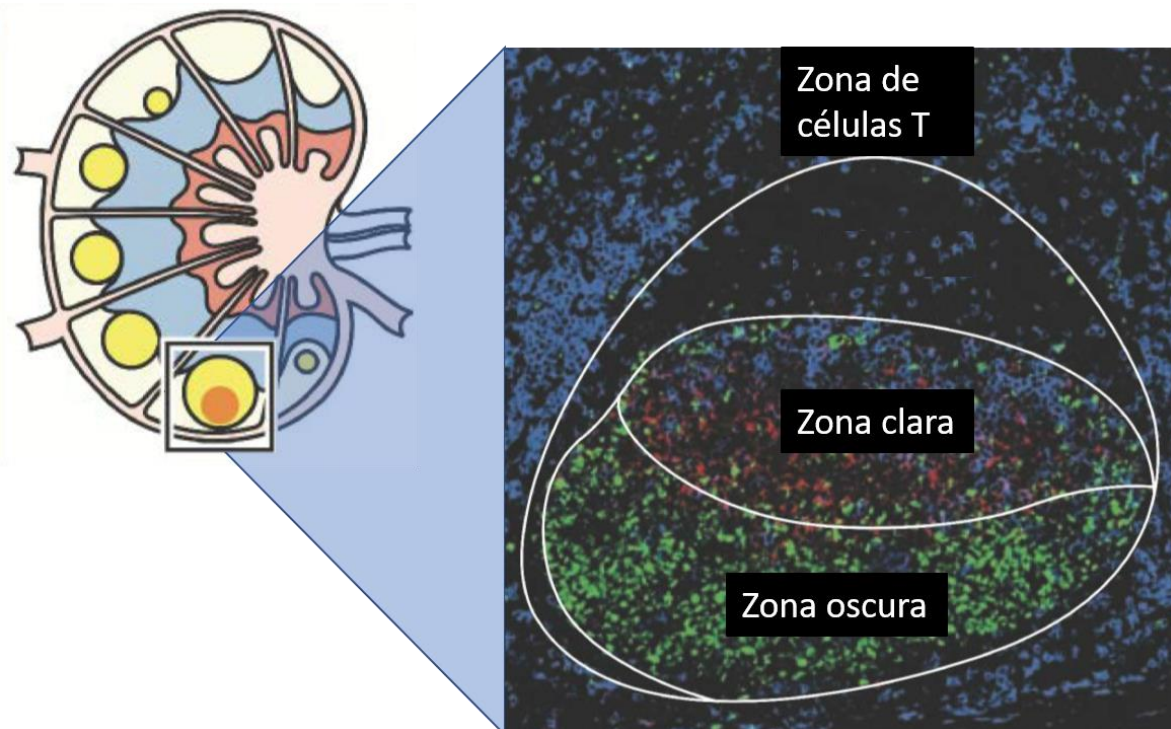


Fig. 5 Organización del tejido linfóide secundario. (Izquierda) Esquemización del tejido linfóide secundario. Los folículos están compartimentalizados, pero no divididos por membranas. Dentro de los folículos primarios no hay centros germinales (círculo amarillo). (Derecha) Microscopia de tinción histológica en donde se muestra el centro germinal dividido por sus zonas: zona de linfocitos T (azul), zona clara (rojo) y zona oscura (verde). Modificado de Janeway, 2012.

El CG se divide en dos zonas: zona clara y zona oscura. Dentro de la zona oscura los linfocitos B llevan a cabo múltiples rondas de proliferación e hipermutación somática en la región variable de los genes de Ig. En la zona clara, los linfocitos B son seleccionados dependiendo de la afinidad de su receptor de Ig hacia el antígeno seleccionado y de la interacción con diversos tipos celulares (Allen et al., 2004; Meffre et al., 2016; Zou et al., 2017).

Dentro del CG los linfocitos B interactúan con células dendríticas foliculares que les facilitan el encuentro con el antígeno. Posteriormente, los linfocitos B les presentarán antígeno a los linfocitos T foliculares (Tfh) y a su vez, los Tfh les proporcionarán señales de sobrevivencia a los linfocitos B (Takemori, Kaji, Takahashi, Shimoda, & Rajewsky, 2014).

Neuman y colaboradores reportaron que existen diferencias significativas en el porcentaje de diferentes subpoblaciones de memoria en distintos tejidos de primates no humanos macacos Rhesus (Neumann et al., 2015). En ese estudio reportaron que, en tejido linfoide secundario, la mayoría de células B tienen fenotipo naive, el porcentaje más alto de linfocitos B de memoria en reposo se encuentra en amígdalas y la subpoblación con el mayor porcentaje en sangre es la de memoria activada (Neumann et al., 2015). Das y colaboradores, reportaron que el porcentaje de linfocitos B de memoria en reposo es significativamente mayor en tejido linfoide secundario, comparado con muestras de sangre de macacos Rhesus (Das, Xu, et al., 2011).

La entrada, retención y recirculación de las células del sistema inmunológico por el tejido linfoide está mediada por receptores de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Fig. 6) (Zou et al., 2017). La recirculación de los linfocitos B por la zona clara y zona oscura del CG está mediado por la producción de CXCL13 (zona clara) y CXCL12 (zona oscura) y de la expresión de sus receptores CXCR5 y CXCR4 respectivamente (Allen et al., 2004). Sin embargo, se demostró que la expresión de CXCR5 es más importante en la orientación apropiada de la zona clara y oscura dentro del folículo que en la segregación de linfocitos B entre las dos zonas (Allen et al., 2004). Las células estromales en la zona de linfocitos T del folículo

producen CCL19 y CCL21 que son ligandos para CCR7. La expresión de CCR7 regula la interacción de linfocitos T y B en la frontera del centro germinal y la zona de linfocitos T (Zou et al., 2017). Se ha reportado que la alta expresión de CXCR5 y la baja expresión de CCR7 es necesaria en linfocitos T para su entrada al folículo (Haynes et al., 2007), mientras que, la expresión de CCR7 en linfocitos B es necesaria para su migración y entrada a tejido linfoide (Okada et al., 2002). En 1996 se reportó que la formación de ganglios linfáticos inguinales y la formación de centro germinal se veía afectada en ratones CXCR5^{-/-} (Förster et al., 1996).

En pacientes con inmunodeficiencia común variable, los linfocitos B expresan menos CXCR5 y CCR7, lo que se asocia con una menor capacidad de migración y deriva en una pobre producción de anticuerpos (Moratto et al., 2006; Payne, Drinkwater, Baretto, Duddridge, & Browning, 2009).

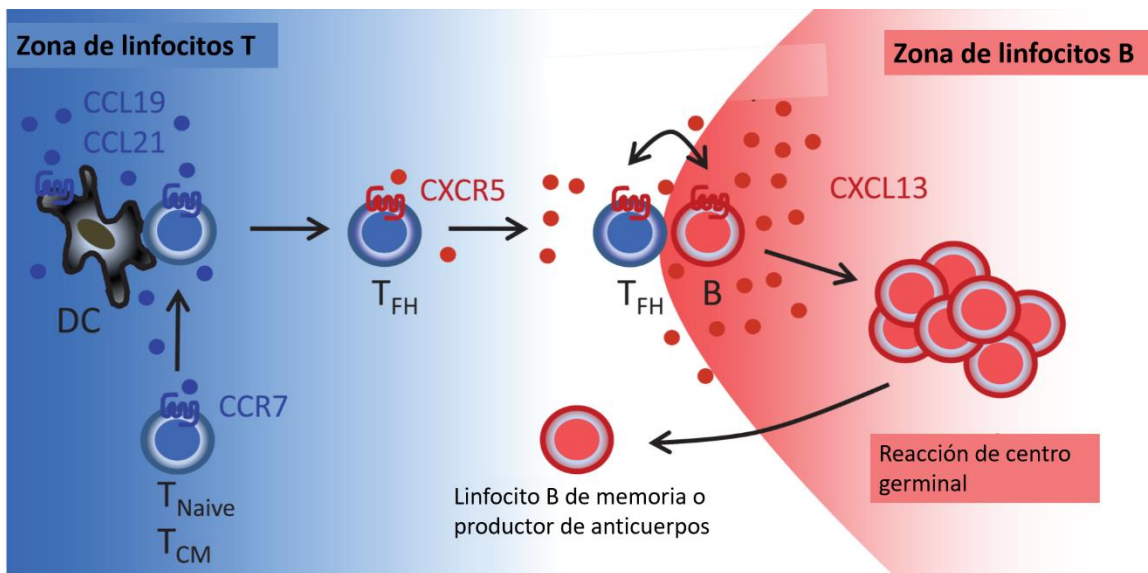


Fig. 6 Organización del tejido linfóide dada por la expresión de citocinas y sus receptores. Células T naïve, células dendríticas (DC) y células B expresan CCR7, molécula que media la migración tejido linfóide. Células T foliculares cooperadoras (Tfh) y células B expresan CXCR5 lo que propicia la interacción entre éstas dos células. Modificado de Mores, 2015.

1.11 Inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son proteínas glicosiladas que cuando están unidas a la membrana funcionan como BCR y cuando se secretan al medio se unen

y neutralizan a diferentes antígenos (Hoffman, Lakkis, & Chalasani, 2016; Owen et al., 2014).

Las inmunoglobulinas son heterodímeros compuestos por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) (Fig. 7). Cada cadena (H y L) tiene una región altamente conservada, llamada región constante, y una región altamente variable, llamada región variable (Owen et al., 2014).

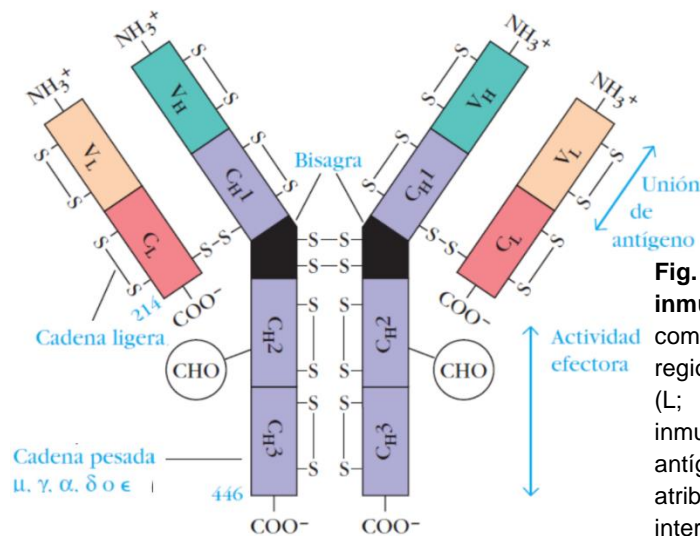


Fig. 7 Esquema de estructura de las inmunoglobulinas. La cadena pesada (H) está compuesta por una región constante (C_H) y una región variable (V_H), al igual que la cadena ligera (L; C_L ; V_L). La región variable de las inmunoglobulinas se encarga de la unión de antígeno, mientras que a la cadena ligera se le atribuye la función efectora debido a las interacciones con otros componentes. Modificado de Owen et al., 2014.

Cada región cumple con una función. Las regiones variables conforman el sitio de unión a antígeno y tiene una selectividad alta para epítopos de distintos patógenos (Owen et al., 2014). La región constante no interactúa con el epítipo, pero es importante en la función efectora de las inmunoglobulinas (Hoffman et al., 2016).

Los epítopos son las regiones con actividad inmunitaria de un inmunógeno que se unen a receptores de membrana específicos de antígeno en los linfocitos B o a anticuerpos secretados (Owen et al., 2014).

La respuesta humoral surge a partir de las interacciones entre proteínas, células y tejidos con la región constante de las inmunoglobulinas, llamada región Fc. Existen cinco regiones diferentes de cadena pesada (μ , δ , γ , ϵ y α) que determinarán la clase o isotipo de cada inmunoglobulina: IgM (μ), IgG (γ), IgA (α), IgD (δ) e IgE (ϵ) (Owen et al., 2014).

Las funciones efectoras, es decir, los procesos por los cuales las inmunoglobulinas eliminarán a los patógenos, se pueden agrupar en tres procesos principales: 1) neutralización del objetivo; 2) activación de macrófagos y otras células del sistema inmunológico al unirse a receptores de Fc (FcR); y 3) activación de las proteínas del complemento (Hoffman et al., 2016). Sin embargo, la función efectora que cada inmunoglobulina tiene estará determinada por el isotipo de la cadena pesada y la afinidad de los FcR en las células del sistema inmune (Hoffman et al., 2016; Owen et al., 2014).

1.12 Alteraciones de la respuesta inmune por la infección por el VIH.

El VIH se caracteriza por infectar directamente a las células T CD4+, ocasionando una importante disminución progresiva en el porcentaje de estas células en periferia (Dimopoulos et al., 2017; Estes, 2013; Lederman & Margolis, 2008). Además, la infección por el VIH causa un estado de activación generalizado que afecta a múltiples subpoblaciones celulares, ocasionando una pérdida gradual en las funciones del sistema inmune, resultando en una disminución en la capacidad de responder a nuevos antígenos y, consecuentemente, aumentar la susceptibilidad a enfermedades oportunistas y reinfecciones (De Milito, 2004; Lederman & Margolis, 2008; Moir et al., 2008; Okoye & Picker, 2013). La infección directa de células del sistema inmunológico, la producción de citocinas proinflamatorias y la pérdida de subpoblaciones de células T reguladoras también contribuye a la activación latente (McMichael et al., 2010).

La constante activación propicia la aparición de células con fenotipo exhausto, éste fue caracterizado por primera vez en 1993 en linfocitos T CD8+ en un modelo murino durante una infección viral crónica (Revisado en: Saeidi et al., 2018). El fenotipo exhausto es un fenómeno caracterizado por la sobre expresión de moléculas inmunoregulatoras, como PD-1, y disfuncionalidad celular, que eventualmente lleva a la eliminación de las células, usualmente, específicas al antígeno (Revisado en: Saeidi et al., 2018). Este fenotipo también se ha encontrado en los linfocitos B y se le atribuye a una subpoblación de memoria, caracterizada por una capacidad disminuida de proliferación y de respuesta a estímulos nuevos, además de un

aumento en la expresión de receptores asociados a una función de inhibición, por ejemplo FcRH4 o PD-1 (Cooper et al., 2005; Moir & Fauci, 2014; Titanji et al., 2010).

Las células T CD4+ de memoria son las principales células blanco del VIH (Okoye & Picker, 2013). Antes de 1984, se creía que la infección por el VIH no afectaba a las células B debido a que se registraban niveles normales de inmunoglobulinas en sangre en los pacientes. Sin embargo, se reportó que la producción de anticuerpos después de una inmunización contra polisacárido y péptidos era significativamente menor a los controles negativos (Ammann & Abrams, 1984), lo que sugirió un defecto en la respuesta humoral ante la inmunización con neo-antígenos a pesar de una marcada hipergammaglobulinemia (Yarchoan, Redfield, & Broder, 1986).

A partir de estos estudios iniciales, se reportó que además de la hipergammaglobulinemia, la infección por el VIH induce activación policlonal de células B (Yarchoan et al., 1986), secreción espontánea de inmunoglobulinas (Nagase et al., 2001), aumento en enfermedades autoinmunes (De Milito, 2004), producción disminuida de anticuerpos específicos, pérdida en el porcentaje de poblaciones de memoria que no se recupera con el tratamiento antirretroviral (De Milito, Mörch, Sönnernborg, & Chiodi, 2001; Titanji et al., 2010), aumento en los niveles de activación basal, sensibilidad reducida a la estimulación y aumento en las porcentajes de subpoblaciones terminalmente diferenciadas que no expresan CD21 (Das, Veazey, et al., 2011; Moir et al., 2008), entre otros.

Nagase demostró que la interacción entre CD27/CD70 contribuye a la hipergammaglobulinemia (Nagase et al., 2001), De Milito reportó que el porcentaje de células T que expresan CD70 es mayor en personas VIH positivas, comparadas con personas que no viven con VIH (De Milito et al., 2001).

Se cree que la mayoría de las alteraciones a las células B de memoria podrían ser explicadas por el cambio en la distribución de subpoblaciones de sangre periférica hacia tejido linfoide (Moir et al., 2008; Titanji et al., 2010). Sin embargo, se sabe que cerca del 50% de los CG en tejidos linfoides asociados a intestino se pierden durante la etapa aguda de la infección, lo que refleja una alteración en la producción de los linfocitos B de memoria (McMichael et al., 2010).

En 2008, Moir y colaboradores observaron un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos B de memoria activada en muestras de sangre periférica de personas virémicas. Además, reportaron que existen células B específicas para el VIH dentro de esta población celular (Moir et al., 2008). Titanji reportó que la progresión rápida del Virus de la Inmunodeficiencia Simiana (VIS) en macacos está correlacionada con la depleción rápida y preferencial de células B de memoria activada, dado que la expresión de PD-1 en esta subpoblación celular está aumentada (Titanji et al., 2010). Das y colaboradores reportaron que la infección por VIS en macacos ocasiona una disminución en la capacidad proliferativa de linfocitos B de memoria en reposo (Das, Veazey, et al., 2011). Además, se ha reportado que el mantenimiento de la alta proporción de células B de memoria activada y memoria tipo tejido en sangre periférica se correlaciona con la alta carga viral (Moir et al., 2010; Negera et al., 2017; Portugal et al., 2017).

Moir y colaboradores reportaron que en la infección por VIH, los linfocitos B de memoria tipo tejido expresan menos CCR7 y CXCR5 en relación con los linfocitos B naive y de memoria (Moir et al., 2008). Se ha reportado que los linfocitos B naive expresan menos CXCR5 en pacientes sin tratamiento antiretroviral (Chong et al., 2004), esta disminución se ha asociado a un bajo porcentaje de linfocitos T CD4+ (Cagigi et al., 2008) y al aumento en los niveles de CXCL13 (Bekele et al., 2019).

Los modelos de primates no humanos han sido importantes en el avance de la ciencia, sin embargo, es importante resaltar que existen diferencias entre los modelos y las muestras de humanos (Titanji et al., 2010). Debido a los impedimentos metodológicos y éticos que sugieren la extracción de tejidos linfoides humanos sanos para su estudio, el acceso a estas muestras es restringido, sin embargo, se han desarrollado técnicas menos invasivas que podrían proponer una solución a este impedimento (Hey-Nguyen et al., 2017).

Los estudios sobre linfocitos B están limitados a muestras de sangre periférica y a modelos de primates no humanos y ratones. El porcentaje y fenotipo de las distintas subpoblaciones está caracterizada en muestras de sangre periférica y esta información se extrapola hacia tejido linfoide. Los estudios en tejido linfoide,

realizados en primates no humanos, reportan diferencias en la distribución y porcentaje de distintas subpoblaciones que es dependiente de tejido. Finalmente, el estudio sobre los receptores determinantes de alojamiento en linfocitos B está limitado a reportes de los niveles de expresión en algunas subpoblaciones en sangre periférica o a ensayos de localización por inmunohistoquímica en tejido de ratones. Es necesario realizar estudios sobre el estado de los linfocitos B tanto en sangre como en tejido linfoide para conocer el daño que el VIH ocasiona y de esta manera poder desarrollar tratamientos para contrarrestar los efectos del virus en el estado de salud del paciente.

Hipótesis

La infección por VIH propicia el aumento de la frecuencia de linfocitos B disfuncionales y de la expresión de marcadores de activación en tejido linfoide, cambios que son más evidentes en la etapa crónica de la infección.

Objetivos

Objetivo general

Identificar las diferencias relacionadas a las diferentes etapas de la infección por el VIH y a la localización celular en diferentes subpoblaciones de linfocitos B en muestras de humanos adultos.

Objetivos específicos

Determinar las diferencias en los porcentajes de distintas subpoblaciones de linfocitos B, en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH.

Identificar las diferencias en las subpoblaciones de linfocitos B en relación con el tejido de localización celular en muestras de humanos adultos con y sin VIH.

Analizar la expresión de moléculas asociadas a maduración y activación en diferentes subpoblaciones de linfocitos B en las diferentes etapas de la infección por VIH y en sangre y tejido linfoide secundario.

Metodología

4.1 Características de la cohorte de estudio

En este estudio se utilizaron muestras de sangre y tejido linfoide de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células mononucleares de tejido linfoide secundario (LNMC) de personas con VIH que pertenecieron a un estudio transversal de una cohorte del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). Estas muestras se obtuvieron de los protocolos B03-16 y B33-10 del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del INER, los cuales, fueron revisados y autorizados por los Comités de Bioseguridad, Investigación, y de ética en Investigación del INER. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado, previo a la donación de sangre y tejido linfoide. A partir de la sangre obtenida de los donadores, se realizaron cuantificaciones de la carga viral y conteo de poblaciones linfocitarias (linfocitos T CD4+ y T CD8+).

En esta tesis se incluyeron muestras de tres grupos de estudio: muestras de un grupo control de participantes sin VIH (n=18, VIH NEG), muestras participantes con VIH que se encontraban en la etapa aguda de la infección (n=9, AGUDO) y muestras de participantes con VIH que estaban en etapa crónica de la infección (n=15, CRÓNICO). El tamaño de la muestra se basó en la disponibilidad de muestras biológicas. Para determinar si los participantes se encontraban en la etapa de infección aguda se tomó en cuenta la fecha de aparición de síntomas clínicos, contar con una prueba rápida positiva con un tiempo de infección menor a 6 meses, y pruebas de western blot y carga viral que, en conjunto, permitieron la clasificación de los participantes dentro de la clasificación de Fiebig I a V (Eberhard W et al., 2003). Para determinar la etapa crónica de la infección se tomó en cuenta tener una prueba positiva para la infección, con al menos un año de infección. Ninguno de los participantes estaba bajo un régimen de tratamiento antirretroviral al momento de la donación de la biopsia y sangre. Ninguno de los participantes de este estudio tuvo infección latente o evidente de Hepatitis B o C al momento de la biopsia. Todas las

biopsias fueron de ganglios palpables o detectables por ultrasonido. Las características clínicas de los grupos de estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características epidemiológicas de los participantes del estudio.

	VIH NEG (n = 18)	AGUDO (n = 9)	CRÓNICO (n = 15)	p VIH NEG vs AGUDO	p VIH NEG vs CRÓNICO	p AGUDO vs CRÓNICO
Hombres (%)	100	100	100	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Edad (años), Mediana (min-max)	29 (23-47)	24 (18-36)	26 (20-37)	0.0312	0.0441	<i>ns</i>
CD4 (%), Mediana (min-max)	43 (29-54)	21 (6-35)	16 (2-28)	0.0016	<0.0001	<i>ns</i>
CD8+ (%), Mediana (min-max)	31.5 (21-42)	43 (27-77)	61 (22-81)	<i>ns</i>	<0.0001	<i>ns</i>
CD4:CD8, Mediana (min-max)	1.34 (0.77- 2.25)	0.51 (0.08- 1.18)	0.31 (0.03- 1.02)	0.0054	<0.0001	<i>ns</i>
log pVL, Mediana (min-max)	0	5.81 (4.65- 6.77)	5.09 (3.67- 6.55-)	<i>na</i>	0.0691	

VIH NEG: Personas sin VIH; AGUDO: Personas con VIH en la etapa aguda de la infección; CRÓNICO: personas con VIH en la etapa crónica de la infección; *ns*: no significativo; *na*: no aplica. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$

4.2 Obtención y separación de PBMC y LNMC

Las PBMC se obtuvieron de muestras de sangre completa y se separaron utilizando el método de centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll (Lymphoprep™). Las biopsias de tejido se preservaron en medio Hanks (Lonza, Walkersville, MD) antes de ser procesadas dentro del laboratorio. El tejido linfoide se dividió en porciones pequeñas y se incubó en medio Hanks con calcio, magnesio y colagenasa D (400 unidades/mL, Roche) a 37°C durante 20 minutos, posteriormente las LNMC se obtuvieron por disociación manual. Tanto las PBMC como las LNMC se criopreservaron y almacenaron en tanques de nitrógeno a -195°C para su posterior uso.

La descongelación de células se realizó conforme a lo reportado por Villaruel-Vázquez (Villaruel Vázquez & del Río Estrada, 2014). Posterior a la extracción de los tanques de nitrógeno, los criovales fueron calentados en baños de agua a 37°C hasta que el hielo se desprendió de las paredes del criovial. Las PBMC y LNMC se decantaron en tubos de 50 mililitros (ml) con 50 ml de medio HUT (medio RPMI-1640, 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina) y 1.6 microlitros (uL) de DNAsa (10 U/ml de medio; Invitrogen) y se centrifugaron a una velocidad de 1200 rpm durante 10 minutos. Posterior a la centrifugación, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 15 ml de medio HUT. Las células se contaron y se resuspendieron a una densidad final de 2×10^6 por ml y se dejaron en incubación a 37°C (5% CO₂ y 86% Humedad Relativa) durante 24 horas. Finalmente se tiñeron para análisis de citometría de flujo.

4.3 Análisis fenotípico

En este estudio se utilizó un panel de citometría de flujo multiparamétrica para la identificación de subpoblaciones de linfocitos B: Naive, Plasmablastos, Células plasmáticas, Memoria Activada, Memoria en Reposo y Memoria Tipo Tejido. En el panel se utilizaron los anticuerpos anti CD3 (clona OKT3), CD14 (clona M5E2), CD56 (clona HCD56), CD19 (clona SJ25C1), CD20 (clona L27), CD27 (clona M-T271), CD21 (B-ly4), CD38 (clona HIT2), CD138 (clona MI15), CXCR5 (clona RF8B2), CCR7 (clona 150503), IgD (clona IA6-2), IgM (clona G20-127), e IgG (clona G18-145). Las células se analizaron en un citómetro LSRFORTESSA.

4.4 Estrategia de análisis

Para el análisis de las células B, se utilizó una gráfica de FSC-A (área) contra FSC-H (altura) para identificar células únicas descartando eventos agregados. Se utilizó una gráfica de morfología para discriminar linfocitos de monocitos y granulocitos, en ésta se utilizaron las señales de los detectores de tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A). Posteriormente se realizó una gráfica de viabilidad (AmCyan, Life Technologies) junto con anticuerpos anti CD3 (clona OKT3), CD14 (clona M5E2) y CD56 (clona HCD56) acoplados a BV510 para excluir los linfocitos T, monocitos/macrófagos y células NK, respectivamente, y continuar el análisis en los

linfocitos B vivos. Los linfocitos B se identificaron como CD19+ y negativos para cualquier otro marcador de linaje (CD3- CD14- CD56-). Los plasmablastos y células plasmáticas fueron identificados en muestras de sangre y de tejido linfoide a partir de los linfocitos B totales con una alta expresión de CD27 (CD27^{hi}). Los plasmablastos se identificaron por la expresión de CD38 y la ausencia de expresión de CD138 (CD27^{hi} CD38^{hi} CD138⁻) (Liao et al., 2017), mientras que las células plasmáticas se identificaron por la expresión de CD38 y CD138 (CD27^{hi} CD38^{hi} CD138⁺) (Klippert, Neumann, & Stahl-Hennig, 2016). Las subpoblaciones de células B se identificaron con base a la expresión de las proteínas de superficie CD27 y CD21 (Titanji et al., 2010): naive, (N, CD27- CD21+), memoria activada (MA, CD27+ CD21-), memoria en reposo (MR, CD27+ CD21+), y memoria tipo tejido (MTT, CD27- CD21-) (Fig. 8).

Los datos obtenidos se analizaron en el software Flowjo (V.10). Los resultados se reportan en porcentajes e intensidades medias de fluorescencia (IMF). La IMF es una medida de la expresión de una proteína por célula analizada.

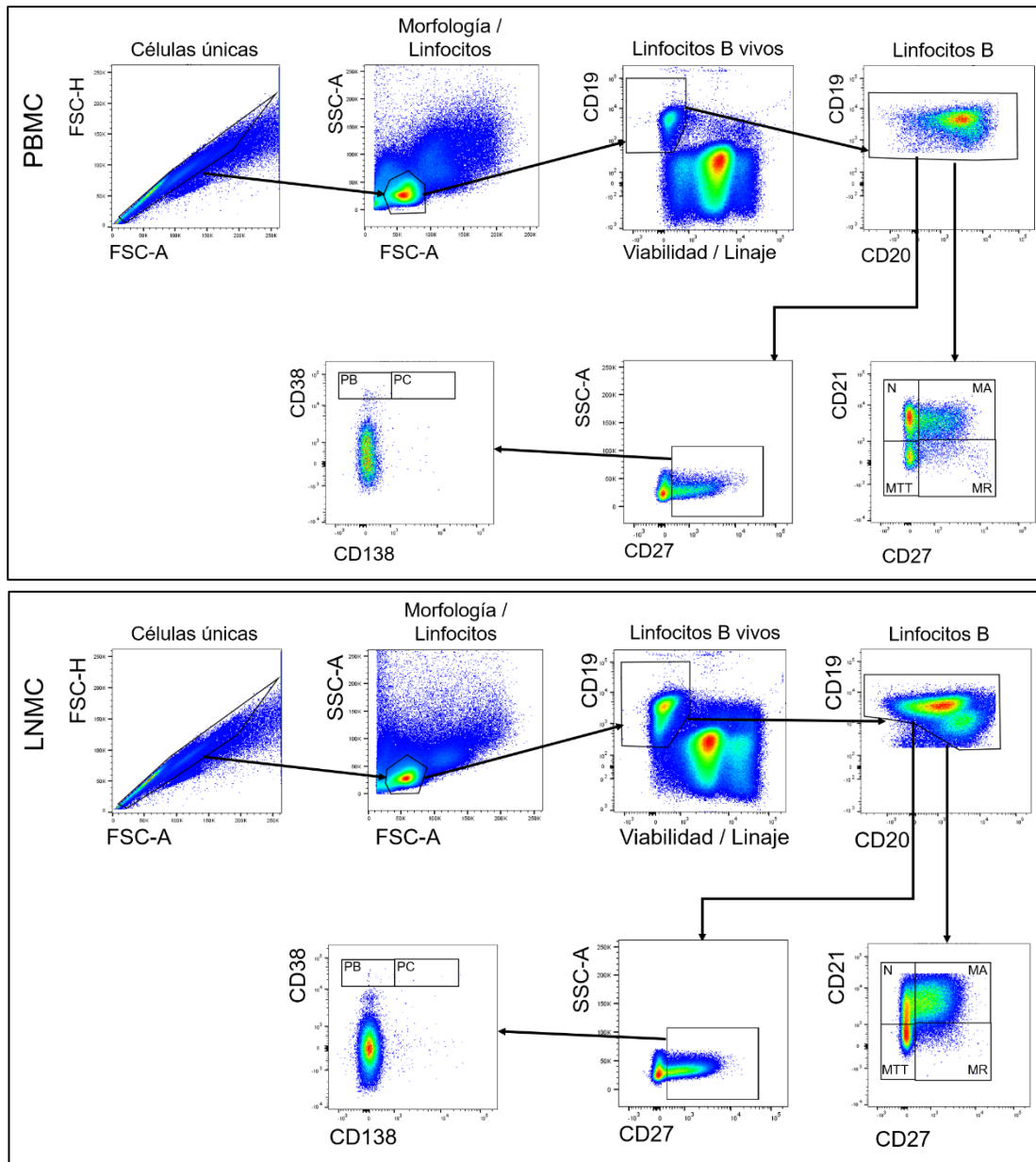


Fig. 8 Estrategia representativa de análisis fenotípico de los linfocitos B en sangre y tejido linfoide en una muestra de VIH negativo. PBMC: sangre; LNMC: tejido linfoide. N: linfocitos B naive; MA: linfocitos B de memoria activada; MR: linfocitos B de memoria en reposo; MTT: linfocitos B de memoria tipo tejido; PB: plasmablastos; PC: células plasmáticas.

4.5 Análisis estadístico

Se utilizaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon para determinar diferencias significativas entre tejidos y la de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn para determinar diferencias significativas entre grupos. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism (V.7.04). Se consideró la significancia si el valor de P es menor a 0.05.

Resultados

5.1 Porcentaje de linfocitos B totales en sangre y tejido en las diferentes etapas de la infección por el VIH.

Para describir la distribución de linfocitos B totales en sangre y tejido linfoide en muestras de humanos adultos, analizamos los porcentajes de estas células en ambos tejidos en los grupos de personas VIH neg y en la etapa aguda y crónica de la infección por el VIH. Observamos que el porcentaje de linfocitos B totales fue mayor en tejido linfoide, comparado con sangre, en los tres grupos estudiados (Fig. 9.a). Adicionalmente, nos preguntamos si el porcentaje de los linfocitos B totales difiere dependiendo de la etapa de la infección por VIH. Encontramos que el porcentaje de linfocitos B totales del grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, fue menor en sangre ($p=0.0003$) y mayor en tejido linfoide ($p=0.0029$), comparado con el grupo sin VIH (Fig. 9.b).

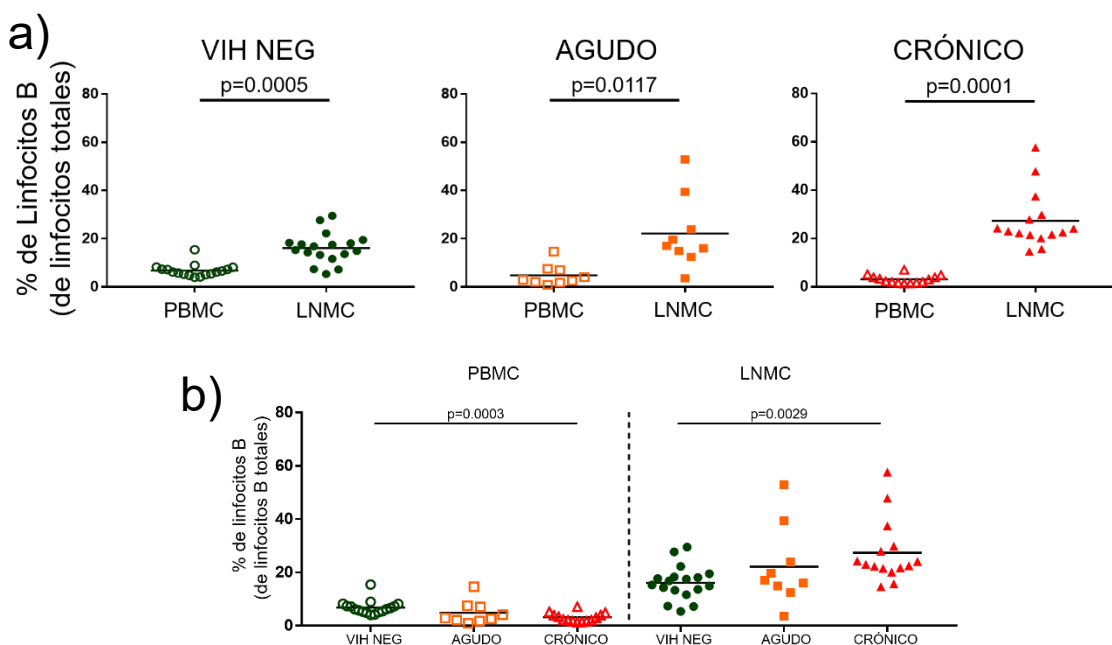


Fig. 9. a - b) Porcentaje de linfocitos B del total de linfocitos en sangre y tejido linfoide en el grupo sin VIH, en la etapa aguda y en la etapa crónica de la infección por VIH. Consideramos linfocitos B como células CD19+ y negativos para cualquier otro marcador de linaje celular (CD3, CD14 y CD56). Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar las diferencias entre tejidos y la de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: células de tejido linfoide, figuras sólidas; **VIHneg**: grupo sin VIH, círculos verdes; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados amarillos; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos rojos.

5.2 Porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas en sangre y tejido linfoide.

Para determinar el tejido de localización preferencial de las células secretoras de anticuerpo en pacientes VIH neg y en la etapa aguda y crónica de la infección por el VIH, evaluamos los porcentajes de plasmablastos y células plasmáticas en sangre y tejido linfoide en todos los grupos. Observamos que el porcentaje de plasmablastos fue mayor en sangre en el grupo sin VIH ($p=0.0073$) y en el grupo en la etapa aguda de la infección por el VIH ($p=0.0059$), comparado con tejido linfoide de cada grupo. Se observó una tendencia similar en el grupo en la etapa crónica ($p=0.0863$) (Fig. 10.a). En relación al porcentaje de células plasmáticas, el porcentaje de éstas fue mayor en sangre, con respecto a tejido linfoide, únicamente en el grupo en la etapa aguda de la infección por el VIH ($p=0.0156$). Los porcentajes de células plasmáticas fueron muy similares entre sangre y tejido linfoide en los grupos sin VIH y en la etapa crónica de la infección por VIH (Fig. 10.b).

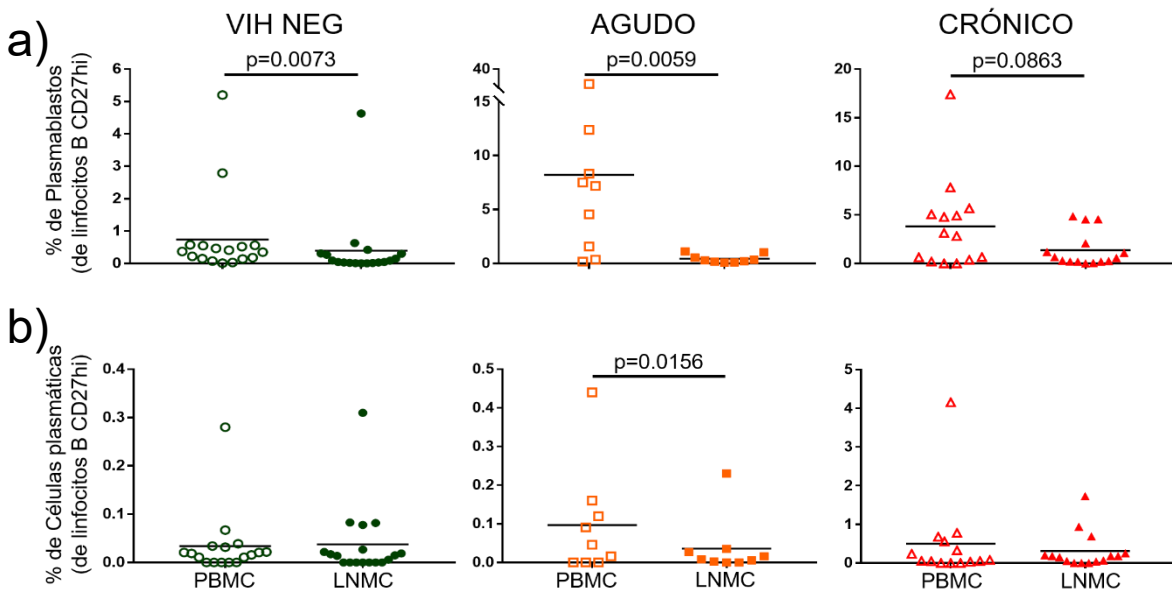


Fig. 10. El porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas es mayor en sangre. Porcentaje de plasmablastos (a) y células plasmáticas (b) en sangre y tejido linfoide en el grupo sin VIH y en la etapa aguda y crónica de la infección por el VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar las diferencias entre tejidos (PBMC vs LNMC). Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos verdes; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados amarillos; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos rojos.

5.3 Porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas en las diferentes etapas de la infección por VIH.

Para evaluar si el porcentaje de plasmablastos y células plasmáticas difiere en la infección por el VIH, se compararon los porcentajes de plasmablastos y células plasmáticas en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH, tanto en sangre como en tejido linfoide (Fig. 11).

Encontramos que, en sangre, el porcentaje de plasmablastos es mayor durante la etapa aguda de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH ($p=0.0073$). Mientras que, el porcentaje de plasmablastos en tejido linfoide fue mayor en la etapa crónica de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH ($p=0.0116$) (Fig. 11.a).

Respecto al porcentaje de las células plasmáticas, no se observaron diferencias en sangre ni en tejido linfoide en el grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH. Sin embargo, encontramos que el porcentaje de células plasmáticas fue mayor en sangre ($p=0.0303$) y tejido linfoide ($p=0.0137$) en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH (Fig. 11).

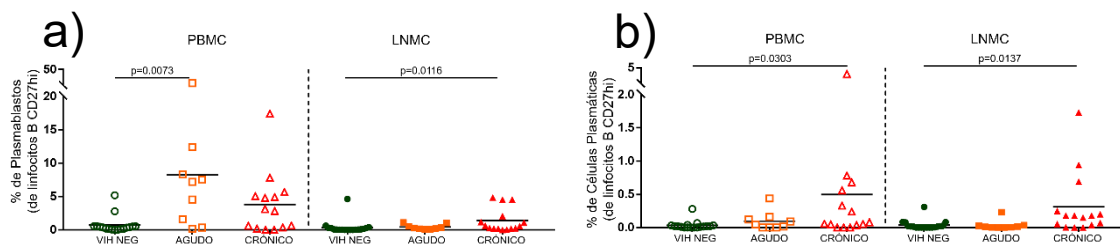


Fig. 11. Porcentaje de plasmablastos (a) y células plasmáticas (b) de linfocitos B CD27hi en sangre y tejido linfoide en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH en sangre y tejido linfoide. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos verdes; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados amarillos; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos rojos.

5.4 Niveles de expresión de CD38 y CD138 en linfocitos B totales.

Para determinar si la expresión de CD38 y CD138 es diferente dependiendo del tejido de localización o de la etapa de la infección por VIH, se comparó el nivel de expresión (reportado en IMF) de CD38 y CD138 en los linfocitos B totales de los tejidos de los diferentes grupos (Fig. 12).

Se observó que la expresión de CD38 y la de CD138 no difirió entre sangre y tejido linfoide, esto fue evidente en todos los grupos estudiados (Fig. 12). No obstante, la expresión de CD38 (IMF) en los linfocitos B de sangre fue mayor en el grupo en la etapa aguda y en la etapa crónica de la infección por VIH ($p=0.026$ y $p=0.0342$, *etapa aguda y crónica de la infección, respectivamente*), comparada con la expresión en sangre del grupo sin VIH. De manera importante, también observamos que la expresión de CD38 en células B de tejido linfoide es mayor en el tejido linfoide de las personas en la etapa crónica de la infección por VIH ($p=0.0018$; Fig. 12.a).

La expresión de CD138 (IMF) en los linfocitos B totales fue mayor únicamente en sangre en la etapa crónica de la infección por el VIH, respecto al grupo sin VIH ($p=0.0236$). La expresión de CD138 (MFI) en los linfocitos B totales fue similar en tejido linfoide entre los grupos estudiados (Fig. 12.b).

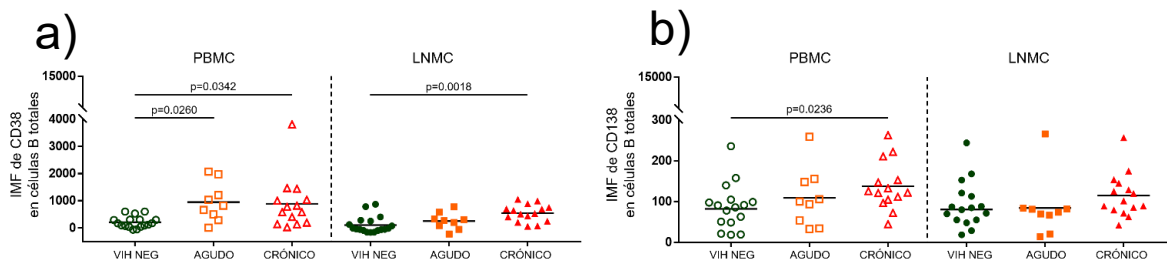


Fig. 12. a) Expresión (IMF) de CD38 en linfocitos B totales en sangre y tejido linfoide en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por el VIH. b) Expresión (MFI) de CD138 en linfocitos B totales en sangre y tejido linfoide en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por el VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar la diferencia entre los grupos. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg:** grupo sin VIH, círculos verdes; **agudo:** grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados

5.5 Distribución de subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide en los grupos estudiados.

Para tener una caracterización más detallada de los linfocitos B en sangre y tejido linfoide, determinamos la distribución de células naive, memoria activada, memoria en reposo y memoria tipo tejido. Encontramos que, la subpoblación predominante en sangre de las personas sin VIH fueron los linfocitos B naive (47.08%). Mientras que los porcentajes de las poblaciones de linfocitos B naive, de memoria en reposo y de memoria tipo tejido en el tejido linfoide fueron muy similares, cada subpoblación representó cerca del 30% del total de linfocitos B. Los linfocitos B de memoria

activada representaron menos del 5% del total de linfocitos B en ambos tejidos (Fig. 13).

La distribución de los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos B en el grupo de personas en la etapa aguda de la infección por VIH fueron similares en sangre y tejido linfoide. Los linfocitos B naive y de memoria tipo tejido, representaron cerca del 40% cada uno, mientras que los de memoria activada representaron menos del 5% del total de linfocitos B (Fig. 13). La subpoblación predominante en el grupo de personas en la etapa crónica de la infección por VIH fueron los linfocitos B de memoria tipo tejido, tanto en sangre como en el tejido linfoide (52.39% y 60.31%, en sangre y tejido linfoide, respectivamente). El porcentaje de los linfocitos B naive, en sangre y tejido linfoide del grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, representó menos del 25% del total de linfocitos B. Los linfocitos de memoria activada y de memoria en reposo representaron menos del 15%, cada uno, en ambos tejidos (Fig. 13).

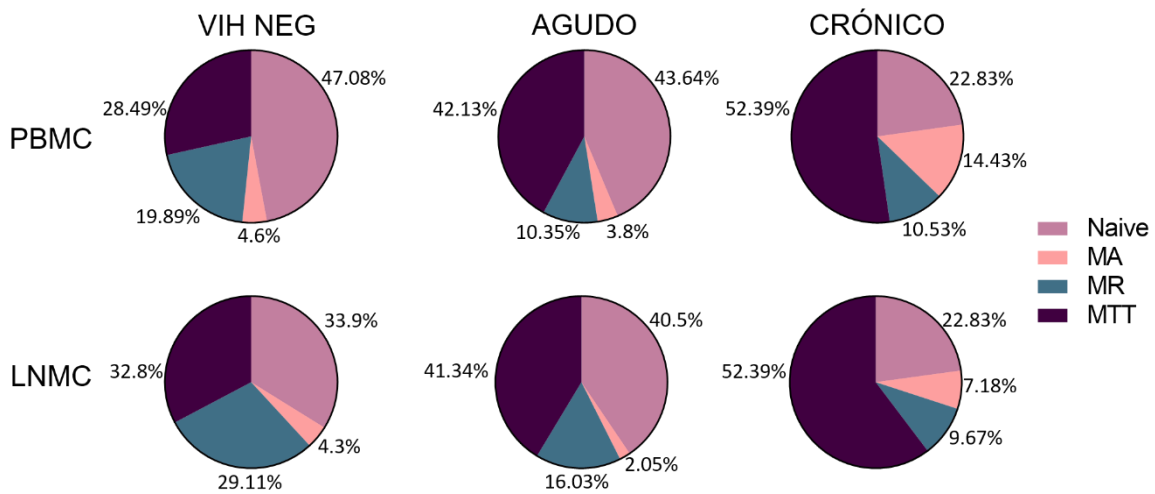


Fig. 13. Representación en gráficas de pay de la distribución de porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos B en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH en sangre y tejido linfoide. PBMC: sangre; LNMC: tejido linfoide; **VIH neg**: grupo sin VIH; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH; Naive: linfocitos B naive, morado claro; MA: linfocitos B de memoria activada, rosa; MR: linfocitos B de memoria en reposo, azul; MTT: linfocitos B de memoria tipo tejido, morado.

5.6 Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide.

De acuerdo con lo reportado, los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B, previamente descritas, son diferentes en sangre y tejido linfoide en modelos de primates no humanos (Neumann et al., 2015; Titanji et al., 2010). Por ello, en este trabajo quisimos conocer si los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos B cambian con respecto al tejido de localización celular en humanos.

Observamos que, en las muestras de personas sin VIH, la población con mayor porcentaje es la de linfocitos B naive, siendo ésta de mayor porcentaje en sangre que en tejido linfoide ($p=0.0004$; Fig. 14.a). Mientras que el porcentaje de linfocitos de memoria en reposo es mayor en tejido linfoide, comparado con muestras de sangre ($p=0.0133$; Fig. 14.c).

Observamos también, que en la infección por VIH los porcentajes de las poblaciones de células B tanto en sangre como en tejido linfoide son diferentes respecto al grupo VIH neg. El porcentaje de células B naive fue similar en sangre y tejido linfoide desde la etapa aguda de la infección por VIH (Fig. 14.a). En cambio, encontramos que el porcentaje de células B de memoria activada es significativamente menor en tejido linfoide, comparado con sangre, en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH (Fig. 14.b). Similar a lo encontrado en las muestras del grupo sin VIH, encontramos que el porcentaje de linfocitos B de memoria en reposo fue mayor en tejido linfoide, respecto a sangre, en la etapa aguda de la infección por VIH. Esta diferencia no se observó en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH (Fig. 14.c). De manera interesante, el porcentaje de linfocitos B de memoria tipo tejido fue mayor en tejido linfoide, comparado con el porcentaje en sangre, únicamente en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH ($p=0.0338$; Fig. 14.d).

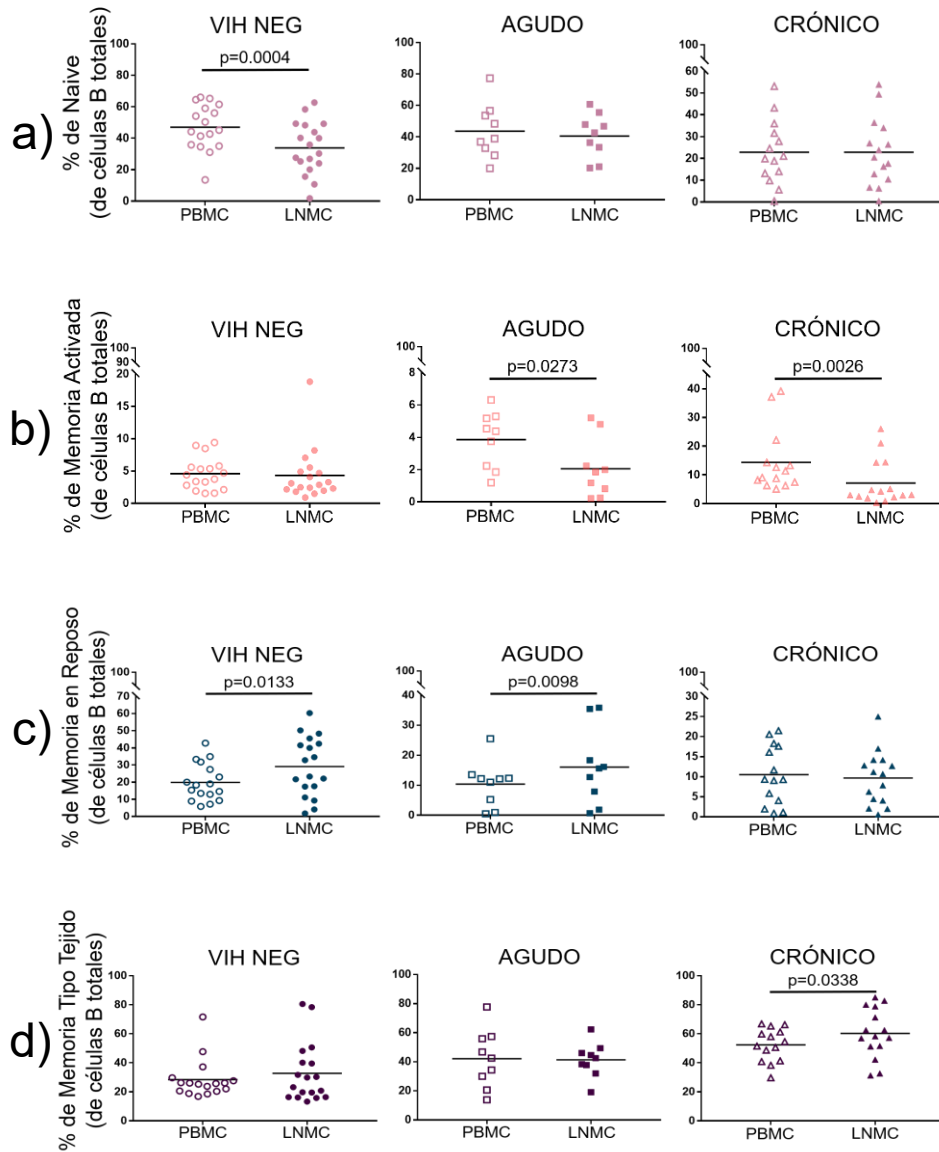


Fig. 14. Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide. Porcentaje de linfocitos B naive (a), de memoria activada (b), de memoria en reposo (c) y de memoria tipo tejido (e) en sangre y tejido linfoide en el grupo de personas sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar las diferencias entre tejidos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre; LNMC: tejido linfoide; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH; Naive: morado claro; Memoria activada: rosa; Memoria en reposo: azul; Memoria tipo tejido: morado.

5.7 Porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B en las diferentes etapas de la infección por VIH.

Se ha reportado que el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B está alterada en la infección por VIH (Fogli et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado únicamente en muestras de sangre periférica (Moir & Fauci, 2009). En este estudio quisimos conocer si existen cambios en el porcentaje de las subpoblaciones de células B, no sólo en sangre, sino también en tejido linfoide durante la infección aguda y crónica por VIH.

No se observaron diferencias en los porcentajes de las distintas subpoblaciones de linfocitos B en el grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, en relación con el grupo sin VIH (Fig. 15). Sin embargo, sí encontramos que, en la etapa crónica de la infección por VIH, el porcentaje de linfocitos B naive es menor en sangre, mientras que el de memoria en reposo es menor en tejido linfoide, ambos respecto al grupo sin VIH. De manera interesante, observamos un mayor porcentaje de las poblaciones de memoria activada en sangre y de memoria tipo tejido en sangre y tejido linfoide en la etapa crónica de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH (Fig. 15).

También observamos que el porcentaje de linfocitos B naive en la etapa crónica de la infección por VIH, fue significativamente menor, en sangre y tejido linfoide, respecto a la etapa aguda de la infección por VIH. De manera similar, el porcentaje de linfocitos de memoria activada durante la etapa crónica de la infección por VIH fue significativamente mayor respecto a la etapa aguda de la infección por VIH, tanto en sangre como en tejido linfoide (Fig. 15).

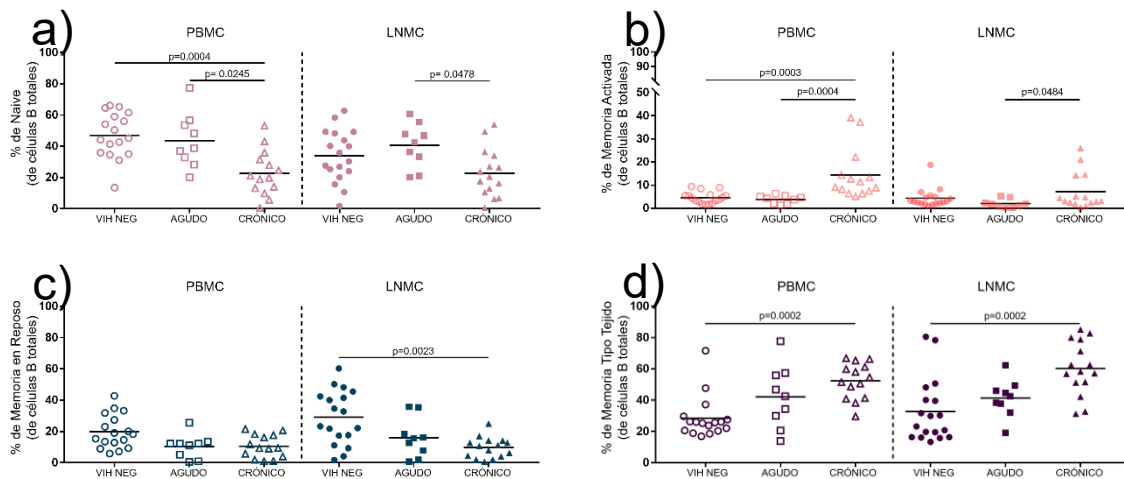


Fig. 15. Cambios en el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B durante la infección por VIH. Porcentaje de linfocitos B naive (a), de memoria activada (b), de memoria en reposo (c) y de memoria tipo tejido (d) en sangre y tejido linfoide en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección, triángulos; Naive: morado; Memoria activada: rosa; Memoria en reposo: azul; Memoria tipo tejido: morado.

5.8 Los linfocitos B de memoria activada y de memoria tipo tejido expresan CD20 con mayor densidad respecto a los linfocitos B naive y de memoria en reposo.

De acuerdo a lo reportado (Titanji et al., 2010), el marcador de activación CD20 se expresa de manera diferenciada en las subpoblaciones de memoria. En este trabajo quisimos saber si la expresión de CD20 en las poblaciones de memoria se modifica durante la infección por VIH. Para esto determinamos la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD20 y se comparó entre las subpoblaciones.

Los linfocitos B de memoria tipo tejido y los de memoria activada del grupo de personas sin VIH, expresaron más CD20 (IMF) comparado con los linfocitos B naive y de memoria en reposo, tanto en sangre como en tejido linfoide (Fig. 16.a). Interesantemente, la expresión diferencial de CD20 en las diferentes subpoblaciones de células B no se observó en las muestras de sangre, ni en las de tejido linfoide del grupo de personas en la etapa aguda de la infección por VIH (Fig.

16.b). En cambio, durante la etapa crónica de la infección por VIH observamos que los linfocitos B de memoria tipo tejido expresaron CD20 con mayor intensidad en sangre y tejido linfoide, en comparación con los linfocitos B naive y de memoria en reposo (Fig. 16.c).

Para determinar si la expresión de CD20 es diferente en los tejidos analizados y si ésta se modifica con la infección por VIH, se comparó el nivel de expresión (MFI) de CD20 en las subpoblaciones de linfocitos B de los tejidos de los diferentes grupos.

Observamos que la expresión de CD20 fue mayor en sangre, comparado con tejido linfoide, en el grupo sin VIH y en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, en todas las subpoblaciones celulares, excepto en los linfocitos de memoria activada en el grupo sin VIH y en los linfocitos B naive en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH. En cambio, durante la fase aguda de la infección por VIH, no se observó diferencia en la expresión de CD20 en relación con el tejido de localización de las células (Fig. 16. d - g).

No se observaron diferencias en la expresión de CD20 en las subpoblaciones de linfocitos B durante la etapa aguda de la infección por VIH en sangre ni en tejido linfoide con respecto al grupo sin VIH. No obstante, la expresión de CD20 fue mayor en todas las subpoblaciones de linfocitos B durante la etapa crónica de la infección por VIH, comparado con el grupo sin VIH. Éste aumento en la expresión de CD20 durante la etapa crónica de la infección fue significativo en los linfocitos B naive en tejido linfoide ($p=0.0068$), en los de memoria activada en sangre ($p=0.0036$) y en sangre y tejido linfoide en los de memoria en reposo ($p=0.0356$ y $p=0.0117$, *sangre y tejido linfoide, respectivamente*) y de memoria tipo tejido ($p=0.0024$ y $p=0.0123$, *sangre y tejido linfoide, respectivamente*). Además, el aumento en la expresión de CD20 durante la etapa crónica de la infección por VIH también fue significativamente mayor respecto al grupo en la etapa aguda de la infección por VIH en los linfocitos B de memoria activada en sangre ($p=0.0036$) y en los de memoria tipo tejido en sangre ($p=0.0024$) y tejido linfoide ($p=0.0159$; Fig. 16).

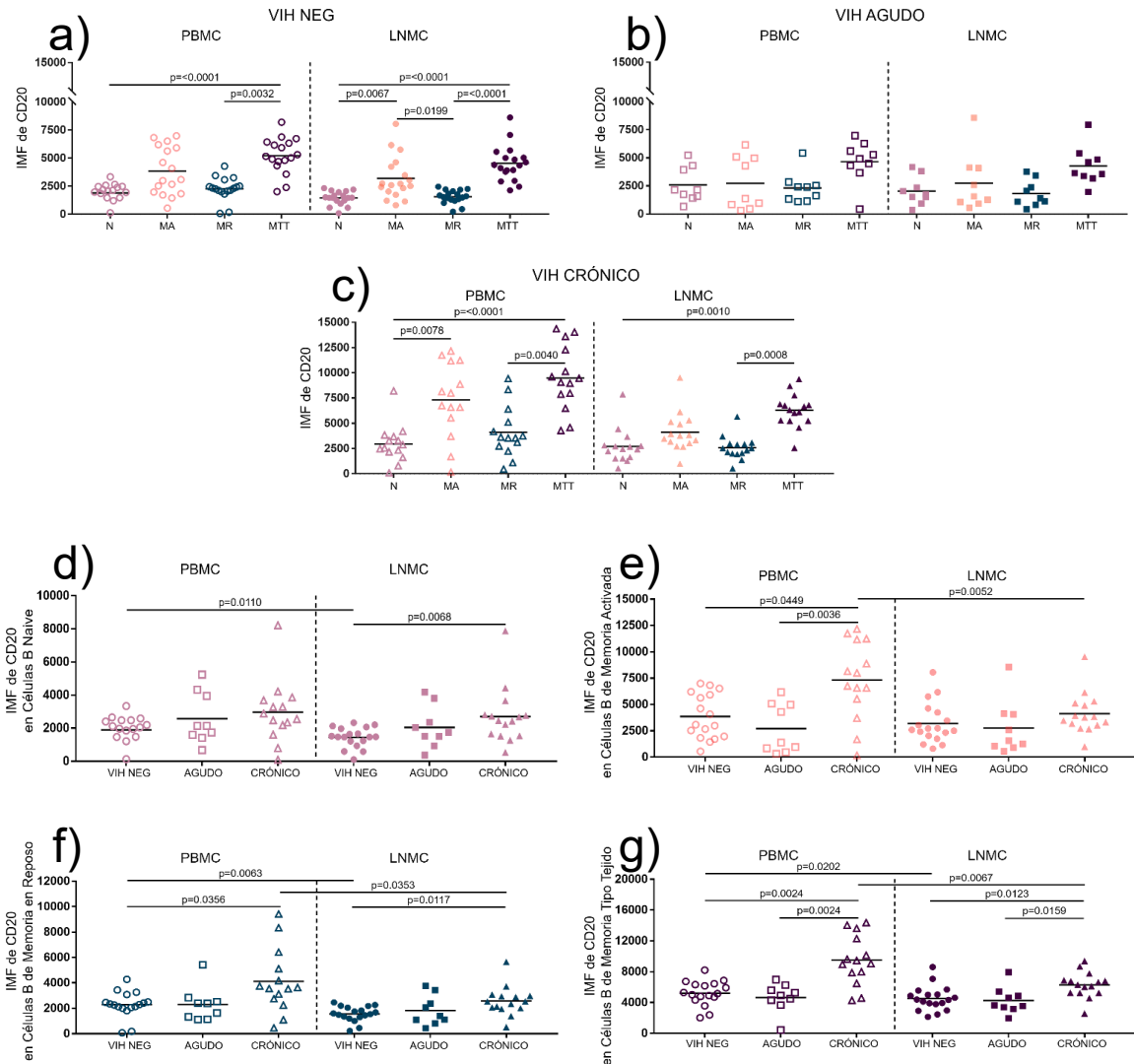


Fig. 16. Expresión (IMF) de CD20 en sangre y tejido linfóide en las subpoblaciones de linfocitos B naive (d), de memoria activada (e), de memoria en reposo (f) y de memoria tipo tejido (g) en el grupo sin VIH (a) y en los grupos en la etapa aguda (b) y crónica (c) de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar la diferencia entre tejidos y la de Kruskal-Wallis para determinar la diferencia entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las barras horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfóide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos; N: naive, morado claro; MA: memoria activada, rosa; MR: memoria en reposo, azul; MTT: memoria tipo tejido, morado.

5.5 Expresión de receptores determinantes de alojamiento en las subpoblaciones de linfocitos B.

Se ha propuesto que la alteración de la expresión de los receptores determinantes de alojamiento en linfocitos B de sangre periférica deriva en una respuesta humoral ineficiente, por ello, en este estudio quisimos conocer si el porcentaje de linfocitos B con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento se veía alterada dependiendo de la localización celular o en las diferentes etapas de la infección por VIH. Se evaluaron los porcentajes de linfocitos B que expresan ambos receptores (CCR7+ CXCR5+), sólo un receptor (CCR7+ CXCR5- ó CCR7- CXCR5+) o ninguno de los receptores (CCR7- CXCR5-) en sangre y tejido linfoide de los diferentes grupos estudiados.

Linfocitos B Naive

Los linfocitos B naive con mayor porcentaje, en todos los grupos estudiados, fueron los CCR7+ CXCR5+ tanto en sangre como en tejido linfoide (Fig. 17.a). Encontramos una mayor proporción de linfocitos CCR7+ CXCR5+ en sangre, comparado con tejido linfoide, en el grupo sin VIH ($p=0.0075$) y en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH ($p=0.0453$), pero no durante la infección aguda por el VIH (Fig. 17.b). Además, observamos un mayor porcentaje de linfocitos CCR7+ CXCR5- en sangre, comparado con tejido linfoide, en todos los grupos estudiados, mientras que los linfocitos CCR7- CXCR5+ tuvieron un mayor porcentaje en tejido linfoide, comparado con sangre, en todos los grupos estudiados (Fig. 17. c, d). También, encontramos un mayor porcentaje de linfocitos B naive CCR7- CXCR5- en tejido linfoide, comparado con sangre, únicamente en el grupo sin VIH ($p=0.0002$; Fig. 17.e).

En la infección por VIH no se observaron diferencias en el porcentaje de linfocitos B naive con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento.

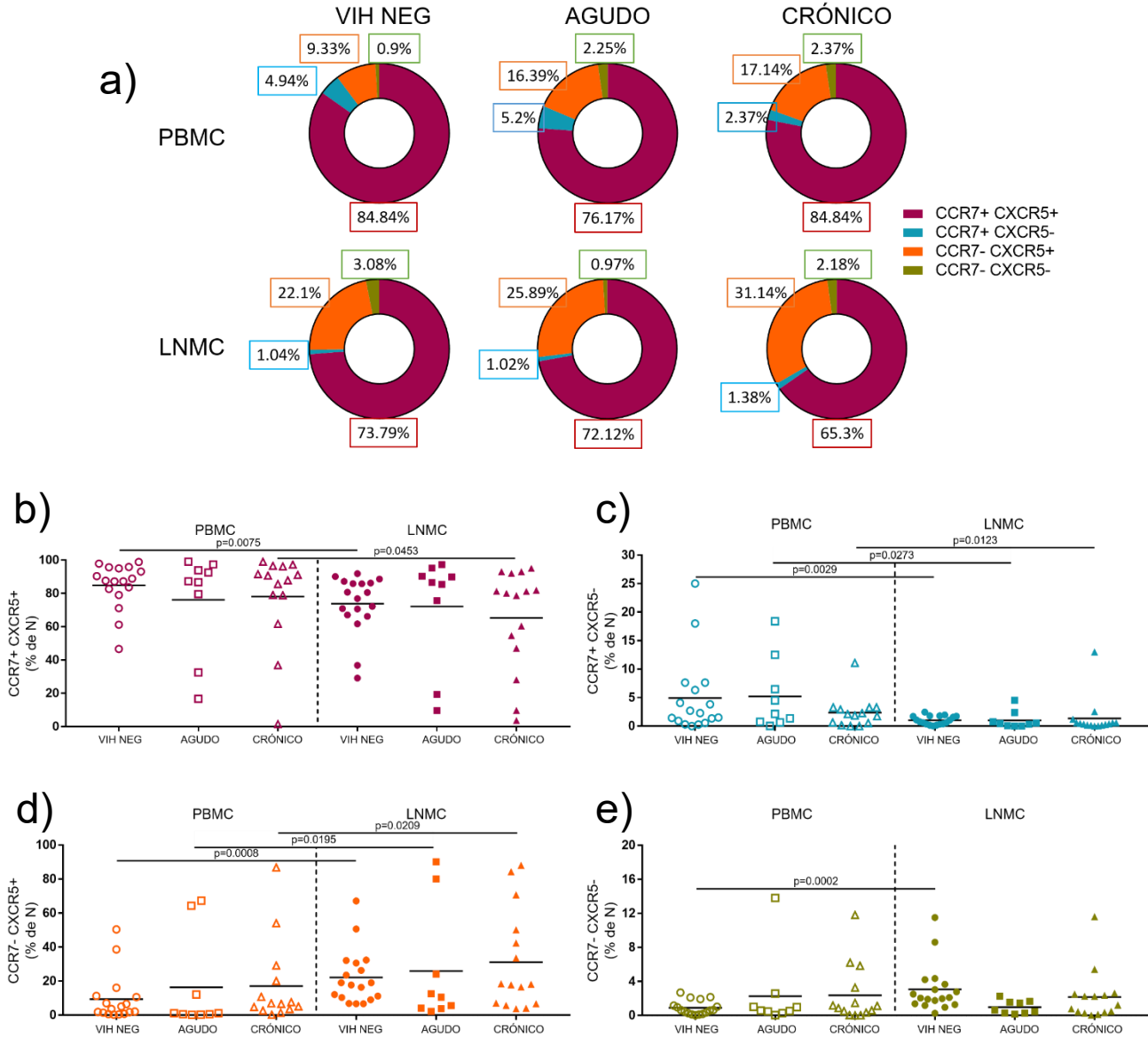


Fig. 17. a) Representación en gráficas de pay de la distribución de porcentajes de los linfocitos B naive con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH en sangre y en tejido linfoide. b - e) Porcentaje de linfocitos B naive CCR7+ CXCR5+ (b), CCR7+ CXCR5- (c), CCR7- CXCR5+ (d) y CCR7- CXCR5- (e) en sangre y tejido linfoide en el grupo de personas sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar la diferencia entre tejidos y la de Kruskal-Wallis para determinar la diferencia entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las bandas horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos; N: naive; CCR7+ CXCR5+ morado; CCR7+ CXCR5-: azul; CCR7- CXCR5+: naranja; CCR7- CXCR5-: verde.

Linfocitos B de Memoria Activada

Similar a lo encontrado en la población de células B naive, la población con mayor porcentaje tanto en sangre como en tejido linfoide fue la doble positiva (CCR7 + CXCR5+; Fig. 18.a). No encontramos diferencia en el porcentaje de esta subpoblación entre sangre y tejido linfoide, salvo en las muestras de infección aguda (Fig. 18.b). Encontramos también que el porcentaje de linfocitos B de memoria activada CCR7+ CXCR5- fue mayor en sangre, comparado con tejido linfoide, en el grupo sin VIH y en la etapa aguda de la infección por VIH, pero no en la etapa crónica de la infección por VIH (Fig. 18.c). El porcentaje de linfocitos CCR7- CXCR5+ fue mayor en tejido linfoide, comparado con sangre, en todos los grupos estudiados (Fig. 18.d). De manera importante, encontramos que la subpoblación doble negativa (CCR7- CXCR5-) fue mayor en sangre, comparado con tejido linfoide, en todos los grupos estudiados (Fig. 18.e).

No se encontraron diferencias en el porcentaje de los linfocitos B de memoria activada con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en la etapa aguda o crónica de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH.

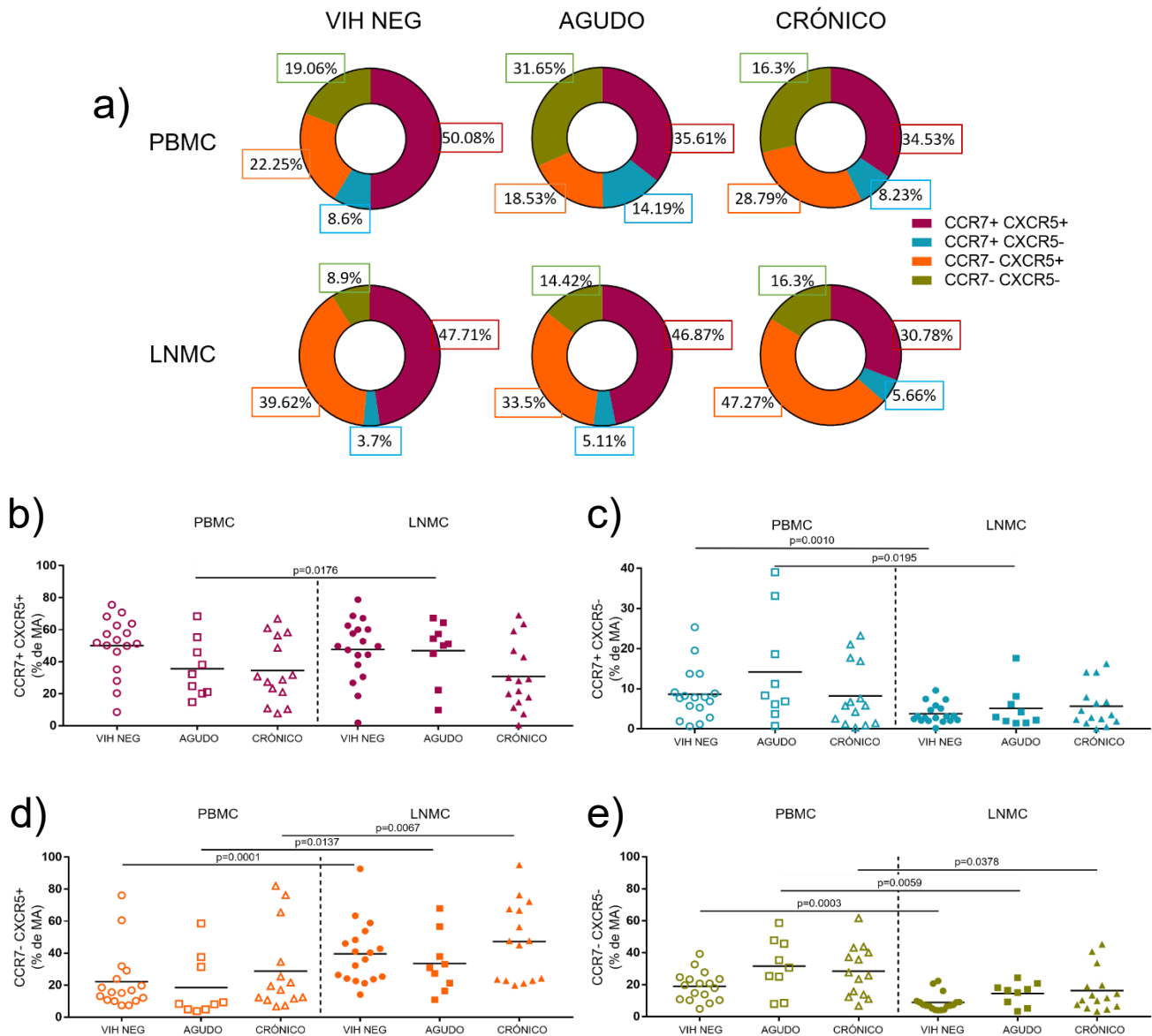


Fig. 18. a) Representación en gráficas de pay de la distribución de porcentajes de los linfocitos B de memoria activada con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH en sangre y en tejido linfoide. b – e) Porcentaje de linfocitos B de memoria activada CCR7+ CCR5+ (b), CCR7+ CXCR5- (c), CCR7- CXCR5+ (d) y CCR7- CCR5- (e) en sangre y en tejido linfoide en el grupo de personas sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar la diferencia entre tejidos y la de Kruskal-Wallis para determinar la diferencia entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las bandas horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos; MA: memoria activada; CCR7+ CCR5+ morado; CCR7+ CXCR5-: azul; CCR7- CXCR5+: naranja; CCR7- CCR5-: verde.

Linfocitos B de Memoria en Reposo

El porcentaje de linfocitos B de memoria en reposo predominante, en todos los grupos estudiados, fue la de CCR7+ CXCR5+ tanto en sangre como en tejido linfoide (Fig. 19.a). De acuerdo con lo esperado, encontramos que la población CCR7+ CXCR5- tuvo un mayor porcentaje en sangre, en comparación con tejido linfoide, tanto en las muestras del grupo sin VIH como en las muestras de las diferentes etapas de la infección por VIH (Fig. 19.c). Ninguna de las poblaciones que expresan estos receptores determinantes de alojamiento dentro del tejido linfoide se afectaron durante la infección por VIH, los porcentajes de las subpoblaciones estudiados son similares en todos los grupos estudiados (Fig. 19).

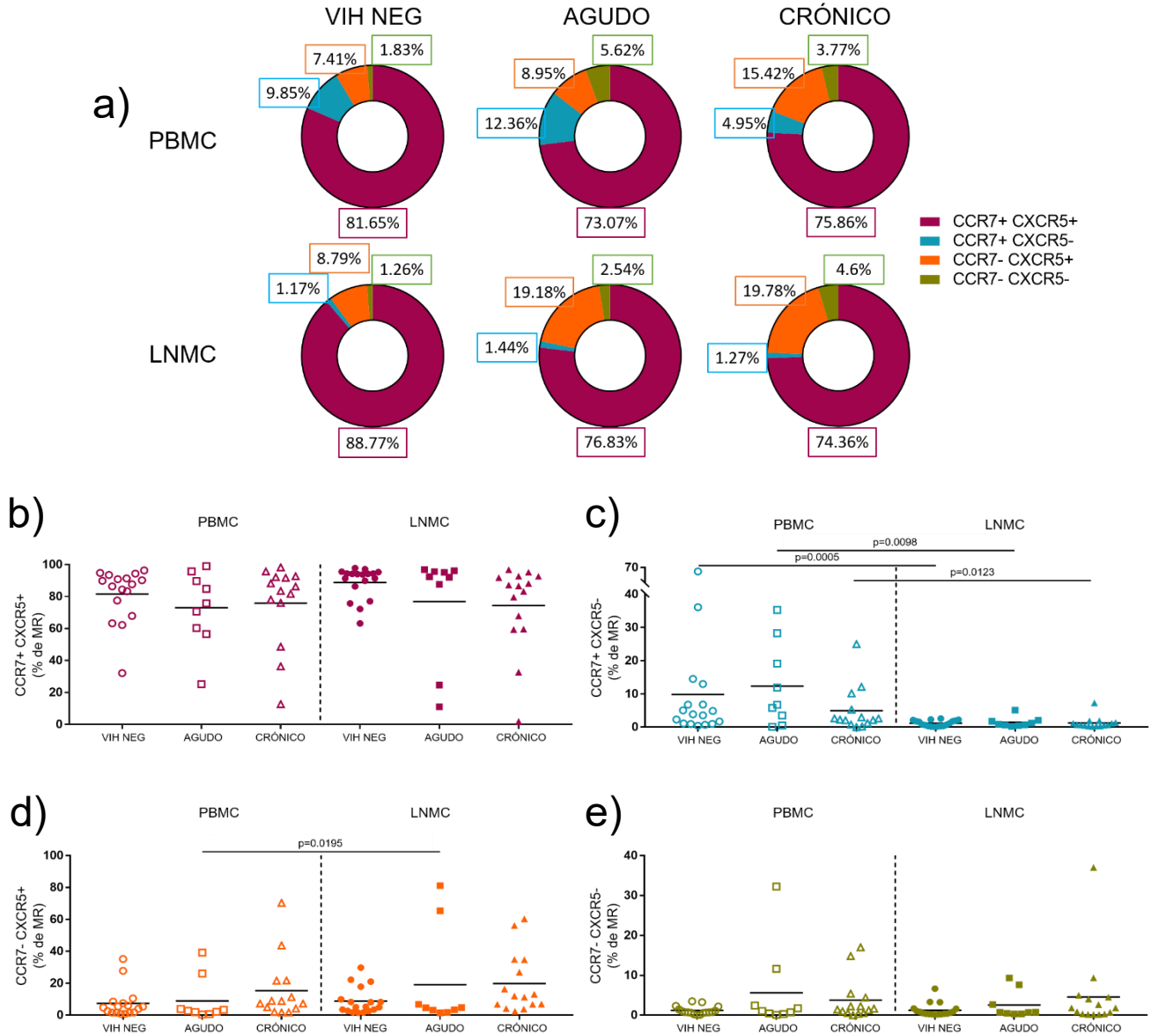


Fig. 19. a) Representación en gráficas de pay de la distribución de porcentajes de los linfocitos B de memoria en reposo con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH en sangre y en tejido linfoide. b – e) Porcentaje de linfocitos B de memoria en reposo CCR7+ CCR5+ (b), CCR7+ CXCR5- (c), CCR7- CXCR5+ (d) y CCR7- CXCR5- (e) en sangre y tejido linfoide en el grupo de personas sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar la diferencia entre tejidos y la de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las bandas horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos; MR: memoria en reposo; CCR7+ CXCR5+ morado; CCR7+ CXCR5-: azul; CCR7- CXCR5+: naranja; CCR7- CXCR5-: verde.

Linfocitos B de Memoria Tipo Tejido

El porcentaje predominante de linfocitos B de memoria tipo tejido en el grupo sin VIH y en el grupo en la etapa crónica de la infección fue la de los CCR7- CXCR5+, tanto en sangre como en tejido linfoide, mientras que en el grupo en la etapa aguda de la infección por VIH esta población fue la predominante en el tejido linfoide (Fig. 20.a). A pesar de que no se encontraron diferencias en el porcentaje de los linfocitos B de memoria tipo tejido con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en la etapa aguda o crónica de la infección por VIH, respecto al grupo sin VIH (Fig. 20. b-e); sí se encontraron diferencias en su distribución entre tejidos.

De manera interesante, observamos un mayor porcentaje de linfocitos CCR7+ CXCR5+ en sangre, comparado con tejido linfoide, únicamente en el grupo sin VIH ($p=0.0192$; Fig. 20.b). Además, encontramos que el porcentaje de los linfocitos B de memoria tipo tejido CCR7+ CXCR5- y CCR7- CXCR5- fue mayor en sangre, comparado con tejido linfoide, y los linfocitos B CCR7- CXCR5+ fue mayor en tejido linfoide, comparado con sangre, en todos los grupos estudiados (Fig. 20).

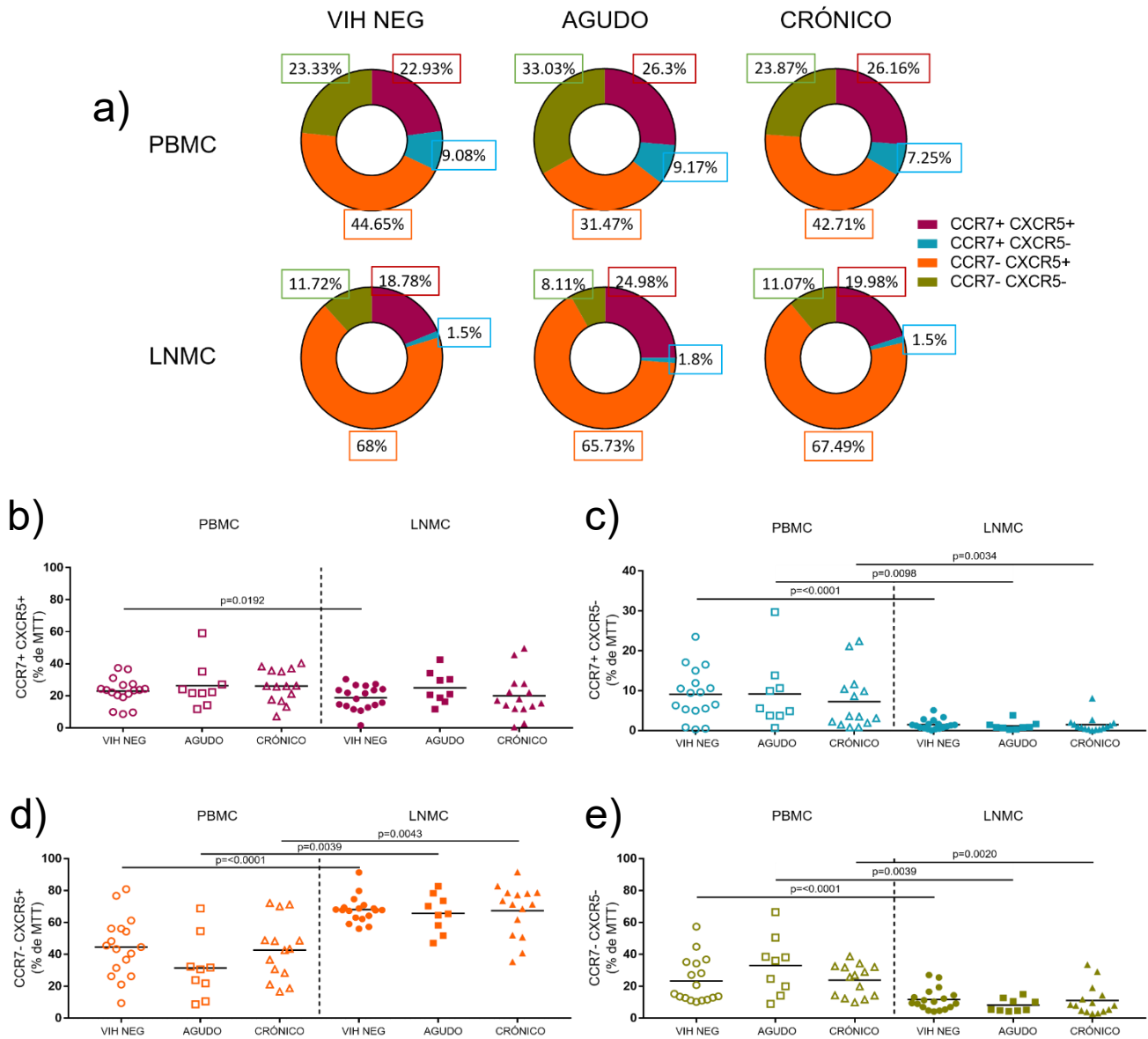


Fig. 20. a) Representación en gráficas de pay de la distribución de porcentajes de los linfocitos B de memoria tipo tejido con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en el grupo sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH en sangre y en tejido linfoide. b – e) Porcentaje de linfocitos B de memoria tipo tejido CCR7+ CCR5+ (b), CCR7+ CXCR5- (c), CCR7- CXCR5+ (d) y CCR7- CXCR5- (e) en sangre y tejido linfoide en el grupo de personas sin VIH y en los grupos en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH. Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para determinar la diferencia entre tejidos y la de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre grupos. Se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Las bandas horizontales representan la media y los puntos, datos individuales. PBMC: sangre, figuras sin relleno; LNMC: tejido linfoide, figuras sólidas; **VIH neg**: grupo sin VIH, círculos; **agudo**: grupo en la etapa aguda de la infección por VIH, cuadrados; **crónico**: grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, triángulos; MTT: memoria tipo tejido; CCR7+ CXCR5+ morado; CCR7+ CXCR5-: azul; CCR7- CXCR5+: naranja; CCR7- CXCR5-: verde.

Discusión

La mayoría de los estudios de los linfocitos B se han realizado en muestras de sangre de humanos o tejidos de primates no humanos o ratones (Brocca-Cofano et al., 2017; Das, Veazey, et al., 2011; Moir et al., 2010; Titanji et al., 2010). Por lo tanto, con este estudio contribuimos al conocimiento general de los linfocitos B en tejido linfoide de humanos adultos en presencia y ausencia del VIH.

En este estudio evaluamos el porcentaje de linfocitos B totales en sangre y en tejido linfoide secundario en la infección por el VIH. De acuerdo con lo esperado, encontramos un mayor porcentaje de linfocitos B totales en tejido linfoide, respecto a sangre, en todos los grupos estudiados. Los linfocitos B se desarrollan y maduran dentro del tejido linfoide, además, dentro del centro germinal reciben señales de supervivencia que propician la proliferación y maduración.

Durante la etapa crónica de la infección por VIH observamos un mayor porcentaje de linfocitos B totales en tejido linfoide, comparado con el grupo sin VIH. Este cambio en la distribución ya se ha reportado (Brocca-Cofano et al., 2017; Moir & Fauci, 2008) y se ha propuesto que esta diferencia de porcentajes es debido a la redistribución de linfocitos B en circulación hacia tejido linfoide (Moir et al., 2008; Titanji et al., 2010). Esto podría estar afectado por la activación y migración hacia tejido linfoide de los linfocitos B naive o el impedimento de la recirculación por la disposición de colágeno en el tejido linfoide (Dimopoulos et al., 2017; Estes, 2013; Lederman & Margolis, 2008).

Se ha reportado que el balance de las subpoblaciones de linfocitos B en sangre cambia en la infección persistente del VIH (Klein et al., 1998; Moir et al., 2010, 2008). En este estudio evaluamos los porcentajes de cuatro subpoblaciones de linfocitos B con base en la expresión de las proteínas de membrana CD27 y CD21 como se mencionó en la metodología (Titanji et al., 2010). Observamos que, de acuerdo con lo reportado, la subpoblación predominante en el grupo sin VIH, son los linfocitos B naive en ambos tejidos, mientras que, en el grupo en la etapa crónica de la infección por VIH, son los linfocitos B de memoria tipo tejido. Durante la etapa aguda de la infección por el VIH no observamos una subpoblación predominante,

por lo que creemos que esta etapa de la infección podría ser una etapa transicional y podría reflejar el posible resultado observado en la etapa crónica de la infección por VIH.

De manera interesante, observamos que cada subpoblación de linfocitos B se distribuye diferencialmente en sangre o tejido linfoide y esta distribución cambia en las diferentes etapas de la infección por VIH. Desde la etapa aguda observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos B de memoria activada en sangre, en relación a tejido linfoide y hasta la etapa crónica observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos B de memoria tipo tejido en tejido linfoide respecto a sangre. Aunado a esto, encontramos que durante la etapa crónica hay un aumento en el porcentaje de linfocitos de memoria activada y de memoria tipo tejido en relación con los demás grupos estudiados. El aumento de estas subpoblaciones es relevante debido a las características funcionales y fenotípicas que se han reportado. Ambas subpoblaciones tienen una menor capacidad proliferativa y una mayor expresión de proteínas inmunoreguladoras, además los linfocitos de memoria activada son propensos a procesos apoptóticos por la señalización de PD-1 (Moir et al., 2008, 2004; Titanji et al., 2010). Por lo tanto, la deficiencia en la respuesta humoral en la infección por el VIH podría estar asociada al aumento de estas subpoblaciones.

También, evaluamos la distribución de las células secretoras de anticuerpos en los tejidos y grupos estudiados. Encontramos que el porcentaje de plasmablastos es mayor en sangre, comparado con tejido linfoide, mientras que el porcentaje de células plasmáticas es similar entre sangre y tejido linfoide. Por lo tanto, el porcentaje de plasmablastos es diferente entre ambos tejidos, pero la de células plasmáticas no. Esto podría estar relacionado al sitio de maduración de cada subpoblación celular. Mientras que los plasmablastos maduran dentro del tejido linfoide y posteriormente migran hacia el sitio de inflamación, las células plasmáticas residen dentro de médula ósea y recirculan a sangre únicamente ante una reinfección.

Se ha reportado que en la infección por el VIH la distribución de las células secretoras de anticuerpo cambia (Moir et al., 2010). De acuerdo con lo esperado,

encontramos un mayor porcentaje de plasmablastos en sangre únicamente en la etapa aguda y un aumento de células plasmáticas en la etapa crónica. Se ha propuesto que el aumento de plasmablastos en la etapa aguda no es específico para VIH, sino un reflejo de la activación sistémica ocasionada por el VIH (Buckner et al., 2013). Además, se ha reportado que las células plasmáticas se distribuyen en médula ósea (Hammarlund E. et al., 2017; Medina, Segundo, Campos-Caro, González-García, & Brieva, 2002) y se ha propuesto que las células plasmáticas presentes en circulación o en tejidos linfoides son células con un fenotipo transicional (Medina et al., 2002). Por lo cual, podríamos inferir que el aumento en el porcentaje de las células secretoras de anticuerpos en las diferentes etapas de la infección por VIH no contribuye de mane directa a la neutralización del virus, pero es un marcador del estado inmunológico y la activación sistémica de cada etapa de la infección.

Debido a que el porcentaje de plasmablastos fue menor al 10% y el de las células plasmáticas menor del 1% del total de linfocitos B en todos los grupos, no se realizaron más estudios sobre la expresión de marcadores de activación, migración o de inmunoglobulinas en superficie en estas poblaciones celulares.

Posteriormente, se evaluó la expresión de las proteínas membranales CD38 y CD138 en los linfocitos B totales debido a su importancia en los procesos de activación y proliferación celular (Malavasi et al., 1992). La expresión de estas proteínas en los linfocitos B totales fue similar entre sangre y tejido linfoide en todos los grupos estudiados. Sin embargo, observamos que la expresión de CD38 aumentó desde la etapa aguda de la infección por VIH, mientras que la de CD138 aumentó hasta la etapa crónica de la infección por VIH. Esto podría ser un indicativo del estado de activación de los linfocitos B totales en cada etapa de la infección por el VIH, además, debido a su importancia en el reconocimiento de plasmablastos y células plasmáticas (Klippert et al., 2016; Liao et al., 2017; Malavasi et al., 1992), el aumento de la expresión de CD38 y CD138 también podría estar asociado al aumento de los porcentajes de las poblaciones celulares correspondientes.

La señalización de la proteína CD20 está asociada a vías de activación y producción de anticuerpos (Kuijpers et al., 2010; Morsy et al., 2013), además se ha reportado que las subpoblaciones de linfocitos B expresan de manera diferenciada la proteína membranal CD20 (Titanji et al., 2010). Nosotros evaluamos la expresión de CD20 en las subpoblaciones de linfocitos B de los tejidos y grupos previamente descritos. Encontramos que la expresión de CD20 es mayor en los linfocitos B de memoria activada y memoria tipo tejido. La expresión de CD20 fue mayor en la etapa crónica de la infección por el VIH. Se ha propuesto que CD20 es un canal de calcio asociado a la activación del BCR (Marshall et al., 2017; Morsy et al., 2013; Santos, 2018). De manera interesante observamos que los linfocitos B con marcadores de fenotipo exhausto (de memoria activada y de memoria tipo tejido) son los que tienen una mayor expresión de esta proteína, por lo que esto podría contribuir al constante estado de activación y de proliferación reportado para estas subpoblaciones, sin embargo, se necesitan estudios posteriores para determinar si esta proteína expresada es funcional en estas células y si se correlaciona con el aumento en la activación celular en la etapa crónica de la infección por VIH.

Los linfocitos B expresan una combinación de receptores de quimiocinas que son necesarias para la migración, localización y retención en sangre o tejido linfoide (Förster et al., 1996; Okada et al., 2002). La expresión de CCR7 regula la interacción de linfocitos T y B en la frontera del folículo y la zona de linfocitos T (Zou et al., 2017), además la expresión de CCR7 en linfocitos B es necesaria para su migración y entrada a tejido linfoide (Okada et al., 2002). La expresión y señalización de CXCR5 en linfocitos B en circulación propicia la migración hacia tejido linfoide, mientras que dentro del tejido linfoide es necesario para el correcto posicionamiento del centro germinal dentro del folículo (Allen et al., 2004). Nosotros evaluamos el porcentaje de linfocitos de las subpoblaciones que expresaban una combinación de CCR7 y CXCR5 en superficie. El porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos B con distintos patrones de expresión de los receptores determinantes de alojamiento no fueron diferentes en la infección por el VIH respecto al grupo sin VIH, sin embargo, se ha reportado que la expresión de CXCR5 está disminuida en los linfocitos B naive en la infección por el VIH (Bekele et al., 2019; Cagigi et al.,

2008; Chong et al., 2004). En este estudio no reportamos niveles de expresión de los receptores determinantes de localización, sin embargo, es probable que la expresión de esta proteína esté relacionada tanto al tejido donde se encuentra la célula como a la etapa de la infección por el VIH.

Encontramos que el porcentaje de las subpoblaciones con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento es diferente entre subpoblaciones de linfocitos B. Los linfocitos B naive, de memoria activada y de memoria en reposo, mostraron un mayor porcentaje de linfocitos dobles positivos en ambos tejidos. A diferencia de los linfocitos B de memoria tipo tejido, que tuvieron un mayor porcentaje de linfocitos CCR7- CXCR5+. La coexpresión de CCR7 y CXCR5 podría indicar la capacidad de circular entre sangre y tejido linfoide, por lo que esto nos podría indicar que las subpoblaciones con esta expresión de receptores determinantes de alojamiento celular tienen una mayor capacidad de migración al tejido linfoide, mientras que los que únicamente expresan CXCR5 podrían estar más estrechamente asociados a la interacción con la zona de linfocitos T dentro del centro germinal. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios de colocalización y de migración para comprobar esta hipótesis.

De manera importante, se observó que los linfocitos CCR7+ CXCR5- se encuentran predominantemente en sangre, mientras que los CCR7- CXCR5+ se encuentran predominantemente en tejido linfoide. Este porcentaje diferenciado y selectivo para cada compartimento puede ser un reflejo de la combinación de receptores determinantes de alojamiento necesarios para la entrada y migración hacia tejidos específicos, además de la localización dentro del tejido linfoide. Es importante recalcar que no encontramos diferencias en la infección por el VIH respecto al grupo sin VIH, por lo que no hay evidencia para sugerir que el porcentaje de estas células se vea alterada por la presencia del virus.

Adicionalmente, encontramos una subpoblación CCR7- CXCR5- presente únicamente en sangre de todos los grupos en los linfocitos de memoria activada y tipo tejido. La pérdida de estos receptores podría estar asociada a la capacidad disminuida de migración o a la pérdida debido a la sobre activación y proliferación

de estas subpoblaciones celulares. No se ha reportado la secreción de CXCR5 en la infección por el VIH, por lo que esta pérdida se podría deber a la internalización del receptor de quimiocinas. En este estudio no realizamos ensayos de migración y de capacidad de respuesta, sin embargo, sería interesante conocer si estos procesos se ven alterados dependiendo de la expresión de los receptores determinantes de alojamiento en las diferentes subpoblaciones.

Conclusiones

En este estudio concluimos que en la infección por VIH hay un aumento en las poblaciones disfuncionales de linfocitos B, mientras que los linfocitos B naive y de memoria convencional están disminuidos. De acuerdo con nuestros resultados, este cambio en los porcentajes se explica por el cambio de fenotipo de los linfocitos convencionales hacia fenotipos exhaustos y disfuncionales. No observamos cambios en el porcentaje de las subpoblaciones con distintos patrones de expresión de receptores determinantes de alojamiento en la infección por VIH, sin embargo, encontramos que la distribución de estas subpoblaciones es específica para cada tejido.

Este estudio es un aporte importante en el estudio de diversas subpoblaciones de linfocitos B en sangre y tejido linfoide en la infección por VIH en humanos adultos. Es importante mencionar que la técnica utilizada es limitante en cuanto a diversos aspectos importantes en la respuesta inmunológica, sin embargo, es un buen punto de inicio para continuar la investigación sobre el estado general de las células responsables de la protección humoral.

Este estudio es importante debido a las muestras disponibles, ya que nos permitieron tener una imagen inicial de lo que podría estar sucediendo en los diferentes tejidos de humanos adultos tanto en la ausencia de VIH como en la etapa aguda y crónica de la infección por VIH.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Comisión de Equidad y Género de las Legislaturas LX-LXI, y por la Comisión de Igualdad de la Legislatura LXII de la H. Cámara de Diputados de la República Mexicana.

A los participantes de los protocolos, sin su apoyo este estudio no podría llevarse a cabo.

Al equipo de médicos y clínicos en el CIENI por el apoyo en la toma de muestras.

Al equipo de trabajo de la Dra. Perla M. Del Río por sus comentarios del trabajo escrito y la ayuda dentro y fuera del laboratorio.

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A., Pillai, S., Baker, D., & Baker, A. (2012).
Inmunodeficiencias congénitas y adquiridas. En A. K. Abbas, *Inmunología celular y molecular* (7a. edición ed., pág. 558). Barcelona, España: Elsevier.
- Allen, C. D. C., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., & Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology*, 5(9), 943-952.
<https://doi.org/10.1038/ni1100>
- Allen, C. D. C., Okada, T., & Cyster, J. G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*, 27(2), 190-202.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009>
- Ammann, A. J., & Abrams, D. (1984). *B-Cell Immunodeficiency in Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 251(11), 1447-1449.
- Amu, S., Lavy-Shahaf, G., Cagigi, A., Hejdeman, B., Nozza, S., Lopalco, L., ... Chiodi, F. (2014). Frequency and phenotype of B cell subpopulations in young

and aged HIV-1 infected patients receiving ART. *Retrovirology*, 11(1), 76.
<https://doi.org/10.1186/s12977-014-0076-x>

Ananworanich, J., Fletcher, J. L., Pinyakorn, S., van Griensven, F., Vandergeeten, C., Schuetz, A., ... de Souza, M. (2013). A novel acute HIV infection staging system based on 4th generation immunoassay. *Retrovirology*, 10(1), 56.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-56>

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., ... Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>

Bekele, Y., Lemma, M., Bobosha, K., Yibeltal, D., Nasi, A., Gebre, M., ... Chiodi, F. (2019). Homing defects of B cells in HIV-1 infected children impair vaccination responses. *Vaccine*, 37(17), 2348-2355.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.03.027>

Berrón-Ruíz, L., López-Herrera, G., Ávalos-Martínez, C. E., Valenzuela-Ponce, C., Ramírez-SanJuan, E., Santoyo-Sánchez, G., ... Santos-Argumedo, L. (2016). Variations of B cell subpopulations in peripheral blood of healthy Mexican population according to age: Relevance for diagnosis of primary immunodeficiencies. *Allergologia et Immunopathologia*, 44(6), 571-579.
<https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.05.003>

Bour, S., Geleziunas, R., & Wainberg, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1

infection. *Microbiological Reviews*, 59(1), 63-93. Recuperado de PubMed. (7708013)

Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., ... Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), 1365-1371. <https://doi.org/10.1038/nm1511>

Brière, F., Dubois, B., Fayette, J., Vandenabeele, S., Caux, C., & Banchereau, J. (2001). CHAPTER 19—B cells. En M. T. Lotze & A. W. Thomson (Eds.), *Dendritic Cells (Second Edition)* (pp. 255-261). <https://doi.org/10.1016/B978-012455851-9/50058-4>

Brocca-Cofano, E., Kuhrt, D., Siewe, B., Xu, C., Haret-Richter, G. S., Craigo, J., ... Pandrea, I. (2017). Pathogenic Correlates of Simian Immunodeficiency Virus-Associated B Cell Dysfunction. *Journal of Virology*, 91(23). <https://doi.org/10.1128/JVI.01051-17>

Buckner, C. M., Moir, S., Ho, J., Wang, W., Posada, J. G., Kardava, L., ... Fauci, A. S. (2013). Characterization of Plasmablasts in the Blood of HIV-Infected Viremic Individuals: Evidence for Nonspecific Immune Activation. *Journal of Virology*, 87(10), 5800-5811. <https://doi.org/10.1128/JVI.00094-13>

Cagigi, A., Mowafi, F., Phuong Dang, L. V., Tenner-Racz, K., Atlas, A., Grutzmeier, S., ... Nilsson, A. (2008). Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood*, 112(12), 4401-4410. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140426>

- CDC. (1981). Pneumocystis Pneumonia—Los Angeles. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm
- CDC. (1983). Current Trends Update: Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)—United States. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000137.htm>
- CDC. (2014). Revised Surveillance Case Definition for HIV Infection—United States, 2014. Recuperado 12 de septiembre de 2019, de <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6303a1.htm>
- CDC. (2017). HIV and AIDS Timeline | National Prevention Information Network. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de <https://npin.cdc.gov/pages/hiv-and-aids-timeline>
- Chong, Y., Nabeshima, S., Furusyo, N., Murata, M., Yamaji, K., & Hayashi, J. (2004). Downregulation of CXCR5 in CD27⁺ B cells of HIV-1 infected patients. *Journal of Medical Virology*, 73(3), 362-367. <https://doi.org/10.1002/jmv.20099>
- Cooper, M. D., Ehrhardt, G. R. A., Hsu, J. T., Gartland, L., Leu, C.-M., Zhang, S., & Davis, R. S. (2005). Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(6), 783-791. <https://doi.org/10.1084/jem.20050879>

- Das, A., Veazey, R. S., Wang, X., Lackner, A. A., Xu, H., & Pahar, B. (2011). Simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques induces selective tissue specific B cell defects in double positive CD21+CD27+ memory B cells. *Clinical Immunology*, 140(3), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.04.018>
- Das, A., Xu, H., Wang, X., Yau, C. L., Veazey, R. S., & Pahar, B. (2011). Double-Positive CD21+CD27+ B Cells Are Highly Proliferating Memory Cells and Their Distribution Differs in Mucosal and Peripheral Tissues. *PLoS ONE*, 6(1), e16524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016524>
- De Milito, A. (2004). B Lymphocyte Dysfunctions in HIV Infection. *Current HIV Research*, 2(1), 11-21. <https://doi.org/10.2174/1570162043485068>
- De Milito, A., Mörch, C., Sönnernborg, A., & Chiodi, F. (2001). Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection: *AIDS*, 15(8), 957-964. <https://doi.org/10.1097/00002030-200105250-00003>
- Dimopoulos, Y., Moysi, E., & Petrovas, C. (2017). The Lymph Node in HIV Pathogenesis. *Current HIV/AIDS Reports*, 14(4), 133-140. <https://doi.org/10.1007/s11904-017-0359-7>
- Eberhard W, F., David J, W., Bhupat D, R., Patricia E, G., Richard T, S., Lorraine, P., ... Michael P, B. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: Implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, (13), 1871. Recuperado de edsovi.

- Estes, J. D. (2013). Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunological Reviews*, 254(1), 65-77. <https://doi.org/10.1111/imr.12070>
- Fecteau, J. F., Côté, G., & Néron, S. (2006). A New Memory CD27⁻ IgG⁺ B Cell Population in Peripheral Blood Expressing V_H Genes with Low Frequency of Somatic Mutation. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3728-3736. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3728>
- Fogli, M., Torti, C., Malacarne, F., Fiorentini, S., Albani, M., Izzo, I., ... Caruso, A. (2012). Emergence of Exhausted B Cells in Asymptomatic HIV-1-Infected Patients Naïve for HAART is Related to Reduced Immune Surveillance. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/829584>
- Förster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., & Lipp, M. (1996). A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell*, 87(6), 1037-1047. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81798-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81798-5)
- Gent, U. (s. f.). Accurate staging of immuno-virological dynamics during acute HIV infection. 2018, 26.
- German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203-222. <https://doi.org/10.1159/000445852>

Greene, W. C. (2007). A history of AIDS: Looking back to see ahead. *European Journal of Immunology*, 37(S1), S94-S102.
<https://doi.org/10.1002/eji.200737441>

Hammarlund E., Thomas A., Amanna I.J., Holden L.A., Ov D. Slayden, Park B., ...
Slifka M.K. (2017). Plasma cell survival in the absence of B cell memory.
Nature Communications, (1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01901-w>

Haynes, N. M., Allen, C. D. C., Lesley, R., Ansel, K. M., Killeen, N., & Cyster, J. G.
(2007). Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and
Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1^{High} Germinal Center-
Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology*, 179(8), 5099-5108.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5099>

Hey-Nguyen, W. J., Xu, Y., Pearson, C. F., Bailey, M., Suzuki, K., Tantau, R., ...
Koelsch, K. K. (2017). Quantification of Residual Germinal Center Activity and
HIV-1 DNA and RNA Levels Using Fine Needle Biopsies of Lymph Nodes
During Antiretroviral Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*,
33(7), 648-657. <https://doi.org/10.1089/aid.2016.0171>

Hoenigl, M., Chaillon, A., Moore, D. J., Morris, S. R., Mehta, S. R., Gianella, S., ...
Little, S. J. (2016). Rapid HIV Viral Load Suppression in those Initiating
Antiretroviral Therapy at First Visit after HIV Diagnosis. *Scientific Reports*,
6(1), 32947. <https://doi.org/10.1038/srep32947>

- Hoffman, W., Lakkis, F. G., & Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 11(1), 137-154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Jackson, S. M., Wilson, P. C., James, J. A., & Capra, J. D. (2008). Chapter 5 Human B Cell Subsets. En *Advances in Immunology* (Vol. 98, pp. 151-224). [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)00405-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)00405-7)
- Jamjian, C. (2007). THE GUIDE TO LIVING WITH HIV INFECTION DEVELOPED AT THE JOHNS HOPKINS AIDS CLINIC, 6th Edition. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy*, 21(3), 112. Recuperado de edb.
- Jourdan, M., Robert, N., Cren, M., Thibaut, C., Duperray, C., Kassambara, A., ... Moreaux, J. (2017). Characterization of human FCRL4-positive B cells. *PLOS ONE*, 12(6), e0179793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179793>
- Kaiser Family Foundation. (2019, enero). *The Global HIV/AIDS Epidemic*. Recuperado de <http://files.kff.org/attachment/Fact-Sheet-The-Global-HIV-AIDS-Epidemic>
- Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F., & Sanz, I. (2012). Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00302>
- Kelly, M., & Varma, R. (2016). Natural history of HIV infection—HIV Management Guidelines. Recuperado 21 de septiembre de 2019, de <http://hivmanagement.ashm.org.au/index.php/home/natural-history-of-hiv-infection>

- Kirchhoff, F. (2013). HIV Life Cycle: Overview. En T. J. Hope, M. Stevenson, & D. Richman (Eds.), *Encyclopedia of AIDS* (pp. 1-9). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9610-6_60-1
- Klein, U., Rajewsky, K., & Küppers, R. (1998). *Human Immunoglobulin (Ig)M2IgD2 Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells*. *188*(9), 1679-1689.
- Klippert, A., Neumann, B., & Stahl-Hennig, C. (2016). Comparative phenotypical analysis of B cells in fresh and cryopreserved mononuclear cells from blood and tissue of rhesus macaques. *Journal of Immunological Methods*, *433*, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.03.003>
- Kuijpers, T. W., Bende, R. J., Baars, P. A., Grummels, A., Derks, I. A. M., Dolman, K. M., ... van Lier, R. A. W. (2010). CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(1), 214-222. <https://doi.org/10.1172/JCI40231>
- Lederman, M. M., & Margolis, L. (2008). The lymph node in HIV pathogenesis. *Seminars in Immunology*, *20*(3), 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.06.001>
- Lewthwaite, P., & Wilkins, E. (2009). *Natural history of HIV/AIDS*. 5.
- Liao, H., Yu, Y., Li, S., Yue, Y., Tao, C., Su, K., & Zhang, Z. (2017). Circulating Plasmablasts from Chronically Human Immunodeficiency Virus-Infected

Individuals Predominantly Produce Polyreactive/Autoreactive Antibodies.
Frontiers in Immunology, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01691>

Malavasi, F., Funaro, A., Alessio, M., DeMonte, L. B., Ausiello, C. M., Dianzani, U., ... Roggero, S. (1992). CD38: A multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 22(1-4), 73-80. <https://doi.org/10.1007/BF02591400>

Marshall, M. J. E., Stopforth, R. J., & Cragg, M. S. (2017). Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going? *Frontiers in Immunology*, 8, 1245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01245>

McCarron, M. J., Park, P. W., & Fooksman, D. R. (2017). CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. *Blood*, 129(20), 2749-2759. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761643>

McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: Clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 11-23. <https://doi.org/10.1038/nri2674>

Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., & Brieva, J. A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*, 99(6), 2154. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.2154>

- Meffre, E., Louie, A., Bannock, J., Kim, L. J. Y., Ho, J., Frear, C. C., ... Moir, S. (2016). Maturation characteristics of HIV-specific antibodies in viremic individuals. *JCI Insight*, 1(3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.84610>
- Mindel, A. (2001). ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection. *BMJ*, 322(7297), 1290-1293. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7297.1290>
- Moir, S., Buckner, C. M., Ho, J., Wang, W., Chen, J., Waldner, A. J., ... Fauci, A. S. (2010). B cells in early and chronic HIV infection: Evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood*, 116. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-285528>
- Moir, S., & Fauci, A. S. (2008). Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(1), 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.034>
- Moir, S., & Fauci, A. S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 235-245. <https://doi.org/10.1038/nri2524>
- Moir, S., & Fauci, A. S. (2014). B-cell exhaustion in HIV infection: The role of immune activation. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 9(5), 472-477. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000092>
- Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A. C., O'Shea, M. A., ... Fauci, A. S. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *The Journal*

of *Experimental Medicine*, 205(8), 1797-1805.
<https://doi.org/10.1084/jem.20072683>

Moir, S., Malaspina, A., Pickeral, O. K., Donoghue, E. T., Vasquez, J., Miller, N. J., ... Fauci, A. S. (2004). Decreased Survival of B Cells of HIV-viremic Patients Mediated by Altered Expression of Receptors of the TNF Superfamily. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(5), 587-600.
<https://doi.org/10.1084/jem.20032236>

Moratto, D., Gulino, A. V., Fontana, S., Mori, L., Pirovano, S., Soresina, A., ... Badolato, R. (2006). Combined decrease of defined B and T cell subsets in a group of common variable immunodeficiency patients. *Clinical Immunology*, 121(2), 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.07.003>

Morsy, D. E. D., Sanyal, R., Zaiss, A. K., Deo, R., Muruve, D. A., & Deans, J. P. (2013). Reduced T-Dependent Humoral Immunity in CD20-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 191(6), 3112-3118.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202098>

Nagase, H., Agematsu, K., Kitano, K., Takamoto, M., Okubo, Y., Komiyama, A., & Sugane, K. (2001). Mechanism of Hypergammaglobulinemia by HIV Infection: Circulating Memory B-Cell Reduction with Plasmacytosis. *Clinical Immunology*, 100(2), 250-259. <https://doi.org/10.1006/clim.2001.5054>

Negera, E., Walker, S. L., Bekele, Y., Dockrell, H. M., & Lockwood, D. N. (2017). Increased activated memory B-cells in the peripheral blood of patients with

erythema nodosum leprosum reactions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006121. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006121>

Neumann, B., Klippert, A., Raue, K., Sopper, S., & Stahl-Hennig, C. (2015). Characterization of B and plasma cells in blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs of rhesus macaques by multicolor flow cytometry. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(1), 19-30. <https://doi.org/10.1189/jlb.1HI0514-243R>

O'Cofaigh, E., & Lewthwaite, P. (2013). Natural history of HIV and AIDS. *Medicine*, 41(8), 411-416. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.05.009>

Okada, T., Ngo, V. N., Eklund, E. H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D. R., & Cyster, J. G. (2002). Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer's Patches. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(1), 65-75. <https://doi.org/10.1084/jem.20020201>

Okoye, A. A., & Picker, L. J. (2013). CD4 + T-cell depletion in HIV infection: Mechanisms of immunological failure. *Immunological Reviews*, 254(1), 54-64. <https://doi.org/10.1111/imr.12066>

ONUSIDA. (2019). Grupos de población clave. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de <https://www.unaids.org/es/topic/key-populations>

Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., Rivera Muñoz, B., & Owen, J. A. (2014). *Kuby inmunología*. Recuperado de <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cab02025a&AN=lib.MX001001698945&lang=es&site=eds-live>

- Payne, D., Drinkwater, S., Baretto, R., Duddridge, M., & Browning, M. J. (2009). Expression of chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 on B and T lymphocytes from patients with primary antibody deficiency. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(2), 254-262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03889.x>
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., ... and the Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. (2010). Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78B(S1), S47-S60. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20547>
- Pitzalis, C., Jones, G. W., Bombardieri, M., & Jones, S. A. (2014). Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 447-462. <https://doi.org/10.1038/nri3700>
- Portugal, S., Obeng-Adjei, N., Moir, S., Crompton, P. D., & Pierce, S. K. (2017). Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. *Cellular Immunology*, 321, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.07.003>
- Prieto Martín, A., Barbarroja Escudero, J., García Torrijos, C., & Monserrat Sanz, J. (2013). Linfocitos B. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1710-1719. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70547-X](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70547-X)

- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., ... Gray, R. H. (2000). Viral Load and Heterosexual Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *New England Journal of Medicine*, 342(13), 921-929. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003303421303>
- Rajasuriar, R., Khoury, G., Kamarulzaman, A., French, M. A., Cameron, P. U., & Lewin, S. R. (2013). Persistent immune activation in chronic HIV infection: Do any interventions work? *AIDS*, 27(8), 1199-1208. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835ecb8b>
- Ruelas, D. S., & Greene, W. C. (2013). An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell*, 155(3), 519-529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.044>
- Saeidi, A., Zandi, K., Cheok, Y. Y., Saeidi, H., Wong, W. F., Lee, C. Y. Q., ... Shankar, E. M. (2018). T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02569>
- Salazar Montes Adriana María, Sandoval Rodríguez, A. S., & Armendáriz Borunda, J. S. (2013). *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Recuperado de <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001698807&lang=es&site=eds-live>

- Santos, M. A. O. (2018). Retracted: Role of CD 20 in Physiopathology of Hodgkin's Disease. *Journal of Medicine*, 19(2), 119. <https://doi.org/10.3329/jom.v19i2.37232>
- Sokoya, T., Steel, H. C., Nieuwoudt, M., & Rossouw, T. M. (2017). HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2017/6825493>
- Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R., & Schlossman, S. F. (1980). *Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen*. 9.
- Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. (2018). Regulation of the Germinal Center Response. *Frontiers in Immunology*, 9, 2469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., & Rajewsky, K. (2014). Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *European Journal Of Immunology*, 44(5), 1258-1264. <https://doi.org/10.1002/eji.201343716>
- Thorarinsdottir, K., Camponeschi, A., Cavallini, N., Grimsholm, O., Jacobsson, L., Gjertsson, I., & Mårtensson, I.-L. (2016). CD21^{-low} B cells in human blood are memory cells: CD21^{-low} B cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 185(2), 252-262. <https://doi.org/10.1111/cei.12795>
- Thorbecke, G. J., Amin, A. R., & Tsiagbe, V. K. (1994). Biology of germinal centers in lymphoid tissue. *FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of*

American Societies For Experimental Biology, 8(11), 832-840. Recuperado de cmedm. (8070632)

Titanji, K., Velu, V., Chennareddi, L., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A. T., Freeman, G. J., & Amara, R. R. (2010). Acute depletion of activated memory B cells involves the PD-1 pathway in rapidly progressing SIV-infected macaques. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3878-3890. <https://doi.org/10.1172/JCI43271>

UNAIDS. (2017). UNAIDS DATA 2017. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de https://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book

UNAIDS. (2018). UNAIDS Country Facts sheets: México 2019. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de <https://www.unaids.org/es/regionscountries/countries/mexico>

UNAIDS. (2019). Global HIV & AIDS statistics—2019 fact sheet. Recuperado 20 de septiembre de 2019, de <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>

Villarruel Vázquez, R. E., & Rio Estrada, P. M. (2014). *Importancia de la cantidad de linfocitos T CD4 en la expresión de marcadores de activación en personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana*. Recuperado de <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000708653&lang=es&site=eds-live>

- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., ... Shaw, G. M. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), 117-122. <https://doi.org/10.1038/373117a0>
- Yarchoan, R., Redfield, R. R., & Broder, S. (1986). Mechanisms of B cell activation in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. Contribution of antibody-producing B cells, of Epstein-Barr virus-infected B cells, and of immunoglobulin production induced by human T cell lymphotropic virus, type III/lymphadenopathy-associated virus. *Journal of Clinical Investigation*, 78(2), 439-447. <https://doi.org/10.1172/JCI112595>
- Zou, Y.-R., Grimaldi, C., & Diamond, B. (2017). B Cells. En *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology* (pp. 207-230.e3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-31696-5.00013-9>