



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CAMBIO EN EL FENOTIPO DE LOS LINFOCITOS T DE SANGRE
PERIFÉRICA EN LA COINFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y *Mycobacterium tuberculosis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en I.B.B. GERMÁN BERNAL FERNÁNDEZ

ASESOR DE LA TESIS DR. RAÚL MANCILLA JIMÉNEZ.



BIOMEDICAS

México, D.F. Junio 2008



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.

Para Chayo y Germancito por ser lo más importante que la vida me ha dado... Gracias por ser mi familia

A Doña Jesu y a Don Nacho por su amor, sacrificio, apoyo y comprensión; con todo mi cariño y respeto porque siempre estarán conmigo...

A Juan Manuel... Se nos acabó el tiempo antes de terminar... pero un día bailaremos la jota... por siempre con admiración

A mis hermanos Berna, Alex y Nacho... con mucho cariño porque seguimos siendo la familia

A mis amigos y compañeros de laboratorio

A mi comité tutorial:

Dr. Raul Mancilla Jiménez

Dr. Rafael Saavedra Durán

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Mil gracias...

A los miembros del jurado:

Dra. Yolanda López Vidal

Dra. Luz María López Marín

Dra. Carmen Soler Claudin

Dr. Gustavo Reyes Terán

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Por su buena disposición y aportaciones a este trabajo

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Ana Cristina Cubillas Tejeda, al Dr. Jesús Fidel Salazar González y al Dr. Carlos Hermida, por hacer posible este trabajo

Para quien de una u otra manera hizo posible este trabajo, para lo que quedó en el camino, y para las ilusiones que me acompañan...ya sabes

No hay palabras ni manera para agradecer lo que hizo por mi.... Muchas gracias por todo Dr. Mancilla

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Numero de registro 87838

INDICE

	Indice	1
	Abreviaturas	4
	Resumen	6
I	Introducción	7
II	La infección por el VIH-1	9
II-1	El agente etiológico	9
II-2	Mecanismos de infección	9
II-3	Replicación y transcripción del VIH-1	11
II-4	Eventos inmunológicos y curso de la infección	11
II-5	Papel regulador de las citocinas sobre la replicación viral	14
II-6	El papel de los linfocitos T CD8+ en la infección por el VIH-1	15
III	Tuberculosis	16
III-1	El agente causal	16
III-2	Factores genéticos en la susceptibilidad a la infección por <i>M. tuberculosis</i>	17
III-3	Métodos de diagnóstico	18
III-4	Inmunoprofilaxis de la tuberculosis	18
III-5	Patogenia de la tuberculosis	19
III-6	Respuesta inmunológica en contra de <i>M. tuberculosis</i>	21
III-7	El granuloma tuberculoso	23
III-8	Inmunosupresión en la tuberculosis	24
IV	Coinfección VIH-1/Mtb	25

V	Planteamiento del problema e hipótesis	28
VI	Objetivo general	28
VII	Materiales y métodos	29
VII-1	Pacientes	29
VII-2	Obtención de las células mononucleares de sangre periférica	29
VII-3	Análisis por citometría de flujo	30
VII-4	Anticuerpos	30
VII-5	Análisis estadístico	31
VIII	Resultados	32
VIII-1	Individuos control	32
VIII-2	Pacientes VIH-1+. Clasificación, datos clínicos y de laboratorio	32
VIII-3	Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo	34
VIII-4	Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de linaje linfocitario	36
VIII-5	Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de activación	38
VIII-6	Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Marcador de apoptosis, CD95	40
VIII-7	Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Moleculas de coestimulación	41
VIII-8	Pacientes con tuberculosis. Datos clínicos y de laboratorio	43
VIII-9	Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo	44
VIII-10	Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de linaje linfocitario	46

VIII-11	Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de activación	47
VIII-12	Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo. Moléculas de coestimulación	48
VIII-13	Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Datos clínicos y de laboratorio.	50
VIII-14	Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo	50
VIII-15	Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de linaje linfocitario	52
VIII-16	Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de activación	54
VIII-17	Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Marcador de apoptosis, CD95	55
VIII-18	Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Moléculas de coestimulación	57
IX	Discusión	60
IX-1	El fenotipo de los linfocitos de pacientes con VIH-1	61
IX-2	El fenotipo de los linfocitos de pacientes con TB pulmonar	64
IX-3	El fenotipo de los linfocitos de pacientes con la coinfección VIH-1/Mtb	67
X	Conclusiones	70
XI	Apéndice 1	71
XII	Apéndice 2	77
XI	Bibliografía	78

ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
ADN	Ácido desoxiribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
b-DNA	Ácido desoxiribonucleico ramificado
CD	Célula dendrítica
CR	Receptor del complemento
CTL	Linfocito T citotóxico
gp	Glicoproteína
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor de interleucina 2
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
ManLAM	Manosa- Lipoarabinomanana
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	Minutos
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PHA	Fitohemaglutinina
PPD	Derivado proteico purificado
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humanan
TB	Tuberculosis
TCR	Receptor de células T
TGF	Factor de crecimiento y transformación

Th0	Células T de ayuda tipo 0
Th1	Células T de ayuda tipo 1
Th2	Células T de ayuda tipo 2
TLR	Receptor tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tr	Células T reguladoras
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

RESUMEN

Las consecuencias clinicopatológicas de la TB oportunista en el curso y desenlace de la infección del VIH-1 han sido bien estudiadas. Sin embargo, poca información ha sido generada acerca del impacto de la infección micobacteriana sobre el fenotipo de los linfocitos T en pacientes coinfectados por el VIH-1/Mtb. En este estudio se analizó el fenotipo de células mononucleares de sangre periférica de 46 pacientes infectados únicamente por el VIH-1, 23 pacientes con tuberculosis pulmonar activa y 9 pacientes con la coinfección VIH-1/Mtb. En congruencia con lo establecido, en los 46 pacientes VIH-1+ estudiados se observó disminución de los linfocitos CD4 (≥ 500 células CD4+/ μl , 16 casos; 499-200/ μl , 17 casos; $< 200/\mu\text{l}$, 13 pacientes) que se asoció a un incremento compensatorio de los linfocitos CD8+, disminución en la expresión de moléculas asociadas a activación celular, incremento en la regulación del marcador de apoptosis CD95 y de la molécula de coestimulación CD28. Los hallazgos en los 23 pacientes con TB, mostraron disminución marcada de linfocitos CD3+ y disminución marcada de células CD4+ y CD8+. El principal hallazgo fue la gran disminución en la expresión de CD28 en las células CD4+ y CD8+. No hubo diferencias entre SIDA y coinfección en lo que respecta a las células CD4+. En relación con el SIDA, en la coinfección se observó un incremento en la expresión de la molécula proapoptótica CD95 en linfocitos CD4+. En la coinfección se observó un aparente efecto de rescate en la expresión de CD45RA, CD45RO y CD27. En las tres condiciones analizadas, el hallazgo más sobresaliente fue el decremento marcado en la expresión de CD28. En resumen en este trabajo mostramos que la TB oportunista modifica el fenotipo de los linfocitos T en la coinfección VIH-1/Mtb.

I. INTRODUCCIÓN.

La asociación de dos agentes infecciosos pertenecientes a géneros diferentes como son *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo-1 (VIH-1) ha dado lugar a un problema de salud de grandes dimensiones sobretodo en países pobremente desarrollados. La coinfección VIH-1/Mtb ejemplifica de manera dramática las sinergias que se pueden dar entre dos microorganismos filogenéticamente distantes. Esta coinfección además demuestra la importancia del papel que los linfocitos T CD4+ participan en la resistencia a la infección por micobacterias.

El VIH-1, agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es un patógeno de muy reciente identificación. A principios de la década de los 80's se detectaron los primeros casos de SIDA en individuos homosexuales y en 1983 un grupo de investigadores del Instituto Pasteur de París encabezado por Luc Montagnier, identificaron al virus responsable, al que se denominó inicialmente como el virus asociado a la linfadenopatía (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). En 1984 Robert Gallo identificó al mismo virus denominándolo virus linfotrópico T humano tipo III (Popovic *et al.*, 1984). Por lo anterior se produjo una disputa entre Gallo y Montagnier que se resolvió a favor de este último. Finalmente, el virus se denominó VIH-1. Ha habido controversias acerca de si este virus es el causante real del SIDA, sin embargo, el consenso actual de la comunidad científica es que el SIDA es producido por el virus identificado por Montagnier en 1983. Poco después de que se identificó el VIH-1, se identificó un virus semejante en macacos cautivos denominado virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV, por sus siglas en inglés) (Henrickson *et al.*, 1984). Posteriormente, en pacientes africanos con SIDA se identificó un virus relacionado con el VIH-1 denominado VIH-2 el cual produce cuadros menos graves de SIDA en África, principalmente en Guinea-Bissau y en Cabo Verde (Clavel *et al.*, 1986). Hay que mencionar que la gran mayoría de los casos de SIDA son producidos por el VIH-1.

Mtb es el agente etiológico de la tuberculosis (TB) una infección que se adquiere por 3 vías principales: por vía respiratoria al inhalar aerosoles que transportan bacilos, por ingestión de material contaminado como la leche de vacas tuberculosas y por inoculación accidental con material infectado; la primera vía es la principal (2000). En 1882, ante la Sociedad Fisiológica de Berlín, Roberto Koch presentó estudios que demostraban que el bacilo que hoy lleva su nombre era el agente causal de la TB (Schluger, 2005). A partir de

ese momento se han venido realizando numerosos esfuerzos para erradicar la TB, lo que todavía no se ha logrado, en parte porque el conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en la infección por Mtb es aún insuficiente.

La infección por el VIH-1 se reconoce ahora como una pandemia. Para enero del 2006 el Programa de la ONU para el SIDA (UNAIDS) estimaba que esta infección viral había causado la muerte, desde su aparición en diciembre de 1981, a más de 25 millones de personas, lo que la hace una de las infecciones más letales en la historia de la humanidad. Se estima que en 2005, a nivel mundial, 40 millones de personas estaban infectadas por el VIH-1, se registraron 4.1 millones de nuevos casos y hubo 2.8 millones de decesos, de los cuales 570,000 fueron niños (Lekkerkerker *et al.*, 2006).

La TB es una de las enfermedades infecciosas más importantes, sobretodo en países en vías de desarrollo (Aung *et al.*, 2000; Bloom, 1992; Bloom and Murray, 1992; Trunz *et al.*, 2006). En el siglo XX la incidencia de la TB disminuyó y se pensó que pronto sería erradicada. Esto se atribuyó principalmente a la vacunación con BCG y al uso de medicamentos antifímicos. Sin embargo, en los 80's se observó un aumento inesperado en los casos de TB tanto en países ricos como pobres (Corbett *et al.*, 2003; Dolin *et al.*, 1994). En la actualidad la infección por el bacilo de Koch es la principal causa de muerte por un agente infeccioso individual y se piensa que continuará siendo la séptima causa de muerte en el mundo, incluso hasta el año 2020 (Bloom and Murray, 1992; Bloom, 1992). Anualmente se reportan a la Organización Mundial de la Salud (OMS) 8.3 millones de casos nuevos de TB y 1.8 millones de decesos por esta infección (Corbett *et al.*, 2003; Dolin *et al.*, 1994). Por otra parte, es preocupante que aproximadamente dos tercios de la población mundial desarrollen reacciones positivas a la tuberculina, lo cual se ha tomado como una indicación de infección latente (Corbett *et al.*, 2003; Dolin *et al.*, 1994).

En lo que concierne a la coinfección por el VIH-1 y Mtb (VIH-1/Mtb), está bien establecido que estos patógenos se potencian para producir una infección que recientemente se ha convertido en un problema de salud muy preocupante, sobre todo en países pobres (Garrait *et al.*, 1997). La inmunosupresión producida por el VIH-1 favorece la infección por Mtb, y en reciprocidad, la activación del sistema inmune inducida por el bacilo promueve la infectividad y la replicación viral (Corbett *et al.*, 2003). Se considera que la emergencia del VIH-1 es en parte la causa del incremento de los casos de TB, lo que se relaciona con la disminución de los linfocitos T CD4+ que son la principal defensa en contra del bacilo de la TB (Flynn and Chan, 2001; Pantaleo and Fauci, 1996); (Stenger and Modlin, 1999). El

impacto de la epidemia del SIDA en la incidencia de la TB ha sido muy significativa como lo demuestran los siguientes datos: 9 % de los casos de TB y 12 % de los decesos por esta infección se atribuyen a la infección por VIH-1; la prevalencia de la coinfección VIH-1/Mtb es de 0.36 %, con 11 millones de coinfectados reportados en todo el mundo en el 2003. En África, la TB es la causa más importante de muerte del paciente con SIDA (Corbett *et al.*, 2003; Dolin *et al.*, 1994; Whalen *et al.*, 1995).

Enseguida revisaremos separadamente aspectos importantes de la infección por el VIH-1, de la TB y de la coinfección VIH-1/Mtb

II. LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

II-1. El agente etiológico.

El VIH-1 es el agente etiológico del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). A grandes rasgos la estructura del VIH-1 es la siguiente. Se trata de un retrovirus de 120 nm de diámetro, compuesto por 2 copias de ácido ribonucleico (ARN) de una cadena que codifica 9 genes virales rodeados por una cápside cónica compuesta por la proteína viral p24 (Chan *et al.*, 1997). El ARN está firmemente unido a las proteínas de la nucleocápside, p7 y a enzimas requeridas para el desarrollo del virión, como son la transcriptasa reversa, proteasa y la integrasa. El virión está rodeado por una matriz compuesta por la proteína viral p17 que protege su integridad. El virión está rodeado por la envoltura viral compuesta de dos capas de fosfolípidos provenientes de la membrana de la célula infectada. En la envoltura viral se expresan las proteínas producto del gen env compuesta por las glicoproteínas transmembranales gp120 y gp41. Este complejo de glicoproteínas participa en la unión y fusión del virus con la célula hospedera (Chan *et al.*, 1997).

II-2. Mecanismos de infección.

La infección por el VIH-1 se puede adquirir por tres vías principales (Pope and Haase, 2003). Por la vía sexual el contagio se produce por el contacto de secreciones infectadas con la mucosa genital, rectal u oral de la otra persona. La vía parenteral es generalmente por el uso de jeringas contaminadas, transfusión de sangre contaminada o de productos

contaminados derivados de la sangre. La transmisión vertical de madre a hijo ocurre durante el embarazo, o la lactancia. En menor grado la transmisión se da por contagio ocupacional y por la realización de perforaciones cutáneas para colocar anillos u otros adornos y por tatuajes y escarificaciones. La principal ruta de infección es a través de las mucosas durante el contacto sexual.

El VIH-1 infecta células del sistema inmune como son los linfocitos T de ayuda CD4+, los macrófagos y las células dendríticas (CD) (Pantaleo and Fauci, 1996). El VIH-1 infecta macrófagos y linfocitos T CD4+ inicialmente por la unión de glicoproteínas virales de superficie a receptores membranales de la célula blanco lo que es seguido de la liberación de la cápside viral al interior de la célula (Chan *et al.*, 1997; Chan and Kim, 1998). El primer paso consiste en la unión de dominios de la gp120 viral a la glicoproteína CD4, lo que resulta en la exposición de dominios de unión para el receptor de quimiocina generalmente CCR5 o CXCR4. La gp41 interviene en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula blanco, para la posterior entrada del genoma y las proteínas virales asociadas como la transcriptasa reversa, integrasa y proteasa al interior de la célula. (Chan and Kim, 1998).

El papel que juegan las CD en la infección por el VIH-1 es de mucho interés. Estas células, que funcionan como centinelas del sistema inmunológico en mucosas y submucosas, capturan al virus en el sitio de entrada y lo transportan a los ganglios linfáticos de drenaje donde lo transfieren a la célula blanco (Belyakov and Berzofsky, 2004);(Pope and Haase, 2003). *In vitro*, se ha observado que las CD promueven la infección no productiva de células T CD4+ (Cameron *et al.*, 1992). Estas células son susceptibles a la infección viral en etapas tardías y producen nuevas partículas virales infectivas, funcionando como reservorios del virus (Lekkerkerker *et al.*, 2006). La molécula de adhesión DC-SIGN específica de las CD funciona como una molécula de adhesión que facilita la infección ya que interacciona con la glicoproteína viral de superficie (gp120) sin inducir fusión membranal (Curtis *et al.*, 1992; Geijtenbeek *et al.*, 2000); al entrar en contacto las CD con las células T CD4+, el VIH-1 se transloca a la membrana de la CD para formar la llamada sinapsis infecciosa la que facilita la infección (McDonald *et al.*, 2003). La formación de la sinapsis infecciosa es similar al contacto que se genera entre la CD y la célula T en la sinapsis inmunológica que involucra moléculas de adhesión, señalización, coestimulación y al receptor de células T para antígeno (Piguet and Sattentau, 2004). En CD manipuladas genéticamente que no expresan DC-SIGN, el VIH-1 no es transferido al linfocito T CD4+ (Arrighi *et al.*, 2004).

Otro aspecto fundamental en la infección por el VIH-1 es la participación de los receptores para quimiocinas CCR5 y CXCR4. El VIH-1 se puede clasificar de acuerdo a su habilidad para usar selectivamente CCR5, CXCR4, o ambos receptores. Las cepas virales que predominan durante la fase asintomática utilizan casi exclusivamente CCR5; estas cepas se replican eficientemente en células T de activación/memoria que expresan niveles altos de CXCR5, que abundan en el tejido linfoide asociado a intestino (Brenchley *et al.*, 2004), en células T CD4+ primarias (Schweighardt *et al.* 2004), macrófagos (Locher *et al.*, 2005) y células dendríticas (Schmitt *et al.* 2006). Esta cepa ha mostrado elevados niveles de replicación (Schweighardt *et al.* 2004), supervivencia mayor capacidad para diseminarse (Locher *et al.*, 2005) a través de células dendríticas epiteliales (Turville *et al.* 2003) y del timo (Schmitt *et al.* 2006).

En la fase progresiva de la infección aparecen cepas que usan CXCR4; este “switch” parece deberse a la competencia por quimiocinas con afinidad por CCR5. Estos últimos coreceptores menores, como por ejemplo CCR1, CCR3 y GPR15 (Xu *et al.* 2008), a diferencia de CCR5 y CXCR4, tienen un patrón de expresión tejido específico.

II-3. Replicación y transcripción del VIH-1

Una vez que la cápside viral penetra la célula, se llevan a cabo una serie de eventos que culminan en la integración del material genético viral al de la célula infectada (Zheng *et al.*, 2005). En primer término, la transcriptasa reversa libera al RNA de las proteínas virales y lo copia como ácido desoxiribonucleico (ADN) complementario para formar ADN viral de doble cadena que es transportado al núcleo de la célula infectada donde es integrado al genoma celular bajo la acción de una enzima llamada integrasa. Para que se replique el virus es necesaria la participación de factores de transcripción, siendo importante NF- κ B el cual se sobre expresa en el linfocito T activado (Hiscott *et al.*, 2001).

II- 4. Eventos inmunológicos y curso de la infección.

Una vez que el VIH-1 ha infectado al linfocito T CD4+, el curso de la infección se caracteriza por una fase aguda sintomática, de inicio brusco que dura de 3 a 14 días, caracterizada clínicamente por fiebre, malestar general, sudoración, letargia, anorexia mialgias, artralgias, cefalea, náuseas diarrea, adenopatía generalizada y erupción maculopapular en el tronco. Los datos de laboratorio muestran trombocitopenia, viremia

elevada y caída de linfocitos T CD4+ (Cooper *et al.*, 1985). Esta fase conlleva a la formación de un reservorio de linfocitos infectados con el virus en estado latente (Chun *et al.*, 1998; Pitcher *et al.*, 1999). Posteriormente, se observa una caída abrupta de la carga viral, aumento de células T CD8+ periféricas y el establecimiento de una fase asintomática que dura unos 10 años en progresores típicos. Además, se han reportado individuos de rápida progresión, con dos o tres años de infección primaria y una carga viral elevada desde el inicio de la infección; de la misma manera se reportan los no progresores que se caracterizan por mantener sus funciones inmunológicas y cuentas de los linfocitos T CD4+ dentro del rango normal con una baja carga viral y un curso asintomático de la infección. También se han descrito pacientes que la progresión de la infección viral es similar al comportamiento típico, pero con parámetros clínicos y de laboratorio anormales, no obstante, se mantienen estables por un periodo largo de tiempo (Pantaleo and Fauci, 1996). La fase asintomática se caracteriza por una disminución gradual del número de células T CD4+ de sangre periférica y aumento en la viremia. La infección por el VIH-1 conduce a una disminución de las células T CD4+ en sangre a través de varios mecanismos: la lisis directa de la célula infectada, inducción de apoptosis y lisis de los linfocitos T CD4+ por linfocitos T CD8+ citotóxicos. Además de la participación de moléculas virales como Nef que participa en el secuestro intracelular de la molécula CD4 (Brady *et al.* 1993), el reclutamiento de células T CD4+ en órganos linfoides infectados a través de receptores de quimiocinas también contribuye en la disminución en sangre de estas células (Foley *et al.* 2005) y otro aspecto importante es la reducida capacidad proliferativa de los precursores hematopoyéticos en pacientes con SIDA, asociada a los cambios de la morfología, citopenia y funciones deficientes en la médula ósea inducidos por el VIH-1 (Isgrò *et al.* 2000).

Cuando las cuentas de linfocitos T CD4+ periféricos disminuyen a menos de $200/\text{mm}^3$, aparecen neoplasias y las infecciones oportunistas que caracterizan al SIDA (Pantaleo and Fauci, 1996).

La infección por el VIH-1 resulta en una disminución progresiva de la inmunidad celular que se debe en gran medida a la caída progresiva en el número de los linfocitos T CD4+. Así mismo, se ha reportado trastornos en la funcionalidad de las células T CD4+, como lo reportado por Rosenberg que no detectó respuesta proliferativa en contra de p24 en pacientes con infección crónica, pero fue detectada de manera importante en pacientes no progresores, e inversamente proporcional a la carga viral (Rosenberg *et al.* 1997). Por otra parte, se demostró que pacientes con enfermedad progresiva, así como no progresores

expresan síntesis de citocinas en respuesta a p55, un antígeno proteico del VIH-1 (Pitcher *et al.* 1999). Estos hallazgos indican que probablemente la respuesta proliferativa se pierde en una etapa temprana del curso de la infección crónica, mientras que la respuesta de citocinas es aún detectable (Palmer *et al.* 2002).

Con respecto a las células T CD8+, también se han detectado trastornos en su función, incluso en mayor grado y en un número más grande de individuos que lo reportado para las células T CD4+ (Gea-Banacloche *et al.* 2000; Betts *et al.* 2001). Por ejemplo los linfocitos T CD8+ pueden ser capaces de producir citocinas, pero no de ejercer su función citotóxica (Appay *et al.* 2000), así mismo, pueden no producir IFN- γ (Kostense *et al.* 2001) o solo cuando son estimuladas por IL-2 (Lieberman *et al.* 2001), indicando que una posible causa de la disfunción in vivo, sea la falta de IL-2 (Maecker *et al.* 2003), incluso otra causa podría ser la presencia de TGF- β (Garba *et al.* 2002).

El curso de la infección puede ser monitoreado mediante cuentas periódicas de células T CD4+ en sangre periférica. Además de la disminución de las células T CD4+, en el paciente VIH-1+ se han reportado alteraciones fenotípicas diversas. Por ejemplo, hay disminución de la molécula coestimuladora CD28 en linfocitos T CD4+ y CD8+, lo que resulta en decremento del potencial proliferativo y en anergia (Choremi-Papadopoulou *et al.*, 1994).

Se ha observado disminución de células B CD27+ lo que se correlaciona con la disminución de las células T CD4+ y un aumento en los niveles séricos de la forma soluble del CD27 (Widney *et al.*, 1999). En condiciones normales no se observan células CD30+ en sangre, sin embargo, se han detectado niveles elevados de CD30 soluble en sueros de pacientes VIH-1+, lo que sugiere la participación de CD30 en la patogénesis del VIH-1 (del Prete *et al.*, 1995;Pizzolo *et al.*, 1994). Por otra parte, se sabe que el VIH-1 se replica preferentemente en células Th2 y Th0, las que expresan CD30 (del Prete *et al.*, 1995;Pizzolo *et al.*, 1994). Además, líneas policlonales CD4+ y clones de células T CD8+CD30L+ de pacientes con SIDA estimuladas con anticuerpos monoclonales anti-CD30 o anti-CD3, inducen un incremento de p24, un indicador de la replicación viral. En el mismo estudio, CD30L incrementó la p24 10 a 100 veces más, indicando que la activación celular vía CD30 es más efectiva a través de su ligando natural. Estos hallazgos fueron apoyados por observaciones estimulando células mononucleares de sangre periférica de individuos VIH-1+ con anticuerpos anti-CD30L o una proteína de fusión CD30-Ig, lo que resultó en la inhibición de la producción de p24 (Biswas *et al.*, 1995;Maggi *et al.*, 1995;Romagnani *et al.*, 1996).

II-5. Papel regulador de las citocinas sobre la replicación viral.

Las citocinas juegan un papel importante en la infección por el VIH-1. Se han demostrado niveles séricos elevados de interferón IFN- α (Krown *et al.*, 1991), IFN- γ (Fusch *et al.*, 1989), interleucina 6 (Breen *et al.*, 1990), interleucina 1 (Lepe-Zuniga *et al.*, 1987) y TNF- α (Wright *et al.*, 1988), lo que es más pronunciado en etapas avanzadas de la enfermedad. Se ha reportado así mismo que algunas citocinas son capaces de inducir la replicación del VIH-1 (Clouse *et al.*, 1989; Poli *et al.*, 1990; Poli *et al.*, 1990; Tsunetsugu-Yokota and Honda, 1990). Por otra parte, por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (Fan *et al.*, 1993) y por la técnica del "DNA ramificado" (b-DNA) (Breen *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 1993) se han demostrado niveles elevados de ARNm de IFN- γ en individuos VIH-1+, que se correlacionan con un número bajo de linfocitos T CD4⁺ (Fan *et al.*, 1993; Breen *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 1993). TNF- α es un potente activador de la replicación viral en células T y monocitos infectados (Rosenberg and Fauci, 1990; Clouse *et al.*, 1989), al igual que lo son interleucina (IL) -1 e IL-6 (Tsunetsugu-Yokota and Honda, 1990). Se ha observado una correlación entre el incremento del TNF- α y los niveles del ARNm del VIH-1 en plasma y la gravedad de la enfermedad (Lau and Williams, 1990). Se ha propuesto que la progresión al SIDA es mediada por un cambio en el patrón de síntesis de citocinas de Th1 a Th2 (Clerici *et al.* 1993). Sin embargo este cambio cualitativo de citocinas Th1/Th2 también podría ser más que la causa, una consecuencia de la progresión al SIDA debido al fracaso progresivo de la inmunidad mediada por células observado en estos pacientes (Klein *et al.* 1997).

Es de interés que no haya un incremento concomitante en la síntesis de IL-2, lo cual indica que en la infección por VIH-1 hay un trastorno en la regulación de las citocinas, reportándose además una disociación entre la producción de IL-2 y la de IFN- γ (Fan *et al.*, 1993; Tsunetsugu-Yokota and Honda, 1990). Sin embargo, la adición de IL-2 recombinante a cultivos *in vitro* mejora la respuesta a mitógenos de las células T de pacientes con SIDA (Sheridan *et al.*, 1984). Ensayos clínicos con IL-2 en pacientes infectados con el VIH-1 demuestran un incremento en el número de células T CD4⁺ (Sereti and Lane, 2001). Así mismo, niveles disminuidos de IL-16 correlacionan con progresión de la infección por el VIH-1, por lo que la terapia con IL-16 además de IL-2 podría ser benéfica restaurando la

respuesta de las células T CD4+. IL-16 activa células T CD4+ de memoria que responden a IL-2 (Center *et al.*, 2000). En vista de lo anterior, se considera que la progresión al SIDA está mediada por una sobreproducción de citocinas que incrementan la replicación del VIH-1, como sería el TNF- α . Esto podría deberse a la alta producción de IFN- γ característica de la infección por VIH-1, el cual al generar una señal de activación en macrófagos, los hace secretar niveles altos de TNF- α , estableciéndose así un círculo vicioso que conduciría a la progresión de la infección por VIH-1 al SIDA y finalmente a la muerte (Lau and Williams, 1990; Breen *et al.*, 1997).

II-6. El papel de los linfocitos CD8+ en la infección por el VIH-1+.

Concomitante con la disminución de células T CD4+, en las fases iniciales y en la fase de latencia hay una expansión de los linfocitos T CD8+, que se considera importante en el control de la viremia, sin embargo esta respuesta no es capaz de eliminar al VIH-1 (Pantaleo and Fauci, 1996). Los linfocitos T CD8+ expresan marcadores de membrana asociados con activación como CD38 y HLA-DR (Choremi-Papadopoulou *et al.*, 2000). El incremento de las células CD8+CD38+ y CD8+HLA-DR+ es proporcional a la gravedad de la infección viral, habiéndose reportado que las células CD8+HLA-DR+ de pacientes VIH-1+ no proliferan *in vitro* al ser tratadas con PHA, IL-2 y anticuerpos en contra de CD2, CD3 y CD28 (Prince and Jensen, 1991). Estas células mostraron una deficiente expresión de CD25 (IL-2R de alta afinidad), lo que podría explicar la anergia. La importancia de la activación celular en el curso de la infección por el VIH-1 se confirma por estudios en los que el tratamiento con antivirales resultó en disminución de células CD8+HLA-DR+ lo que se asoció a una disminución de la carga viral (Gray *et al.*, 1998). Se han identificado factores con actividad supresora del VIH-1, producidos por las células T CD8+ como son RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β bloqueando la entrada del VIH-1 y otro denominado factor antiretroviral de linfocitos T CD8+ que controla la replicación del virus sin actividad citotóxica (Cocchi *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1996). Además de los linfocitos T CD8+, los macrófagos producen factores solubles aun no caracterizados que bloquean las variantes virales que usan CXCR4 para infectar sus células blanco (Verani *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1997). La actividad no lítica supresora del VIH-1 de las células T CD8+ es considerablemente más fuerte cuando se da un contacto directo con las células blanco infectadas indicando la participación de factores no solubles asociados a la célula (Levy *et al.*, 1996).

Hay que mencionar que en pacientes infectados se han identificado anticuerpos con importante actividad neutralizante en contra diferentes proteínas del VIH-1 como son p24, gp120, gp41, p17, nef, gag y pol (Tsoukas and Bernard, 1994), que se detectan principalmente al principio de la infección primaria (Pantaleo and Fauci, 1996; Tsoukas and Bernard, 1994). Sin embargo, esto no ha sido descrito en la mayoría de los pacientes por lo que se cuestiona su relevancia contra el virus. Por otro lado, el VIH-1 emplea diversos mecanismos para evadir la respuesta inmunológica. La proteína reguladora del VIH-1, nef, además de impedir la migración de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-I hacia la superficie de la célula y el reconocimiento por los linfocitos T CD8+, induce internalización y degradación endosomal de algunas de estas moléculas (Schwartz *et al.*, 1996).

III. TUBERCULOSIS

III-1. El agente causal

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria que pertenece al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, cuyos otros miembros son *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti* (2000). Se trata de una bacteria estructuralmente muy compleja; la secuenciación de su genoma en 1998 ha venido a dar un gran impulso al estudio de su estructura molecular (Cole *et al.*, 1998; Tsoukas and Bernard, 1994). El genoma de Mtb posee la capacidad para dirigir la síntesis de unas 4,000 proteínas. Se piensa que casi la cuarta parte de los genes codifican para proteínas conservadas. Se han identificado 272 genes que codifican para proteínas de función desconocida. Entre los genes que codifican para proteínas de función conocida destacan los involucrados en el metabolismo de lípidos, en el metabolismo intermediario, en la respiración y en la síntesis de la pared celular. Así mismo se han identificado 99 genes que codifican para proteínas que participan en la virulencia. El análisis del proteoma ha demostrado 1800 “spots”, identificándose proteínas integrales, de choque térmico, proteínas asociadas a la envoltura celular, proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y glicolípidos, en la biosíntesis de ácidos micólicos, de resistencia a isoniazida y miembros del complejo antigénico 85 (Dobos *et al.*, 2004; RANY, 1959; Sinha *et al.*, 2005; Urquhart *et al.*, 1997). Muchas de las proteínas de secreción estudiadas son capaces de activar la inmunidad protectora mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+. Algunas

de estas proteínas se han propuesto para producir nuevas vacunas, como ESAT-6, complejo antigénico 85, MPT64 entre otras(Orme *et al.*, 2001)

III-2. Factores genéticos en la susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*.

Es bien sabido que no todos los individuos expuestos a un paciente bacilífero adquieren la TB, lo que ha sugerido la existencia de factores genéticos (Casanova and Abel, 2002). Se han identificado pacientes con trastornos hereditarios mendelianos en quienes el eje IL-12/IFN- γ es disfuncional y que son muy susceptibles a la infección con micobacterias (Mansouri *et al.*, 2005). Así mismo, en pacientes tuberculosos se han detectado mutaciones en genes que codifican receptores macrofágicos para el IFN- γ , receptores para IL-12 y en STAT-1 de células T (Casanova and Abel, 2002). El denominador común de estos trastornos hereditarios, que generalmente son de tipo autosómico recesivo, es la deficiencia o ausencia de mecanismos antimicobacterianos que modulan la síntesis de IFN- γ . Además hay estudios que involucran a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en la susceptibilidad a la TB. En un estudio reciente se demostró asociación entre DRB1*1501 (un alelo de DR2) y TB pulmonar en India y México (Teran-Escandon *et al.*, 1999). El estudio de la herencia en la susceptibilidad o resistencia a la TB fue impulsado por las observaciones de Skamene y su grupo, quienes identificaron cepas murinas susceptibles a la infección con *M. bovis*/BCG (Skamene *et al.*, 1998). Las bases genéticas de esta susceptibilidad se localizan en un gene localizado en el cromosoma 1 del ratón denominado *nramp1* que codifica la llamada “proteína macrofágica asociada a resistencia natural” (NRAMP1) (Skamene *et al.*, 1998). Esta proteína funciona como un transportador transmembranal de cationes divalentes como el hierro (McDonald *et al.*, 2003). Se desconoce como NRAMP1 confiere protección a la infección con BCG; se ha sugerido que depriva de hierro a la bacteria, que favorece la producción de radicales libres de oxígeno y que induce la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (Blackwell *et al.*, 2003). Este efecto es de la mayor relevancia ya que el principal factor micobactericida es el óxido nítrico (Chan *et al.*, 1995). En ratones susceptibles, NRAMP1 presenta una mutación puntual que la hace disfuncional y en seres humanos se han identificado polimorfismos que se asocian a un aumento de la susceptibilidad a la TB (Bellamy, 2000;Skamene *et al.*, 1998).

III-3. Métodos de diagnóstico

Existen en la actualidad una variedad de métodos para llevar a cabo el diagnóstico preciso de TB (Keeler *et al.*, 2006;Palomino, 2006). Además de los datos clínicos obtenidos del paciente, el método de diagnóstico que más aceptación tiene es la prueba de la tuberculina, un derivado purificado de proteínas obtenido del medio de cultivo de Mtb. La reacción a la tuberculina identifica personas infectadas con el bacilo de la tuberculosis (2000). En el laboratorio el diagnóstico de la TB se puede hacer en frotis de esputo teñidos con la tinción de Ziehl-Neelsen (tinción para bacterias ácido-alcohol resistente). Además se utilizan tinciones con fluorocromos como la Auramina-Rodamina que mejoran la sensibilidad y la especificidad (2000). Sin embargo, estas tinciones no pueden discernir entre diferentes especies de micobacterias; esto requiere de cultivos en medios sólidos y/o líquidos que permiten la identificación de la micobacteria con pruebas bioquímicas (producción de niacina, catalasa, nitrato reductasa, etc). Actualmente se están usando métodos de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar por medio de sondas específicas las diferentes especies de micobacterias, análisis por RFLP y búsqueda de elementos repetidos que son diferentes para cada especie de micobacteria (Somoskovi *et al.*, 2003).

III-4. Inmunopprofilaxis de la tuberculosis.

Durante la 2a y 3a décadas del siglo XX los investigadores franceses Calmette-Guérin desarrollaron la vacuna conocida como BCG; esto se logró a través de múltiples pases en medios de cultivo de una cepa de *Mycobacterium bovis* lo que dio lugar a una cepa atenuada altamente inmunogénica pero incapaz de producir enfermedad en animales de laboratorio (Kaufmann, 2001). Esta vacuna ha sido aplicada en la mayor parte del mundo con resultados muy variables en lo que concierne a la protección en contra de la TB pulmonar, la cual va de 0 hasta 100 %. Esta variabilidad se atribuye a múltiples factores como son el tipo y viabilidad de la cepa utilizada, dosis y ruta de administración y características de la población vacunada, como son el estado nutricional e inmunológico, factores genéticos y exposición a micobacterias saprofitas del medio ambiente (Orme *et al.*, 2001;Roche *et al.*, 1995). Sin embargo, hay datos que muestran que la protección en contra de la TB meníngea y de otras formas de diseminación hematológica es muy alta lo que se piensa justificaría por sí solo la vacunación con BCG (Kumar *et al.*, 2005;Trunz *et al.*, 2006). Por lo anterior, es una prioridad

actual el desarrollo de nuevas vacunas que vengán a sustituir o a complementar a la vacunación con BCG. En la actualidad los esfuerzos se dirigen principalmente a la obtención de moléculas, ADN micobacteriano, micobacterias atenuadas y micobacterias recombinantes. En principio se busca desarrollar una respuesta inmune protectora caracterizada por la expansión de linfocitos T CD4+ productores de IFN- γ y citocina que estimula la capacidad micobactericida del macrófago (Flynn *et al.*, 1993).

III-5. Patogenia de la tuberculosis.

Es de interés que solo el 10% de los individuos sanos en contacto prolongado con un paciente bacilífero adquiera la infección (evidenciada por una reacción positiva a la tuberculina) y de los individuos infectados solo 10% desarrollan TB clínica y bacteriológicamente evidente (2000). Esto parece indicar que en la gran mayoría de los individuos inmunocompetentes los mecanismos de inmunidad innata y adquirida son altamente eficientes. Para poder infectar, el bacilo debe primero superar una variedad de mecanismos protectores presentes en las vías respiratorias como son el moco, el movimiento mucociliar, enzimas, péptidos antibacterianos secretados por células epiteliales y las proteínas surfactantes (Diamond *et al.*, 2000). Cuando el bacilo llega a la parte terminal del tracto respiratorio, que es el alveolo, es fagocitado por el macrófago alveolar y transportado al intersticio pulmonar y/o a los ganglios linfáticos del hilio pulmonar; este papel se ha atribuido recientemente a la célula dendrítica (Humphreys *et al.*, 2006; Gordon and Read, 2002). La fagocitosis del bacilo, paso crucial inicial en la patogenia de la TB, puede ser dependiente de opsoninas como algunos factores del complemento y de anticuerpos, para las cuales el macrófago posee receptores membranales (2000; Schlesinger, 1996). Se ha observado que en el fluido broncoalveolar hay factores del complemento que pueden ser activados por el bacilo (Ferguson *et al.*, 2004). Otra proteína con función de opsonina es la proteína A surfactante, que se secreta en el espacio alveolar, la cual reconoce residuos de manosa en glicoconjugados presentes en la superficie de patógenos como LAM, (Sidobre *et al.*, 2000).

En la fagocitosis independiente de opsoninas participan moléculas propias del bacilo que se conocen con el nombre genérico de adhesinas. Una de ellas, el LAM, interacciona con el receptor para manosa del macrófago promoviendo la fagocitosis del bacilo (Kang and

Schlesinger, 1998). Recientemente se ha observado que los componentes glicoconjugados de la capa más externa de la pared de las micobacterias pueden interaccionar con el receptor para manosa (Villeneuve *et al.*, 2005). Otro receptor involucrado en la fagocitosis mediada por adhesinas es el receptor recolector de desecho o procesador, que reconoce lipopolisacáridos y sulfolípidos polianiónicos de la pared de patógenos (Zimmerli y col, 1996). También se ha involucrado a CD14 en la fagocitosis de Mtb (Peterson y col, 1995); esta molécula, que reconoce componentes lipídicos de la pared de la bacteria, coopera con otros receptores para llevar a cabo la fagocitosis pues por si sola es incapaz de promoverla ya que carece de los dominios intracitoplasmáticos necesarios (Stelzer, F. 2000). Poco se sabe sobre la participación de adhesinas de origen proteico en la fagocitosis de Mtb. Hay observaciones que sugieren que una proteína de 50 kDa y proteínas del complejo A85 pueden funcionar como adhesinas micobacterianas (Arruda y col, 1993; Hetlyy Wiker, 1994). Una molécula micobacteriana con función de adhesina es la proteína con afinidad por la heparina (Dupres y col, 2005). Recientemente en nuestro laboratorio hemos demostrado que la glicolipoproteína de 19 kDa de Mtb funciona como una adhesina en la fagocitosis de micobacterias (Díaz-Silvestre *et al.*, 2005). De los datos anteriores es claro que Mtb posee múltiples mecanismos para llevar a cabo con éxito el paso crítico que es la infección de su célula nicho.

Mtb es un patógeno intracelular que ha desarrollado una capacidad sorprendente para sobrevivir y replicarse al interior del macrófago, que paradójicamente es la célula mejor armada para contender con microbios de vida intracelular. Esto se logra impidiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma (Russell, 2001). En el fagosoma micobacteriano hay niveles disminuidos de constituyentes esenciales de maduración tardía como son el receptor para manosa-6-fosfato, catepsina y la ATPasa de la bomba de protones. El fagosoma micobacteriano carece además de los factores que regulan la fusión de membranas y el transporte de enzimas lisosomales. Recientemente se ha observado que el reclutamiento de la sintasa inducible del óxido nítrico está disminuido en el fagosoma micobacteriano (Miller *et al.*, 2004); esto es de mucho interés por ser el óxido nítrico el factor micobactericida más eficaz, por lo menos en macrófagos de ratón. Al bloquear la maduración del fagosoma, Mtb evita las acciones bactericidas del macrófago asegurando así su sobrevivencia intracelular.

III-6. Respuesta inmunológica en contra de *M. tuberculosis*.

En el intersticio pulmonar, el bacilo y/o sus productos interaccionan con células de la respuesta inmune innata, principalmente el macrófago y la célula dendrítica (van Crevel *et al.*, 2003). Esta interacción resulta en la fagocitosis del bacilo y/o en la activación de dichas células. La activación se debe a la interacción de receptores macrofágicos de superficie con motivos presentes en moléculas de la pared micobacteriana, como LAM y lipoproteínas (Aliprantis *et al.*, 1999; van Cravel *et al.*, 2003). Los receptores celulares involucrados en la activación macrofágica mejor caracterizados son CR3, CR1, CR4, el receptor de manosa, DC-SIGN, los receptores recolectores de desecho o procesadores y receptores de la familia Toll (TLR) (Stenger and Modlin, 2002; Schlesinger, 1996).

De manera posterior o concomitante a la respuesta innata se inicia el reconocimiento del bacilo por las células del sistema inmune adquirido. La inmunidad mediada por linfocitos T es el principal mecanismo de protección en contra de la infección por Mtb (Flynn and Chan, 2001; Kaufmann, 2001). Células del sistema inmune innato como el macrófago y la célula dendrítica fagocitan bacilos y procesan sus antígenos para ser presentados a linfocitos T con receptores para antígeno (TCR alfa/beta o gamma/delta) a través de moléculas del MHC. Con la participación de una variedad de moléculas coestimuladoras, la presentación de antígeno resulta en la activación de linfocitos T CD4+ cuando la presentación es vía moléculas de clase II del MHC y de linfocitos T CD8+ cuando la presentación es a través de moléculas de clase I (Flynn and Chan, 2001; Stenger and Modlin, 2002). Recientemente se ha demostrado que la presentación de antígenos micobacterianos a linfocitos T puede llevarse a cabo a través de moléculas CD1, las cuales presentan antígenos lipídicos a células T CD8+ induciendo su expansión y activación (Ulrichs *et al.*, 2003). Se acepta que los linfocitos T CD4+ son los más importantes en la inmunidad antimicobacteriana. En la actualidad y basados fundamentalmente en estudios con ratones se reconocen dos subpoblaciones polares de los linfocitos T CD4+: Th1 y Th2 (Mosmann *et al.*, 1997). Los linfocitos Th1 producen citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y la IL-2, las que participan de manera importante en la respuesta antimicobacteriana (Flynn and Chan, 2001; Kaufmann, 2001). En el otro polo están las células Th2 productoras de citocinas anti-inflamatorias como son IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que generan un ambiente permisivo para la infección por el bacilo de la TB (Baliko *et al.*, 1998; Lienhardt *et al.*, 2002). En la TB humana las evidencias acerca del papel diferenciado de las dos poblaciones de linfocitos T CD4+ no es tan claro como en el ratón. En la pleuritis tuberculosa, una forma benigna de TB de resolución

espontánea, el exudado pleural contiene numerosas células T CD4+ y se demuestra IFN- γ y TNF- α en el líquido pleural (Barnes *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1990). A pesar de lo anterior, en diversos laboratorios y en el nuestro se ha observado que los linfocitos T de pacientes con TB pulmonar producen *in vitro* mezclas de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10, es decir un patrón no diferenciado o Th0 (Datos no publicados). Estos hallazgos son apoyados por un estudio *in vitro* con clonas de células T CD4+ generadas a partir de células de lavados broncoalveolares de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, las cuales producen *in vitro* predominantemente IFN- γ e IL-10 (Barnes *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1990; Gerosa *et al.*, 1999).

Los linfocitos T CD8+ también proliferan en respuesta al bacilo de la TB (Cho *et al.*, 2000; Lazarevic and Flynn, 2002; Orme, 1993); no se conocen los mecanismos por los que antígenos micobacterianos tienen acceso a la vía de procesamiento y presentación de antígeno por MHC-1. Se ha postulado que los antígenos micobacterianos pueden salir de la vacuola fagocítica para ser captados por moléculas MHC-1 y presentados a linfocitos T CD8+ (Cho *et al.*, 2000; Pfeifer *et al.*, 1993). En humanos se han observado linfocitos T CD8+ citotóxicos en contra de Mtb en lavados broncoalveolares de pacientes con TB (Tan *et al.*, 1997). Como ya se mencionó, recientemente se demostró que los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos microbianos en el contexto de molécula CD1 (Ulrichs *et al.*, 2003). Las células T con restricción CD1 son principalmente los linfocitos T citotóxicos (CTL) típicos que reconocen antígenos no peptídicos, como ácidos micólicos y lipoarabinomannana y que participan en la lisis de monocitos infectados, aunque los linfocitos T CD4+ también lo pueden hacer (Rosat *et al.*, 1999). Estos linfocitos se han aislado de pacientes con tuberculosis y de individuos sanos (Stenger *et al.*, 1997; Sugita *et al.*, 1998). La actividad citotóxica de estas células radica en dos mecanismos; inducen la muerte de la célula infectada por apoptosis por la vía Fas-FasL o por lisis celular inyectando gránulos de perforina y granulicina (Stenger *et al.*, 1997). Además los linfocitos T CD8+ citotóxicos matan bacilos extracelulares liberando gránulos de granulicina; así mismo la granulicina en combinación con perforina disminuye la viabilidad de la bacteria intracelular (Stenger *et al.*, 1998). Por otra parte, los linfocitos T CD8+ contribuyen en la respuesta antimicobacteriana produciendo IFN- γ (Silva and Lowrie, 2000).

III-7. El granuloma tuberculoso.

El granuloma es una reacción inflamatoria característica de la respuesta tisular al bacilo de Koch (Boros, 1978). Se trata de una reacción inflamatoria organizada en capas concéntricas de macrófagos activados, células epitelioides, células gigantes multinucleadas de tipo Langhans. En el centro del granuloma se observan macrófagos con bacilos en su interior, los que también pueden observarse ocasionalmente en el espacio extracelular. En el granuloma temprano hay necrosis central y en las fases tardías fibrosis y calcificación. Una función que se le atribuye al granuloma es encapsular y prevenir la diseminación de la infección (Boros, 1978;Saunders and Cooper, 2000). En el granuloma los bacilos pueden permanecer en estado latente como ocurre en el nódulo de Ghon (Schluger, 2005). El granuloma representa un microcosmos donde se llevan a cabo la respuesta inmune innata la adquirida con la participación orquestada de quimiocinas, citocinas, expresión de receptores, de selectinas y de integrinas lo que resulta en el reclutamiento coordinado, activación y retención de células inflamatorias en el granuloma (Saunders and Cooper, 2000;Saunders *et al.*, 2002). En la respuesta innata los macrófagos y las células dendríticas que entran en contacto con, o fagocitan bacilos son estimuladas a través de receptores de superficie que reconocen componentes micobacterianos diversos. Entre estos son de gran importancia los receptores TLR sobre todo los TLR-2 y TLR-4 a través de los cuales las células del sistema inmune innato son activadas para producir una variedad de factores de gran importancia en la respuesta en contra del bacilo como son quimiocinas, TNF- α , IL-12, TGF- β y radicales libres de nitrógeno, entre otros (Drennan *et al.*, 2004;Quesniaux *et al.*, 2004;Reiling *et al.*, 2002). En la fase adquirida del granuloma hay reclutamiento de linfocitos T CD4+ y CD8+, los que son fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmune adquirida y del granuloma protector, siendo especialmente importantes los linfocitos T CD4+ (Saunders *et al.*, 2002;Fenhalls *et al.*, 2002). Los linfocitos después de ser estimulados por IL-12 producen entre otras citocinas, IFN- γ , que estimula la capacidad micobactericida del macrófago. El mecanismo efector del macrófago es a través de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, actividad que se incrementa en presencia de IFN- γ y TNF- α (Chan *et al.*, 1995); (Flynn and Chan, 2001). En las fases crónicas del granuloma, el macrófago activado produce TGFB- β citocina que induce fibrosis del granuloma lo que contribuye al enclaustramiento del bacilo (Fujita *et al.*, 2002;RANY, 1959).

III-8. Inmunosupresion en la tuberculosis.

Es muy frecuente que el paciente tuberculoso presente reacciones de inmunidad celular deprimidas lo que se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Lenzini *et al.*, 1977; Vanham *et al.*, 1997). Entre el 17 y el 25% de los individuos con tuberculosis son anérgicos a la tuberculina; los linfocitos de 40-60% de los pacientes muestran disminución en la transformación blástica *in vitro*, en respuesta a mitógenos y antígenos micobacterianos (Kleinhenz and Ellner, 1987; Lenzini *et al.*, 1977). Además, los linfocitos T de pacientes anérgicos estimulados *in vitro* en lugar de producir IL-2 o IFN- γ como ocurre en el individuo PPD+ sano, producen IL-10, una citocina inmunosupresora que disminuye la capacidad antimicobacteriana de los macrófagos (Delgado *et al.*, 2002). Otras posibles causas de la respuesta T deficiente del paciente tuberculoso son: linfopenia de linfocitos T CD4+ (Onwubalili *et al.*, 1987; Pilheu *et al.*, 1997), producción disminuida de IFN- γ (Aung *et al.*, 2000), defectos en el receptor de IFN- γ , disminución en la síntesis de IL-2 y células genéticamente deficientes en el receptor de IL-12 (Jouanguy *et al.*, 2000; Altare *et al.*, 1998b; Jouanguy *et al.*, 1997). (Altare *et al.*, 1998a) A la inmunosupresión del individuo con TB podría contribuir la apoptosis excesiva de macrófagos y de linfocitos T CD4+ (Hirsch *et al.*, 2001; Fratazzi *et al.*, 1999). Algunos de estos defectos se corrigen con el uso de antitubercílicos lo que sugiere que son causados por el bacilo. Recientemente se han hecho observaciones que sugieren que la respuesta inmune en contra de Mtb está modulada por las células T reguladoras CD25+ (Tr) y que una excesiva regulación por estas células podría contribuir a la inmunosupresión del paciente tuberculoso (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2006).

IV. COINFECCIÓN VIH-1/Mtb

En el paciente con SIDA, como consecuencia de la caída en el número de linfocitos T CD4+ y de la depresión de la inmunidad celular, se presentan una variedad de infecciones oportunistas; una de las más importantes y frecuentes es la TB como lo muestra el hecho de que a nivel mundial, uno de cada cuatro pacientes VIH-1+ tiene TB activa (Harries *et al.*, 2002). Las personas infectadas por el VIH-1 tienen un riesgo incrementado de adquirir TB por reactivación endógena o por reinfección exógena; en comparación con la población normal, el riesgo es 113 veces mayor en el individuo VIH-1 + y 170 veces mayor en el paciente con SIDA (Small *et al.*, 1993; Daley *et al.*, 1992). Los pacientes VIH-1+ que se infectan con Mtb, desarrollan TB activa en un 37% en los primeros 6 meses (Daley *et al.*, 1992). En África sub-sahariana habitan la mayoría de personas que sufren esta coinfección.

La susceptibilidad del paciente VIH-1+ a la TB es probablemente multifactorial. El principal factor parece ser la disminución de las células T CD4+ que son fundamentales en la respuesta inmune protectora en contra de Mtb (Flynn and Chan, 2001; Kaufmann, 2001; Nakata *et al.*, 1997). Por otra parte, los linfocitos T son disfuncionales y aun antes de que disminuyan exhiben respuestas blastogénicas y actividad citotóxica disminuida (Musey *et al.*, 1999; Ogg *et al.*, 1999). Otras anormalidades que podrían predisponer a una TB oportunista del paciente VIH-1+ son la apoptosis excesiva y una coestimulación de células T deficiente asociada con un decremento en la expresión de las moléculas CD28 y CD40L (Baumler *et al.*, 1996; Borthwick *et al.*, 1994; Subauste *et al.*, 2001). En comparación con los pacientes infectados solamente con el VIH-1, en los linfocitos T de los pacientes coinfectados la muerte por apoptosis esta aumentada de manera significativa (Bohler *et al.*, 1997).

Los pacientes con la coinfección VIH-1/Mtb tienen cargas virales muy altas, esto debido por lo menos en parte a que Mtb promueve la infección de las células blanco y la replicación viral, a través del incremento en la expresión de la molécula CXCR4 en macrófagos alveolares, lo que explica en parte, porque la TB acelera la progresión al SIDA (Hoshino *et al.* 2004). Se ha demostrado que linfocitos y macrófagos de pacientes VIH-1+ expuestos a Mtb *in vitro* regulan positivamente la replicación viral (Toossi *et al.*, 1997) y que la incubación de linfocitos que contienen el provirus del VIH-1 integrado con Mtb, resulta en activación de la expresión del VIH-1 (Lederman *et al.*, 1994). Se ha observado así mismo que el líquido pleural de pacientes con TB incrementa la replicación del VIH-1 (Garrait *et al.*,

1997) y que la cantidad de ARN viral en lavados broncoalveolares es mayor en lóbulos con lesiones tuberculosas (Nakata *et al.*, 1997). Es de interés que la diversidad de cuasiespecies y la heterogeneidad del VIH-1 sea mayor en pacientes coinfectados, lo que se asocia al incremento de la replicación del VIH-1 mediada por la TB (Collins *et al.*, 2000). Esta heterogeneidad se demostró comparando granulomas tuberculosos con tejidos no afectados por la infección tuberculosa (Nakata *et al.*, 1997), sugiriendo que las lesiones tuberculosas de individuos coinfectados, son focos de replicación y diversificación del VIH-1 (Toossi, 2003).

En respuesta a la infección por Mtb los macrófagos producen citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6, que son potentes inductores de la replicación viral (Osborn *et al.*, 1989). Se ha observado que la neutralización de TNF- α con anticuerpos disminuye de manera significativa la replicación del VIH-1 en monocitos infectados (Toossi *et al.*, 1999). En este fenómeno participa NF- κ B que es activado por LTRs del VIH-1, que son sitios de unión a NF- κ B (Pereira *et al.*, 2000). Por otra parte se ha observado que la p38 MAP cinasa es fundamental para la replicación del VIH-1, tanto en linfocitos T como en fagocitos mononucleares (Cohen *et al.*, 1997). En este contexto, es de interés que ManLAM, un lipoglicano abundante en la pared de Mtb, activa *in vitro* la expresión de LTRs del VIH-1 de una manera independiente de TNF- α y dependiente de NF- κ B (Bernier *et al.*, 1998).

En el paciente coinfectado se ha observado trastornos en la regulación de la producción de las quimiocinas y en la expresión de sus receptores celulares por células mononucleares, lo que favorece su infección. En el paciente tuberculoso hay una disminución en la síntesis de MIP-1 α y RANTES, quimiocinas con afinidad por CCR5, un co-receptor para el VIH-1, siendo este hallazgo más marcado en las lesiones tuberculosas (Toossi *et al.*, 2001; Toossi *et al.*, 1999; Mayanja-Kizza *et al.*, 2001). En contraste MCP-1 que se une a CCR2 que no es un co-receptor para el VIH-1, se expresa abundantemente (Toossi *et al.*, 2001; Toossi *et al.*, 1999). MCP-1 promueve el reclutamiento de monocitos y células T de memoria, los cuales son células blanco para el VIH-1 (Toossi *et al.*, 2005).

Hoy en día la TB es una de las más importantes causas de muerte en los individuos infectados por el VIH-1 (Corbett *et al.*, 2003). A esto contribuye el que con frecuencia las cepas de Mtb son resistentes a múltiples drogas antifímicas (Perlman *et al.*, 1997; Palmieri *et al.*, 2002). Independientemente de las cuentas de células CD4+, el riesgo de muerte del paciente coinfectado es dos veces mayor que el de individuos infectados solamente por el

VIH-1, lo que se debe a una progresión rápida hacia SIDA, más que a los efectos de la infección por Mtb (Whalen *et al.*, 1995).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS

Siendo *M. tuberculosis* un patógeno altamente eficiente para estimular o bien deprimir la inmunidad celular mediada por linfocitos T CD4+ y siendo estas células el blanco principal de la infección por VIH-1, es factible que la infección por Mtb induzca cambios fenotípicos que podrían afectar positiva o negativamente los linfocitos T del paciente coinfectado.

VI. OBJETIVO GENERAL

Investigar el fenotipo de los linfocitos T de sangre periférica de pacientes VIH-1+, con TB pulmonar y con la coinfección VIH-1/Mtb.

VII. MATERIALES Y METODOS

VII-1. Pacientes

Los pacientes que participaron en este estudio fueron reclutados del Centro Estatal de Información sobre SIDA en San Luis Potosí y el Hospital de infectología del Centro Médico La Raza, del Instituto Mexicano del Seguro Social; 55 pacientes estaban infectados por el VIH-1. El diagnóstico de VIH-1 se realizó utilizando la prueba de ELISA como tamiz (Um Elisa HIV 1+2 recombinante, La Havana, Cuba) y se confirmó con la prueba de inmunoblot (Grupo Roche Syntex, México). De estos 55 pacientes 9 tenían TB pulmonar activa. Al momento de su ingreso, los pacientes VIH-1+, se encontraban bajo tratamiento con una variedad de drogas incluyendo AZT, DDI, DDC y retrovir-videx.

También se estudiaron 23 pacientes con TB pulmonar activa, el diagnóstico se estableció por datos clínicos y radiológicos y fue confirmado por esputo positivo para bacilos ácido alcohol resistentes y cultivo en todos los casos. A estos pacientes se les descartó la infección por VIH-1 con la prueba de ELISA. Al momento de la toma de muestra todos los pacientes estaban bajo tratamiento antifímico con diversas drogas que incluían isoniazida, rifampicina y etambutol. A todos los pacientes con TB se les determinó la prueba de resistencia a drogas con las cepas aisladas. Como control se incluyeron 24 individuos sanos en los cuales se descartó por estudios de laboratorio y/o por datos clínicos la infección por el VIH-1 y Mtb.

VII-2. Obtención de las células mononucleares de sangre periférica.

Las muestras sanguíneas de los pacientes y los individuos sanos se obtuvieron por punción venosa en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante (Becton Dickinson, San José CA USA). Posteriormente a través de un gradiente de densidad en Histopaque-1077 (Sigma Diagnostic Inc; St Louis MO, USA) se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las cuales se llevaron a una concentración de 1×10^6 PBMC/ml.

VII-3. Análisis por citometría de flujo

De la suspensión anterior de 1×10^6 PBMC/ml, se tomaron 5×10^5 células (500 μ l) para analizarse por citometría de flujo. Algunas muestras fueron tratadas con la solución

lisante de eritrocitos para FACS™ (Becton Dickinson), brevemente, 200 µl de sangre diluida 1:2 con PBS fue lisada con 2 ml de solución lisante, las células se lavaron tres veces en PBS a 1500 rpm (Ashmore *et al.*, 1989), posteriormente se marcaron con los anticuerpos monoclonales o controles de isotipo por 30 minutos (min), en la oscuridad a 4^o centígrados, se lavaron en buffer salino de fosfatos (PBS) con 1% de suero bovino fetal y 0.1% de azida de sodio (NaN₃). Después las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario adecuado por 30 min. Después de lavar como se indicó en el paso anterior, las células fueron fijadas con para-formaldehído al 1% en PBS. Por lo menos 10,000 PBMC fueron analizadas en un FACScan, equipado con un láser de argón de 488 nm y se usó el programa de análisis Cellquest. Se realizó el típico “forward and right angle scatterin” para establecer la ventana de los linfocitos y excluir blastos, restos y agregados celulares (Prince *et al.*, 1992).

VII-4. Anticuerpos

Para el análisis de citometría de flujo, los anticuerpos fueron adquiridos en las casa comerciales indicadas, anticuerpos monoclonales de ratón en contra de las siguientes moléculas humanas: anti-CD3 acoplado a isotiocianato de fluoresceína (anti-CD3-FITC) clona UCHT1 isotipo IgG1, anti-CD45RA-FITC clona F8-11-13 isotipo IgG1, anti-CD27-FITC clona LT27 isotipo IgG1, anti-CD40L clona TRAP1.3.6 isotipo IgG1, anti-CD30L clona MB1 isotipo IgG2b (Serotec, Raleigh NC USA), anti-CD4 acoplado a phycoeritrina (anti-CD4-RPE) clona RPA-T4 isotipo IgG1, anti-CD40-FITC clona 5C3 isotipo IgG1, anti-CD28-FITC clona CD28.2 isotipo IgG1, anti-CD95-FITC clona DX2 isotipo IgG1, anti-CD45RO-RPE clona UCHL1 isotipo IgG2a, (Pharmingen, San Diego CA, USA), anti-CD4 acoplado a phycoeritrina-Cy-crome (anti-CD4-RPE-Cy5) clona MT310 isotipo IgG1, anti-CD8-RPE-Cy5 clona DK25 isotipo IgG1, anti-CD30-FITC clona Ber-H2 isotipo IgG1 (DAKO Carpinteria CA USA). Los anticuerpos controles de isotipo fueron IgG1 conjugado con FITC, RPE o RPE-Cy5 clona DAK-GO1 (Dako), IgG2a conjugado con FITC o RPE clona X39, IgG1 puro clona X40 (Becton-Dickinson) y IgG2b clona 27-35 (Pharmingen). El anticuerpo secundario para el marcaje de CD40L y CD30L (Serotec) fue un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón marcado con FITC (Becton-Dickson).

VII-5. Análisis estadístico

Para establecer las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ONE-WAY ANOVA) y se usó el estatus de infección por VIH-1 o Mtb como factores. En los casos en los que las pruebas de ANOVA identificaron diferencias significativas entre los grupos, se realizó un análisis de comparación múltiple de medias de Tukey (**Quezada-Calvillo et al., 1993**) y se usó el programa GraphPad Prism versión 3.02 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA).

VIII. RESULTADOS

VIII-1. Individuos control

A los individuos participantes se les hizo la historia clínica habitual y diversos exámenes de laboratorio. En nuestra revisión se obtuvieron los datos siguientes: edad, sexo, duración de la enfermedad, infección o padecimientos concomitantes y tratamiento.

En este estudio se incluyeron 24 voluntarios sanos, 13 hombres y 11 mujeres, con un rango de de 21 a 81 años de edad y una media de 35.3 años. A 17 individuos se les realizó una biometría hemática en donde los glóbulos blancos se observaron entre los 9900 a los 3300 leucocitos/mm³ y una media de 6,208 leucocitos/mm³, los linfocitos mostraron un rango de 20 a 51 % con una media de 32 %, los monocitos tuvieron un rango de 0 a 10 % y una media de 4 % y los polimorfonucleares un rango de 48 a 80 % con una media de 61 %.

Los datos clínicos obtenidos de los individuos del grupo control se muestran en la tabla 1 del apéndice 1.

Es importante mencionar que con propósitos comparativos, el grupo control se dividió en subgrupos, lo anterior se debió a que al realizar el análisis experimental de las muestras de los pacientes, estas fueron apareadas por edad y sexo con otras muestras de individuos del grupo control.

VIII-2. Pacientes VIH-1+. Clasificación, datos clínicos y de laboratorio.

Después de analizar las células mononucleares (CMN) del total de individuos VIH-1+ (55 pacientes) por citometría de flujo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4, los pacientes se agruparon de acuerdo al número de linfocitos T CD4+/mm³ de sangre periférica, como lo establece el CDC de Atlanta, Estados Unidos. La distribución de los pacientes fue la siguiente:

Tabla 2. Pacientes VIH-1+. Clasificación

Grupo	Células CD4+/ml	# Pacientes	Edad
I	≥500	16	24 a 58 años, media 34.2
II	499-200	17	21 a 55años, media 31.5
III	<200	22	22 a 56 años, media 33.1

A continuación se describen los datos clínicos obtenidos de los pacientes. El Grupo I estuvo formado por 12 hombres y 4 mujeres, con edades que fluctuaban de 24 a 58 años (edad media 34.2), el diagnóstico se observó entre 1 y 96 meses (media de 12.9 meses), los glóbulos blancos fluctuaron entre las 2800 y las 9250 células/mm³, (media de 6469 células/mm³), los linfocitos mostraron un rango entre 22 a 56 % (media de 39.3 %), los monocitos se expresaron de 0 a 4 % (media de 2 %) y los polimorfonucleares se detectaron de 42 a 76 % (media de 54 %).

El Grupo II formado por 13 hombres y 4 mujeres con edades de 21 a 55 años, (edad media 35.1), el diagnóstico se observó entre los 3 y los 48 meses (media 16.9 meses), los glóbulos blancos alcanzaron un rango de 2550 a 9500 leucocitos/mm³ (media 4541 leucocitos/mm³), los linfocitos fluctuaron entre 21 y 82 % (media 38.9 %), los monocitos mostraron un rango de 0 a 5 % (media 2.5 %) y los polimorfonucleares se detectaron de 12 a 74 % (media 51 %).

El Grupo III estuvo formado por 18 hombres y 4 mujeres, con edades de 22 a 56 años (edad media de 33.1), una diagnóstico de entre 14 y 96 meses (media 42.4 meses), un rango de glóbulos blancos de 1120 a 8500 células/mm³ (media de 3682 células/mm³), los linfocitos se observaron entre 12 y 49 % (media 24.3 %), los monocitos mostraron un rango de 0 a 5 % (media 2%) y los polimorfonucleares de 48 a 86 % (media 65 %). Los pacientes con SIDA (Grupo III, Células CD4+ <200/ μ l) presentaron los siguientes padecimientos asociados: linfadenopatía cervical (1), síndrome de desgaste (3), candidiasis (5), herpes (2), neumonía por *P. carinii* (2) criptococosis cerebral (2) y tuberculosis pulmonar activa (9), siendo este el grupo de pacientes coinfectados que forma la base de este estudio.

Los datos clínicos y de laboratorio de estos pacientes se muestran en las tablas 3, 4 y 5 del apéndice 1.

Con respecto a la edad la distribución de los 3 grupos de pacientes VIH1+ fue muy semejante. En el Grupo I la edad varió de 24 a 58 años con una media de 34.2 años. En el Grupo II la edad varió de 21 a 55 años siendo la media de 35.1 años. En el Grupo III, del cual se excluyen los 9 casos de coinfección VIH-1/Mtb, la edad varió de 28 a 51 años con una media de 34.2. Esta similitud en la edad es en cierto modo inesperada, pues era de esperarse

que lo pacientes con SIDA fueran de edad mayor dada la evolución prolongada que generalmente se requiere para una caída marcada de las células T CD4+. De los 46 pacientes infectados con el VIH-1 estudiados, la gran mayoría fueron del sexo masculino (78.2% hombres y 21.3 mujeres).

El tiempo de diagnóstico fue muy heterogéneo. En el Grupo I varió de 1 a 96 meses, en el Grupo II de 3 a 48 meses y en el Grupo III de 14 a 96 meses. Estos datos, sin embargo, son cuestionables por la dificultad que existe para ubicar con precisión el tiempo de inicio de la infección, dada la inespecificidad de la sintomatología (Pantaleo and Fauci, 1995). Por otra parte, los pacientes generalmente buscan atención médica en estadios avanzados de la enfermedad. Una de las marcas características de la infección por el VIH-1 es la disminución de los linfocitos T CD4+, que se refleja en las cuentas de linfocitos al practicar biometrías hemáticas. En estas observamos que el porcentaje de linfocitos es muy semejante en los Grupos I y II (39.3 y 38.9 % respectivamente) mientras que en los pacientes con SIDA (Grupo III), las cuentas de linfocitos bajaron marcadamente (24.3 %).

VIII-3. Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo

Una vez que se obtuvo la sangre de los pacientes, se aislaron las CMN y se marcaron con los anticuerpos adecuados de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos, se procedió a su análisis por citometría de de flujo. Los resultados del total de 46 pacientes VIH1+ (sin TB) se muestran numéricamente en la Tabla 6 y gráficamente de la Figura 1 a la 5.

Tabla 6. Resultados del estudio de citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica de 46 pacientes infectados por el VIH-1 y de 21 individuos control.

Marcador	Control (n=21)		VIH ≥ 500 (n=16) Grupo I		VIH 499-200 (n=17) Grupo II		VIH < 200 (n=13) Grupo III	
	%	#	%	#	%	#	%	#
CD3	63±19	1536±601	64±15	735±580	62±15	1215±365	47±24	729±417 ^{cf}
CD3/CD4	38±12	943±460	30±10	807±327	17±8 ^{ce}	06±89 ^{cf}	8±6 ^{cf}	118±117 ^{cf}
CD3/CD8	19±8	447±217	32±11	73±392 ^b	42±15 ^c	838±376 ^b	31±24	458±343 ^{dg}
CD4/CD45RA	26±12	261±177	26±20	209±150	14±15	47±63 ^{cd}	27±35	34±64 ^{cd}
CD8/CD45RA	54±27	296±178	56±30	525±375	26±19	251±213 ^d	42±39	194±247 ^d
CD4/CD45RO	59±18	490±242	44±22	420±469	51±16	149±58 ^b	59±25	70±67 ^{cd}
CD8/CD45RO	47±26	273±174	54±28	398±284	98±162	483±334	39±28	267±216
CD4/CD95	40±26	491±431	26±18	232±222	25±29	75±94 ^c	58±25 ^g	59±57 ^c
CD8/CD95	39±26	234±181	40±37	352±332	16±17	138±170	36±36	190±245
CD4/CD27	38±35	447±472	46±43	379±372	8±17 ^d	20±41 ^{bd}	26±29	23±28 ^b
CD8/CD27	32±31	146±138	34±34	355±428	5±9	49±86 ^e	40±49	66±67 ^e
CD4/CD30	2±3	11±14	1±2	9±18	0.5±2	2±6	3±8	2±6
CD8/CD30	7±21	24±58	2±4	11±17	0.3±1	3±10	1±2	7±14
CD4/CD30L	26±32	264±419	10±5	82±52	9±8	31±32	45±28 ^d	74±59
CD8/CD30L	23±36	96±149	6±10	34±44	1±2	5±9	27±45	19±26
CD4/CD40	5±10	36±64	1±2	8±17	1±3	4±8	3±7	4±8
CD8/CD40	12±20	60±87	1±3	9±20	2±3	16±24	2±4	14±28
CD4/CD40L	11±21	106±199	5±7	38±59	4±9	18±38	33±38 ^{dg}	31±39
CD8/CD40L	10±24	38±61	5±12	26±56	1±1	6±9	22±37	58±156
CD4/CD28	69±30	676±378	40±36	372±330 ^a	36±33	116±133 ^c	37±34	47±49 ^{cd}
CD8/CD28	46±26	260±142	30±25	286±260	17±20 ^a	146±154	16±29 ^a	58±90 ^{ad}

Se presenta la media ± desviación estándar de los números absolutos y del porcentaje de las subpoblaciones celulares analizadas, de los 3 grupos de pacientes VIH-1+, así como de los individuos sanos del grupo control.

- ^a.- Estadísticamente diferente del control (p<0.05)
- ^b.- Estadísticamente diferente del control (p<0.01)
- ^c.- Estadísticamente diferente del control (p<0.001)
- ^d.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥500 (p<0.05)
- ^e.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥500 (p<0.01)
- ^f.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥500 (p<0.001)
- ^g.- Estadísticamente diferente del grupo VIH 499-200 (p<0.05)

VIII-4. Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de linaje linfocitario

Enseguida presentamos gráficamente los hallazgos que fueron estadísticamente significativos, sobretodo en relación con el Grupo control. En la Figura 1 se muestran los cambios observados en los linfocitos T CD3+.

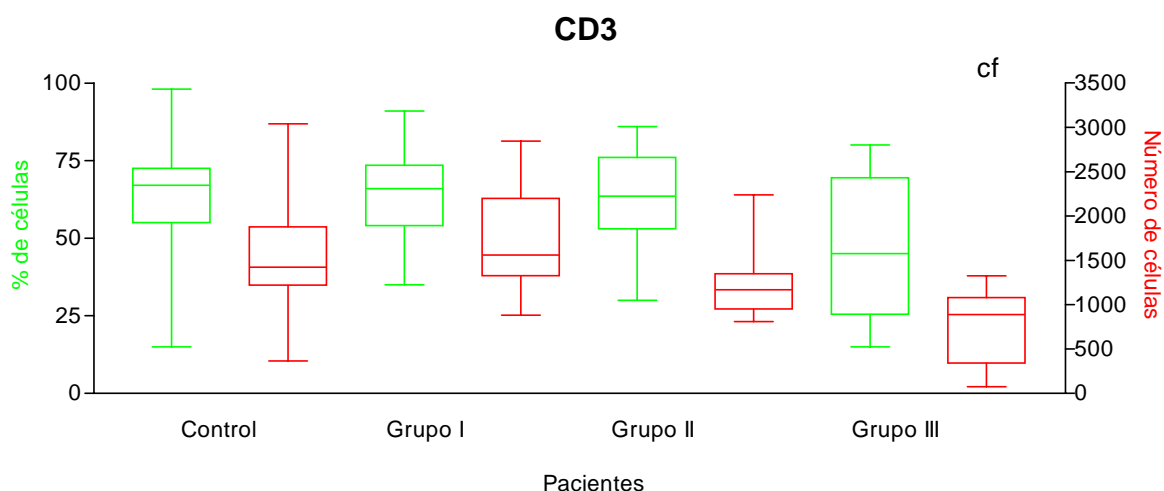


Figura 1. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75 y el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y el número absoluto de la subpoblación celular. Grupo I es ≥ 500 células T CD4+/mm³, Grupo II es 499-200 células T CD4+/mm³, Grupo III es < 200 células T CD4+/mm³.

c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

f.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥ 500 ($p < 0.001$)

No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos I y II. En cuanto al Grupo III (SIDA) hubo una caída altamente significativa en el número de linfocitos CD3+ ($p < 0.001$). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de estas células, sin embargo, se observó una tendencia a la disminución (SIDA 47 ± 24 , control 63 ± 19).

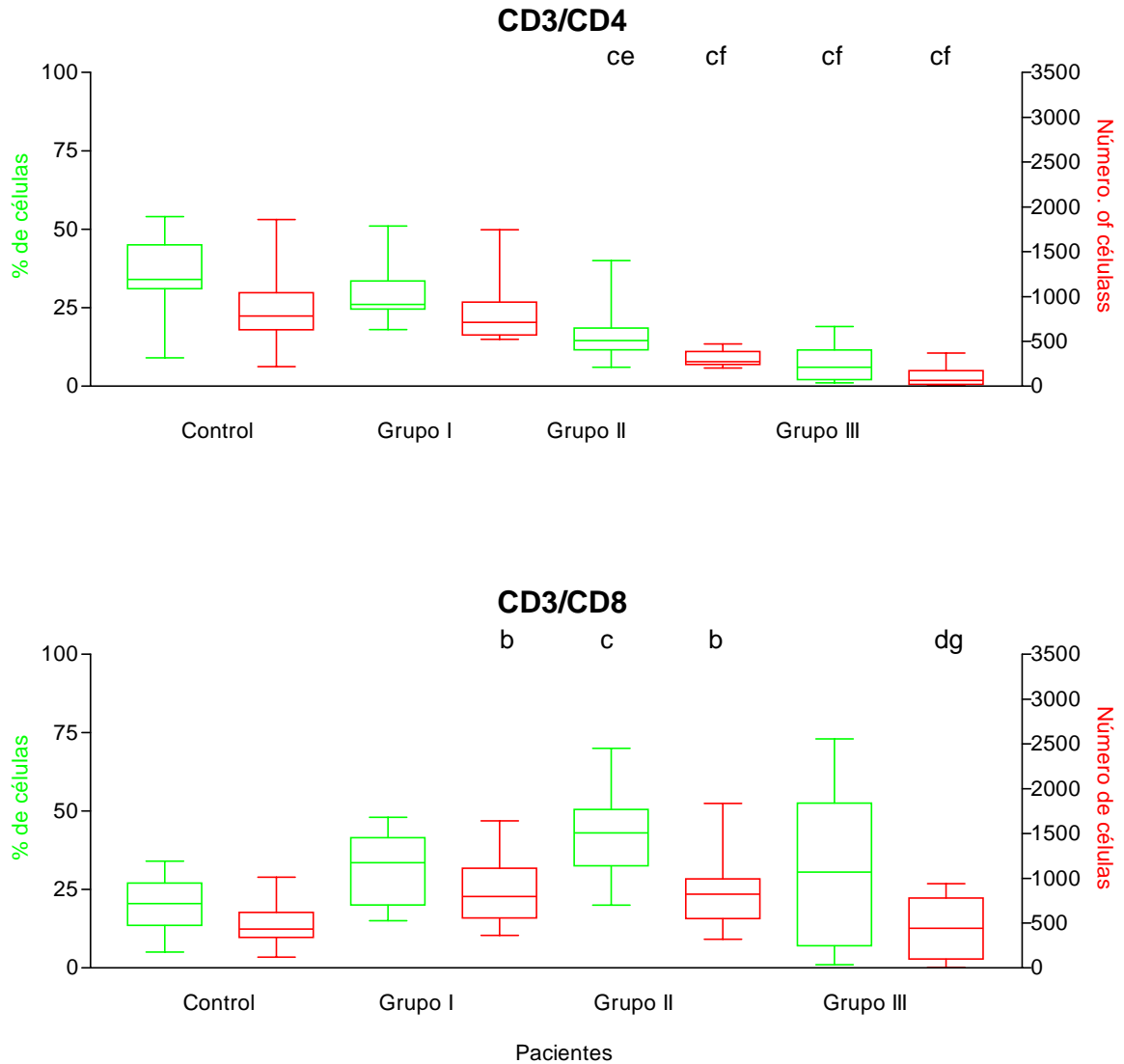


Figura 2. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75 y el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y el número absoluto de la subpoblación celular. Grupo I es ≥ 500 células T CD4+/mm³, Grupo II es 499-200 células T CD4+/mm³, Grupo III es < 200 células T CD4+/mm³.

- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)
- d.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥ 500 ($p < 0.05$)
- e.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥ 500 ($p < 0.01$)
- f.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥ 500 ($p < 0.001$)
- g.- Estadísticamente diferente del grupo VIH 499-200 ($p < 0.05$)

Con respecto a las células T CD4+ (Tabla 6, Figura 2), nuestros resultados corroboran lo reportado previamente en la literatura (Pantaleo and Fauci, 1995), al mostrar una disminución muy marcada de esta importante subpoblación de linfocitos, tanto en porcentaje como en números absolutos. En comparación con el grupo control (% 38±12; número 943±460) la diferencia fue altamente significativa ($p < 0.001$) tanto en el Grupo II (% 17±8; número 306±89) como en el Grupo 3 (% 8±6, número 118±117). Las diferencias del Grupo I con el II y III fue igualmente significativa ($p < 0.001$).

En comparación con el Grupo control, hubo un incremento en el número de los linfocitos T CD8+, desde las primeras etapas de la infección (en número Grupo 1, $p < 0.01$). El incremento en el número de estas células se mantiene al mismo nivel en el Grupo II y en los pacientes con SIDA el número de las células CD8+ es significativamente menor que en los pacientes del Grupo I y II (ambos $p < 0.05$). Los linfocitos CD8+ del Grupo III fueron similares en número y porcentaje al Grupo Control.

VIII-5. Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de activación

Con respecto a los marcadores relacionados con activación celular, en este estudio analizamos el CD45RA que identifica a células vírgenes, es decir, que no han reconocido a su antígeno y el CD45RO que identifica células de activación/memoria. Los resultados estadísticamente significativos se muestran en la Figura 3.

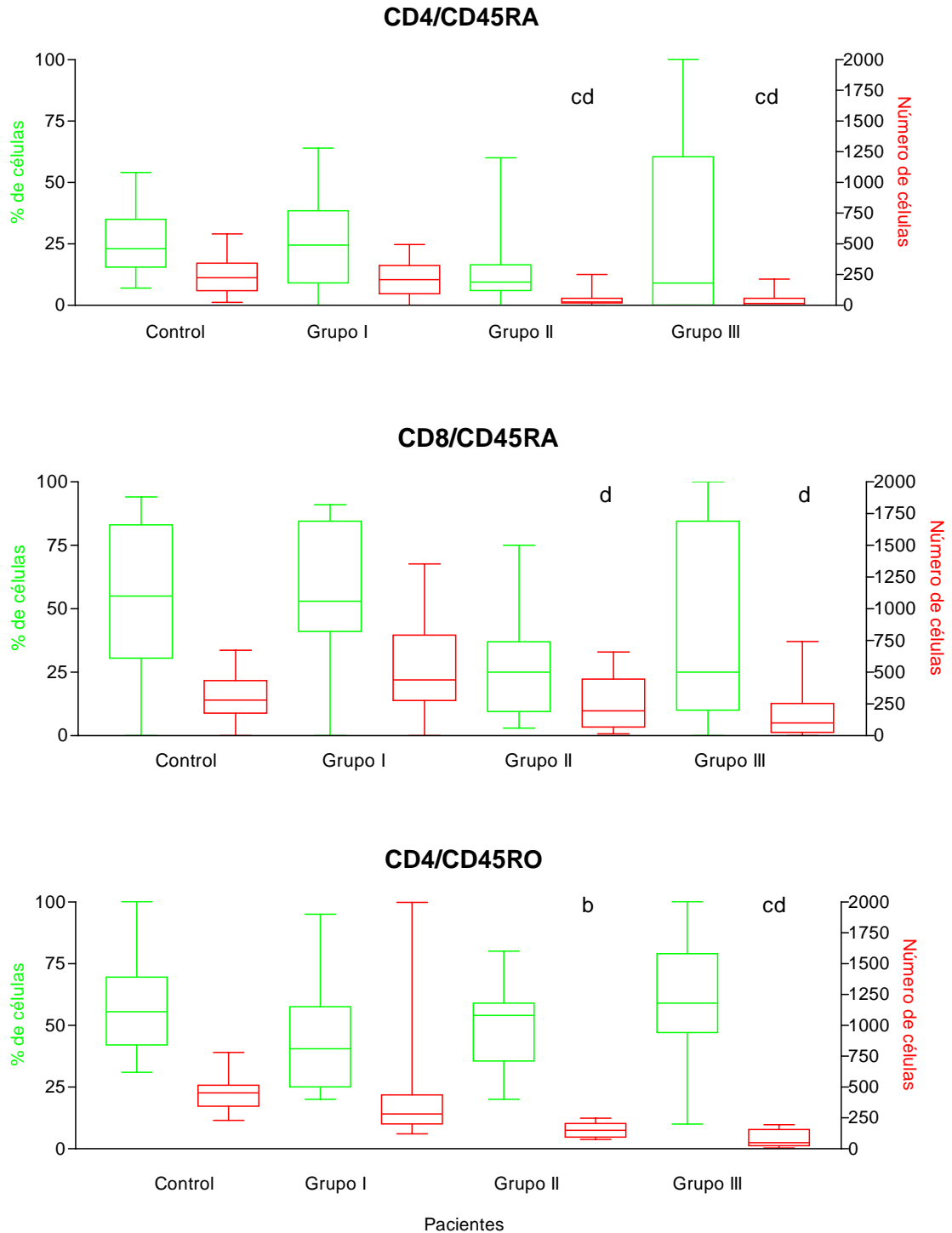


Figura 3. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y el número absoluto de la subpoblación celular. Grupo I es ≥ 500 células T CD4+/mm³, Grupo II es 499-200 células T CD4+/mm³, Grupo III es < 200 células T CD4+/mm³.

b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
 c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

d.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥ 500 ($p < 0.05$)

En comparación con el número absoluto de de las células del grupo control (261 ± 177), las células CD4+ que expresaron CD45RA estuvieron muy disminuidas ($p < 0.001$) en pacientes del Grupo 2 (47 ± 63) y en pacientes con SIDA (34 ± 64). Los porcentajes, sin embargo no estuvieron alterados, sugiriendo que la caída de estas células obedece más bien a la disminución del número de células CD4+. En cuanto a la molécula de memoria/activación CD45RO, en comparación con el control (490 ± 242), su expresión estuvo muy disminuida en números absolutos en la población CD4+ de pacientes del Grupo 2 (149 ± 58 ; $p < 0.01$) y en pacientes con SIDA (70 ± 67 ; $p < 0.001$), siendo los porcentajes semejantes al del grupo control. La expresión de CD45RA y CD45RO en células CD8+ estuvo dentro los límites del grupo control.

VIII-6. Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Marcador de apoptosis, CD95

Como parte del proceso de activación de los linfocitos T, se presenta el fenómeno de apoptosis en el cual se activan genes que la inducen (Nagata and Golstein, 1995). Un marcador que identifica a las células susceptibles a la apoptosis es CD95, el cual fue analizado en este estudio.

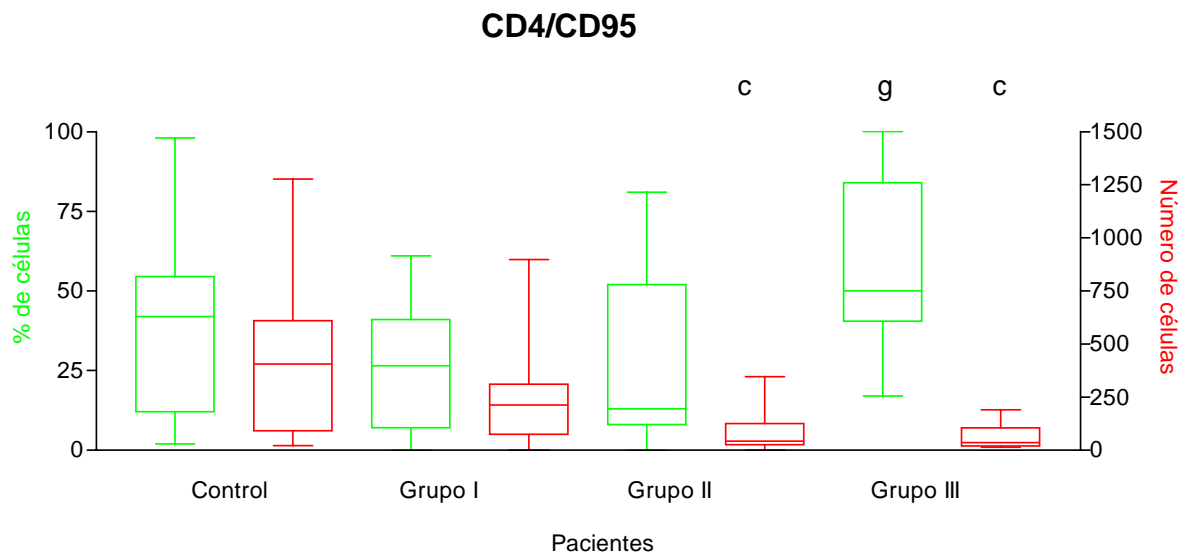


Figura 4. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y el número absoluto de la subpoblación celular.

Grupo I es ≥ 500 células T CD4+/mm³, Grupo II es 499-200 células T CD4+/mm³, Grupo III es < 200 células T CD4+/mm³.

c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

g.- Estadísticamente diferente del grupo VIH 499-200 ($p < 0.05$)

En este estudio observamos una disminución importante en la expresión de CD95 únicamente en las células CD4+ que fue altamente significativo en número en los Grupos 2 y 3 ($p < 0.001$). La expresión de este marcador no estuvo alterado en las células CD8+.

VIII-7. Pacientes VIH-1+. Análisis por citometría de flujo. Moléculas de coestimulación.

En este estudio analizamos la expresión de algunas moléculas involucradas en el proceso de coestimulación durante la presentación de antígeno, pues en la literatura existen reportes que indican diversas anomalías (Haffar *et al.*, 1995). Enseguida presentaremos resultados obtenidos en el análisis citofluorométrico de CD27 y CD28.

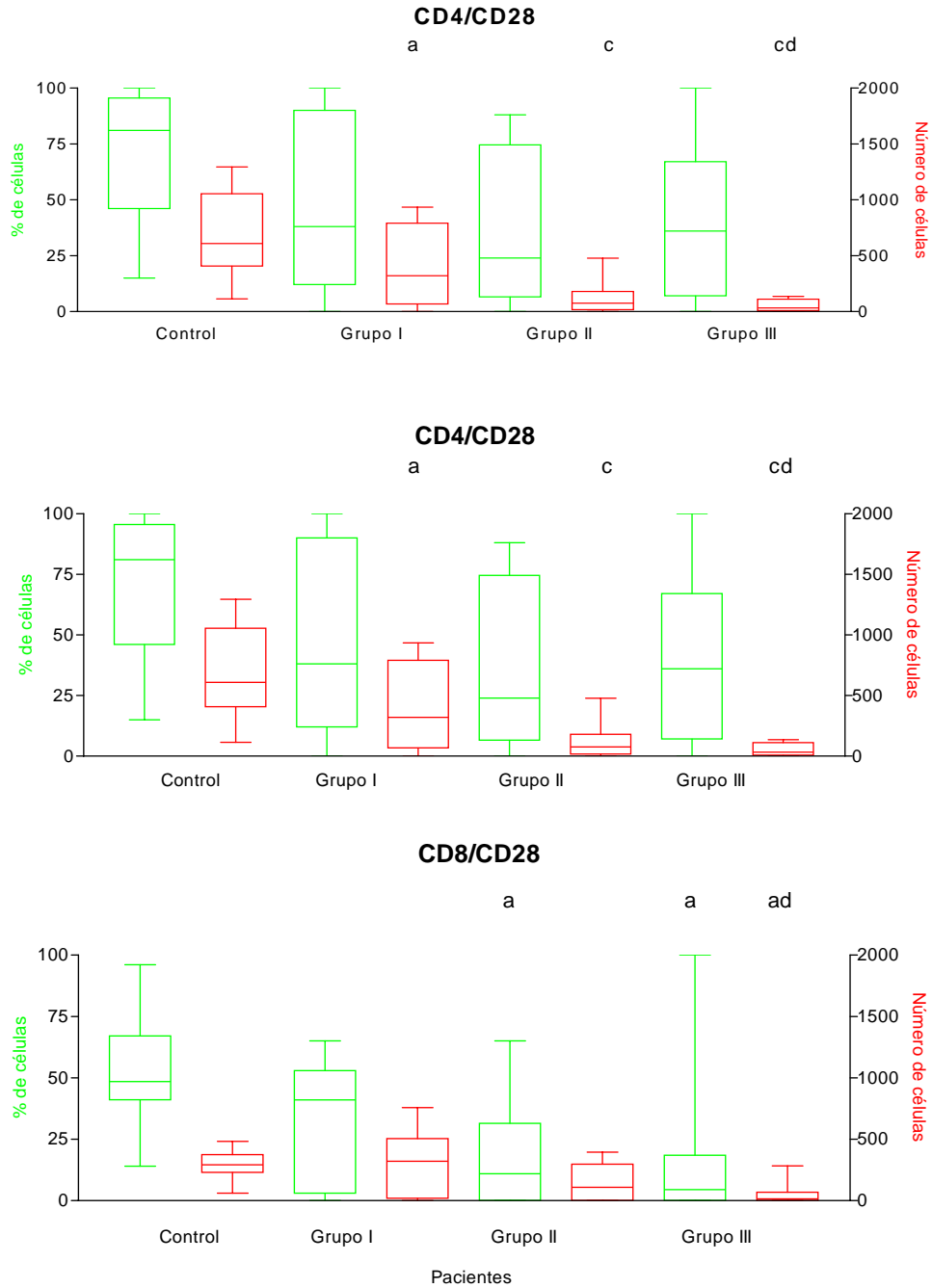


Figura 5. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y el número absoluto de la subpoblación celular. Grupo I es ≥ 500 células T CD4+/mm³, Grupo II es 499-200 células T CD4+/mm³, Grupo III es < 200 células T CD4+/mm³.

- a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)
- d.- Estadísticamente diferente del grupo VIH ≥ 500 ($p < 0.05$)

En pacientes con SIDA y en el Grupo 2 el número absoluto de células CD4+/CD27+ se observó muy disminuido en comparación con el control (control, 447±472; Grupo 2, 20±41; Grupo 3, 23±28). Finalmente, presentaremos el análisis de CD28, la molécula coestimuladora que más ha sido estudiada y a la cual se asigna un papel fundamental en la activación del linfocito T (Sharpe and Freeman, 2002). En las células CD4+, la expresión de CD28 estuvo muy disminuida en números absolutos en relación con el control (676±378) en los 3 grupos de pacientes VIH-1+ (Grupo I, 372±330, $p<0.05$; Grupo II, 116±133, $p<0.001$; Grupo III, 47±49, $p<0.001$). La disminución en el Grupo 3 (SIDA) fue mayor que la del Grupo 1 ($p<0.05$). Finalmente se analizó la expresión de CD28 en las células CD8+, células de gran importancia en la respuesta inmune anti-VIH-1. En comparación con el Grupo control (46±26) se observó una disminución significativa ($p<0.05$) en la proporción de células que expresan CD28 en el Grupo II(17±20) y en pacientes con SIDA (16±29). En cuanto al número absoluto, los pacientes con SIDA (58±90) mostraron una disminución significativa ($p<0.05$) en relación al control (260±142) y al Grupo I (286±260). La expresión de la molécula CD30 que participa en procesos de coestimulación/activación del linfocito T que se asocia al desarrollo de apoptosis (Biswas *et al.*, 2003) no estuvo alterada. Su ligando CD30L, también fue analizado en las células T CD4+ y observamos que el porcentaje sufrió una disminución en las dos primeras etapas de la infección viral y al final, en los pacientes con SIDA se muestra una recuperación del marcador (45±28) lo que lo hace diferente estadísticamente ($p<0.5$) del Grupo I.

VIII-8. Pacientes con tuberculosis. Datos clínicos y de laboratorio

Como con los individuos control y los pacientes VIH-1+, a los pacientes T con TB se les hizo la historia clínica y diversos exámenes de laboratorio. A continuación se muestran algunos de los datos obtenidos. Participaron 23 pacientes con TB pulmonar activa, Con respecto a la edad, el rango varió de los 29 a los 78 años, con una media de 53.3 años. De los 23 pacientes con TB, 13 fueron hombres (56.5%) y 10 mujeres (43.5%), prácticamente una relación 1:1. Como en el caso de los pacientes VIH-1+, la duración de la enfermedad

fue muy heterogénea, de 2 a 88 meses con una media de 17.5 meses. Las mujeres mostraron una media de 11.2 meses y los hombres 19.1 meses en la duración de la enfermedad. En la mayoría de los casos se aislaron cepas resistentes a la quimioterapia 16 (70 %), susceptibles 6 (26 %) y en un caso no se determinó (4 %). La infección tuberculosa se ve acompañada en muchos casos de una linfopenia severa, por lo que analizamos los valores de las células obtenidos en la cuenta diferencial de las células de sangre periférica. Con respecto a los glóbulos blancos, los pacientes mostraron un rango de 3600 a 13700 leucocitos/mm³ y una media de 6396 leucocitos/mm³. Los linfocitos mostraron un intervalo de 17 a 55 % y una media de 26.8 %. Al analizar a los pacientes de sexo femenino observamos una media de 29.3% de linfocitos y en el sexo masculino 30.2% de linfocitos. Los monocitos fluctuaron entre 0 y 17 % con una media de 4.4 % y los polimorfonucleares se observaron entre 38 y 82 % y una media de 63.6 %.

En la Tabla 7 del apéndice 1 se muestran los datos clínicos y los resultados de la biometría hemática de los pacientes infectados con *M. tuberculosis* incluidos en este estudio.

VIII-9. Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo.

Como se mencionó en Materiales y Métodos, las células marcadas se analizaron en el citómetro de flujo y los resultados se evaluaron para identificar diferencias estadísticamente significativas, que se muestran en la Tabla 8, donde se describe la media \pm desviación estándar de los números absolutos y el porcentaje de las subpoblaciones celulares de los pacientes con tuberculosis pulmonar y de los individuos sanos incluido como grupo control.

Tabla 8. Resultados del estudio de citometría de flujo de las células mononucleares de sangre periférica de 23 pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y el grupo control

Marcador	Control		Tuberculosis	
	%	#	%	#
CD3	66±14	1600±531	56±24 ^a	1263±774 ^a
CD3/CD4	39±8	948±347	24±10 ^c	521±225 ^c
CD3/CD8	22±8	520±217	14±7 ^b	286±171 ^b
CD4/CD45RA	45±83	183±157	32±20	206±160
CD8/CD45RA	61±28	330±181	58±26	265±219
CD4/CD45RO	52±18	486±152	73±18 ^b	345±165
CD8/CD45RO	47±18	244±140	45±24	153±124 ^a
CD4/CD95	43±30	425±335	54±35	298±233
CD8/CD95	49±26	280±197	40±38	155±183
CD4/CD27	42±39	401±415	50±40	275±246
CD8/CD27	32±31	154±154	29±31	81±86
CD4/CD30	1±2	8±14	6±8 ^a	28±44
CD8/CD30	0.3±1	1±5	5±8 ^a	15±25
CD4/CD30L	6±4	60±35	23±27	98±79
CD8/CD30L	3±4	17±26	13±10 ^a	60±78
CD4/CD40	2±2	14±19	19±16	106±118
CD8/CD40	9±14	58±87	10±12	27±35
CD4/CD40L	4±4	32±36	11±10	30±21
CD8/CD40L	4±10	21±56	12±20	56±85
CD4/CD28	93±8	885±258	48±40 ^b	268±255 ^c
CD8/CD28	51±9	325±85	24±28 ^b	63±67 ^c

Se presenta la media ± desviación estándar de los números absolutos y el porcentaje de las subpoblaciones celulares de pacientes con tuberculosis pulmonar activa, así como de los individuos sanos del grupo control.

- ^a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- ^b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- ^c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

VIII-10. Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de linaje linfocitario

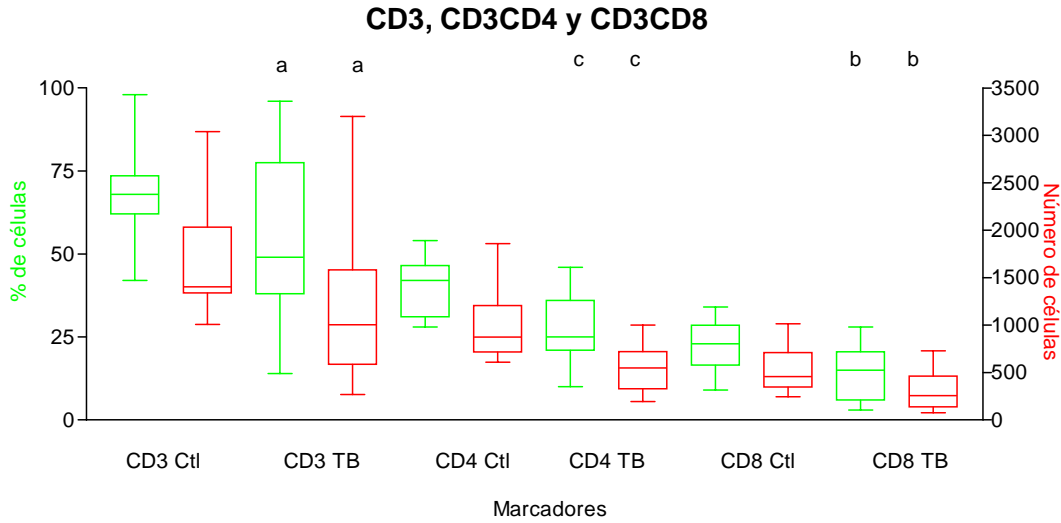


Figura 6. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control y TB es el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

- a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

Con respecto a los marcadores de linaje linfocitario y como se observa en la Figura 6, el análisis mostró que el porcentaje (56 ± 24) y el número absoluto (1263 ± 774) de los linfocitos T CD3+ de los pacientes tuberculosos están disminuidos significativamente ($p < 0.05$) en relación al grupo control (66 ± 14 y 1600 ± 531 , respectivamente). Así mismo, se observó que los linfocitos T CD4+ y CD8+ disminuyeron marcadamente ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente), tanto en proporción (24 ± 10 y 14 ± 7 , respectivamente) como en números absolutos (521 ± 225 y 286 ± 171 , respectivamente), en relación al grupo control (39 ± 8 y 22 ± 8 proporción y 948 ± 347 y 520 ± 217 números absolutos, respectivamente).

VIII-11. Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de activación.

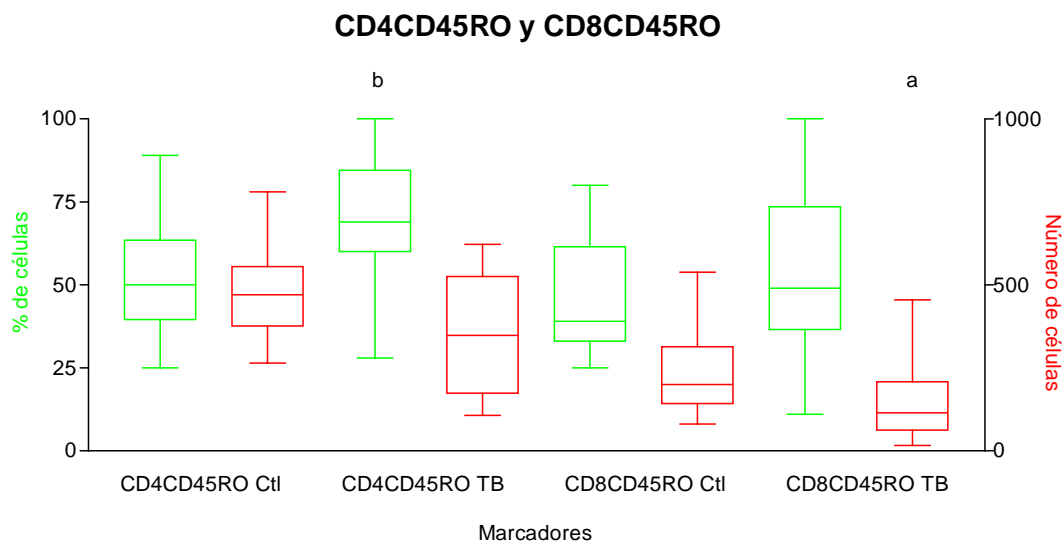


Figura 7. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control y TB es el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

- a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)

Como se observa en la Figura 7, la subpoblación que expresa el marcador de activación/memoria CD45RO se observa incrementada significativamente en el porcentaje ($p < 0.01$, 73 ± 18) de las células CD4+ y en el número absoluto ($p < 0.05$, 153 ± 124) de las células CD8+ en relación al grupo control (52 ± 18 y 244 ± 140 , respectivamente). El marcador de células vírgenes, CD45RA no estuvo alterado.

VIII-12. Pacientes con tuberculosis. Análisis por citometría de flujo. Moléculas de coestimulación.

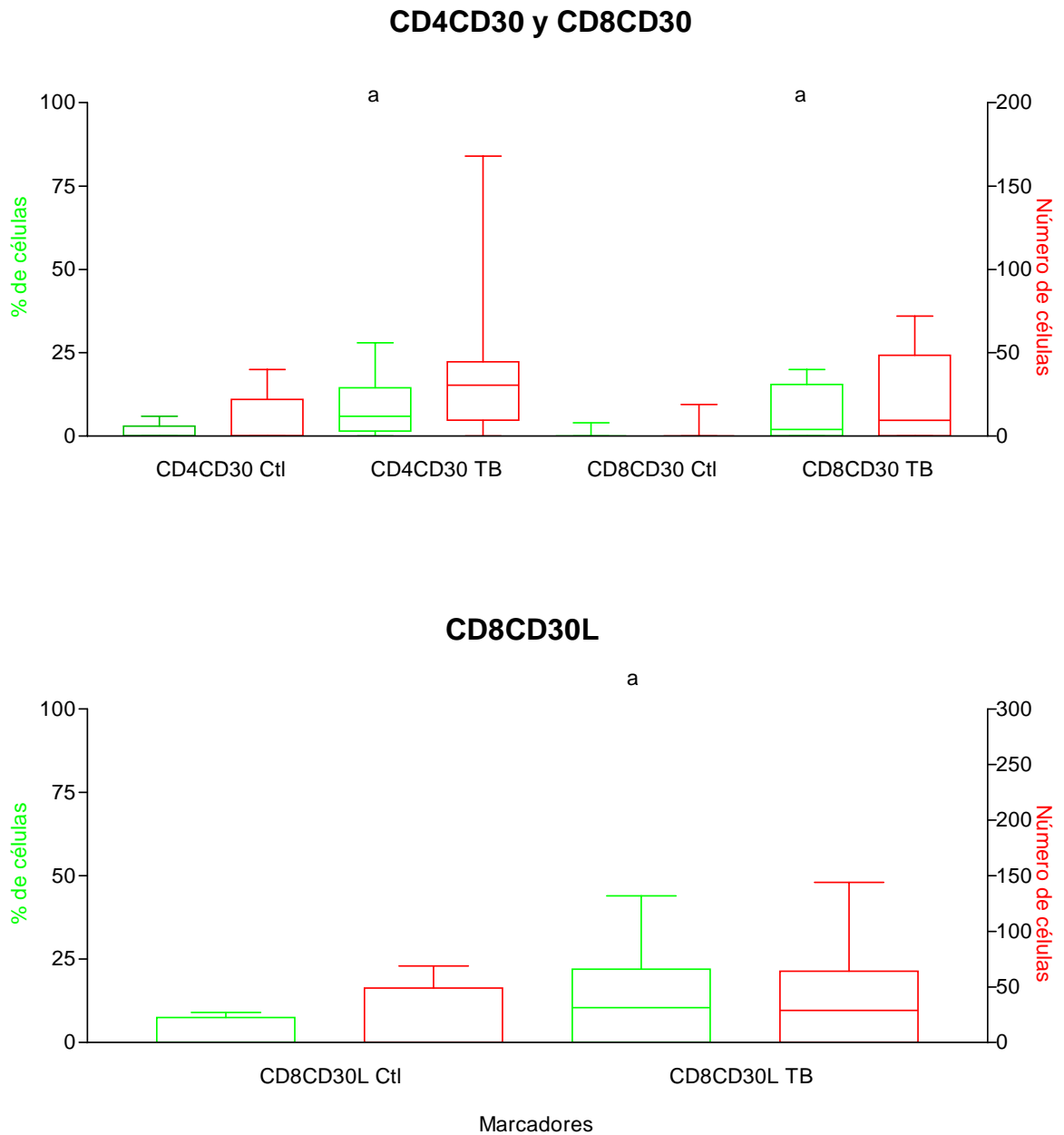


Figura 8. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control y TB es el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)

En este grupo se analizaron también las moléculas de coestimulación CD30, CD30L, CD27, CD40L, CD40, y CD28. Con respecto al receptor CD30 y su ligando CD30L ampliamente relacionados con coestimulación y reconocidos como marcador de la subpoblación Th2, así como participantes en la activación de la apoptosis, observamos que en la subpoblación CD4+, la molécula CD30 sufre un incremento en el porcentaje, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$; 6 ± 8) con relación al grupo control (1 ± 2). En la subpoblación CD8+, el comportamiento fue igual con un incremento en porcentaje que fue significativo ($p < 0.05$; 5 ± 8) comparado con el grupo control (0.3 ± 1). La subpoblación CD8CD30L mostró un incremento en la proporción (13 ± 10), alcanzando una significancia estadística ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (3 ± 4). La molécula CD30L no estuvo alterada en la subpoblación CD4+.

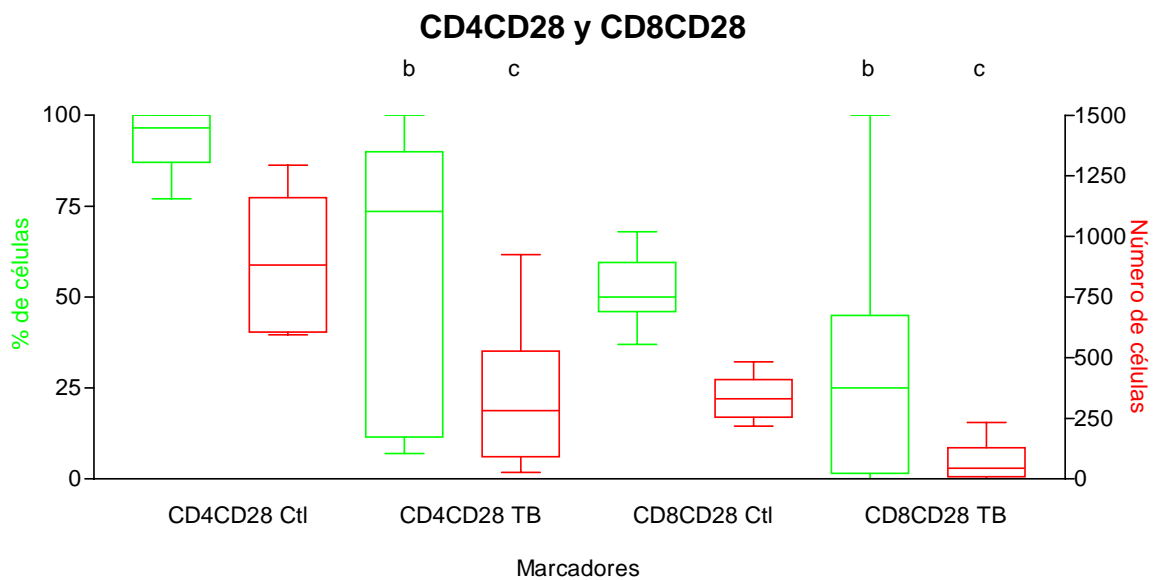


Figura 9. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control y TB es el grupo de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

Finalmente, se analizó la expresión de la molécula CD28, que como se ha descrito anteriormente, libera señales coestimuladoras fundamentales en la activación del linfocito T. Nuestras observaciones indican que en la subpoblación CD4+/CD28+ de los pacientes con TB, hubo una disminución altamente significativa tanto en porcentaje ($p < 0.01$, 48 ± 40), como en números absolutos ($p < 0.001$, 268 ± 255), en relación al grupo control (93 ± 8 y 885 ± 258 , respectivamente). El comportamiento de la subpoblación CD8+/CD28+ fue similar, con una diferencia altamente significativa en porcentaje ($p < 0.01$, 24 ± 28), como en números absolutos ($p < 0.001$, 63 ± 67), en relación al grupo control (51 ± 9 y 325 ± 85 , respectivamente).

VIII-13. Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Datos clínicos y de laboratorio.

En este grupo de pacientes se estudiaron a dos mujeres (22.2 %) y siete hombres (77.8 %). Mostraron un rango de edad en años de 22 a 56 y una media de 33.0 años. Los glóbulos blancos fluctuaron de 2350 a 5500 leucocitos/mm³ y una media de 3850.2 leucocitos/mm³. Los linfocitos mostraron un rango de 11 a 44 % con una media de 31.1 %. Los monocitos se observaron de 0 a 9 % con una media de 2.8 %. Finalmente, los polimorfonucleares mostraron un rango de 47 a 74 % y una media de 59.1%.

En la Tabla 9 del apéndice 1 se muestran los datos clínicos y de laboratorio de este grupo.

VIII-14. Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo.

Los datos arrojados por la citometría de flujo fueron analizados estadísticamente y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. En esta tabla se incluyen, con propósitos comparativos, los resultados de los pacientes con SIDA sin TB, de los pacientes con TB sin SIDA y de un grupo control de individuos sanos apareado en cuanto a la edad.

Tabla 10. Resultado del estudio de citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB, SIDA, coinfectados con VIH-1/Mtb y el grupo control.

Marcador	Control		SIDA		VIH/Mtb		Tuberculosis	
	%	#	%	#	%	#	%	#
CD3	64±19	1518±566	47±24	20±417	55±24	11±582	53±22	1154±686
CD3/CD4	37±11	884±392	8±6 ^c	118±117 ^c	10±10 ^c	176±215 ^c	24 ±8 ^b	488±195 ^b
CD3/CD8	20±8	473±216	31±24	458±343	37±19	592±430	13±8	244±142
CD4/CD45RA	25±13	237±146	27±35	34±64 ^c	39±28	224±229 ^b	35±24	181±143
CD8/CD45RA	55±27	302±182	42±39	193±247	27±17	183±152	48±21	192±170
CD4/CD45RO	59±19	463±145	59±25	70±67 ^c	66±20	139±167	66±18	311±167
CD8/CD45RO	47±26	273±174	39±28	267±216	36±12	224±229	60±27	168±137
CD4/CD95	37±26	410±349	58±25	59±57 ^b	72±38 ^a	99±133 ^a	59±39	316±267
CD8/CD95	42±26	251±181	36±36	190±245	48±39	443±436	45±36	169±183
CD4/CD27	37±36	400±449	26±29	23±28 ^a	38±30	66±102	57±43	293±240
CD8/CD27	32±31	146±138	25±29	66±67	13±13	104±128	33±33	92±100
CD4/CD30	1±2	9±12	3±8	2±6	0±0	0±0	4±4	20±19
CD8/CD30	6±22	16±55	1±2	7±14	0±0	0±0	7±8	17±23
CD4/CD30L	2±30	146±183	45±28	74±59	24±1	59±62	16±16	105±99
CD8/CD30L	26±39	110±160	27±45	19±26	4±5	27±38	13±8	32±21
CD4/CD40	6±10	40±67	3±7	4±8	10±19	18±31	18±10	94±79
CD8/CD40	13±21	66±89	2±4	14±28	6±6	37±56	13±15	33±37
CD4/CD40L	9±21	61±107	33±38	31±39	22±18	29±33	2±4	7±10
CD8/CD40L	10±25	38±64	22±37	58±156	2±3	18±34	7±9	14±14
CD4/CD28	69±30	676±378	16±29	47±49 ^c	54±39	136±232 ^c	59±42	337±313 ^a
CD8/CD28	53±21	302±110	16±29 ^b	58±90 ^b	11±16 ^c	111±201	28±26	77±79 ^b

Se presenta la media ± desviación estándar de los números absolutos y del porcentaje de las subpoblaciones celulares de 9 pacientes coinfectados, de 13 con SIDA sin TB, de 10 pacientes con Tb que fueron VIH-1 negativos y 21 individuos control.

^a.- Estadísticamente diferente del control (p<0.05)

^b.- Estadísticamente diferente del control (p<0.01)

^c.- Estadísticamente diferente del control (p<0.001)

En relación con el fenotipo de los linfocitos T de pacientes con SIDA solamente y solo con TB, se observaron diferencias tanto en la subpoblación CD4+ como en la CD8+. Los cambios estadísticamente significativos se dieron en la expresión de marcadores de linaje, activación, apoptosis y en la expresión de moléculas de coestimulación. Enseguida, estos cambios se presentarán gráficamente.

VIII-15. Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de linaje linfocitario.

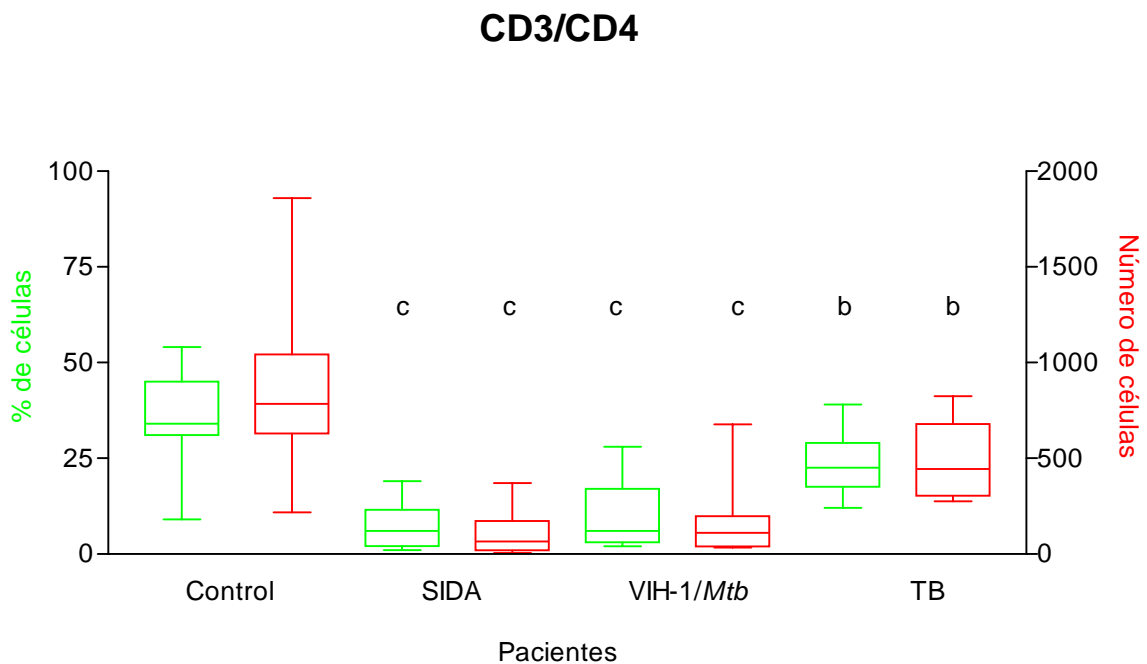


Figura 10. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control, SIDA y TB representan los grupos con dichas enfermedades y VIH-1/Mtb el grupo de pacientes coinfectados.

- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

No se detectaron diferencias significativas entre los grupos en la expresión de CD3. Como era de esperarse, en comparación con el porcentaje y el número absoluto del grupo control (37 ± 11 y 884 ± 392 respectivamente), la subpoblación CD3+/CD4+ de los pacientes con SIDA estuvo muy disminuida

($p < 0.001$), tanto en porcentaje (8 ± 6) como en el número absoluto (118 ± 117). En los pacientes coinfectados la caída de estas células fue semejante a la observada en SIDA ($p < 0.001$). En el grupo de pacientes con TB solamente, como ya se ha descrito líneas arriba, la disminución en el porcentaje y en el número de células fue menor ($p < 0.01$). También se observó un mayor porcentaje y número de células en comparación con los pacientes con SIDA, sin que esta diferencia alcanzara significancia estadística. No se observaron diferencias significativas entre los pacientes con SIDA, TB y coinfectados. Sin embargo hay que señalar que el número de células CD4+ mostró una tendencia al alza en los pacientes coinfectados (176 ± 215) en relación a los pacientes con SIDA (118 ± 117).

VIII-16. Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Marcadores de activación.

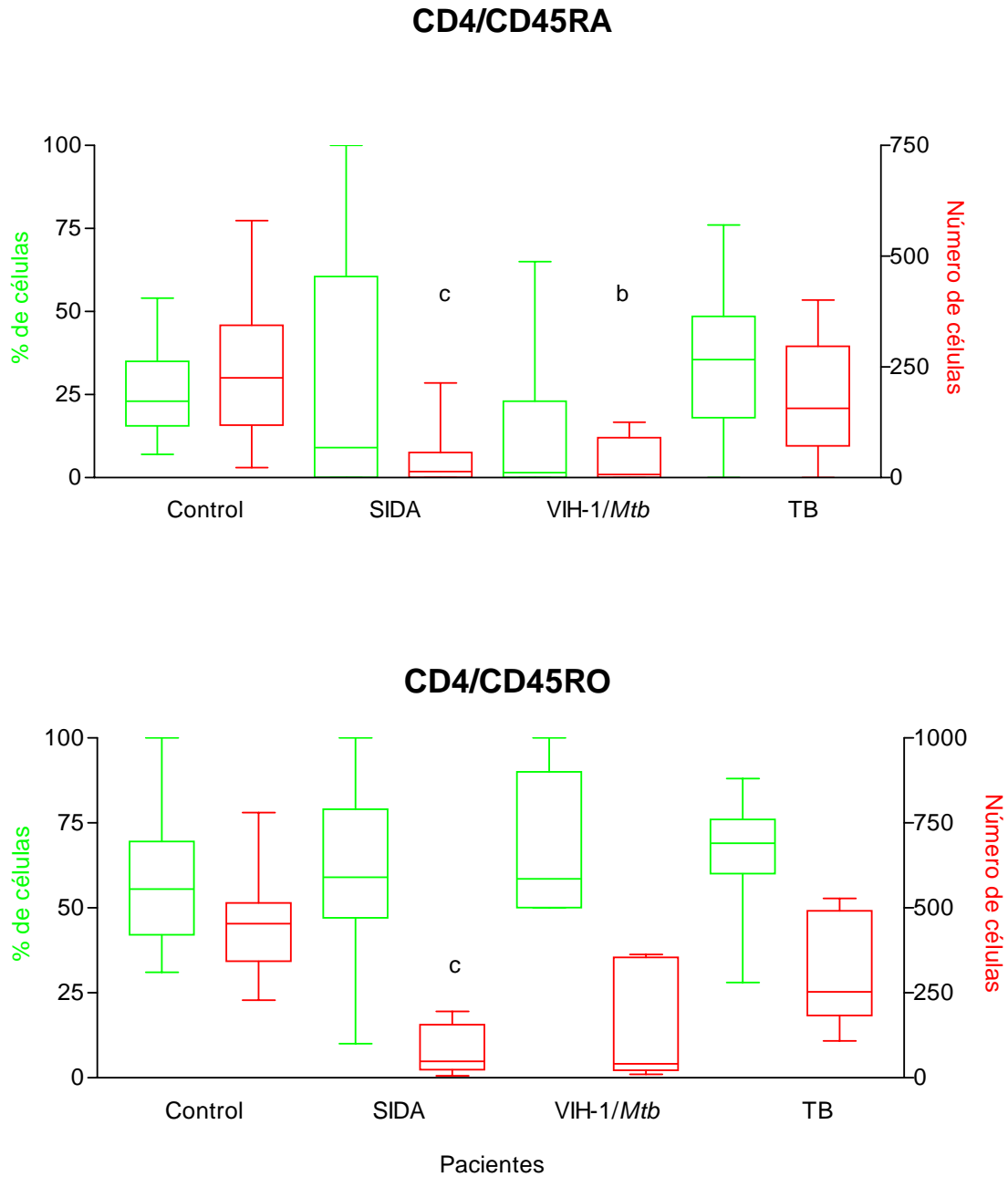


Figura 11. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control, SIDA y TB representan los grupos con dichas enfermedades y VIH-1/Mtb el grupo de pacientes coinfectados.

- a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

En comparación con el grupo control (237 ± 146), la subpoblación de células CD4+ que expresan el marcador CD45RA, que identifica células virgen, es decir que no han sido activadas por antígeno, estuvo muy disminuida en pacientes con SIDA (34 ± 64 , $p < 0.001$). Esta caída se observó en el número absoluto de células CD4+ (34 ± 64), pero no en el porcentaje, el cual fue semejante al del grupo control. En los pacientes coinfectados, el número de linfocitos CD4+/CD45RA+ estuvo también disminuido pero en menor grado ($p < 0.01$; 224 ± 229 células/mm³), sugiriendo un efecto de rescate de la infección micobacteriana añadida. En los pacientes con TB solamente, la expresión de CD45RA en células CD4+ estuvo dentro del rango del Grupo control.

En lo que respecta a la molécula de activación/memoria CD45RO, se observó que el número absoluto de células CD4+ que la expresaban estaba muy disminuido en el grupo de pacientes con SIDA (70 ± 67 ; $p < 0.001$) con respecto al Grupo control (463 ± 145); llamó la atención que la media del número absoluto de células del grupo de pacientes VIH-1/Mtb, es el doble del grupo con SIDA, lo que representa, sin llegar a los niveles del grupo control, una recuperación posiblemente relacionada con la activación crónica de los linfocitos por antígenos micobacterianos. Además, el número absoluto (311 ± 167) de los pacientes con TB fue mayor en comparación al grupo con SIDA (70 ± 67) sin ser estadísticamente significativo. La expresión de CD45RA y CD45RO en las células CD8+ estuvo dentro de los valores del grupo control en los 3 grupos de estudio

VIII-17. Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Marcador de apoptosis, CD95.

En vista de que en la infección por el VIH-1 se ha observado que la muerte por apoptosis contribuye a la caída en el número de linfocitos CD4+ (Katsikis *et al.*, 1995) y que la disminución en el número de linfocitos CD4+ en pacientes con TB se ha atribuido a apoptosis (Hirsch *et al.*, 2001), investigamos la expresión de la molécula proapoptótica CD95 en pacientes coinfectados.

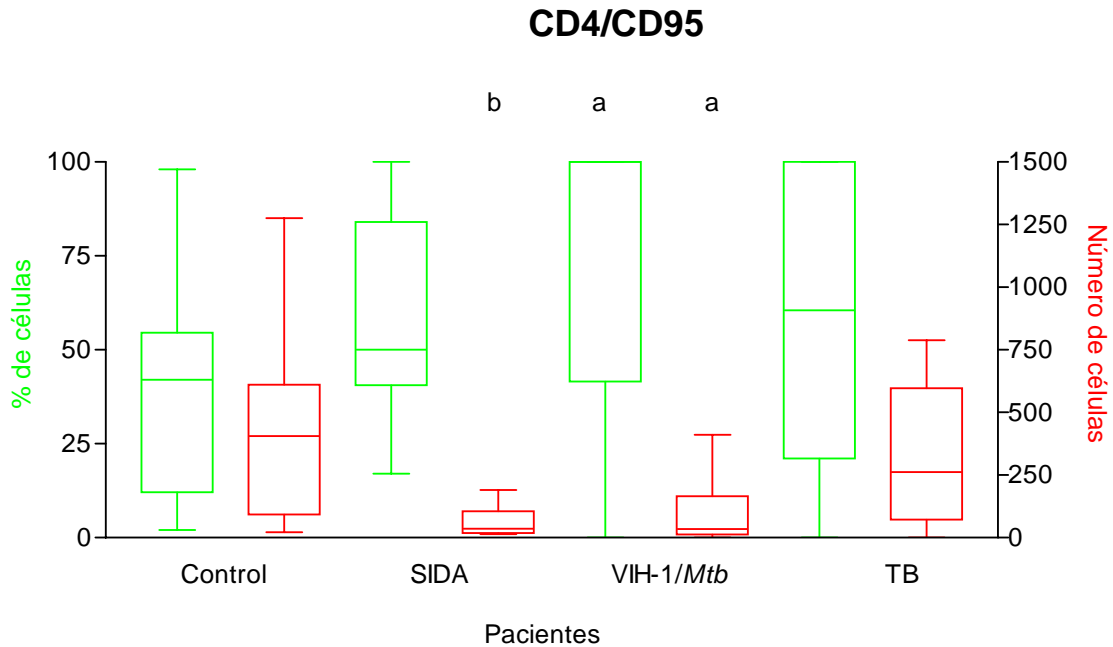


Figura 12. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control, SIDA y TB representan los grupos con dichas enfermedades y VIH-1/Mtb el grupo de pacientes coinfectados.

- a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)

Se observó que en pacientes con SIDA el porcentaje de linfocitos CD4+ con el marcador CD95 estaba dentro de los límites del grupo control, en cambio el número absoluto estaba disminuido (SIDA 59 ± 57 ; Control 410 ± 349 ; $p < 0.01$), probablemente reflejando la marcada disminución en las cuentas de células CD4+. En comparación con los controles, en los pacientes coinfectados, el número de células CD4+CD95+ estuvo disminuido (99 ± 133 ; $p < 0.05$) pero en menor grado que lo observado en SIDA. La proporción de estas células en los pacientes con SIDA (72 ± 38) estuvo incrementada ($p < 0.05$) en relación al grupo control (37 ± 26). La diferencia entre SIDA y coinfección no alcanzó significancia estadística. Al comparar los números de esta subpoblación en pacientes con TB contra pacientes con SIDA, estos últimos mostraron una disminución importante sin ser estadísticamente significativa. La expresión de CD95 en las células CD8+ en los 3 grupos de pacientes fue similar a la observada en el grupo control.

VIII-18. Pacientes coinfectados por VIH-1/Mtb. Análisis por citometría de flujo. Moléculas de coestimulación.

En vista de que en pacientes infectados por el VIH-1 se han reportado múltiples anomalías en la expresión de moléculas de coestimulación en linfocitos T (De *et al.*, 2002; Pizzolo *et al.*, 1994; Choremi-Papadopoulou *et al.*, 1994), en este trabajo analizamos la expresión de CD27, CD28, CD30, CD30L, CD40 y CD40L.

Los hallazgos del estudio de citometría de flujo se muestran en la Tabla 10 y en las Figuras 13 y 14

CD4/CD27

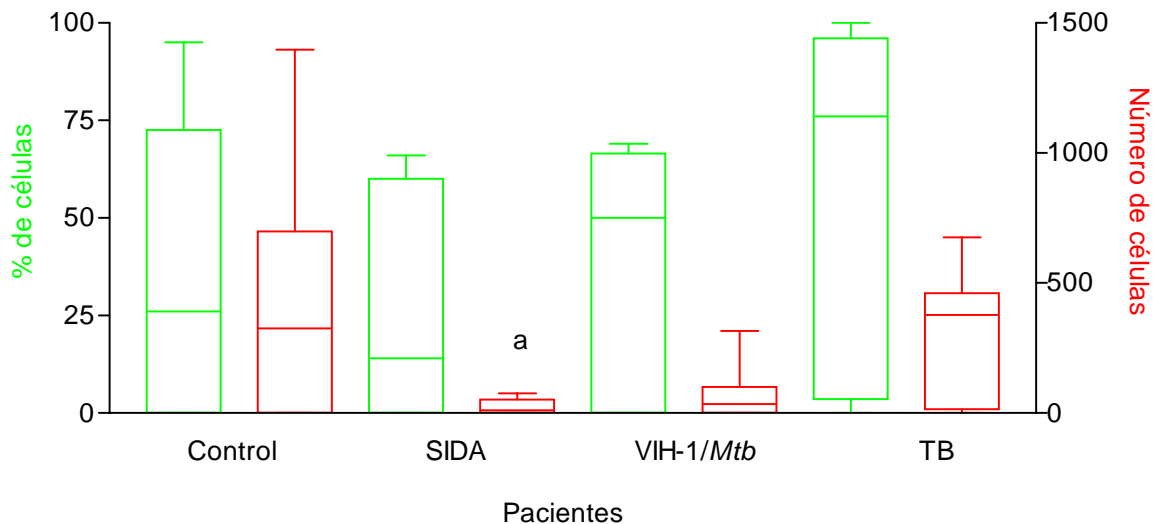


Figura 13. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control, SIDA y TB representan los grupos con dichas enfermedades y VIH-1/Mtb el grupo de pacientes coinfectados.

a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)

En comparación con el grupo control, en los pacientes con SIDA la expresión de CD27 en las células CD4+, estuvo disminuida de manera significativa en lo que concierne al número (SIDA 23 ± 28 ; grupo control 400 ± 449 ; $p < 0.05$) pero no en el porcentaje. Es de interés que en los pacientes

coinfectados, el número de células CD4+/CD27+ (66 ± 102) fue dos veces mayor que el de los pacientes con SIDA, aun cuando este aumento no fue significativo. La expresión de CD27 no estuvo alterada en pacientes con TB, sin embargo se observó que los pacientes con SIDA y al coinfección VIH-1/Mtb mostraron niveles disminuidos en el número de células en comparación a los pacientes con TB, sin que estas diferencias fueran estadísticamente significativas.

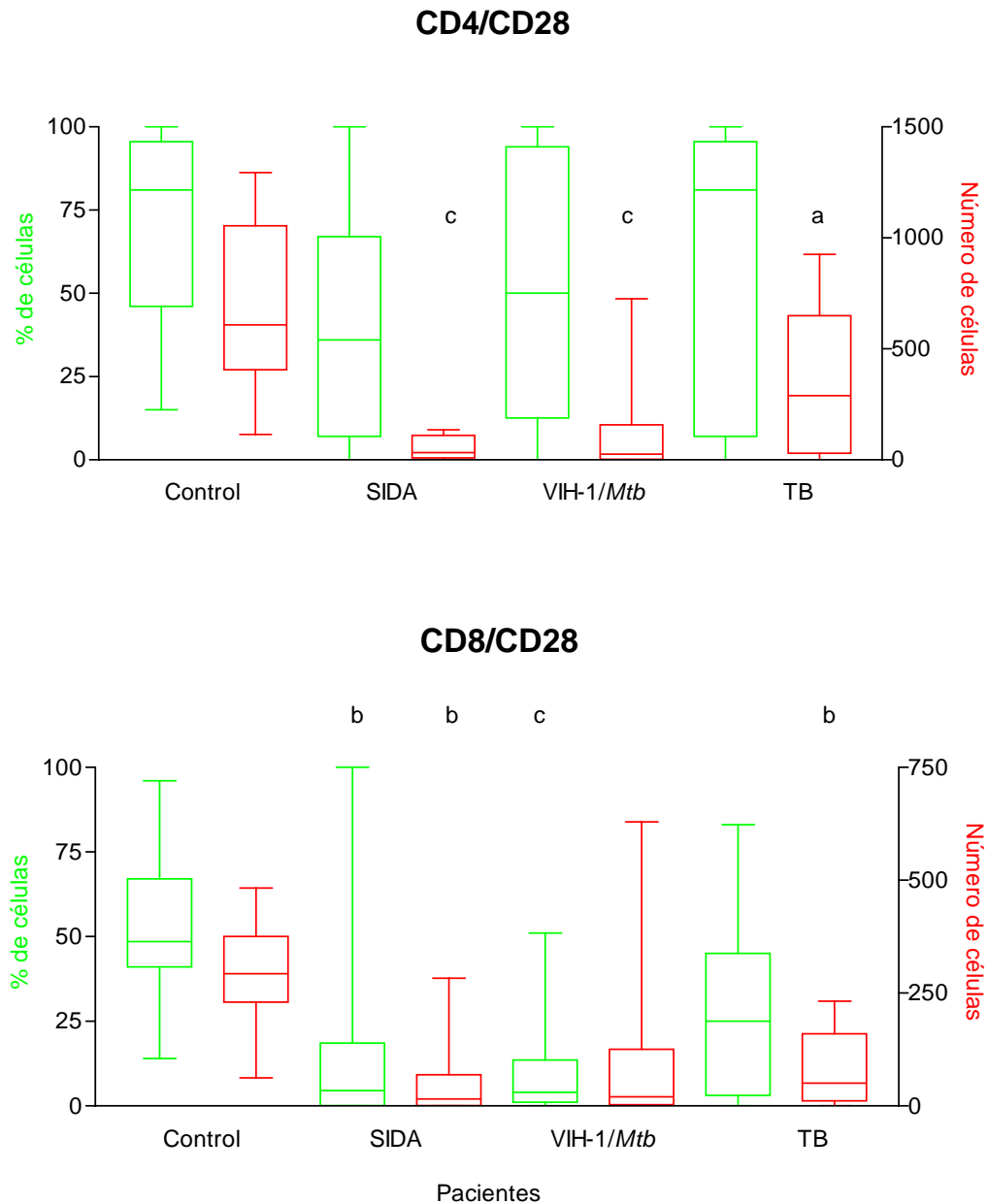


Figura 14. Se presenta la mediana, los percentiles 25 y 75, así como el valor superior e inferior de cada grupo del porcentaje y número absoluto de las subpoblaciones celulares. Ctl es el grupo control, SIDA y TB representan los

grupos con dichas enfermedades y VIH-1/Mtb el grupo de pacientes coinfectados.

- a.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.05$)
- b.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.01$)
- c.- Estadísticamente diferente del control ($p < 0.001$)

Finalmente, la expresión de la molécula CD28, que es fundamental en la coestimulación de las células T, se vio afectada en su expresión tanto en las células CD4+ como en las CD8+. La subpoblación CD4+/CD28+ disminuyó de manera muy significativa en el número ($p < 0.001$), tanto en pacientes con SIDA (47 ± 49), como en individuos con la coinfección VIH-1/Mtb (136 ± 232), esto con respecto al grupo control (676 ± 378). En los pacientes con TB, el decremento en el número de células fue menor (337 ± 313), siendo también significativo ($p < 0.05$). Llama la atención el incremento observado en estas células en el grupo VIH-1/Mtb en comparación con el de SIDA, a pesar de que no fue significativo. Este mismo efecto se observa al comparar el grupo TB con el de SIDA e igualmente no representó diferencia estadística significativa.

La subpoblación CD8+/CD28+ estuvo muy disminuida en proporción (16 ± 29) y en el número de células (58 ± 90) en pacientes con SIDA ($p < 0.01$); esta disminución fue más marcada ($p < 0.001$) en porcentaje en pacientes coinfectados (11 ± 16), estando el número absoluto dentro de los límites del grupo control (% 53 ± 21 ; número 302 ± 110). En los pacientes con TB hubo una caída significativa en el número de células CD8+/CD28+ (77 ± 79 ; $p < 0.01$).

IX. DISCUSIÓN

Después de más de 20 años la infección por el VIH-1 continúa siendo un problema muy grave y por su parte la TB permanece entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Este cuadro se ha ensombrecido aún más por la asociación frecuente de estas dos infecciones, la cual ocurre con mayor frecuencia en las regiones menos desarrolladas del planeta y constituye un problema médico de muy difícil manejo y de pronóstico muy pobre.(Corbett *et al.*, 2003).

El objetivo principal de este estudio fue determinar si la TB oportunista afectaba de alguna manera el fenotipo de los linfocitos del paciente infectado por el VIH-1. Esto se consideró posible porque en la respuesta a micobacterias los linfocitos T son los principales protagonistas y los pacientes con TB presentan con frecuencia, al igual que el paciente con el VIH-1, depresión de la respuesta inmune mediada por linfocitos T (Delgado *et al.*, 2002; Flynn and Chan, 2001). Se consideró posible identificar cambios que pudieran estar relacionados con el curso más severo de la infección con el VIH-1 cuando se asocia con una infección micobacteriana. Esto necesariamente implicó estudiar en nuestro medio el fenotipo de los linfocitos T de pacientes con TB pulmonar y de pacientes infectados únicamente por el VIH-1. El fenotipo de un linfocito sea B o T está determinado por moléculas de superficie las que en muchos casos determinan una función o característica particular. Estas moléculas, frecuentemente glicoproteínas, se reconocen con las letras CD (cluster of differentiation antigens) seguidas de un número progresivo. En la actualidad en las células del sistema inmune se reconocen 350 CDs, muchos de ellos de función desconocida (Zola *et al.*, 2007). Durante las últimas décadas el uso de la citometría de flujo ha hecho posible grandes avances en el estudio de los marcadores o CDs de linfocitos, sobretodo de sangre periférica, tanto en condiciones de normalidad como en estados patológicos (Baumgarth and Roederer, 2000). Sin duda es el SIDA la enfermedad que ha sido estudiada con mayor intensidad de esta manera, ya que en base al monitoreo periódico de las células T CD4+, se establecen las estrategias terapéuticas y se determina el curso y pronóstico de esta infección.

En este estudio investigamos la expresión de algunos marcadores de linfocitos T que se asocian a linaje linfocitario, activación celular, memoria inmunológica, apoptosis y coestimulación, los que consideramos podrían dar información útil. Enseguida discutiremos los hallazgos de interés hechos en los pacientes infectados únicamente por el VIH-1, en pacientes solo con TB pulmonar y finalmente discutiremos los hallazgos de citometría de flujo hechos en individuos con la coinfección VIH-1/Mtb.

IX-1. El fenotipo de los linfocitos de pacientes con VIH-1

La principal característica de la infección por el VIH-1, es la disminución progresiva e inexorable de los linfocitos T CD4+ (Fahey *et al.*, 1984); en forma concomitante se observa un incremento de los linfocitos T CD8+. Esto mantiene a los linfocitos T totales dentro de límites considerados normales, hasta que la progresión de la enfermedad lleva a una disminución de ambos tipos celulares lo que resulta en una caída de las células T CD3+. Como era de esperarse, en este estudio observamos una disminución altamente significativa de células T CD4+ en pacientes con SIDA, reflejada tanto en la proporción como en el número absoluto de células. Así mismo, se observó un incremento compensatorio de los linfocitos T CD8+ en las etapas tempranas de la infección, que desapareció en la fase del SIDA. La importancia de la pérdida de las células CD4+ en el desarrollo del SIDA es incuestionable, pues se correlaciona con la pérdida de capacidades inmunes y la ocurrencia de infecciones oportunistas y de neoplasias (Fahey *et al.*, 1984). Los mecanismos por los cuales el VIH-1 elimina a los linfocitos CD4+ no han sido totalmente dilucidados. Se han propuesto varios mecanismos (Ji *et al.*, 2007). Inicialmente se consideró que la célula infectada moría como consecuencia de la carga viral, es decir, por un efecto citopático. Esta hipótesis ha sido cuestionada y se ha sugerido que la pérdida de linfocitos CD4+ ocurre principalmente en los tejidos linfoides del tracto gastrointestinal, sobretodo en la lamina propia y que se debe principalmente a muerte por apoptosis, que afecta más que a las células infectadas, a linfocitos T no infectados (Brenchley *et al.*, 2004). La apoptosis en la infección por el VIH-1 participa la vía CD95/CD95L (Ji *et al.*, 2007).

Al igual que lo reportado en la literatura (Ullum *et al.*, 1997), en nuestros pacientes infectados por el VIH-1 se observó una disminución de las células CD4+ que expresan los marcadores CD45RA (células vírgenes) y CD45RO (activación/memoria). La disminución en las células vírgenes es muy probablemente consecuencia de la intensa activación celular que ocurre en la infección viral (Jones *et al.*, 2006). Con respecto a la molécula de memoria/activación CD45RO, su expresión en células CD4+ estaba disminuida, lo que podría deberse a la disminución del número total de células CD4+. En contraste, las células CD8+/CD45RO+ se encontraron aumentadas en las fases iniciales de la infección por el VIH-1; lo anterior podría deberse a que el número total de linfocitos T CD8+ está incrementado en esas etapas de la infección viral (Roman *et al.*, 2002).

En vista de que la apoptosis se considera en la actualidad un mecanismo importante en la pérdida de células CD4+, analizamos la expresión de CD95, un receptor de muerte celular que se activa cuando es ligado por CD95L (Nagata and Golstein, 1995). A diferencia de lo reportado sobre expresión de CD95 en linfocitos CD4+ de pacientes infectados por el VIH-1 (Silvestris *et al.*, 1996), en nuestros casos observamos que el número y el porcentaje de células CD4+ que expresaron este marcador estaban disminuidas, lo cual podría reflejar simplemente la pérdida de las células CD4+ y no una disminución en su expresión.

Además de la disminución en el número de linfocitos T, el VIH-1 genera defectos en la respuesta inmune celular como son una respuesta blástica disminuida o ausente de las células T CD4+, respuesta ineficiente de las células T CD8+ y trastornos en las células presentadoras de antígeno (Nilsson *et al.*, 2006). Se ha reportado que la pérdida de la respuesta inmune mediada por células T en SIDA, se debe en parte a maduración deficiente de las células CD8+ específicas del VIH-1, que frecuentemente expresan CD27 pero no perforina, sugiriendo un bloqueo en su diferenciación a células efectoras (Appay *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2002). La infección de las células T CD4+ por el VIH-1 requiere de su activación (Korin and Zack, 1998), en la que son fundamentales las moléculas de coestimulación, las que investigamos en este estudio. Una de ellas, quizá la más importante, es CD28 la que al interactuar con su ligando (CD80, CD86), incrementa la replicación del VIH-1 (Smithgall *et*

al., 1995). En este estudio, el número y la proporción de la subpoblación CD4+/CD28+ en el paciente con SIDA estaba muy disminuida lo que concuerda con lo reportado (Borthwick *et al.*, 1994). La subpoblación CD8+/CD28+ estaba también disminuida, aunque en menor grado que la observada en las células CD4+/CD28+. Este cambio es potencialmente significativo pues los linfocitos T citotóxicos CD8+ están involucrados en el control de la enfermedad sobretodo en la fase asintomática (Goulder *et al.*, 1997). Caruso y col. observaron un incremento en la subpoblación de células T CD8+/CD28- con una disminución concomitante de las CD8+/CD28+ y CD4+/CD28+ lo que se atribuyó a efectos citotóxicos de los linfocitos T CD8+/CD28- (Caruso *et al.*, 1994). Por otra parte se ha demostrado, que la disminución en la expresión de CD28 refleja una diferenciación terminal y acortamiento de telómeros, lo que es propio de células seniles. La disminución de la subpoblación CD8+/CD28+ observada en este estudio confirma previos estudios y sugiere que la expresión disminuida de esta molécula coestimuladora podría contribuir a los defectos proliferativos de las células CD4+ y CD8+ observados en los individuos infectados por el VIH-1.

IX-2. El fenotipo de los linfocitos de pacientes con TB pulmonar

En la respuesta inmune en contra del bacilo de la tuberculosis los linfocitos T juegan un papel preponderante tanto por sus actividades efectoras como reguladoras (Flynn and Chan, 2001). Por lo anterior consideramos importante analizar los linfocitos T de sangre periférica de pacientes con TB pulmonar activa. El primer paso para que ocurra la activación y diferenciación del linfocito T es el reconocimiento del antígeno a través del receptor para antígeno (TCR), que le es presentado por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígeno (Flynn and Chan, 2001). La ausencia de este fenómeno resulta en anergia, un estado de no-respuesta a estímulos antigénicos por parte de los linfocitos T (Schwartz, 2003). Ya que los individuos con TB avanzada generalmente son anérgicos a la prueba del PPD, en este estudio nos propusimos investigar si la expresión de diversas moléculas de linaje linfocitario, activación, coestimulación y apoptosis sobre las células CD4+ y CD8+, se veía afectada por la TB pulmonar activa. Un hallazgo relevante fue la marcada linfopenia de células T CD4+ y CD8+ observada en pacientes con TB pulmonar activa. La disminución de los linfocitos T CD4+ ya se ha reportado, mientras que la de los linfocitos T CD8+ ha sido raramente reconocida (Pilheu *et al.*, 1997). Hay estudios que sugieren que más que una disminución, hay un “secuestro” de dichos linfocitos en las lesiones tuberculosas (Tsao *et al.*, 2002). Se ha reportado que el decremento de los linfocitos T CD4+ es un indicador de mal pronóstico, ya que se asocia con pérdida de peso, niveles bajos de albúmina sérica, enfermedad severa y mortalidad alta (Pilheu *et al.*, 1997). En nuestro estudio, los pacientes con o sin linfopenia de células CD4+ o CD8+ siguieron un curso clínico similar, lo que coincide con lo observado en pacientes tuberculosos de África (Djomand *et al.*, 1994). Es interesante señalar que la intensidad de la linfopenia del paciente con TB fue semejante a la observada en pacientes con SIDA.

Además de la linfopenia, observamos un incremento en la expresión del marcador CD45RO (memoria/efector) en las células CD4+, esta observación concuerda con un estudio de citometría de flujo de células recuperadas de pulmones de pacientes por lavado broncoalveolar, que reveló que la gran mayoría de células T CD4+ eran CD45RO+ (Urdaneta *et al.*, 1998). Con respecto a las moléculas de coestimulación, observamos un incremento en la

expresión de CD30 tanto en las células CD4+ como CD8+. Esta expresión fue más alta en los pacientes con un historial de recaída, un tipo de enfermedad tuberculosa más severa, frecuentemente asociada con la falta en el cumplimiento del tratamiento y con cepas resistentes a múltiples medicamentos antifímicos (Murray *et al.*, 1999). Nuestras observaciones van de acuerdo con estudios *in vitro* que muestran que Mtb es un potente inductor de la expresión de CD30 en células T estimuladas con antígenos mycobacterianos (Munk *et al.*, 1997). Además se ha observado un número alto de células T CD30+ en granulomas pulmonares y pleuritis tuberculosa humana (Munk *et al.*, 1997). También se ha documentado el incremento de los niveles de CD30 soluble en sueros de pacientes con TB (Lienhardt *et al.*, 2002).

El papel de las moléculas coestimuladoras CD28/B7 y CD40/CD40L en la TB ha sido poco estudiado. En este estudio no observamos anomalías en la expresión de CD40/CD40L pero sí de CD28. En lo que concierne a CD40L se ha reportado una disminución en pacientes con TB avanzada, aquí no encontramos cambios en CD40/CD40L. Estudios sobre esta vía de coestimulación en TB han arrojado resultados variables. Pacientes con TB avanzada mostraron una expresión disminuida de CD40L después de la estimulación *in vitro* con antígenos micobacterianos (Samten *et al.*, 2000) y ratones infectados con *M. avium* tratados con anticuerpos anti-CD40L desarrollan un aumento en la carga bacilar (Hayashi *et al.*, 1999).

Un hallazgo importante de este trabajo fue el marcado decremento en la expresión de CD28 tanto en las células T CD4+ como en las CD8+ en pacientes con TB activa. A la fecha hay pocos estudios sobre la expresión de CD28 en TB aún cuando se ha reportado disminución de las células T CD8+/CD28+ (Ponticello *et al.*, 2001). La reducción importante de los linfocitos T CD8+/CD28+ observada en este estudio es muy interesante y novedosa por la importancia creciente que han adquirido los linfocitos T CD8+ en la respuesta inmune en contra de Mtb (Flynn and Chan, 2001; Lazarevic and Flynn, 2002). El papel de CD28 en la activación de las células T CD8+ es controversial; se ha documentado una estricta dependencia (Chai *et al.*, 1999), mientras que en otros estudios la activación procede de forma normal en la ausencia de coestimulación vía CD28 (Wang *et al.*, 2000). Las células T CD8+/CD28- difieren de la CD8+/CD28+ en su gran capacidad citotóxica,

elevada producción de IFN- γ y una tendencia incrementada hacia la apoptosis (Vingerhoets *et al.*, 1995).

La expresión de CD28 en células T CD4+ de pacientes con TB ha sido poco estudiada. La interacción de CD28 con su ligando B7 es crucial en la activación del linfocito T regulándose positivamente la expresión del IL-2R y el factor de sobrevivencia bcl-xL (Schwartz, 2003). La activación a través del TCR en ausencia de CD28 resulta en anergia (Sharpe and Freeman, 2002; Schwartz, 2003). En resumen, en este estudio descriptivo de citometría de flujo, observamos la expresión alterada de moléculas de coestimulación en células T de pacientes con TB pulmonar activa que junto con otras anomalías fenotípicas, particularmente la disminución de los linfocitos T CD4+, podría ser la causa de la inadecuada respuesta inmune celular de los pacientes con TB avanzada.

IX-3. El fenotipo de los linfocitos de pacientes con la coinfección VIH-1/Mtb.

Las consecuencias de la TB oportunista en el curso clínico y resultado de la infección por el VIH-1 han sido muy estudiadas (Corbett *et al.*, 2003; Flynn and Chan, 2001; Lazarevic and Flynn, 2002). En contraste, hay muy poca información acerca del impacto de la coinfección en el fenotipo de los linfocitos T. Contrario a lo que esperábamos, la TB oportunista no disminuyó las cuentas de células CD4+ del paciente coinfectado, a pesar de que dos condiciones caracterizadas por la pérdida de dichas células convergen en el individuo coinfectado. En el individuo con el VIH-1, la disminución de las células T CD4+ es progresiva y severa y predice un mal pronóstico. En la TB, la linfopenia de células CD4+ es menos frecuente y severa, no siempre se asocia con un mal pronóstico y puede ser corregida con quimioterapia antituberculosa (Corbett *et al.*, 2003; Flynn and Chan, 2001; Lazarevic and Flynn, 2002; Pilheu *et al.*, 1997). En este estudio hicimos observaciones que sugieren un efecto de rescate por parte de la infección micobacteriana en los pacientes VIH-1+. Estas observaciones que deben ser confirmadas en estudios con un número mayor de pacientes, son las siguientes. En comparación con los pacientes con SIDA sin TB, en el paciente coinfectado la linfopenia de células CD3+ se atenuó, lo que podría ser relevante, pues la pérdida de las células T CD3+ se asocia al desarrollo del SIDA independientemente del número de células T CD4+ (Margolick *et al.*, 1998).

Las células T CD4+ que expresan en su superficie las isoformas CD45RA y CD45RO son los principales blancos en la infección con el VIH-1 (Jaleco *et al.*, 1994). El marcador CD45RA caracteriza a las células vírgenes que se diferencian en CD45RO como células de memoria después de la activación antigénica (de Jong *et al.*, 1991). En este trabajo encontramos que la disminución en la expresión de CD45RA y CD45RO en las células CD4+ fue parcialmente revertida en pacientes coinfectados sugiriendo, una vez más, un efecto de rescate de significancia desconocida. Un efecto similar aunque menos notable fue observado en la expresión disminuida de CD27 y CD95 en las células CD4+. El último es un dato interesante porque la infección con el VIH-1 se sabe incrementa la expresión del marcador CD95 sobre las células T,

lo que se asocia con muerte celular por apoptosis y disminución en las cuentas de linfocitos T CD4+ de sangre periférica (Bohler *et al.*, 1999).

Con relación a las moléculas de coestimulación, la subpoblación CD8+/CD30L+ en pacientes coinfectados mostró una tendencia a la disminución tanto en número como en porcentaje, a diferencia del grupo con SIDA, donde solo se observó disminución en los números absolutos. Estudiamos también las moléculas CD40 y CD40 ligando (CD40L), relacionadas con activación y coestimulación celular. Los resultados mostraron una tendencia a la disminución del marcador CD40 en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ en pacientes con SIDA. Esta disminución fue menor en los pacientes coinfectados. En la subpoblación CD4+, CD40L mostró una tendencia al incremento en porcentaje, en pacientes con SIDA y coinfectados con el VIH-1/Mtb, mientras que en los números absolutos, se observó una tendencia a la disminución, en los mismos dos grupos de pacientes. Con respecto a la subpoblación CD8+, CD40L, mostró una tendencia a la disminución en pacientes coinfectados. Estos hallazgos sugieren que la coinfección VIH-1/Mtb altera la expresión de estas moléculas de coestimulación.

La interacción de CD28 con su ligando B7 juega un papel crucial en la activación de los linfocitos T (Sharpe and Freeman, 2002). En la infección por el VIH-1, CD28 juega un papel tanto positivo como negativo, pues la activación de las células T CD4+ a través del TCR y CD28 promueve la transcripción viral (Barker *et al.*, 1998), mientras que la coestimulación por CD28 puede inhibir también la infección por el VIH-1 al regular negativamente la expresión de receptores de quimiocinas (Carroll *et al.*, 1997).

La disminución en la expresión de la molécula CD28 en células T tanto CD4+ como CD8+ ha sido observada en la infección con el VIH-1 (Choremi-Papadopoulou *et al.*, 1994;Choremi-Papadopoulou *et al.*, 2000). En TB se ha reportado la disminución de la subpoblación CD8+/CD28+ en pacientes con TB (Ponticiello *et al.*, 2001). En nuestro estudio observamos que los pacientes con TB presentan disminución severa en la expresión de CD28 en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ y de CD28 sobre las células CD4+ de pacientes con SIDA. La subpoblación CD8+/CD28+ estuvo disminuida de manera similar

en todos los grupos de pacientes. Actualmente, los efectos de la pérdida de la subpoblación CD8+/CD28+ en el curso de la infección por el VIH-1 son desconocidos, sin embargo, esta disminución se ha relacionado con la repetida estimulación antigénica (Borthwick *et al.*, 1994), lo que ocurre en SIDA y TB.

En resumen, en este estudio encontramos que el fenotipo de las células T de pacientes con SIDA se altera por la infección adicional de *M. tuberculosis*, incluyendo efectos positivos y negativos sobre las células de sangre periférica. Es necesario generar un estudio de seguimiento prospectivo para determinar si estos cambios influyen en el curso y resultado de la enfermedad de los pacientes coinfectados. Podemos especular que el aumento en la expresión del marcador proapoptótico CD95 sobre las células CD4+ y la disminución de la expresión de la principal molécula coestimuladora CD28 sobre las células CD8+, relacionadas a la infección adicional de Mtb podrían comprometer aún más la función de los linfocitos T en el paciente infectado por el VIH-1.

X. CONCLUSIONES

- Las infecciones por el VIH-1 y *M. tuberculosis*, de manera individual y en la coinfección alteran de manera muy importante a los linfocitos T sobretodo al CD4+.
- En la infección por el VIH-1, por *M. tuberculosis* y en la coinfección hay linfopenia severa de células T CD4+, que es semejante en magnitud en las 3 condiciones.
- La linfopenia de las células T CD8+ se observó únicamente en la TB.
- Se observó incremento de las moléculas coestimuladoras CD30/CD30L en la TB, lo que puede asociarse a predominancia de un patrón de producción de citocinas de tipo Th2.
- El hallazgo principal de este estudio fue la disminución en la expresión de la molécula coestimuladora CD28 en las células CD4+ y CD8+ de pacientes infectados con el VIH-1, *M. tuberculosis* y la coinfección del VIH-1/Mtb.

XI. APÉNDICE 1

Tabla 1. Datos clínicos y de laboratorio de los individuos control.

Control	Edad (años)	Sexo	GB (mm ³)	Linfos (%)	MØ (%)	PMN (%)
01	31	M	9750	20	0	80
02	39	F	4750	39	1	60
03	22	F	8000	39	0	61
04	21	F	3300	44	0	56
05	21	F	5800	48	2	49
06	23	M	5900	38	1	60
07	22	F	5300	51	0	48
08	32	M	ND	ND	ND	ND
09	33	M	ND	ND	ND	ND
10	28	M	ND	ND	ND	ND
11	22	F	ND	ND	ND	ND
12	26	M	ND	ND	ND	ND
13	25	F	ND	ND	ND	ND
14	21	F	ND	ND	ND	ND
15	34	F	4670	34	7	53
16	29	M	6200	29	6	58
17	68	M	6670	24	9	67
18	63	F	6550	28	5	67
19	56	F	5990	28	5	67
20	51	M	7879	23	6	71
21	64	M	5050	41	7	52
22	61	M	7760	32	7	61
23	81	M	5880	24	8	68
24	74	M	9900	22	10	68

Se muestran la distribución por edad y sexo y resultados de las biometrías hemáticas practicadas. GB, glóbulos blancos; Linfos, linfocitos; MØ, monocitos; PMN, polimorfonucleares; M, masculino; F, femenino, ND, no determinado.

Tabla 3. Grupo I (≥ 500 células T CD4+/mm³). Datos clínicos y biometría hemática

Paciente	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico (meses)	GB (mm ³)	Linfos (%)	MØ (%)	PMN (%)
01	24	M	72	5100	49	4	47
02	38	F	ND	2800	49	2	48
03	29	M	3	5400	41	0	58
04	26	M	ND	9250	35	4	58
05	30	F	6	5250	50	1	48
06	25	M	1	5800	35	4	61
07	34	M	3	8700	22	1	71
08	28	M	ND	6500	31	2	63
09	32	F	24	7700	50	2	46
10	35	M	ND	6950	46	2	52
11	34	F	12	6050	27	1	69
12	30	M	96	5950	50	3	47
13	39	M	62	8500	53	3	43
14	58	M	3	8600	56	2	42
15	28	M	ND	--	--	--	--
16	35	M	84	8400	22	2	76

Se muestran la distribución por edad y sexo y resultados de las biometrías hemáticas practicadas. GB, glóbulos blancos; Linfos, linfocitos; MØ, monocitos; PMN, polimorfonucleares; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado.

Tabla 4. Grupo II (499-200 células T CD4+/mm³). Datos clínicos y biometría hemática

Paciente	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico (meses)	GB (mm ³)	Linfos (%)	MØ (%)	PMN (%)
01	35	M	46	5000	38	1	58
02	39	M	12	3400	50	4	45
03	53	M	6	5600	31	0	69
04	22	M	ND	3800	27	1	71
05	31	M	24	2550	49	1	50
06	34	F	21	3300	49	1	50
07	30	M	24	5500	29	4	48
08	34	M	ND	4900	34	1	55
09	39	M	3	5100	32	4	64
10	55	F	ND	4250	44	2	53
11	37	M	24	8200	33	2	63
12	21	M	36	2750	82	5	12
13	37	M	30	9500	41	3	54
14	28	M	19	3500	55	4	39
15	26	F	5	3450	42	2	56
16	26	F	11	--	--	--	--
17	30	M	48	7100	21	5	74

Se muestran la distribución por edad y sexo, y resultados de las biometrías hemáticas practicadas. GB, glóbulos blancos; Linfos, linfocitos; MØ, monocitos; PMN, polimorfonucleares; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado.

Tabla 5. Grupo III (<200 células T CD4+/mm³). Datos clínicos y biometría hemática

Paciente	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico (meses)	GB (mm ³)	Linfos (%)	MØ (%)	PMN (%)
01	36	F	ND	3500	40	0	60
02	36	M	48	4050	31	0	69
03	51	M	ND	4500	22	2	76
04	ND	M	ND	3450	37	2	56
05	30	M	24	3250	49	2	48
06	30	M	72	8150	32	2	65
07	31	M	14	4050	40	4	54
08	29	M	24	2300	12	2	86
09	33	M	96	1500	42	5	53
10	41	M	96	8500	12	3	85
11	29	M	36	8000	18	4	78
12	31	M	48	1120	ND	ND	ND
13	28	F	ND	ND	ND	ND	ND

Se muestran la distribución por edad y sexo y resultados de las biometrías hemáticas practicadas. GB, glóbulos blancos; Linfos, linfocitos; MØ, monocitos; PMN, polimorfonucleares; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado.

Tabla 7. Pacientes con tuberculosis pulmonar activa. Datos clínicos y biometría hemática

Paciente	Edad (años)	Sexo	Recaída	Duración (meses)	Cepa	GB (mm ³)	Linfos (%)	MØ (%)	PMN (%)
01	39	F	-	12	R	5500	20	3	77
02	49	F	-	12	S	4800	30	3	67
03	49	M	✓	24	R	6900	28	1	71
04	44	M	✓	22	R	13700	23	2	75
05	47	M	-	10	S	5700	24	2	74
06	64	M	✓	63	R	6800	32	3	65
07	57	M	✓	16	S	4200	32	1	67
08	75	M	-	12	R	6700	22	1	77
09	78	M	-	22	R	6500	24	5	71
10	30	F	✓	36	R	7200	28	2	70
11	61	F	✓	55	R	8000	29	5	66
12	29	F	✓	12	R	10700	17	1	82
13	58	M	✓	12	R	5700	42	1	57
14	58	F	-	6	S	6400	30	1	69
15	68	F	-	4	S	4100	44	0	56
16	63	M	✓	36	R	6700	32	8	60
17	40	F	-	18	R	5700	34	17	49
18	71	M	✓	88	R	8500	25	6	69
19	54	F	-	60	R	5600	45	10	45
20	47	M	-	2	S	3600	34	5	61
21	74	M	✓	36	R	7100	33	16	51
22	66	F	-	9	ND	7200	28	2	70
23	46	M	-	12	R	6300	55	7	38

Se muestran la distribución por edad y sexo y los datos de laboratorio de cada paciente, donde se indica que pacientes tuvieron recaídas de la infección tuberculosa, duración de la enfermedad, cepa susceptible o resistente a los medicamentos antifímicos; GB, glóbulos blancos; Linfos linfocitos; MØ monocitos; PMN, polimorfonucleares; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado.

Tabla 9. Pacientes coinfectados con el VIH-1/Mtb

Paciente	Edad (años)	Sexo	Duración (meses)	Cepa Mtb	GB (mm ³)	Linfos (%)	MØ (%)	PMN (%)
01	36	M	ND	ND	3850	26	0	74
02	22	M	ND	ND	5500	42	2	55
03	34	M	21	R	4700	44	2	54
04	56	M	ND	ND	2350	38	3	59
05	51	M	ND	ND	3300	37	2	59
06	24	M	9	ND	3300	42	9	47
07	22	M	ND	ND	3950	11	ND	ND
08	25	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND
09	46	F	2	S	4800	28	2	70

Se muestran la distribución por edad y sexo y los datos de laboratorio de cada paciente, donde se indica duración de la enfermedad, cepa susceptible o resistente a los medicamentos antifímicos; GB, glóbulos blancos; Linfos, linfocitos; MØ, monocitos; PMN, polimorfonucleares; M, masculino; F, femenino; ND, no determinado.

XII. APENDICE II

Impact of Opportunistic *Mycobacterium tuberculosis* Infection on the Phenotype of Peripheral Blood T Cells of AIDS Patients

Germán Bernal-Fernández,¹ Carlos Hermida,⁴ Patricia Espinosa-Cueto,¹
Ana Cristina Cubilla-Tejeda,² Jesús Fidel Salazar-González,³ Librado Ortiz-Ortiz,¹
Rosario Leyva-Meza,¹ Hugo Diaz-Silvestre,¹ and Raul Mancilla^{1*}

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

²Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

³Divisions of Hematology and Oncology, Department of Medicine,
University of Alabama–Birmingham, Birmingham, Alabama

⁴Hospital de Enfermedades Infecciosas, Centro Médico La Raza,
Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

While the detrimental consequences of opportunistic tuberculosis (TB) in the course and outcome of HIV-1 infection are well studied, little information about the impact of the mycobacterial infection on the phenotype of T lymphocytes is available. In this study we analyzed by cytometry the peripheral blood T cell phenotype of 13 patients with AIDS, 23 HIV-1 negative patients with active pulmonary TB, nine HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* coinfecting individuals, and 21 age- and sex-matched healthy controls. CD4+ T cells were equally depleted in AIDS and coinfection ($P < 0.001$). The findings suggest a rescuing effect of the added mycobacterial

infection. CD3 T cell loss was not observed in coinfection, whereas it was severe in AIDS ($P < 0.001$). Similar (albeit less striking) effects were observed with other markers (CD45RA, CD45RO, and CD27) that were diminished in CD4+ T cells of AIDS patients. Apparent detrimental effects of the added mycobacterial infection were the increased expression of the proapoptotic molecule CD95 on CD4+ T cells, and decreased expression of the major costimulatory molecule CD28 on CD8+ T cells. In this work we show that *M. tuberculosis* infection modifies the T cell phenotype of the HIV-1 infected individual. *J. Clin. Lab. Anal.* 20:80–86, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: HIV-1; AIDS; tuberculosis; flow cytometry; T cells

INTRODUCTION

The synergistic interaction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) poses an important challenge to public health, particularly in less-developed countries. The impact of the HIV epidemic on the incidence of tuberculosis (TB) is important: 9% of the 8.3 million new TB cases and 12% of the 1.8 million TB deaths in 2000 were HIV-related (1). On the other hand, TB aggravates the course of HIV-1 infection and is the cause of 11% of all adult acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) deaths (1). The superimposed Mtb infection, by further activating the immune system, favors cell infection and intracellular viral replication (2).

The high susceptibility of patients with AIDS to Mtb infection is probably related to a progressive decline of CD4+ T cells (3), which play a central role in the immune response to Mtb (4). Moreover, CD4+ T cells are dysfunctional even before depletion occurs, with

Grant sponsor: Consejo Nacional de la Investigación Científica y Tecnológica; Grant number: 41588-8

*Correspondence to: Raul Mancilla, M.D., Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico.

E-mail: mancilla@correo.biomedicas.unam.mx

Received 16 September 2005; Accepted 16 September 2005

DOI 10.1002/jcla.20105

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

poor in vitro blastogenic responses (5,7), diminished cytotoxic activity (8), increased apoptosis (9,10), and defective T cell costimulation, which is associated with decreased expression of CD28 and CD40L on CD4+ T cells (11,13). High levels of soluble CD27 and CD30 in serum that correlate with high viral loads in plasma and CD4+ T cell loss have also been reported (14,15). Related to the above T cell defects, particularly CD4+ T cell depletion, HIV-1 infection is frequently complicated by opportunistic infections, including TB (3). AIDS/TB coinfecting patients present higher viral loads and follow a poor clinical course that is related to several factors (16). Lymphocyte activation is crucial for viral infection and replication (17,18), and mycobacteria are potent activators of CD4+ T cells (4). In addition, the T cells of TB patients produce high levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6, which promote viral replication (2,19). On the other hand, a defective T cell response is frequently observed in TB, which is manifested by CD4+ T cell lymphopenia and anergy (20,21). In addition, as observed in AIDS, abnormal apoptosis of T cells and dysregulation of the cytokine network with predominance of a Th2 response are frequently observed in TB patients (22,23).

In view of the above data, we considered it possible that in dually infected patients the impact of mycobacterial antigens on the immune system of HIV-1-infected individuals might modify the phenotype of peripheral blood T cells. To test this hypothesis, we investigated the phenotype of peripheral blood T cells in patients with AIDS, patients with pulmonary TB, and AIDS/TB-coinfecting individuals, with an emphasis on the expression of T cell costimulatory molecules.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This study included 13 AIDS patients, 23 HIV-1-negative patients with active pulmonary TB, and nine AIDS/TB-coinfecting individuals. Patients were recruited at the Centro Estatal de Información sobre SIDA in San Luis Potosí, México, and the Hospital de Infectología, Centro Médico La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, in Mexico City. The HIV-1 diagnosis was done by a standard screening enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; UmELISA HIV 1+2 Reconviant, La Havana, Cuba) and confirmed by immunoblotting (Grupo Roche Syntex, Mexico City, Mexico). At the time of bleeding, patients were taking medications such as zidovudine (AZT), didanosine (ddI), and zalcitabine (ddC). The TB diagnosis was based on clinical and chest X-ray data and confirmed by sputum culture and/or by demonstrating acid-fast bacilli on sputum smears. For controls, blood samples were obtained from 21 individuals

who were HIV-1-negative and clinically healthy. The AIDS patients (two females and 11 males) varied in age from 28 to 51 years (mean = 34 ± 6 years). The AIDS/TB-coinfecting patients (two females and seven males) varied in age from 22 to 56 years (mean = 35 ± 13 years). The TB patients (10 females and 13 males) ranged in age from 29 to 78 years. The average age was 55 ± 14 years, and six patients (26%) were elderly (≥ 65 years old). Of the 23 TB patients, 10 who matched the age of the AIDS and coinfecting groups were chosen for comparative statistical analysis. These 10 HIV-1-negative TB patients (five females and five males) varied in age from 29 to 49 years (mean = 41 ± 7 years). The healthy controls (11 females and 10 males) varied in age from 21 to 64 years (mean = 34 ± 15 years).

Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies (mAb), unlabeled or labeled with fluorescein isothiocyanate, R-phycoerythrin, or R-phycoerythrin-Cy5, were obtained from various laboratories. mAb to CD3 (clone UCHL1, IgG1), CD45RA (clone F8-11-13, IgG1), CD30L (clone MB1, IgG2b), CD40L (clone TRAP1.3.6, IgG1), and CD27 (clone LT27, IgG2a) were purchased from Serotec (Raleigh, NC). mAb to CD4 (clone RPA-T4, IgG1), CD28 (clone CD28.2, IgG1), CD95 (clone DX2, IgG1), and CD45RO (clone UCHL1, IgG2b) were obtained from Pharmingen (San Diego, CA). mAb against CD4 (clone MT310, IgG1), CD8 (clone DK25, IgG1), and CD30 (clone Ber-H2, IgG1) were purchased from the Dako Corporation (Carpinteria, CA). Appropriate isotype control antibodies were employed.

Flow Cytometry Assay

Blood samples were obtained from patients and controls by venipuncture in Vacutainer tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA) with EDTA as anticoagulant. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation in Histopaque-1077 gradient (Sigma, St. Louis, MO). PBMC (5×10^5) were stained with mAbs or isotype controls for 30 min in the dark at 4°C, and washed in PBS with 1% fetal bovine serum and 0.1% sodium azide. The cells were then incubated with the indicated labeled secondary antibodies for 30 min. After the cells were rinsed they were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS. At least 10,000 cells were analyzed in a two-color FACScanTM (Becton Dickinson, San Jose, CA) operating with Cellquest software and a 488-nm argon laser. The cells were gated according to typical forward and right angles to establish a lymphocyte gate that excluded blasts, cell debris, and cell aggregates.

Statistical Analysis

To establish statistical differences between groups, we analyzed the data with a one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post test using GraphPad Prism version 3.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

The statistically significant changes observed in 23 TB patients were as follows: decreased CD3+ T cell counts ($P < 0.05$), severe depletion of CD4+ T lymphocytes ($P < 0.001$), and low CD8+ T cell counts ($P < 0.01$). CD4+/CD45RO+ and CD4/CD30 T cell subsets were increased in percentage ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). The expression of the CD28 T cell costimulatory molecule on CD4+ and CD8+ T cells was severely diminished ($P < 0.001$).

In the AIDS patients, flow cytometry results revealed a severe CD3 T cell loss (controls: $1,518 \pm 19/\text{mm}^3$; AIDS: $720 \pm 417/\text{mm}^3$) that was highly significant ($P < 0.001$). CD3 T cell counts in AIDS/TB-coinfection ($911 \pm 582/\text{mm}^3$) and TB patients ($1209 \pm 676/\text{mm}^3$) were not significantly different from those of controls.

Table 1 and Figs. 1 and 2 show the results of the flow cytometry analysis of CD4+ T cells. As expected, in AIDS patients CD4+ T cells were severely diminished in both percentage and absolute numbers ($P < 0.001$). In AIDS/TB coinfection the loss of CD4+ T cells was also very severe (percentage and absolute numbers, $P < 0.001$). HIV-1-negative pulmonary TB also exhibited CD4+ T cell loss, but of lesser significance (percentage and absolute number, $P < 0.01$). Regarding the expression of the CD45RA naïve T cell marker, the CD4+/CD45RA+ T cell subset was severely diminished in

AIDS ($P < 0.001$), while in coinfection the loss of this subset was less significant ($P < 0.01$). Markedly reduced CD4+/CD45RO+ T cell counts were observed in AIDS patients ($P < 0.001$), whereas these cells did not differ significantly between coinfecting individuals and controls. As regards the proapoptotic CD95 molecule, in AIDS the absolute number of CD4+ T cells that expressed this marker was decreased ($P < 0.01$) and the percentage was unchanged. In AIDS/TB-coinfection the absolute number of CD4+/CD95+ T cells was also diminished ($P < 0.05$), but the percentage was higher than that of controls ($P < 0.05$). We also analyzed the expression of the T cell costimulatory molecules CD27, CD30, CD30L, and CD40L, which belong to the TNF family (24), and of CD28, a member of the immunoglobulin superfamily (25). In AIDS patients the CD4/CD27 T cell subset was diminished in absolute numbers ($P < 0.05$), whereas in AIDS/TB-coinfected individuals these cells were within the normal range. In HIV-1-negative TB patients CD27 expression was not altered. Contrary to findings in the literature (15), in this study the expression of CD30 and CD30L on T cells of AIDS patients was no different from that of controls. These cells were also within the normal range in coinfecting and TB patients. In all study groups the expression of CD40L on CD4+ T cells was within control values. As regards the major T cell costimulatory molecule CD28, its expression in CD4+ T cells of AIDS patients was severely decreased in absolute numbers ($P < 0.001$). In HIV-1-negative TB patients the CD4+/CD28+ T cell subset was also diminished ($P < 0.05$). In AIDS/TB coinfection, the diminished expression of CD28 on CD4+ T cells was similar to that observed in AIDS ($P < 0.001$).

Table 2 shows the results of the flow cytometry analysis of CD8+ T cells. In all study groups the

TABLE 1. The peripheral blood CD4+ T cell phenotype in HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* coinfecting patients*

Marker	Controls (n = 21)		AIDS (n = 13)		HIV/TB (n = 9)		TB (n = 10)	
	%	#	%	#	%	#	%	#
CD3/CD4	37 ± 11	884 ± 392	8 ± 6 ^e	118 ± 117 ^e	10 ± 10 ^e	176 ± 215 ^e	24 ± 8 ^b	488 ± 195 ^b
CD4/CD45RA	25 ± 13	237 ± 146	27 ± 35	34 ± 64 ^e	39 ± 28	224 ± 229 ^b	35 ± 24	181 ± 143
CD4/CD45RO	59 ± 19	463 ± 145	59 ± 25	70 ± 67 ^e	66 ± 20	139 ± 167	66 ± 18	311 ± 167
CD4/CD95	37 ± 26	410 ± 349	58 ± 25	59 ± 57 ^b	72 ± 38 ^a	99 ± 133 ^a	59 ± 39	316 ± 267
CD4/CD27	37 ± 36	400 ± 449	26 ± 29	23 ± 28 ^c	38 ± 30	66 ± 102	57 ± 43	293 ± 240
CD4/CD30	1 ± 2	9 ± 12	3 ± 8	2 ± 6	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 4	20 ± 19
CD4/CD30L	2 ± 30	146 ± 183	45 ± 28	74 ± 59	24 ± 17	59 ± 62	16 ± 16	105 ± 99
CD4/CD40L	9 ± 21	61 ± 107	33 ± 38	31 ± 39	22 ± 18	29 ± 33	2 ± 4	7 ± 10
CD4/CD28	69 ± 30	676 ± 378	16 ± 29	47 ± 49 ^e	54 ± 39	136 ± 232 ^e	59 ± 42	337 ± 313 ^a

*Media, absolute cell counts and percentage ± standard deviation of flow cytometry results. Statistically significant differences between groups were determined by one-way ANOVA with Tukey post test.

^aSignificantly different from the control group ($P < 0.05$).

^bSignificantly different from the control group ($P < 0.01$).

^cSignificantly different from the control group ($P < 0.001$).

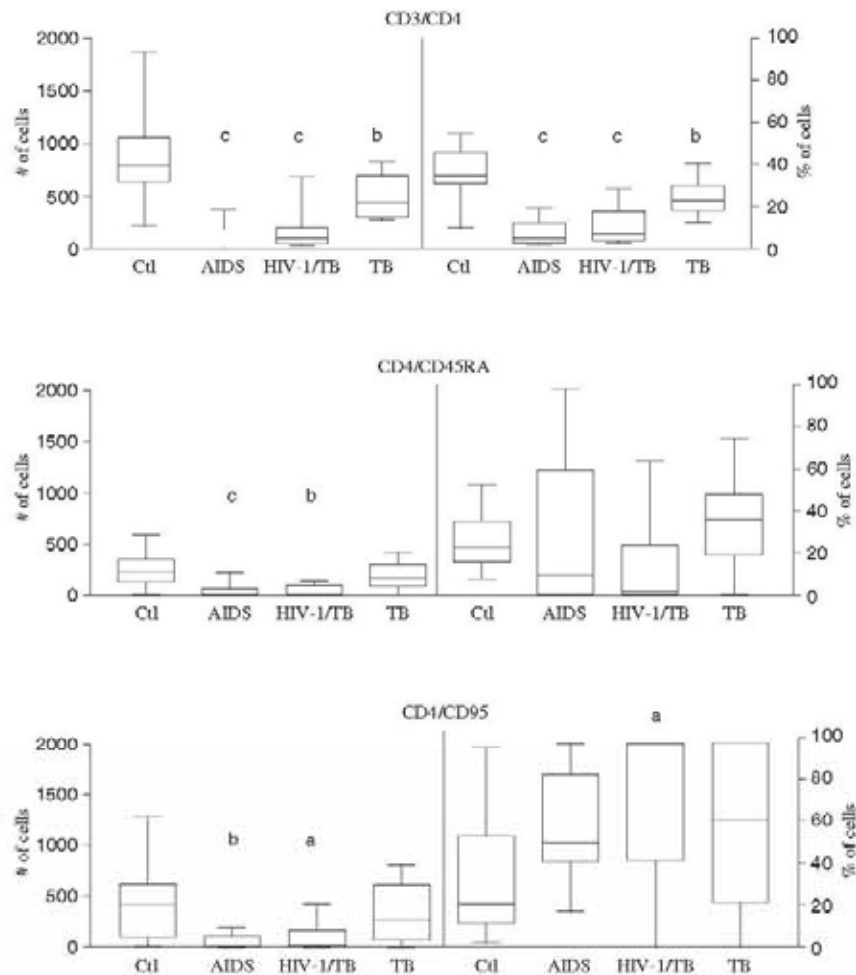


Fig. 1. Flow cytometry analysis of peripheral blood cells from 13 AIDS patients, nine HIV-1/*M. tuberculosis*-coinfected patients, and 10 HIV-1-negative patients with pulmonary TB. Significant results are shown in absolute numbers and percentage of CD4+, CD4+/CD45RA+, and CD4+/CD95. The box plot represents the median, 25/75 percentile, and extreme values. **a:** Significantly different from control group ($P < 0.05$). **b:** Significantly different from control group ($P < 0.01$). **c:** Significantly different from control group ($P < 0.001$).

percentages and absolute numbers of these cells did not differ from those of controls. However, CD8+ cells showed a tendency to increase (AIDS/TB: $592 \pm 430/\text{mm}^3$; AIDS: $458 \pm 343/\text{mm}^3$). Expression of CD45RA and CD45RO on CD8+ T cells of all study groups was not altered. Expression of CD95 on CD8+ T cells of AIDS, AIDS/TB coinfection, and HIV-1-negative TB groups was also within control values. Regarding the T cell costimulatory molecules, the expression of CD27, CD30, CD30L, and CD40L on CD8+ T cells was within control values in all study groups. In contrast, in AIDS patients the number of CD8+/CD28 T cells was reduced in both absolute numbers and percentage ($P < 0.01$). In

HIV-negative TB patients the absolute numbers of these cells was also reduced ($P < 0.01$). In AIDS/TB coinfection, CD28 expression on CD8+ T cells was severely diminished in percentage but not in absolute numbers ($P < 0.001$). Figures 1 and 2 show a graphic representation of the statistically significant results.

DISCUSSION

The consequences of opportunistic TB on the clinical course and outcome of HIV-1 infection have been well studied (1). In contrast, information regarding the impact of the mycobacterial infection on the T cell

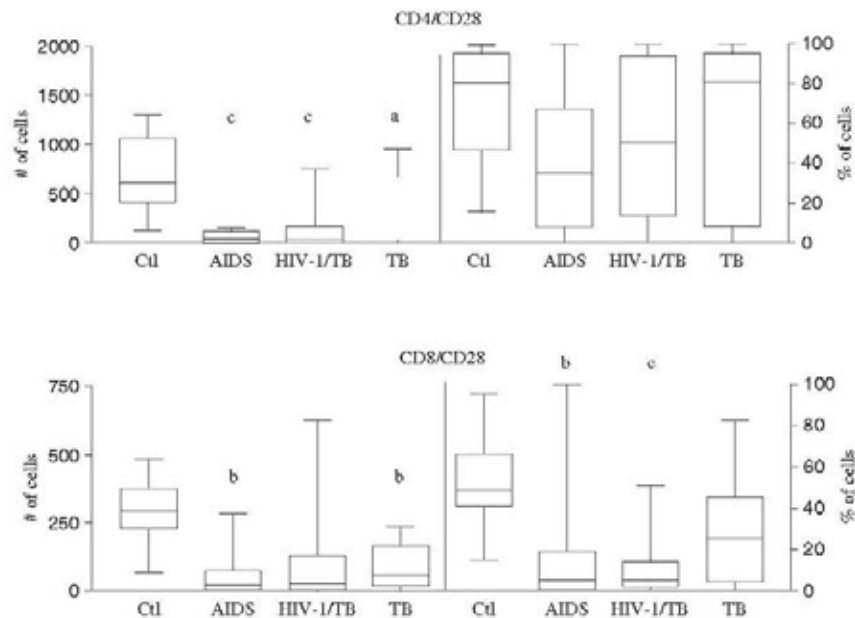


Fig. 2. Flow cytometry analysis of peripheral blood cells from 13 AIDS patients, nine HIV-1/*M. tuberculosis*-coinfecting patients, and 10 HIV-1-negative patients with pulmonary TB. Significant results are shown in absolute numbers and percentage of CD4⁺/CD28⁺, and CD8⁺/CD28⁺ T cells. The box plot represents the median, 25/75 percentile, and extreme values. a: Significantly different from control group ($P < 0.05$). b: Significantly different from control group ($P < 0.01$). c: Significantly different from control group ($P < 0.001$).

TABLE 2. The peripheral blood CD8⁺ T cell phenotype in HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* coinfecting patients*

Marker	Controls (n = 21)		AIDS (n = 13)		HIV/TB (n = 9)		TB (n = 10)	
	%	#	%	#	%	#	%	#
CD3/CD8	20 ± 8	473 ± 216	31 ± 24	4558 ± 343	37 ± 19	592 ± 430	13 ± 8	244 ± 142
CD8/CD45RA	55 ± 27	302 ± 182	42 ± 39	194 ± 247	27 ± 17	183 ± 153	48 ± 21	192 ± 170
CD8/CD45RO	47 ± 26	273 ± 174	39 ± 28	267 ± 216	36 ± 12	224 ± 229	60 ± 27	168 ± 137
CD8/CD95	42 ± 26	251 ± 181	36 ± 36	190 ± 245	48 ± 39	443 ± 436	45 ± 36	169 ± 183
CD8/CD27	32 ± 31	146 ± 138	25 ± 29	66 ± 67	13 ± 13	104 ± 128	33 ± 33	92 ± 100
CD8/CD30	6 ± 22	16 ± 55	1 ± 2	7 ± 14	0 ± 0	0 ± 0	7 ± 8	17 ± 23
CD8/CD30L	26 ± 39	110 ± 160	27 ± 45	19 ± 26	4 ± 5	27 ± 38	13 ± 8	32 ± 21
CD8/CD40L	10 ± 25	38 ± 64	22 ± 37	58 ± 156	2 ± 3	18 ± 34	7 ± 9	14 ± 14
CD8/CD28	53 ± 21	302 ± 110	16 ± 29 ^b	58 ± 90 ^b	11 ± 16 ^c	111 ± 201	28 ± 26	77 ± 79 ^b

*Media, absolute cell counts and percentage ± standard deviation of flow cytometry results. Statistically significant differences between groups were determined by one-way ANOVA with Tukey post test.

^aSignificantly different from the control group ($P < 0.05$).

^bSignificantly different from the control group ($P < 0.01$).

^cSignificantly different from the control group ($P < 0.001$).

phenotype of the HIV-1-infected individual is scanty. Here we analyzed by flow cytometry the peripheral blood T cells of AIDS patients with and without pulmonary TB. In AIDS patients opportunistic TB did not further decrease CD4⁺ T cell counts. This was somewhat unexpected since two conditions characterized by CD4⁺ T cell loss converge in the coinfecting

individual. In HIV-1 infection, CD4⁺ T cell loss is progressive and severe and predicts a bad outcome (3). In TB, CD4 lymphopenia is less frequent and severe, is not always associated with a bad outcome, and may be corrected with antituberculous chemotherapy (21).

Our observations suggest a rescuing effect of the superimposed mycobacterial infection. The reversal of

the severe CD3+ T cell loss in AIDS patients to healthy control values in coinfecting individuals is noteworthy. This finding could be relevant since CD3+ T cell loss may predict the development of AIDS independently of CD4 counts (26).

CD4+ T cells that express the cell-surface isoforms CD45RA and CD45RO are major targets in HIV-1 infection (27). The CD45RA marker characterizes naïve cells that differentiate into CD45RO memory cells after antigen activation (28). In this work we found that the diminished expression of CD45RA and CD45RO on CD4+ T cells was partially reversed in coinfecting individuals. A similar (albeit less striking) rescuing effect was observed in the diminished expression of CD27 and CD95 on CD4+ T cells. The latter is an interesting finding because HIV-1 infection is known to increase the expression of CD95 on T cells, which is associated with decreasing peripheral blood CD4+ T cell counts (9,10,29).

The interaction of CD28 with its ligand B7 plays a crucial role in T cell activation (25). In HIV-1 infection CD28 plays both positive and negative roles. CD4+ T cell activation through TCR and CD28 promotes viral transcription (30). CD28 costimulation may also inhibit HIV-1 infection by downregulating chemokine receptor expression (31). Decreased expression of CD28 on both CD4+ and CD8+ T cells has been observed in HIV-1 infection (11,32), and depletion of the CD8+/CD28+ T cell subset was reported in a previous study of TB patients (33). In our TB patients we observed a severely decreased expression of CD28 on both CD4+ and CD8+ T cells. We also found a decreased expression of CD28 on CD4+ T cells of AIDS patients that was not modified in the coinfecting patients. The CD8+/CD28+ T cell subset was similarly reduced and, interestingly, depletion of this subset was higher in AIDS/TB coinfection. The effects of CD8+/CD28+ T cell loss in the course of HIV-1 infection are unknown. CD8+ CD28- T cells differ from CD28+CD8+ T cells in their high catalytic activity, elevated IFN- γ production, and increased tendency to apoptosis (32,34). The diminished expression of CD28 on CD8+ T cells has been attributed to repeated antigenic stimulation (11,32), as observed in AIDS and TB.

In summary, in this study we found that the T cell phenotype of AIDS patients is impacted by additional *M. tuberculosis* infection inducing both negative and positive effects on peripheral blood T cells. A prospective follow-up study is needed to determine whether these changes influence the course and outcome of the AIDS/TB-coinfecting individual. It is possible, however, that the increased expression of the proapoptotic molecule CD95 on CD4+ T cells, and the decreased expression of the major costimulatory molecule CD28

on CD8+ T cells related to the additional mycobacterial infection further compromise T cell function in the HIV-1-infected patient.

REFERENCES

1. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003;163:1009-1021.
2. Garrait V, Cadranet J, Esvant H, et al. Tuberculosis generates a microenvironment enhancing the productive infection of local lymphocytes by HIV. *J Immunol* 1997;159:2824-2830.
3. Fahey JL, Prince H, Weaver M, et al. Quantitative changes in T helper or T suppressor/cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immune deficiency syndrome from other immune subset disorders. *Am J Med* 1984;76:95-100.
4. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
5. Musey LK, Krieger JN, Hughes JP, Schacker TW, Corey L, McElrath MJ. Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1999;180:278-284.
6. Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med* 1985;313:79-84.
7. Janosy G, Borthwick N, Lomnitzer R, et al. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. I. Predominant proliferative defects among CD45RO+ cells of the CD4 and CD8 lineages. *AIDS* 1993;7:613-624.
8. Ogg GS, Kostense S, Klein MR, et al. Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol* 1999;73:9153-9160.
9. Böhrer T, Baumler C, Herr I, Groll A, Kurz M, Debatin KM. Activation of the CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:754-759.
10. Katsakis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 1995;181:2029-2036.
11. Borthwick NJ, Rofill M, Gombert WM, et al. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28 T-cells. *AIDS* 1994;8:431-441.
12. Subauste CS, Wessendarp M, Smulian AG, Frame PT. Role of CD40 ligand signaling in defective type 1 cytokine response in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2001;183:1722-1731.
13. Vanham G, Penne I, Devalck J, et al. Decreased CD40 ligand induction in CD4+ T cells and dysregulated IL-12 production during HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1999;117:335-342.
14. De Milito A, Aleman S, Marenzi R, et al. Plasma levels of soluble CD27: a simple marker to monitor immune activation during potent antiretroviral therapy in HIV-1-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 2002;127:486-494.
15. Pizzolo G, Vinante F, Morosato L, et al. High serum level of the soluble form of CD30 molecule in the early phase of HIV-1 infection as an independent predictor of progression to AIDS. *AIDS* 1994;8:741-745.

16. Collins KR, Quinones-Mateu ME, Toossi Z, Arts EJ. Impact of tuberculosis on HIV-1 replication, diversity, and disease progression. *AIDS Rev* 2002;4:165-176.
17. Kestens L, Vanham G, Vereecken C, et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1994; 95:436-441.
18. Hertoghe T, Wajja A, Ntambi L, et al. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2000;122:350-357.
19. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor- α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2336-2340.
20. Delgado JC, Tsai EY, Thim S, et al. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:7576-7581.
21. Pilheu JA, De Salvo MC, Gonzalez J, Rey D, Elias MC, Ruppi MC. CD4+ T-lymphopenia in severe pulmonary tuberculosis without evidence of human immunodeficiency virus infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:422-426.
22. Hirsch CS, Toossi Z, Johnson JL, et al. Augmentation of apoptosis and interferon-gamma production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J Infect Dis* 2001;183:779-788.
23. Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. *Eur J Immunol* 2002;32:1605-1613.
24. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 2003;3:609-620.
25. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-126.
26. Margolick JB, Donnenberg AD, Chu C, O'Gorman MR, Giorgi JV, Munoz A. Decline in total cell count is associated with onset of AIDS, independent of CD4(+) lymphocyte count: implications for AIDS pathogenesis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;88: 253-263.
27. Jaleco AC, Covas MJ, Pinto LA, Victorino RM. Distinct alterations in the distribution of CD45RO+ T-cell subsets in HIV-2 compared with HIV-1 infection. *AIDS* 1994;8:1663-1668.
28. de Jong R, Brouwer M, Miedema F, van Lier RA. Human CD8+ T lymphocytes can be divided into CD45RA+ and CD45RO+ cells with different requirements for activation and differentiation. *J Immunol* 1991;146:2088-2094.
29. Silvestris F, Cafforio P, Frassanito MA, et al. Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. *AIDS* 1996;10:131-141.
30. Barker E, Bossart KN, Levy JA. Differential effects of CD28 costimulation on HIV production by CD4+ cells. *J Immunol* 1998;161:6223-6227.
31. Carroll RG, Riley JL, Levine BL, et al. Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 co-stimulation of CD4+ T cells. *Science* 1997;276:273-276.
32. Choremi-Papsodopoulou H, Viglis V, Gargalianos P, Kordosis T, Iniotaki-Theodoraki A, Kosmidis J. Downregulation of CD28 surface antigen on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994;7:245-253.
33. Ponticello A, Perna F, Sturkenboom MC, Marchettiello I, Bocchino M, Sanduzzi A. Demographic risk factors and lymphocyte populations in patients with tuberculosis and their healthy contacts. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:1148-1155.
34. Vingerhoets JH, Vanham GL, Kestens LL, et al. Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1995;100:425-433.

XII. BIBLIOGRAFÍA

(2000) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med* **161**: 1376-1395.

Aliprantis,A.O., Yang,R.B., Mark,M.R., Suggett,S., Devaux,B., Radolf,J.D. *et al.* (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**: 736-739.

Altare,F., Durandy,A., Lammas,D., Emile,J.F., Lamhamedi,S., Le,D.F. *et al.* (1998a) Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**: 1432-1435.

Altare,F., Durandy,A., Lammas,D., Emile,J.F., Lamhamedi,S., Le,D.F. *et al.* (1998b) Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**: 1432-1435.

Andersson,J., Kinloch,S., Sonnerborg,A., Nilsson,J., Fehniger,T.E., Spetz,A.L. *et al.* (2002) Low levels of perforin expression in CD8+ T lymphocyte granules in lymphoid tissue during acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **185**: 1355-1358.

Appay,V., Nixon,D.F., Donahoe,S.M., Gillespie,G.M., Dong,T., King,A. (2000) HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* **192**: 63-75.

Appay,V., Papagno,L., Spina,C.A., Hansasuta,P., King,A., Jones,L. *et al.* (2002) Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol* **168**: 3660-3666.

Arrighi,J.F., Pion,M., Garcia,E., Escola,J.M., van,K.Y., Geijtenbeek,T.B., and Piguet,V. (2004) DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* **200**: 1279-1288.

Ashmore,L.M., Shopp,G.M., and Edwards,B.S. (1989) Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods* **118**: 209-215.

Aung,H., Toossi,Z., McKenna,S.M., Gogate,P., Sierra,J., Sada,E., and Rich,E.A. (2000) Expression of transforming growth factor-beta but not tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-4 in granulomatous lung lesions in tuberculosis. *Tuber Lung Dis* **80**: 61-67.

Betts,M.R., Ambrozak,D.R., Douek,D.C., Bonhoeffer,S., Brenchley,J.M., Casazza,J.P. (2001) Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* **75**: 11983-11991.

- Díaz-Silvestre,H., Espinosa-Cueto,P., Sanchez-Gonzalez,A., Esparza-Ceron,M.A., Pereira-Suarez,A.L., Bernal-Fernandez,G. *et al.* (2005) The 19-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog* **39**: 97-107.
- Baliko,Z., Szereday,L., and Szekeres-Bartho,J. (1998) Th2 biased immune response in cases with active Mycobacterium tuberculosis infection and tuberculin anergy. *FEMS Immunol Med Microbiol* **22**: 199-204.
- Barker,E., Bossart,K.N., and Levy,J.A. (1998) Differential effects of CD28 costimulation on HIV production by CD4+ cells. *J Immunol* **161**: 6223-6227.
- Barnes,P.F., Fong,S.J., Brennan,P.J., Twomey,P.E., Mazumder,A., and Modlin,R.L. (1990) Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol* **145**: 149-154.
- Barnes,P.F., Mistry,S.D., Cooper,C.L., Pirmez,C., Rea,T.H., and Modlin,R.L. (1989) Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol* **142**: 1114-1119.
- Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J. *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.
- Baumgarth,N., and Roederer,M. (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* **243**: 77-97.
- Baumler,C.B., Bohler,T., Herr,I., Benner,A., Krammer,P.H., and Debatin,K.M. (1996) Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood* **88**: 1741-1746.
- Bellamy,R. (2000) Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin Sci (Lond)* **98**: 245-250.
- Belyakov,I.M., and Berzofsky,J.A. (2004) Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. *Immunity* **20**: 247-253.
- Bernier,R., Barbeau,B., Olivier,M., and Tremblay,M.J. (1998) Mycobacterium tuberculosis mannose-capped lipoarabinomannan can induce NF-kappaB-dependent activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in T cells. *J Gen Virol* **79 (Pt 6)**: 1353-1361.
- Biswas,P., Mantelli,B., Delfanti,F., Ferrarini,M., Poli,G., and Lazzarin,A. (2003) CD30 ligation differentially affects CXCR4-dependent HIV-1 replication and soluble CD30 secretion in non-Hodgkin cell lines and in gamma delta T lymphocytes. *Eur J Immunol* **33**: 3136-3145.
- Biswas,P., Smith,C.A., Goletti,D., Hardy,E.C., Jackson,R.W., and Fauci,A.S. (1995) Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity* **2**: 587-596.

- Blackwell,J.M., Searle,S., Mohamed,H., and White,J.K. (2003) Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Immunol Lett* **85**: 197-203.
- Bloom,B.R. (1992) Tuberculosis. Back to a frightening future. *Nature* **358**: 538-539.
- Bloom,B.R., and Murray,C.J. (1992) Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**: 1055-1064.
- Bohler,T., Baumler,C., Herr,I., Groll,A., Kurz,M., and Debatin,K.M. (1997) Activation of the CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* **16**: 754-759.
- Bohler,T., Debatin,K.M., and Linde,R. (1999) Sensitivity of CD4+ peripheral blood T cells toward spontaneous and CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis in pediatric human immunodeficiency virus infection. *Blood* **94**: 1829-1833.
- Boros,D.L. (1978) Granulomatous inflammations. *Prog Allergy* **24**: 183-267.
- Borthwick,N.J., Bofill,M., Gombert,W.M., Akbar,A.N., Medina,E., Sagawa,K. *et al.* (1994) Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28- T cells. *AIDS* **8**: 431-441.
- Brady,H.J., Pennington,D.J., Miles,C.G., Dzierza,E.A. (1993) CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBO J* **12**: 4923-4932.
- Breen,E.C., Rezai,A.R., Nakajima,K., Beall,G.N., Mitsuyasu,R.T., Hirano,T. *et al.* (1990) Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* **144**: 480-484.
- Breen,E.C., Salazar-Gonzalez,J.F., Shen,L.P., Kolberg,J.A., Urdea,M.S., Martinez-Maza,O., and Fahey,J.L. (1997) Circulating CD8 T cells show increased interferon-gamma mRNA expression in HIV infection. *Cell Immunol* **178**: 91-98.
- Brenchley,J.M., Schacker,T.W., Ruff,L.E., Price,D.A., Taylor,J.H., Beilman,G.J. *et al.* (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**: 749-759.
- Cameron,P.U., Forsum,U., Tepler,H., Granelli-Piperno,A., and Steinman,R.M. (1992) During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol* **88**: 226-236.
- Carroll,R.G., Riley,J.L., Levine,B.L., Feng,Y., Kaushal,S., Ritchey,D.W. *et al.* (1997) Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells. *Science* **276**: 273-276.
- Caruso,A., Cantalamessa,A., Licenziati,S., Peroni,L., Prati,E., Martinelli,F. *et al.* (1994) Expression of CD28 on CD8+ and CD4+ lymphocytes during HIV infection. *Scand J Immunol* **40**: 485-490.

- Casanova, J.L., and Abel, L. (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* **20**: 581-620.
- Center, D.M., Kornfeld, H., Ryan, T.C., and Cruikshank, W.W. (2000) Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol Today* **21**: 273-280.
- Chai, J.G., Vendetti, S., Bartok, I., Schoendorf, D., Takacs, K., Elliott, J. *et al.* (1999) Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* **163**: 1298-1305.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**: 263-273.
- Chan, D.C., and Kim, P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**: 681-684.
- Chan, J., Tanaka, K., Carroll, D., Flynn, J., and Bloom, B.R. (1995) Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 736-740.
- Cho, S., Mehra, V., Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Serbina, N., Mazzaccaro, R.J. *et al.* (2000) Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12210-12215.
- Choremi-Papadopoulou, H., Panagiotou, N., Samouilidou, E., Kontopidou, F., Viglis, V., Antoniadou, A. *et al.* (2000) CD28 costimulation and CD28 expression in T lymphocyte subsets in HIV-1 infection with and without progression to AIDS. *Clin Exp Immunol* **119**: 499-506.
- Choremi-Papadopoulou, H., Viglis, V., Gargalianos, P., Kordossis, T., Iniotaki-Theodoraki, A., and Kosmidis, J. (1994) Downregulation of CD28 surface antigen on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **7**: 245-253.
- Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8869-8873.
- Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Guetard, D., Chamaret, S., Laurent, A., Rouzioux, C. *et al.* (1986) [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *C R Acad Sci III* **302**: 485-488.
- Clerici, M., Shearer, G.M.A. (1993) TH1->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* **14**: 107-111.
- Clouse, K.A., Powell, D., Washington, I., Poli, G., Strebel, K., Farrar, W. *et al.* (1989) Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* **142**: 431-438.
- Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**: 1811-1815.

- Cohen,P.S., Schmidtmayerova,H., Dennis,J., Dubrovsky,L., Sherry,B., Wang,H. *et al.* (1997) The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV-1 replication. *Mol Med* **3**: 339-346.
- Cole,S.T., Brosch,R., Parkhill,J., Garnier,T., Churcher,C., Harris,D. *et al.* (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Collins,K.R., Mayanja-Kizza,H., Sullivan,B.A., Quinones-Mateu,M.E., Toossi,Z., and Arts,E.J. (2000) Greater diversity of HIV-1 quasispecies in HIV-infected individuals with active tuberculosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* **24**: 408-417.
- Cooper,D.A., Gold,J., Maclean,P., Donovan,B., Finlayson,R., Barnes,T.G. *et al.* (1985) Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **1**: 537-540.
- Corbett,E.L., Watt,C.J., Walker,N., Maher,D., Williams,B.G., Raviglione,M.C., and Dye,C. (2003) The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**: 1009-1021.
- Curtis,B.M., Scharnowske,S., and Watson,A.J. (1992) Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8356-8360.
- Daley,C.L., Small,P.M., Schechter,G.F., Schoolnik,G.K., McAdam,R.A., Jacobs,W.R., Jr., and Hopewell,P.C. (1992) An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med* **326**: 231-235.
- de Jong,R., Brouwer,M., Miedema,F., and van Lier,R.A. (1991) Human CD8+ T lymphocytes can be divided into CD45RA+ and CD45RO+ cells with different requirements for activation and differentiation. *J Immunol* **146**: 2088-2094.
- De Milito,A., Aleman,S., Marenzi,R., Sonnerborg,A., Fuchs,D., Zazzi,M., and Chiodi,F. (2002) Plasma levels of soluble CD27: a simple marker to monitor immune activation during potent antiretroviral therapy in HIV-1-infected subjects. *Clin Exp Immunol* **127**: 486-494.
- Del,Prete G., Maggi,E., Pizzolo,G., and Romagnani,S. (1995) CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link. *Immunol Today* **16**: 76-80.
- Delgado,J.C., Tsai,E.Y., Thim,S., Baena,A., Boussiotis,V.A., Reynes,J.M. *et al.* (2002) Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7576-7581.
- Diamond,G., Legarda,D., and Ryan,L.K. (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* **173**: 27-38.
- Djomand,G., Diaby,L., N'Gbichi,J.M., Coulibaly,D., Kadio,A., Yapi,A. *et al.* (1994) Idiopathic CD4+ T-lymphocyte depletion in a west African population. *AIDS* **8**: 843-847.

- Dobos, K.M., Spencer, J.S., Orme, I.M., and Belisle, J.T. (2004) Proteomic approaches to antigen discovery. *Methods Mol Med* **94**: 3-17.
- Dolin, P.J., Raviglione, M.C., and Kochi, A. (1994) Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ* **72**: 213-220.
- Drennan, M.B., Nicolle, D., Quesniaux, V.J., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J. *et al.* (2004) Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol* **164**: 49-57.
- Fahey, J.L., Prince, H., Weaver, M., Groopman, J., Visscher, B., Schwartz, K., and Detels, R. (1984) Quantitative changes in T helper or T suppressor/cytotoxic lymphocyte subsets that distinguish acquired immune deficiency syndrome from other immune subset disorders. *Am J Med* **76**: 95-100.
- Fan, J., Bass, H.Z., and Fahey, J.L. (1993) Elevated IFN-gamma and decreased IL-2 gene expression are associated with HIV infection. *J Immunol* **151**: 5031-5040.
- Fenhalls, G., Stevens, L., Bezuidenhout, J., Amphlett, G.E., Duncan, K., Bardin, P., and Lukey, P.T. (2002) Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Immunology* **105**: 325-335.
- Ferguson, J.S., Weis, J.J., Martin, J.L., and Schlesinger, L.S. (2004) Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun* **72**: 2564-2573.
- Flynn, J.L., and Chan, J. (2001) Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**: 93-129.
- Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A., and Bloom, B.R. (1993) An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* **178**: 2249-2254.
- Foley, J.F., Yu, C.R., Solow, R., Yacobucci, M., Peden, K.W., Farber, J.M. (2005) Roles for CXC chemokine ligands 10 and 11 in recruiting CD4+ T cells to HIV-1-infected monocyte-derived macrophages, dendritic cells, and lymph nodes. *J Immunol* **174**: 4892-4900.
- Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C., Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H., and Remold, H.G. (1999) Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol* **66**: 763-764.
- Fujita, J., Ohtsuki, Y., Suemitsu, I., Yamadori, I., Shigeto, E., Shiode, M. *et al.* (2002) Immunohistochemical distribution of epithelioid cell, myofibroblast, and transforming growth factor-beta1 in the granuloma caused by *Mycobacterium avium* intracellulare complex pulmonary infection. *Microbiol Immunol* **46**: 67-74.
- Fusch, D. (1989) IFN- γ concentrations are increased in sera from individuals infected with HIV type 1. *J. AIDS* **2**: 158

- Garba,M.L., Pilcher,C.D., Bingham,A.L., Eron,J., Frelinger,J.A. (2002) HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells. *J Immunol* **168**: 2247-2254.
- Garrait,V., Cadranel,J., Esvant,H., Herry,I., Morinet,P., Mayaud,C., and Israel-Biet,D. (1997) Tuberculosis generates a microenvironment enhancing the productive infection of local lymphocytes by HIV. *J Immunol* **159**: 2824-2830.
- Gea-Banacloche,J.C., Migueles,S.A., Martino,L., Shupert,W.L., McNeil,A.C., Sabbaghian, M.S. *et al.* (2000) Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J Immunol* **165**: 1082-1092.
- Geijtenbeek,T.B., Kwon,D.S., Torensma,R., van Vliet,S.J., van Duijnhoven,G.C., Middel,J. *et al.* (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**: 587-597.
- Gerosa,F., Nisii,C., Righetti,S., Micciolo,R., Marchesini,M., Cazzadori,A., and Trinchieri,G. (1999) CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Immunol* **92**: 224-234.
- Gordon,S.B., and Read,R.C. (2002) Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br Med Bull* **61**: 45-61.
- Goulder,P.J., Phillips,R.E., Colbert,R.A., McAdam,S., Ogg,G., Nowak,M.A. *et al.* (1997) Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* **3**: 212-217.
- Gray,C.M., Schapiro,J.M., Winters,M.A., and Merigan,T.C. (1998) Changes in CD4+ and CD8+ T cell subsets in response to highly active antiretroviral therapy in HIV type 1-infected patients with prior protease inhibitor experience. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**: 561-569.
- Haffar,O.K., Smithgall,M.D., Wong,J.G., Bradshaw,J., and Linsley,P.S. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4+ T cells down-regulates the expression of CD28: effect on T cell activation and cytokine production. *Clin Immunol Immunopathol* **77**: 262-270.
- Harries,A.D., Hargreaves,N.J., Chimzizi,R., and Salaniponi,F.M. (2002) Highly active antiretroviral therapy and tuberculosis control in Africa: synergies and potential. *Bull World Health Organ* **80**: 464-469.
- Hayashi,T., Rao,S.P., Meylan,P.R., Kornbluth,R.S., and Catanzaro,A. (1999) Role of CD40 ligand in *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun* **67**: 3558-3565.
- Henrickson,R.V., Maul,D.H., Lerche,N.W., Osborn,K.G., Lowenstine,L.J., Prahalada,S. *et al.* (1984) Clinical features of simian acquired immunodeficiency syndrome (SAIDS) in rhesus monkeys. *Lab Anim Sci* **34**: 140-145.
- Hirsch,C.S., Toossi,Z., Johnson,J.L., Luzze,H., Ntambi,L., Peters,P. *et al.* (2001) Augmentation of apoptosis and interferon-gamma production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. *J Infect Dis* **183**: 779-788.

- Hiscott, J., Kwon, H., and Genin, P. (2001) Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* **107**: 143-151.
- Hoshino, Y., Tse, D.B., Rochford, G., Prabhakar, S., Hoshino, S., Chitkara, N. *et al.* (2004) Mycobacterium tuberculosis-induced CXCR4 and chemokine expression leads to preferential X4 HIV-1 replication in human macrophages. *J Immunol* **172**: 6251-6258.
- Humphreys, I.R., Stewart, G.R., Turner, D.J., Patel, J., Karamanou, D., Snelgrove, R.J., and Young, D.B. (2006) A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infect* **8**: 1339-1346.
- Isgrò, A., Mezzaroma, I., Aiuti, A., De Vita, L., Franchi, F., Pandolfi, F. *et al.* (2000) Recovery of hematopoietic activity in bone marrow from human immunodeficiency virus type 1-infected patients during highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**: 1471-1479.
- Jaleco, A.C., Covas, M.J., Pinto, L.A., and Victorino, R.M. (1994) Distinct alterations in the distribution of CD45RO+ T-cell subsets in HIV-2 compared with HIV-1 infection. *AIDS* **8**: 1663-1668.
- Ji, J., Chen, J.J., Braciale, V.L., and Cloyd, M.W. (2007) Apoptosis induced in HIV-1-exposed, resting CD4+ T cells subsequent to signaling through homing receptors is Fas/Fas ligand-mediated. *J Leukoc Biol* **81**: 297-305.
- Jones, N., Eggena, M., Baker, C., Nghania, F., Baliruno, D., Mugenyi, P. *et al.* (2006) Presence of distinct subsets of cytolytic CD8+ T cells in chronic HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**: 1007-1013.
- Jouanguy, E., Altare, F., Lamhamedi-Cherradi, S., and Casanova, J.L. (1997) Infections in IFNGR-1-deficient children. *J Interferon Cytokine Res* **17**: 583-587.
- Jouanguy, E., Dupuis, S., Pallier, A., Doffinger, R., Fondaneche, M.C., Fieschi, C. *et al.* (2000) In a novel form of IFN-gamma receptor 1 deficiency, cell surface receptors fail to bind IFN-gamma. *J Clin Invest* **105**: 1429-1436.
- Kang, B.K., and Schlesinger, L.S. (1998) Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Infect Immun* **66**: 2769-2777.
- Katsikis, P.D., Wunderlich, E.S., Smith, C.A., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1995) Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* **181**: 2029-2036.
- Kaufmann, S.H. (2001) How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* **1**: 20-30.
- Keeler, E., Perkins, M.D., Small, P., Hanson, C., Reed, S., Cunningham, J. *et al.* (2006) Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature* **444 Suppl 1**: 49-57.

- Klein,S.A., Dobmeyer,J.M., Dobmeyer,T.S., Pape,M., Ottmann,O.G., Helm,E. *et al.* (1997) Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* **11**: 1111–1118.
- Kleinhenz,M.E., and Ellner,J.J. (1987) Antigen responsiveness during tuberculosis: regulatory interactions of T cell subpopulations and adherent cells. *J Lab Clin Med* **110**: 31-40.
- Korin,Y.D., and Zack,J.A. (1998) Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol* **72**: 3161-3168.
- Kostense,S., Ogg,G.S., Manting,E.H., Gillespie,G., Joling,J., Vandenberghe,K. *et al.* (2001) High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *Eur J Immunol* **31**: 677-686.
- Krown, S.E., Niedzwiecki, D., Bhalla, R.B., Flomenberg.,N., Bundow, D., Chapman, D. (1991) Relationship and prognostic value of endogenous IFN- α , β 2M, and neopterin levels in patients with Kaposi sarcoma and AIDS. *J. AIDS* **4**: 871-880
- Kumar,R., Dwivedi,A., Kumar,P., and Kohli,N. (2005) Tuberculous meningitis in BCG vaccinated and unvaccinated children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**: 1550-1554.
- Lau,A.S., and Williams,B.R. (1990) The role of interferon and tumor necrosis factor in the pathogenesis of AIDS. *J Exp Pathol* **5**: 111-122.
- Lazarevic,V., and Flynn,J. (2002) CD8+ T cells in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **166**: 1116-1121.
- Lederman,M.M., Georges,D.L., Kusner,D.J., Mudido,P., Giam,C.Z., and Toossi,Z. (1994) Mycobacterium tuberculosis and its purified protein derivative activate expression of the human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* **7**: 727-733.
- Lekkerkerker,A.N., van,K.Y., and Geijtenbeek,T.B. (2006) Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr HIV Res* **4**: 169-176.
- Lenzini,L., Rottoli,P., and Rottoli,L. (1977) The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **27**: 230-237.
- Lepe-Zuniga,J.L., Mansell,P.W., and Hersh,E.M. (1987) Idiopathic production of interleukin-1 in acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Microbiol* **25**: 1695-1700.
- Levy,J.A., Mackewicz,C.E., and Barker,E. (1996) Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* **17**: 217-224.
- Lieberman,J., Shankar,P., Manjunath,N., Andersson,J. (2001) Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* **98**: 1667-1677.

- Lienhardt,C., Azzurri,A., Amedei,A., Fielding,K., Sillah,J., Sow,O.Y. *et al.* (2002) Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity *in vivo*. *Eur J Immunol* **32**: 1605-1613.
- Locher,CP., Witt,SA., Kassel,R., Dowell,NL., Fujimura,S., Levy,J.A. *et al.* (2005) Differential effects of R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 infection on CD4+ cell proliferation and activation. *J Gen Virol* **86**: 1171-1179.
- Maecker,H.T., Maino,V.C. (2003) T cell immunity to HIV: defining parameters of protection. *Curr HIV Res* **1**: 249-259.
- Maggi,E., Annunziato,F., Manetti,R., Biagiotti,R., Giudizi,M.G., Ravina,A. *et al.* (1995) Activation of HIV expression by CD30 triggering in CD4+ T cells from HIV-infected individuals. *Immunity* **3**: 251-255.
- Mansouri,D., Adimi,P., Mirsaiedi,M., Mansouri,N., Khalilzadeh,S., Masjedi,M.R. *et al.* (2005) Inherited disorders of the IL-12-IFN-gamma axis in patients with disseminated BCG infection. *Eur J Pediatr* **164**: 753-757.
- Margolick,J.B., Donnenberg,A.D., Chu,C., O'Gorman,M.R., Giorgi,J.V., and Munoz,A. (1998) Decline in total T cell count is associated with onset of AIDS, independent of CD4(+) lymphocyte count: implications for AIDS pathogenesis. *Clin Immunol Immunopathol* **88**: 256-263.
- Mayanja-Kizza,H., Wajja,A., Wu,M., Peters,P., Nalugwa,G., Mubiru,F. *et al.* (2001) Activation of beta-chemokines and CCR5 in persons infected with human immunodeficiency virus type 1 and tuberculosis. *J Infect Dis* **183**: 1801-1804.
- McDonald,D., Wu,L., Bohks,S.M., KewalRamani,V.N., Unutmaz,D., and Hope,T.J. (2003) Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300**: 1295-1297.
- Miller,B.H., Fratti,R.A., Poschet,J.F., Timmins,G.S., Master,S.S., Burgos,M. *et al.* (2004) Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect Immun* **72**: 2872-2878.
- Mosmann,T.R., Li,L., and Sad,S. (1997) Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* **9**: 87-92.
- Munk,M.E., Kern,P., and Kaufmann,S.H. (1997) Human CD30+ cells are induced by Mycobacterium tuberculosis and present in tuberculosis lesions. *Int Immunol* **9**: 713-720.
- Murray,J., Sonnenberg,P., Shearer,S.C., and Godfrey-Faussett,P. (1999) Human immunodeficiency virus and the outcome of treatment for new and recurrent pulmonary tuberculosis in African patients. *Am J Respir Crit Care Med* **159**: 733-740.
- Musey,L.K., Krieger,J.N., Hughes,J.P., Schacker,T.W., Corey,L., and McElrath,M.J. (1999) Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* **180**: 278-284.

- Nagata,S., and Golstein,P. (1995) The Fas death factor. *Science* **267**: 1449-1456.
- Nakata,K., Rom,W.N., Honda,Y., Condos,R., Kanegasaki,S., Cao,Y., and Weiden,M. (1997) Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* **155**: 996-1003.
- Nilsson,J., Boasso,A., Velilla,P.A., Zhang,R., Vaccari,M., Franchini,G. *et al.* (2006) HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* **108**: 3808-3817.
- Ogg,G.S., Kostense,S., Klein,M.R., Jurriaans,S., Hamann,D., McMichael,A.J., and Miedema,F. (1999) Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol* **73**: 9153-9160.
- Onwubalili,J.K., Edwards,A.J., and Palmer,L. (1987) T4 lymphopenia in human tuberculosis. *Tubercle* **68**: 195-200.
- Orme,I.M. (1993) The role of CD8+ T cells in immunity to tuberculosis infection. *Trends Microbiol* **1**: 77-78.
- Orme,I.M., McMurray,D.N., and Belisle,J.T. (2001) Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol* **9**: 115-118.
- Osborn,L., Kunkel,S., and Nabel,G.J. (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2336-2340.
- Palmer,B.E., Boritz,E., Blyveis,N., Wilson,C.C. (2002) Discordance between frequency of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-producing CD4(+) T cells and HIV-1-specific lymphoproliferation in HIV-1-infected subjects with active viral replication. *J Virol* **12**: 5925-5936.
- Palmieri,F., Girardi,E., Pellicelli,A.M., Rianda,A., Bordi,E., Rizzi,E.B. *et al.* (2002) Pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients presenting with normal chest radiograph and negative sputum smear. *Infection* **30**: 68-74.
- Palomino,J.C. (2006) Newer diagnostics for tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* **12**: 172-178.
- Pantaleo,G., and Fauci,A.S. (1995) New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* **13**: 487-512.
- Pantaleo,G., and Fauci,A.S. (1996) Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* **50**: 825-854.
- Pereira,L.A., Bentley,K., Peeters,A., Churchill,M.J., and Deacon,N.J. (2000) A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* **28**: 663-668.

- Perlman,D.C., el-Sadr,W.M., Nelson,E.T., Matts,J.P., Telzak,E.E., Salomon,N. *et al.* (1997) Variation of chest radiographic patterns in pulmonary tuberculosis by degree of human immunodeficiency virus-related immunosuppression. The Terry Beinr Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA). The AIDS Clinical Trials Group (ACTG). *Clin Infect Dis* **25**: 242-246.
- Pfeifer,J.D., Wick,M.J., Roberts,R.L., Findlay,K., Normark,S.J., and Harding,C.V. (1993) Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**: 359-362.
- Piguet,V., and Sattentau,Q. (2004) Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* **114**: 605-610.
- Pilheu,J.A., De Salvo,M.C., Gonzalez,J., Rey,D., Elias,M.C., and Ruppi,M.C. (1997) CD4+ T-lymphocytopenia in severe pulmonary tuberculosis without evidence of human immunodeficiency virus infection. *Int J Tuberc Lung Dis* **1**: 422-426.
- Pitcher,C.J., Quittner,C., Peterson,D.M., Connors,M., Koup,R.A., Maino,V.C., and Picker,L.J. (1999) HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* **5**: 518-525.
- Pizzolo,G., Vinante,F., Morosato,L., Nadali,G., Chilosi,M., Gandini,G. *et al.* (1994) High serum level of the soluble form of CD30 molecule in the early phase of HIV-1 infection as an independent predictor of progression to AIDS. *AIDS* **8**: 741-745.
- Poli,G., Bressler,P., Kinter,A., Duh,E., Timmer,W.C., Rabson,A. *et al.* (1990) Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Exp Med* **172**: 151-158.
- Ponticiello,A., Perna,F., Sturkenboom,M.C., Marchetiello,I., Bocchino,M., and Sanduzzi,A. (2001) Demographic risk factors and lymphocyte populations in patients with tuberculosis and their healthy contacts. *Int J Tuberc Lung Dis* **5**: 1148-1155.
- Pope,M., and Haase,A.T. (2003) Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* **9**: 847-852.
- Popovic,M., Sarngadharan,M.G., Read,E., and Gallo,R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**: 497-500.
- Prince,H.E., and Jensen,E.R. (1991) HIV-related alterations in CD8 cell subsets defined by in vitro survival characteristics. *Cell Immunol* **134**: 276-286.
- Prince,H.E., Jensen,E.R., and York,J. (1992) Lymphocyte subsets in HTLV-II-infected former blood donors: relationship to spontaneous lymphocyte proliferation. *Clin Immunol Immunopathol* **65**: 201-206.
- Quezada-Calvillo,R., Senchyna,M., Underdown, B.J. (1993) Characterization of intestinal gamma-glucoamylase deficiency in CBA/Ca mice. *Am J Physiol* **265**:G1150-G1157

Quesniaux,V., Fremond,C., Jacobs,M., Parida,S., Nicolle,D., Yeremeev,V. *et al.* (2004) Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* **6**: 946-959.

RANY,L.S. (1959) The Ghon focus of tuberculous reinfection. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **81**: 207-210.

Reiling,N., Holscher,C., Fehrenbach,A., Kroger,S., Kirschning,C.J., Goyert,S., and Ehlers,S. (2002) Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **169**: 3480-3484.

Ribeiro-Rodrigues,R., Resende,C.T., Rojas,R., Toossi,Z., Dietze,R., Boom,W.H. *et al.* (2006) A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **144**: 25-34.

Roche,P.W., Triccas,J.A., and Winter,N. (1995) BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. *Trends Microbiol* **3**: 397-401.

Romagnani,S., Annunziato,F., Manetti,R., Almerigogna,F., Biagiotti,R., Giudizi,M.G. *et al.* (1996) Role for CD30 in HIV expression. *Immunol Lett* **51**: 83-88.

Roman,M., Rodriguez,J.W., Pagan,N.O., Rios-Olivares,E., Amill,A., and Hunter,R. (2002) Distribution of naive (CD45RA+) and memory (CD45RO+) T-cells in HIV-infected Puerto Rican population. *P R Health Sci J* **21**: 195-201.

Rosat,J.P., Grant,E.P., Beckman,E.M., Dascher,C.C., Sieling,P.A., Frederique,D. *et al.* (1999) CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool. *J Immunol* **162**: 366-371.

Rosenberg,Z.F., and Fauci,A.S. (1990) Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today* **11**: 176-180.

Rosenberg,E.S., Billingsley,J.M., Caliendo,A.M., Boswell,S.L., Sax,P.E., Kalams,S.A., *et al.* (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**: 1447-1450.

Russell,D.G. (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 569-577.

Samten,B., Thomas,E.K., Gong,J., and Barnes,P.F. (2000) Depressed CD40 ligand expression contributes to reduced gamma interferon production in human tuberculosis. *Infect Immun* **68**: 3002-3006.

Saunders,B.M., and Cooper,A.M. (2000) Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* **78**: 334-341.

Saunders,B.M., Frank,A.A., Orme,I.M., and Cooper,A.M. (2002) CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol* **216**: 65-72.

Schlesinger,L.S. (1996) Role of mononuclear phagocytes in *M tuberculosis* pathogenesis. *J Investig Med* **44**: 312-323.

- Schluger,N.W. (2005) The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**: 251-256.
- Schmitt,N., Nugeyre,M.T., Scott-Algara,D., Cumont,M.C., Barré-Sinoussi,F., Pancino,G. *et al.* (2006) Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *AIDS*. **20**: 533-542.
- Schwartz,O., Marechal,V., Le,G.S., Lemonnier,F., and Heard,J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**: 338-342.
- Schwartz,R.H. (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* **21**: 305-334.
- Schweighardt,B., Roy,A.M., Meiklejohn,D.A., Grace,E.J.^{2nd}, Moretto,W.J., Heymann,J.J., Nixon,DF. (2004) R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replicates more efficiently in primary CD4+ T-cell cultures than X4 HIV-1. *J Virol* **78**: 9164-9173.
- Sereti,I., and Lane,H.C. (2001) Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus: implications for immune-based therapies. *Clin Infect Dis* **32**: 1738-1755.
- Sharpe,A.H., and Freeman,G.J. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**: 116-126.
- Sheridan,J.F., Aurelian,L., Donnenberg,A.D., and Quinn,T.C. (1984) Cell-mediated immunity to cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus (HSV) antigens in the acquired immune deficiency syndrome: interleukin-1 and interleukin-2 modify in vitro responses. *J Clin Immunol* **4**: 304-311.
- Sidobre,S., Nigou,J., Puzo,G., and Riviere,M. (2000) Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem* **275**: 2415-2422.
- Silva,C.L., and Lowrie,D.B. (2000) Identification and characterization of murine cytotoxic T cells that kill Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **68**: 3269-3274.
- Silvestris,F., Cafforio,P., Frassanito,M.A., Tucci,M., Romito,A., Nagata,S., and Dammacco,F. (1996) Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. *AIDS* **10**: 131-141.
- Sinha,S., Kosalai,K., Arora,S., Namane,A., Sharma,P., Gaikwad,A.N. *et al.* (2005) Immunogenic membrane-associated proteins of Mycobacterium tuberculosis revealed by proteomics. *Microbiology* **151**: 2411-2419.
- Skamene,E., Schurr,E., and Gros,P. (1998) Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med* **49**: 275-287.
- Small,P.M., Shafer,R.W., Hopewell,P.C., Singh,S.P., Murphy,M.J., Desmond,E. *et al.* (1993) Exogenous reinfection with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* **328**: 1137-1144.

Smithgall,M.D., Wong,J.G., Linsley,P.S., and Haffar,O.K. (1995) Costimulation of CD4+ T cells via CD28 modulates human immunodeficiency virus type 1 infection and replication in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**: 885-892.

Somoskovi,A., Song,Q., Mester,J., Tanner,C., Hale,Y.M., Parsons,L.M., and Salfinger,M. (2003) Use of molecular methods to identify the Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) and other mycobacterial species and to detect rifampin resistance in MTBC isolates following growth detection with the BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol* **41**: 2822-2826.

Stenger,S., Hanson,D.A., Teitelbaum,R., Dewan,P., Niazi,K.R., Froelich,C.J. *et al.* (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**: 121-125.

Stenger,S., Mazzaccaro,R.J., Uyemura,K., Cho,S., Barnes,P.F., Rosat,J.P. *et al.* (1997) Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* **276**: 1684-1687.

Stenger,S., and Modlin,R.L. (2002) Control of Mycobacterium tuberculosis through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **14**: 452-457.

Stenger,S., and Modlin,R.L. (1999) T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Curr Opin Microbiol* **2**: 89-93.

Subauste,C.S., Wessendarp,M., Smulian,A.G., and Frame,P.T. (2001) Role of CD40 ligand signaling in defective type 1 cytokine response in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **183**: 1722-1731.

Sugita,M., Moody,D.B., Jackman,R.M., Grant,E.P., Rosat,J.P., Behar,S.M. *et al.* (1998) CD1-- a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. *Clin Immunol Immunopathol* **87**: 8-14.

Tan,J.S., Canaday,D.H., Boom,W.H., Balaji,K.N., Schwander,S.K., and Rich,E.A. (1997) Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* **159**: 290-297.

Teran-Escandon,D., Teran-Ortiz,L., Camarena-Olvera,A., Gonzalez-Avila,G., Vaca-Marin,M.A., Granados,J., and Selman,M. (1999) Human leukocyte antigen-associated susceptibility to pulmonary tuberculosis: molecular analysis of class II alleles by DNA amplification and oligonucleotide hybridization in Mexican patients. *Chest* **115**: 428-433.

Toossi,Z. (2003) Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Infect Dis* **188**: 1146-1155.

Toossi,Z., Johnson,J.L., Kanost,R.A., Wu,M., Luzze,H., Peters,P. *et al.* (2001) Increased replication of HIV-1 at sites of Mycobacterium tuberculosis infection: potential mechanisms of viral activation. *J Acquir Immune Defic Syndr* **28**: 1-8.

Toossi,Z., Mayanja-Kizza,H., Baseke,J., Peters,P., Wu,M., Abraha,A. *et al.* (2005) Inhibition of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) by beta-chemokine analogues in mononuclear cells from HIV-1-infected patients with active tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **142**: 327-332.

- Toossi,Z., Nicolacakis,K., Xia,L., Ferrari,N.A., and Rich,E.A. (1997) Activation of latent HIV-1 by Mycobacterium tuberculosis and its purified protein derivative in alveolar macrophages from HIV-infected individuals in vitro. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **15**: 325-331.
- Toossi,Z., Xia,L., Wu,M., and Salvekar,A. (1999) Transcriptional activation of HIV by Mycobacterium tuberculosis in human monocytes. *Clin Exp Immunol* **117**: 324-330.
- Trunz,B.B., Fine,P., and Dye,C. (2006) Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* **367**: 1173-1180.
- Tsao,T.C., Chen,C.H., Hong,J.H., Hsieh,M.J., Tsao,K.C., and Lee,C.H. (2002) Shifts of T4/T8 T lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* **122**: 1285-1291.
- Tsoukas,C.M., and Bernard,N.F. (1994) Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin Microbiol Rev* **7**: 14-28.
- Tsunetsugu-Yokota,Y., and Honda,M. (1990) Effect of cytokines on HIV release and IL-2 receptor alpha expression in monocytic cell lines. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**: 511-516.
- Turville,S., Wilkinson,J., Cameron,P., Dable,J., Cunningham,A.L. (2003) The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol* **74**: 710-718.
- Ullum,H., Lepri,A.C., Victor,J., Skinhoj,P., Phillips,A.N., and Pedersen,B.K. (1997) Increased losses of CD4+CD45RA+ cells in late stages of HIV infection is related to increased risk of death: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS* **11**: 1479-1485.
- Ulrichs,T., Moody,D.B., Grant,E., Kaufmann,S.H., and Porcelli,S.A. (2003) T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* **71**: 3076-3087.
- Urdaneta,E., Feo-Figarella,E., Montalvo,C., Talamo,C., Castillo,Y., Carrasco,D. *et al.* (1998) Characterization of local memory cells in stage-classified pulmonary tuberculosis: preliminary observations. *Scand J Immunol* **47**: 496-501.
- Urquhart,B.L., Atsalos,T.E., Roach,D., Basseal,D.J., Bjellqvist,B., Britton,W.L., and Humphery-Smith,I. (1997) 'Proteomic contigs' of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis (BCG) using novel immobilised pH gradients. *Electrophoresis* **18**: 1384-1392.
- van Crevel R., Ottenhoff,T.H., and Van der Meer,J.W. (2003) Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Adv Exp Med Biol* **531**: 241-247.
- Vanham,G., Toossi,Z., Hirsch,C.S., Wallis,R.S., Schwander,S.K., Rich,E.A., and Ellner,J.J. (1997) Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. *Tuber Lung Dis* **78**: 145-158.

Verani,A., Sironi,F., Siccardi,A.G., Lusso,P., and Vercelli,D. (2002) Inhibition of CXCR4-tropic HIV-1 infection by lipopolysaccharide: evidence of different mechanisms in macrophages and T lymphocytes. *J Immunol* **168**: 6388-6395.

Villeneuve,C., Gilleron,M., Maridonneau-Parini,I., Daffe,M., starie-Dequeker,C., and Etienne,G. (2005) Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *J Lipid Res* **46**: 475-483.

Vingerhoets,J.H., Vanham,G.L., Kestens,L.L., Penne,G.G., Colebunders,R.L., Vandenbruaene,M.J. *et al.* (1995) Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* **100**: 425-433.

Wang,B., Maile,R., Greenwood,R., Collins,E.J., and Frelinger,J.A. (2000) Naive CD8+ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells. *J Immunol* **164**: 1216-1222.

Whalen,C., Horsburgh,C.R., Hom,D., Lahart,C., Simberkoff,M., and Ellner,J. (1995) Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **151**: 129-135.

Widney,D., Gundapp,G., Said,J.W., van der,M.M., Bonavida,B., Demidem,A. *et al.* (1999) Aberrant expression of CD27 and soluble CD27 (sCD27) in HIV infection and in AIDS-associated lymphoma. *Clin Immunol* **93**: 114-123.

Wright,S.C., Jewett,A., Mitsuyasu,R., and Bonavida,B. (1988) Spontaneous cytotoxicity and tumor necrosis factor production by peripheral blood monocytes from AIDS patients. *J Immunol* **141**: 99-104.

Xu,Y., Zhu,H., Wilcox,C.K., Van't Wout,A., Andrus,T., Llewellyn,N. *et al.* (2008) Blood Monocytes harbor HIV type 1 strains with diversified phenotypes including macrophage-specific CCR5 virus. *J Infect Dis* **197**: 309-318

Yang,O.O., Kalams,S.A., Trocha,A., Cao,H., Luster,A., Johnson,R.P., and Walker,B.D. (1997) Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol* **71**: 3120-3128.

Zheng,Y.H., Lovsin,N., and Peterlin,B.M. (2005) Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol Lett* **97**: 225-234.

Zola,H., Swart,B., Banham,A., Barry,S., Beare,A., Bensussan,A. *et al.* (2007) CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods* **319**: 1-5.