



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T
E INMUNOPATOGÉNESIS DE LA
COINFECCIÓN POR *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* Y VIH**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)**

P R E S E N T A

OLIVIA YAZMÍN BRICEÑO CÁRDENAS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. EN CIENCIAS HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA

MÉXICO, D.F. ENERO, 2010



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.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias biológicas. En especial gracias al coordinador del posgrado el Dr. Juan Núñez Farfán, a la Secretaria Técnica Lilia Espinosa Sánchez y a Erika Rodríguez por todo su apoyo durante mi estancia en el posgrado.

Gracias a CONACYT y a su coordinadora en el posgrado Lilia Jiménez por la beca otorgada para el estudio de este posgrado.

Gracias a los miembros del comité tutorial por su valiosa contribución a esta tesis, en especial al Dr. Enrique Espinosa.

Gracias a Dios por poner en mi camino las oportunidades y personas correctas en los tiempos adecuadas. Gracias por darme la fortaleza para no claudicar en los momentos difíciles.

Gracias a mis abuelos, padres y hermanos por su amor y ejemplo de vida. Quiero que sepan que gracias a su apoyo y comprensión yo les debo todo lo que soy. Gracias a toda mi familia por creer en mí.

Gracias César por ser mi compañero en las buenas y en las malas, por tu apoyo, paciencia y amor.

Gracias al Dr. Gustavo Reyes Terán por su apoyo y por brindarme el mejor laboratorio para hacer mi posgrado. Gracias a todo el equipo administrativo, medico y laboratorio de diagnostico del CIENI, sin su ayuda nada de esto sería posible.

Gracias a mis amigos: Daniela, Natalia, Alfredo, Humberto, Gustavo, Claudia, Gonzalo, Criselda, Leticia, Mariana, Ángel, Juan, Klintzy, Israel, Sergio, Akio, Perla y Santiago por hacer los momentos difíciles más llevaderos y los felices inolvidables. Gracias por su apoyo técnico y moral incondicional, por escucharme y por su amistad.

Gracias a la Dra. Candela Iglesias por su ayuda incondicional y por su amistad a pesar de la distancia.

Índice temático

1. Resumen.....	1
1.1 Abstract.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1 Infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.1 <i>Características generales de Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.1.2 <i>Historia natural y epidemiología de la tuberculosis</i>	6
2.1.3 <i>Inmunopatogénesis de Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.1.4 <i>Tratamiento Antifímico</i>	10
2.2 <i>Infección por VIH</i>	12
2.2.1 <i>Características generales del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)</i>	12
2.2.1.1 <i>Mecanismo de replicación del VIH</i>	13
2.2.3 <i>Epidemiología de la infección por VIH</i>	15
2.2.4 <i>Historia Natural e Inmunopatogénesis de la infección por VIH</i>	17
2.2.4.1 <i>Activación inmune y VIH</i>	20
2.2.5 <i>Tratamiento Antirretroviral</i>	24
2.3 <i>Co-infección tuberculosis-VIH</i>	26
2.3.1 <i>Datos epidemiológicos de la coinfección tuberculosis-VIH</i>	26
2.3.2 <i>Implicaciones clínicas e inmunológicas de la coinfección tuberculosis –VIH</i>	28
3. Planteamiento del Problema.....	31
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos generales.....	31
5.1 <i>Objetivos Particulares</i>	32

6. Metodología.....	33
6.1 Características de los pacientes, calendario de seguimiento y muestras requeridas.....	33
6.2 Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica por gradiente de densidad.....	34
6.3 <i>Medición de Fenotipo de PBMC´s mediante citometría de flujo Multiparamétrica</i>	34
6.4 Pruebas Estadísticas.....	35
7. Resultados.....	36
7.1 <i>Citometría de Flujo</i>	37
7.2 Las células T CD4+ y CD8+ de la sangre y del lavado bronquioloalveolar (LBA) en la semana basal del tratamiento no muestran diferencias en activación y entrada a ciclo celular.....	38
7.3 La activación inmune tiende a aumentar en las primeras 4 semanas de tratamiento antifímico en las células T CD4+ totales.....	39
7.4 La activación inmune no parecen tener efecto sobre la frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias.....	40
7.5 La entrada a ciclo celular tiende a aumentar en las células T CD4+ en las primeras 2 semanas de tratamiento antifímico.....	42
7.6 Cambios del perfil de activación de células T CD4+ vírgenes y CD8+ a lo largo del tratamiento antifímico.....	42
7.7 La activación de linfocitos T coincide con cambios en la carga viral cuando el tratamiento antifímico es exitoso.....	44
8. <i>Discusión</i>	46
9. <i>Conclusiones</i>	52
10. <i>Bibliografía</i>	53

Resumen

La OMS ha estimado que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Existen factores que determinan la susceptibilidad a esta enfermedad y uno de los más importantes es la infección por el VIH. La TB es una de las muchas infecciones bacterianas cuyo control inmune está alterado durante la infección por el VIH. Los individuos con doble infección por MTB y el VIH presentan una menor supervivencia que los que tienen sólo la infección viral, además de avanzar más rápidamente a SIDA y presentar más enfermedades oportunistas. Lo anterior sugiere que MTB podría estar exacerbando los mecanismos inmunopatogénicos de la infección por el VIH. Se sabe que la activación inmune se asocia a progresión a SIDA y que genera alteraciones en el número y función de las subpoblaciones de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Para determinar si la infección por MTB da lugar a un aumento en la activación inmune crónica en los individuos infectados por el VIH, estudiamos 11 pacientes a lo largo de las primeras 8 de tratamiento antifímico. Todos los pacientes estaban en tratamiento con isoniazida, rifampicina y etambutol y sin tratamiento antiviral. Cada 2 semanas caracterizamos, por citometria de flujo, los linfocitos de sangre periférica de dichos pacientes. Se observó una tendencia al aumento en la coexpresión de CD38 y HLDR únicamente en la semana 4 postratamiento ($p=.06$). Al mismo tiempo se observó un aumento significativo ($p=.02$) en la activación de células CD4 vírgenes y de la carga viral ($p=.04$). Al analizar a los linfocitos T CD8+ se observó una disminución significativa de la expresión de CD38 y HLADR en la semana 8 postratamiento. Concluimos que la infección por MTB contribuye transitoriamente a la activación inmune de los linfocitos T CD4+ durante las primeras 4 semanas de tratamiento antifímico, al ser estas células el blanco del VIH, esta activación inmune se ve reflejada en la carga viral plasmática. Este aumento transitorio en la activación inmune se asocia a un incremento en la carga viral y podría deberse a un aumento en las funciones de monocitos y a respuestas inespecíficas a componentes liberados de las micobacterias destruidas por el tratamiento así como a un mayor reclutamiento de células susceptibles a la infección por VIH.

Abstract

Co infection tuberculosis-HIV is one of the main causes of mortality in patients with HIV. HIV+ patients have 20 times more probability to acquire active tuberculosis. A lot of studies has shown that tuberculosis worsens HIV. An evidence that suggest this observation is that the individuals co infected progress to AIDS in less time that individuals without tuberculosis. Immune activation, which is central in HIV disease, correlates whit progression to AIDS. In co infected patients expression of activation markers and inflammatory cytokines is increase. It has been describe mechanisms of Tuberculosis to evade immune response and this mechanisms could be implicated in the pathogenesis of co infected patients. We determined if in HIV/TB co infected patients, anti-tuberculosis treatment previous to antiretroviral treatment controlling tuberculosis infection, decreased activation in T cells (TC) and in the subpopulations on T cells and a improvement like increase the number of CD4+Tcells and decrease de viral load. We follow up 11 patients co infected whit tuberculosis and HIV without antituberculosis and/or antiretroviral treatment. The patients start antituberculosis treatment and in weeks 0, 2, 4 and 8. We obtained PBMC and were analyzed by multiparamétrica flow cytometry. Main effects of successful anti-TB treatment before antiretroviral treatment are: CD4 T cell activation tends to increase (during weeks 0-4) transiently w/o HIV pharmacological control. This phenomenon didn't occur in CD8 T cells. We found too that parallel to CD4 activation pattern, viral load increases during the first 4 weeks of anti-tuberculosis treatment w/o HIV pharmacological control. Same pattern of activation in naive and effector memory CD4 T cells during the first 4 weeks of antituberculosis treatment w/o HIV pharmacological control. Activation of effector memory CD8 T cells decreases gradually, but significantly between weeks 0-8 with anti-TB treatment w/o HIV pharmacological control.

All changes seen occur during successful antituberculosis treatment measure by a significative increase in the body weight between weeks 4-8 and decrease in cough, fever and lymph nodes (previous to HIV control).

With this findings we conclude that active TB does not seem to be increasing activation during HIV infection. The control of TB has biphasic effect on T cell activation and this effect is different in the CD4 and CD8 T cells. Coincidence between activation and viremia changes during anti TB treatment suggest a causal link.

Antecedentes

Infección por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

Características Generales de MTB

Las características morfológicas más importantes de MTB se describen a continuación[1]. Son bacilos ligeramente curvados que miden de 1 a 10 μm de largo por 0.2 a 0.5 μm de ancho; pueden mostrar un contorno uniforme, con vacuolas irregularmente distribuidas. En el medio de cultivo, las células pueden variar desde cocoides a filamentosas. Las cepas difieren en su tendencia para crecer como bacilos aislados o como largas hebras llamadas cordones.

Se creía que *MTB* era aerobio obligado, sin embargo, se ha observado su crecimiento en ambientes microaerofílicos en los granulomas en los estadios avanzados de la infección. El bacilo de la tuberculosis es capaz de crecer intracelular principalmente en macrófagos y extracelularmente. Este organismo tiene un tiempo de replicación prolongado, aproximadamente 20 horas [2].

MTB se identifica por su característica propiedad tintoral: es impermeable a colorantes básicos, pero una vez teñida retiene el colorante con tenacidad. Resisten de forma específica a la decoloración con solventes orgánicos acidificados y se llaman por bacilos ácido-alcohol resistente. Esta propiedad se atribuye a la presencia de una pared celular rica en lípidos. Entre los lípidos extraídos con solventes orgánicos neutros están ceras y glicolípidos los cuales están adheridos a polisacáridos que incluyen el glucano, manano, arabinogalactano y arabinomanano. La membrana celular de las micobacterias es una compleja estructura que contiene muchas proteínas, lípidos y carbohidratos, muchos de los cuales son únicos de esta bacteria. Los glicolípidos y las proteínas se ubican en una capa externa firmemente adherida a la pared y esta ubicación externa del lípido es la responsable del carácter hidrofóbico de las células (3). La representación esquemática de la membrana de MTB se representa en la Fig.1.

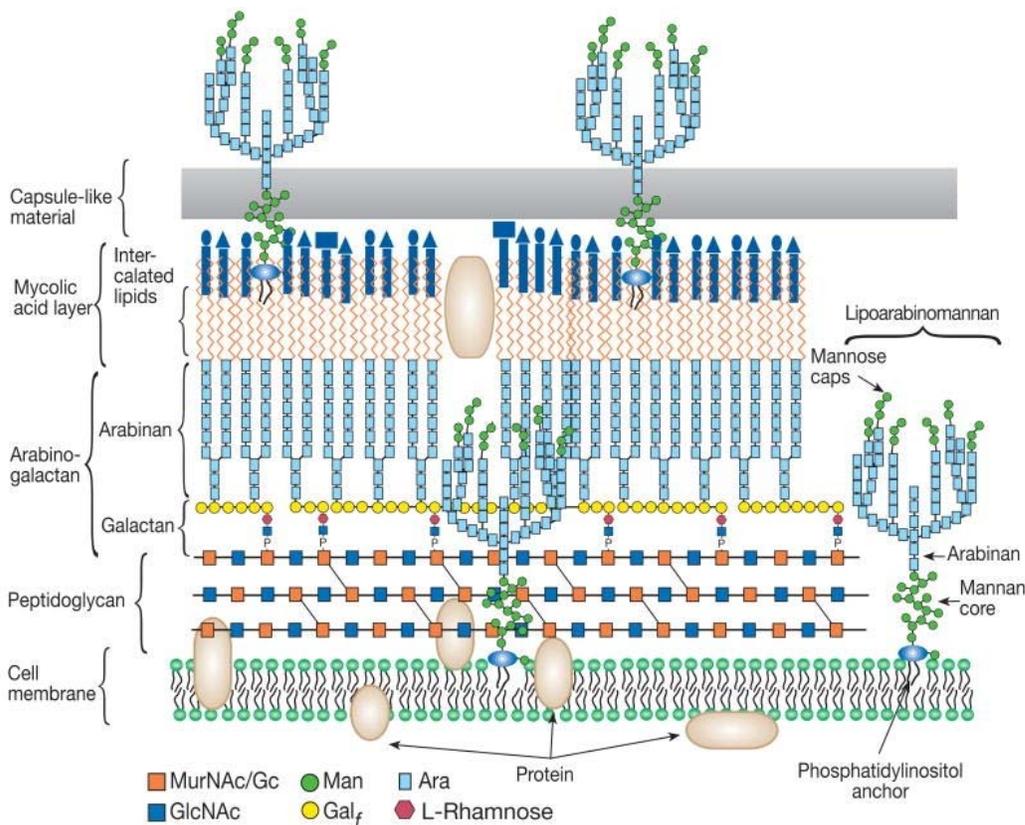


Figura.1 Estructura de la Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

El genoma de *MTB* H37Rv consiste en 4.4×10^6 pares de bases y contiene aproximadamente 4000 genes. Se sabe que cerca de 200 genes parecen estar involucrados en el metabolismo de componentes lipídicos [3].

Historia Natural y Epidemiología de la Infección por *MTB*

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada principalmente por *MTB*. Se ha estimado que la tercera parte de la población mundial está infectada por *MTB* latente. El número estimado de nuevos casos de TB en 2008 es de 9.2 millones (139 por 100 000 habitantes), de los cuales 700 000 estaban infectados por el VIH (7.6% del total). La infección por *MTB* ocupa el séptimo lugar entre las causas de muerte; en el 2008 hubo 1.7 millones de defunciones, incluidos 0.2 millones de personas infectadas por el VIH [4].

El 75% de las personas con tuberculosis activa se encuentran en la etapa económicamente productiva de su vida(entre 15 y 54 años). El 95% de los casos y el 99% de las muertes ocurren en países en desarrollo, con mayor incidencia en África subsahariana y el sureste de Asia. La mayoría de las personas con enfermedad activa se encuentran en Bangladesh, China, India, Indonesia y Pakistán [5].

La infección por el virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) ha tenido un gran impacto sobre la epidemiología de la tuberculosis, con un aumento anual de hasta un 50% desde su aparición [6].

MTB es altamente infeccioso, basta inhalar 10 bacilos para contraer la infección y se adquiere por vía aérea a partir de una persona infectada que expulsa los bacilos al toser, estornudar o hablar[7].

La infección inicial por *MTB* suele producir síntomas tales como fiebre, tos productiva, pérdida de peso y aparición de ganglios palpables. En algunos de los casos, las lesiones desaparecen y no dejan alteraciones, excepto calcificación ocasional de los ganglios linfáticos pulmonares[7].

No todos los sujetos infectados por el bacilo de la tuberculosis desarrollan la enfermedad. Aproximadamente el 95% de las personas infectadas controlan la infección y entran a la fase de latencia con el peligro permanente de reactivación, por cambios en la capacidad del sistema inmune los que pueden deberse a la infección con VIH, desnutrición, por tratamientos como quimioterapias, vejez, etc. En el 5% de los casos, la infección inicial evoluciona de manera directa hacia tuberculosis pulmonar activa [7].

Este bacilo tiene la capacidad de diseminarse e infectar los huesos, las meninges, el riñón, etc. Este tipo de infecciones se denominan tuberculosis extrapulmonares [8].

Inmunopatogénesis de *Mycobacterium tuberculosis*

La llegada de *MTB* hasta el espacio alveolar implica que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio. Los macrófagos alveolares y a las células dendríticas constituyen la primera línea de defensa en contra de esta patógeno [9]. Este primer contacto es crucial ya que va a definir el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad.

La fagocitosis de *MTB* es llevada a cabo por los macrófagos alveolares y es favorecida por el surfactante A producido por las células epiteliales alveolares tipo II, ya que aumentan la interacción entre la micobacteria y los macrófagos [10].

Además, *MTB* puede emplear diferentes receptores para entrar a los macrófagos y esta primera interacción es crucial para el posterior control de la infección [11].

Durante la fagocitosis, la micobacteria es incluida en un fagosoma y destruida en el fagolisosoma. Algunos de sus antígenos son procesados y presentados a linfocitos TC D4+ (por moléculas MCHII) y CD8+ (por moléculas MCH I), por lo que los macrófagos además de ser células capaces de eliminar a la micobacteria a través de la fagocitosis, funcionan como células presentadoras de antígeno y pueden definir el curso de la respuesta inmune celular. Se ha visto que *MTB* interfiere con la maduración del fagosoma bloqueando la fusión fagolisosomal promoviendo su supervivencia dentro del macrofago alveolar (13).

Las células dendríticas reconocen, capturan y procesan antígenos haciendo posible la presentación de antígenos en el contexto del MHC y de la molécula CD1 a las células T. A las células dendríticas se les unen los antígenos de *MTB* vía varios receptores como los de lectina, Fc o DC-SIGN. Una vez que los antígenos han sido captuados e internalizados, las células dendríticas maduran y migran eficientemente a nódulos linfoides periféricos en donde inducen la maduración de las células T hacia patrones Th1 o Th2. [12]

El patrón Th1, necesario para el control de un organismo intracelular como MTB, está caracterizado por la producción de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 y TNF- α . [7]. El patrón Th2, que es deletérea en la infección por MTB se caracteriza por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, y TGF- β [13].

Como resultado de la presentación antigénica, los linfocitos T CD4+ son activados y empiezan a producir IFN- γ [14]. Esta citocina es de gran importancia por su capacidad de incrementar la función microbicida de macrófagos al activarlos e incrementar la producción de moléculas del estallido respiratorio que hacen a esta célula más eficaz en la eliminación de la micobacteria [15].

Otra citocina de importancia es IL-1, que es producida por macrófagos, y promueve la producción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 con la subsecuente expansión clonal de los linfocitos T CD4+ [16].

Además de los linfocitos CD4+, otra fuente importante de IFN- γ la constituyen los linfocitos CD8+. Estos reconocen antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas de MHC de clase I, y además, tienen funciones citotóxicas sobre las células infectadas a través de un mecanismo dependiente de gránulos [17].

El factor de necrosis tumoral, (TNF- α), es el mediador principal de la respuesta inflamatoria inducida por MTB. La principal fuente de TNF- α son los macrófagos activados, aunque también puede ser secretado en pequeña cantidad por linfocitos T activados. Una de las funciones más importantes del TNF- α es la de inducir la formación del granuloma. Esta es una estructura de contención de las micobacterias, las que se encuentran rodeadas de células dendríticas, macrófagos, linfocitos activados y células B; se cree que el granuloma constituye un mecanismo de defensa para evitar la propagación de la infección [18]. El TNF- α induce la expresión de ciertas quimiocinas que son factores quimiotácticos que reclutan células del sistema inmunológico al sitio de infección [19].

Si la respuesta inmune no logra contener a las micobacterias dentro del granuloma o si los macrófagos no son capaces de destruirlas a través de la fagocitosis, se favorece una respuesta tipo Th2. Esta permite una diseminación de las micobacterias a todo el organismo a través de la sangre lo cual hace difícil el control de esta infección, causando más frecuentemente la muerte [20] .

Tratamiento contra la tuberculosis

Los medicamentos para tratar la tuberculosis se clasifican en dos grandes categorías. Los compuestos de primera elección combinan el máximo nivel de eficacia con un grado aceptable de toxicidad; incluyen isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida. Cuando las micobacterias muestran resistencia a alguno o varios de los fármacos de primera elección se necesita recurrir a fármacos de segunda elección como ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido amino salicílico, cicloserina, amikacina, kanamicina y capreomicina que pueden causar mayor grado de toxicidad que los de primera elección y resultan menos eficientes [22].

La duración del tratamiento antifímico es de aproximadamente 6 meses. Se divide en una primera fase intensiva que dura 2 meses, durante la cual se administra isoniazida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida y en la cual se elimina a la mayor parte de las micobacterias. La segunda fase dura aproximadamente 4 meses y en esta se administra isoniazida y rifampicina, durante esta etapa se persigue matar a las micobacterias remanentes, cuyo metabolismo esté reducido y que son las responsables de la latencia de esta infección [23].

La isoniazida interfiere con la producción de los ácidos micólicos en la micobacteria que son indispensables para la estructura de su pared celular. El uso de la isoniazida reduce la carga bacteriana aproximadamente un tercio de logaritmo por día después de los primeros dos días de tratamiento [24].

La rifampicina actúa inhibiendo a la subunidad beta de la RNA polimerasa dependiente de DNA de la micobacteria, con lo que se detiene el comienzo de la formación catenaria en la síntesis de RNA. Es uno de los fármacos más eficaces

de los que se dispone ya que tiene la capacidad de esterilizar rápidamente las lesiones tuberculosas [25].

El etambutol es tuberculostático y se ha demostrado que afecta el metabolismo de los ácidos nucleídos e inhibe específicamente la arabinosil transferasa de la micobacteria, impidiendo la formación de arabinogalactosa y del lipoarabinomanano, que son elementos básicos que forman parte de los glicolípidos dominantes de la envoltura de *M. tuberculosis*. Se ha visto que suprime la proliferación de casi todos los bacilos tuberculosos resistentes a la isoniazida y a la estreptomycinina [25]. En la figura 2 se muestra un esquema del mecanismo de acción de los fármacos antifímicos.

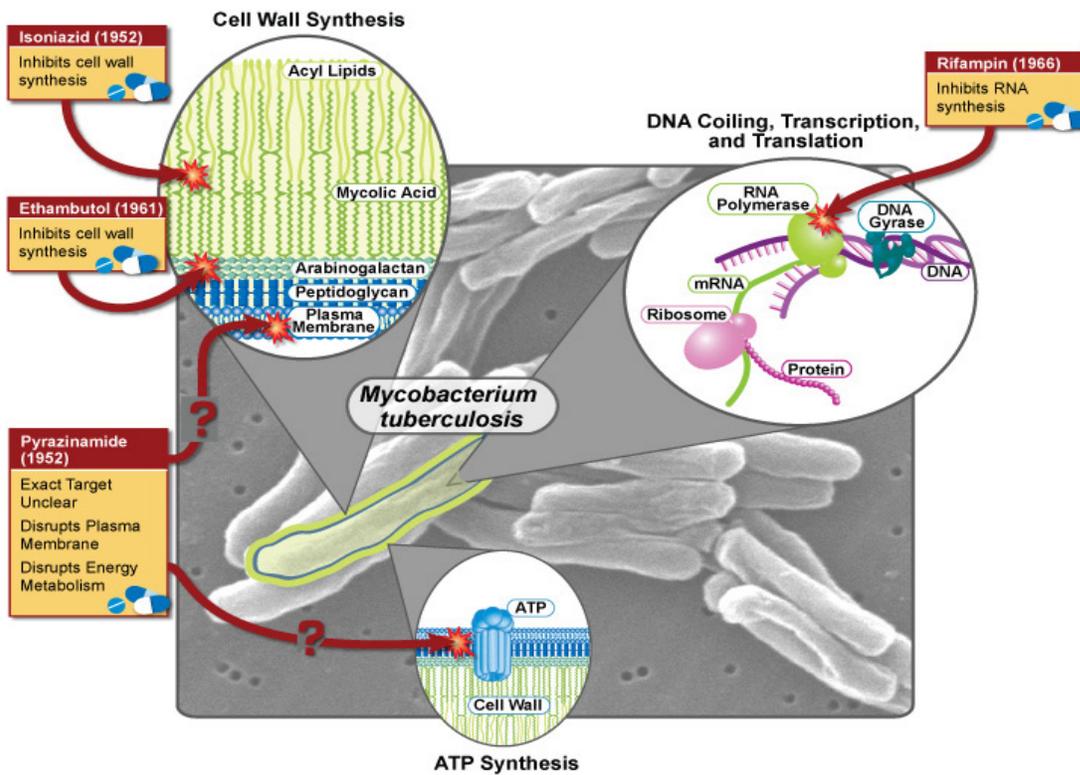


Figura 2. Mecanismo de acción de los principales fármacos antifímicos.

La infección por VIH

Características generales del virus de la inmunodeficiencia humana

El VIH es miembro del género lentivirus, perteneciente a la familia Retroviridae. Se caracteriza por tener: a) un genoma compuesto de dos cadenas idénticas de ARN, b) una estructura génica organizada por tres genes poliprotéicos llamados grupo antígeno específico (*gag*), polimerasa (*pol*) y envoltura (*env*), y c) un ciclo replicativo después de una etapa de transcripción inversa, en el que el genoma viral transcrito a ADN, se incorpora al material genético del hospedero. Los lentivirus, además de los genes estructurales de los retrovirus, se caracterizan por presentar una combinación compleja de genes accesorios o genes no estructurales y por tener largos periodos de latencia clínica durante la infección [26].

El VIH es un virus envuelto, la partícula es de forma icosaédrica de 110 nm de diámetro. Posee cerca de 72 espículas en su superficie que constan de dos glicoproteínas llamadas gp120 y gp41 codificadas por el gen *env*. La forma y la integridad de los viriones está dada por los productos del gen *gag*. En la nucleocápside se encuentra el genoma viral que tiene una longitud aproximada de 9.2 kb el cual está compuesto de dos cadenas simples/positivas de ARN. La nucleocápside contiene todos los componentes necesarios para la replicación: dos copias idénticas de ARN genómico, un ARN de transferencia reclutado durante el proceso de liberación del virión y tres enzimas llamadas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa que se codifican en las secuencias *pol* [27, 28].

En la figura 3 se esquematiza el genoma del VIH. Las repeticiones terminales largas (LTR por sus siglas en inglés) en los dos extremos del genoma regulan la integración del virus en el genoma del hospedero, la expresión de los genes y la replicación del virus. El VIH posee asimismo otros seis genes: *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*, cuyos productos regulan la reproducción vírica de varias formas y contribuyen a la patogénesis [26].



Figura 3 Esquema del genoma del VIH.

Mecanismo de replicación del VIH

Las células blanco del VIH son las células T CD4+. Al principio de la infección su principal blanco lo constituyen las células de memoria efectoras activadas y hacia la fase avanzada de la infección parece cambiar su tropismo hacia células vírgenes [29].

En la figura 4 se esquematiza el ciclo de replicación del VIH que se describirá a continuación. El mecanismo de entrada a la célula comienza con el reconocimiento del receptor de membrana CD4 por medio de la glicoproteína gp120. Posteriormente ocurre un cambio conformacional que expone gp41 que reconoce al correceptor CCR5 o al CXCR4, provocando que la membrana viral y celular se fusionen [27].

Una vez fusionadas las membranas, la cápside es liberada al citoplasma celular. En él, el complejo de retrotranscripción promueve la síntesis del ADN viral; la proteína viral Vif ayuda a mantener la estabilidad del complejo. Una vez completa la síntesis del ADN viral por medio de la RT, se forma el complejo de preintegración que viaja al núcleo. Ya dentro del núcleo, la adecuada integración del ADN viral al ADN celular está mediada por la integrasa. Al ADN viral integrado en el ADN celular se le conoce como provirus [28].

El inicio de la transcripción de los genes del VIH en los linfocitos T está relacionado con el estado de activación de la célula por antígenos o citocinas.

Para que se expresen los genes del VIH se necesita la presencia de la proteína Tat, que actúa como transactivador, uniéndose a una secuencia corta de RNA al extremo 5' del transcrito de RNA. Los ARN mensajeros virales que codifican las diversas proteínas del virus proceden de una sola transcripción completa del genoma la cual es sometida a varios procesos de corte y empalme ("splicing"). La expresión de los genes del VIH puede dividirse en una fase temprana, durante la cual se expresan los genes reguladores, y una fase avanzada, en la que se expresan los genes estructurales y se empaquetan los genomas virales completos [28, 30-33].

El ensamblaje de las partículas víricas infecciosas requiere del empaquetamiento del ARN completamente transcrito en el interior de un complejo formado por las proteínas nucleares *gag* y las enzimas codificadas por *pol* necesarias para el siguiente ciclo de integración. Este complejo nucleoprotéico se rodea de membrana y es liberado de la célula mediante gemación a partir de la membrana plasmática. Una vez que la partícula viral ha sido liberada al espacio extracelular la nueva partícula vírica comienza su maduración en donde la enzima proteasa acaba de cortar las cadenas de poliproteína del VIH en proteínas individuales que se combinan para formar un nuevo virus funcional e infeccioso [28, 30-33].

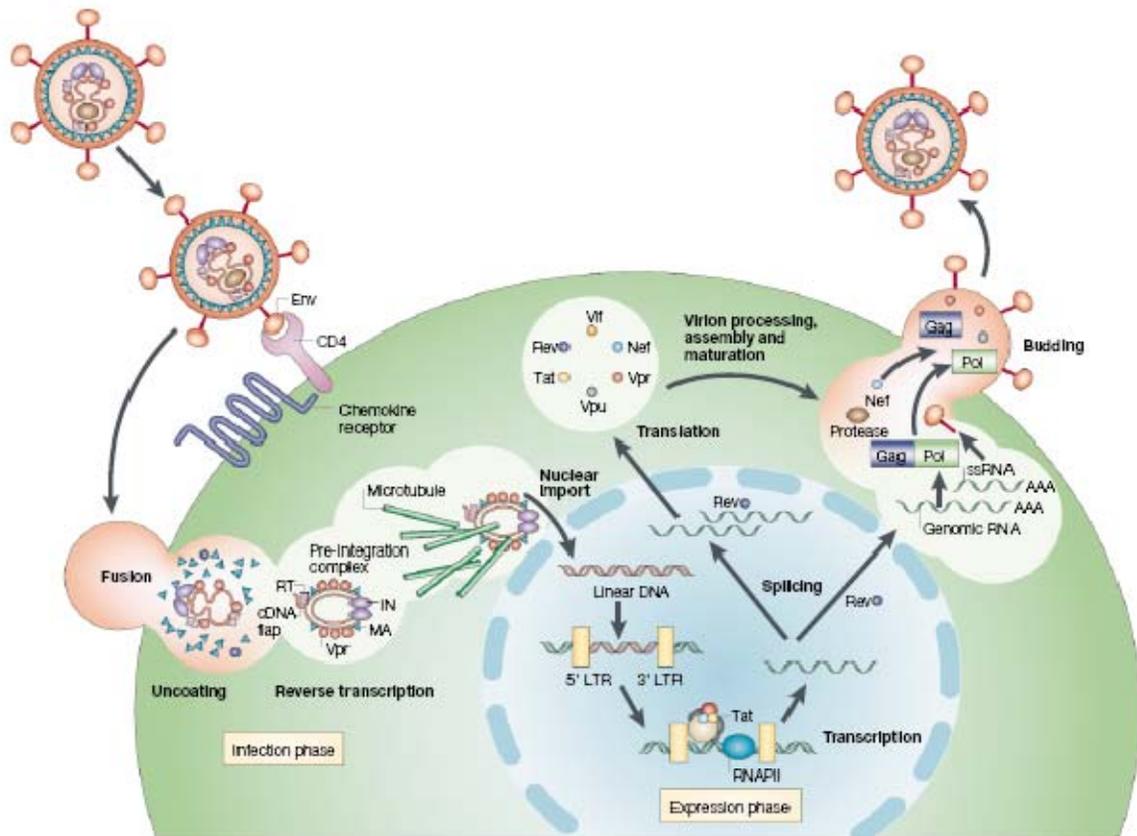


Figura 4. Ciclo de replicación del virus de inmunodeficiencia humana.

Epidemiología del VIH

El VIH continúa siendo un problema de salud mundial de una magnitud sin precedentes. Desconocido hace 30 años, el VIH ya ha provocado un estimado de 25 millones de fallecimientos en todo el mundo y ha generado profundos cambios demográficos en los países más afectados [34].

Los datos epidemiológicos internacionales más recientes muestran que en algunos países de Asia, América Latina y África subsahariana, el número anual de nuevas infecciones producidas por el VIH se encuentra en ligera disminución. También ha disminuido la tasa estimada de fallecimientos por SIDA, en parte como resultado del éxito alcanzado en la ampliación del acceso a los medicamentos antirretrovirales en lugares de recursos limitados [35].

La OMS reportó en el 2008 que 33 millones de personas vivían con el VIH en todo el mundo [34]. El número anual de nuevas infecciones por el VIH disminuyó de 3.0 millones en 2001 a 2.7 millones en 2008. En total, 2 millones de personas fallecieron a causa del SIDA en 2008, mientras que las estimaciones para 2001 fueron de 1.7 millones. El número total de personas que viven con el VIH ha ido aumentando de manera uniforme debido a las nuevas infecciones que ocurren cada año, a los tratamientos que prolongan la vida y a que las nuevas infecciones superan en número a los fallecimientos provocados por el SIDA [34].

África meridional continúa soportando una parte desproporcionada de la carga mundial de VIH: En 2008, el 35% de las infecciones por el VIH y el 38% de los fallecimientos por SIDA se produjeron en esta subregión. En conjunto, África subsahariana alberga al 67% de todas las personas que viven con el VIH [34].

Las mujeres representan la mitad de las personas que viven con el VIH en todo el mundo, y más del 60% de las infecciones por el VIH en África subsahariana. Durante los últimos 10 años, la proporción de mujeres que viven con el VIH, ha permanecido estable a nivel mundial, pero ha crecido en muchas regiones. Los jóvenes entre 15 y 24 años representan el 45% estimado de las nuevas infecciones por el VIH en todo el mundo [34].

En México se estima que cerca de 200,000 personas viven con VIH. El número de casos nuevos se han mantenido constantes alrededor de 5,000 casos por año desde el 2006. Los estados con mayor número de casos son: el Distrito Federal, Estado de México, Veracruz y Jalisco según el reporte del 2009 lo cual probablemente se explique en términos de la densidad poblacional de estas entidades federativas [36].

La epidemiología en México es distinta a las tendencias observadas en otros países del mundo, en donde, la cantidad de hombres y mujeres infectados tienden a la misma proporción. Según el reporte 2009, 4.5 hombres por cada mujer están

infectados con VIH en nuestro país y la mayoría de ellos en edad productiva entre 15 y 40 años. Los fallecimientos atribuidos al VIH-SIDA en México según el reporte 2009 son de 5.151 casos acumulados [37].

Historia natural e inmunopatogénesis de la infección por VIH

Para su estudio, se ha dividido a la historia natural del VIH temporalmente en 3 etapas: aguda, crónica y SIDA, y cada una de ellas está caracterizada por diversos fenómenos que describiré a continuación. En la figura 5 se ilustra la historia natural de la infección por VIH.

Durante la etapa aguda, uno de los primeros fenómenos que se han descrito es una pérdida de casi el 50% de los linfocitos T CD4+ de memoria efectora CCR5+ en el cuerpo [38]. Esta disminución coincide temporalmente con un pico en la replicación viral que está acompañado por un aumento en la expresión de marcadores de activación inmune (CD38 y HLADR) en las células T y de citocinas proinflamatorias en el plasma [39].

Un fenómeno importante en VIH lo constituye la dinámica de las subpoblaciones linfocitarias. Existen dos subpoblaciones principales de los linfocitos T CD4+ y CD8+: células vírgenes al antígeno es decir, que nunca han estado en contacto con ningún antígeno y células de memoria que si han estado en contacto con el antígeno. Las células de memoria se dividen en dos grande grupos: las células de memoria central (MC) que circulan dentro del tejido linfoide secundario a través de la sangre y la linfa y expresan CCR7 y CD62L los cuales permiten el trafico al tejido linfoide y la recirculación. Por exposición al antígeno, estas células producen rápidamente citocinas, reducen su expresión de CCR7, proliferan y se ubican en los órganos periféricos volviéndose células de memoria efectoras (ME). Las células ME, migran de los tejidos linfoides secundarios hacia sitios efectores, tales como el intestino, la lamina propia y el epitelio; estas células carecen de CCR7 y CD62L, permanecen en el sitio de infección microbiana para combatir al organismo a través de la secreción de citocinas y moléculas citotóxicas, pueden responder activamente al antígeno, y al activarse, se transforman en células

efectoras terminales de vida corta. Estas células efectoras terminales, después de la reducción del antígeno, sobreviven alrededor de una semana y algunas se convierten en células MC [40].

El daño a la superficie de la mucosa gastrointestinal ocurre como uno de los primeros fenómenos de depleción de los linfocitos T CD4+, ya que es este sitio, el que contiene mayor cantidad de los linfocitos T susceptibles a la infección por VIH. [41-43]. Esta depleción no compromete inicialmente la capacidad regenerativa del sistema inmune porque las células vírgenes y algunas células T de memoria central suplen a las células perdidas por la infección [44].

La aparición de la respuesta inmune antiviral, mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8+ del huésped, marcan la entrada a la fase crónica de la infección, esta respuesta del huésped para controlar la infección, coincide con la caída en la carga viral en plasma [45, 46]. Los niveles de activación inmune continúan aumentando, sin embargo, en la etapa crónica de la infección ocurre a una menor tasa [39, 47].

La pérdida de linfocitos T CD4+, que se produjo en la fase aguda, se mantiene y continúa aumentando durante la fase crónica de la infección. Existen múltiples modelos que han tratado de explicar porque esta linfopenia no puede revertirse a lo largo de la infección, estos son: a) la muerte de estas células es inducida por el virus, b) la destrucción por el sistema inmune de las células infectadas, y c) apoptosis asociada a una discapacidad para la producción de nuevos linfocitos [47, 48].

En vista de la pequeña proporción de las células T CD4+ que están infectadas por el VIH [49, 50], la muerte celular debida a la infección viral (efecto citopático directo) y/o mediada por mecanismos inmunes, como los linfocitos citotóxicos, no serian suficientes para explicar la rápida pérdida de linfocitos T CD4+ que ocurre en los individuos infectados con VIH. La apoptosis representa un mecanismo más importante para explicar la depleción, no sólo de los linfocitos T CD4+, sino también de los CD8+ [51, 52].

Con respecto a la teoría de una discapacidad para la producción de nuevos linfocitos, se sabe que el VIH disminuye la maduración de las células vírgenes en el timo, además, las glicoproteínas de la envoltura del virus así como las citocinas pro inflamatorias suprimen las células progenitoras de la médula ósea [47]. Se ha observado una reducción en el número y defectos en la proliferación de células vírgenes en la fase aguda de la infección por VIH, así como, una disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras en estas células [53]-[54-56].

Además de las vírgenes otras células parecen jugar un papel en la pérdida de la capacidad proliferativa mencionada. Las células de ME parecen tener una vida media menor y por ello dependen de las células de MC para su incorporación en la circulación. Se ha encontrado que las células de MC se encuentran en ciclo celular con frecuencia y que estas células son más susceptibles a morir que las que no están en ciclo. Todos estos hallazgos soportan la idea de que una deficiencia en la capacidad regenerativa de las células T podría estar implicada en la progresión final a SIDA [57-59].

Cuando comienzan a presentarse infecciones oportunistas en los individuos infectados, se dice que el paciente ha entrado a la etapa de SIDA. La respuesta inmune inflamatoria a infecciones oportunistas provee un ambiente en el que hay mayor expresión de moléculas coestimuladoras y mayor secreción de citocinas pro inflamatorias. Este ambiente aumenta la activación celular propiciando la replicación viral [60-62]. En esta etapa prácticamente desaparecen los linfocitos T CD4+.de circulación

Durante el tratamiento antirretroviral altamente activo ocurren cambios que repercuten de forma importante en la dinámica viral y celular y conllevan una reducción en la activación inmune, la secreción de citocinas pro inflamatorias disminuye, los linfocitos T CD4 y CD8 y los correceptores CCR5 y CXCR4 aumentan y la expresión de las moléculas de adhesión disminuyen [63-65].

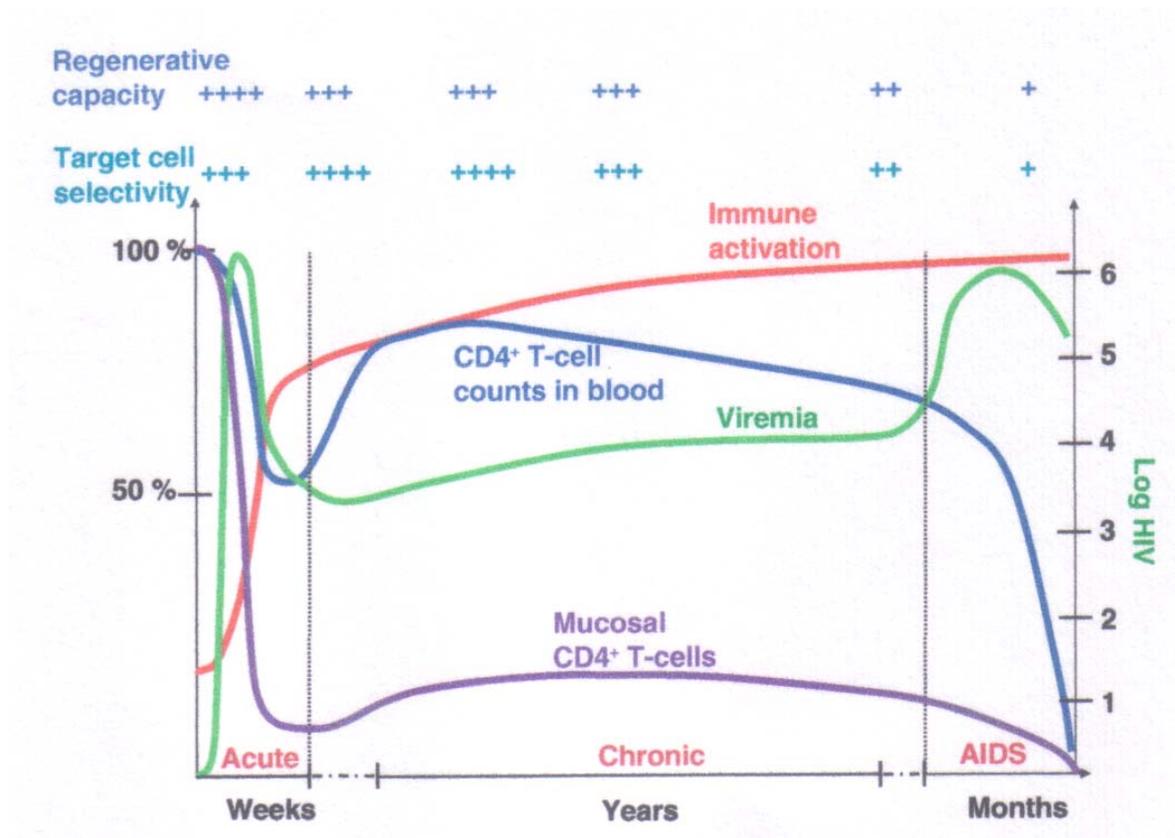


Figura 5. Historia natural de la infección por VIH.

Activación inmune y VIH

El mecanismo mediante el cual el HIV induce la disfunción inmunológica que llevan hasta el SIDA ha sido un tema de intenso estudio desde el descubrimiento del virus a principios de 1980. La pequeña proporción de células infectadas ha sugerido que el virus, por si mismo, es incapaz de inducir SIDA y que existían factores adicionales que debían jugar un papel determinante en las disfunciones inmunológicas asociadas al VIH [66].

En estos años de ardua investigación comenzaron a surgir indicios correlativos y posteriormente estudios más cercanos a lo causal que apuntaban a la activación inmune como un candidato responsable de estas disfunciones no explicables por el virus.

La activación inmune puede medirse en las células T por la alta frecuencia en la expresión de marcadores de activación (CD38 y HLADR) [67, 68] y entrada a ciclo celular (Ki67) [69], y por altos niveles de apoptosis de las células no infectadas [70].

CD38 es una glicoproteína de 49kDa que se codifica en el cromosoma 4 y cuyo ligando es CD31. Es una ectoenzima multifuncional que cataliza la síntesis e hidrólisis de ADP-Ribosa cíclica. Se le ha implicado en múltiples procesos biológicos como la maduración celular, la regulación del flujo de calcio intracelular, síndromes metabólicos y la activación inmune. HLA-DR es una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II que se codifica en el cromosoma 6. Es un receptor de superficie celular encargado de la presentación de antígenos proteicos de 9 aminoácidos o mayores y que es ligando del receptor de células T (TCR). Se le ha involucrado en la susceptibilidad o resistencia a infecciones y se sobreexpresa en la superficie de las células que han sido estimuladas, por lo que se considera un marcador de activación, especialmente de las células T [72-74].

La activación inmune de las células T está asociada con un aumento en la apoptosis. Ocurre no solo en las células infectadas o específicas de VIH, sino que también se observa en células no infectadas con especificidad diferente a VIH [51, 53, 75].

Con respecto a la proliferación estudios *in vitro* han mostrado que las células de individuos recientemente infectados y de monos que no son hospederos naturales de la infección por VIH proliferan más, comparadas con individuos o monos no infectados. Esta proliferación no se restringe a las células T CD4 y CD8 específicas de VIH, sino que es generalizada a todas las células T cualquiera que sea su especificidad [47, 76]. Conceptualmente, la proliferación de las células T podrían reflejar un proceso homeostático en respuesta a las células destruidas por el virus, por estimulación antigénica o señales por citocinas pro inflamatorias, en el caso de la infección por VIH, todos estos factores podrían estar participando.

Uno de los primeros estudios que resaltaron la importancia de la activación inmune, mostró que durante la fase crónica de la infección por VIH se expresaban altos porcentajes de CD38 en células T CD8+ lo que predecía la evolución a SIDA por lo que CD38 se considera el mejor indicador del estado de las células CD4 y de la carga viral en plasma [77].

Otra evidencia de la importancia de la activación inmune es que esta parece distinguir al virus patogénico del no patogénico en la infección por el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV). Los macacos Rhesus, que no son hospederos naturales, pero que pueden infectarse con un SIV, experimentan un dramático aumento en la activación inmune de las células T, una depleción rápida de las células T CD4+, progresión a SIDA y muerte. Al contrario, el mangabey ahumado (*Cercocebus atys*) o los monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*), los hospederos naturales del SIV, muestran un incremento mínimo en la activación de las células T a pesar de los altos niveles en la replicación viral, en la mayoría de los casos no presentan pérdida de linfocitos T CD4+, y pocas veces progresan a SIDA [78].

Se le han atribuido a la activación inmune fenómenos tales como facilitar la infección de las células T CD4 [62]. Se sabe que la activación inmune promueve la expresión de CCR5 incrementando la infectividad de las células que lo expresan, así pues, la activación inmune crónica funciona como sustento de la replicación viral, proveyendo células blanco para la replicación del VIH [47].

También se le ha atribuido a la activación inmune la destrucción de la arquitectura de los nódulos linfoides. Al ser un sitio de replicación viral elevada, ocasiona la presencia de estímulos inflamatorios (anticuerpos, citocinas, quimiocinas, células T CD8 produciendo moléculas citotóxicas, moléculas de adhesión etc.), que al destruir a las células infectadas, también ocasiona daño al tejido linfoide que se caracteriza por la depósitos de colágena, fibrosis, y en las fases avanzadas, atrofia de los ganglios [61, 79, 80].

Se sabe que durante la infección por VIH la proporción de las distintas subpoblaciones de células T vírgenes, MC y ME, anteriormente descritas, se ven alteradas [81]. Este fenómeno parece estar relacionado con la activación inmune ya que al haber concentraciones elevadas de citocinas inflamatorias, antígenos del virus, expresión de marcadores de activación y apoptosis, se estimula a las células vírgenes y MC a diferenciarse más rápidamente, disminuyendo su tiempo de vida media con lo que el sistema inmune gradualmente va perdiendo la capacidad de regenerar de forma homeostática las células muertas por la infección de forma directa o indirecta [57, 82].

Existen evidencias correlativas de que la activación inmune puede resultar en una respuesta reducida a antígenos para los cuales ya se había generado memoria o específicos del virus. Esta respuesta reducida hace a las células T incapaces de responder a un antígeno al producir moléculas citotóxicas, citocinas o de proliferar en respuesta a éste [68]. Otro fenómeno que se ha descrito en la infección por VIH es la senescencia, que consiste en el envejecimiento prematuro de las células, reduciendo con ello, su capacidad de respuesta y proliferación [83].

Estudios recientes demuestran que los productos microbianos circulantes (LPS entre otros), que derivan de una translocación bacteriana del tracto gastrointestinal después del deterioro inicial de las mucosas, podrían ser una causa de la activación inmune generalizada. Se encontró una correlación entre la cantidad de LPS en plasma y la frecuencia de células T CD8+ que expresan marcadores de activación (CD38 y HLADR) en sangre de simios infectados con SIV [43, 84].

Otros datos muestran la importancia de la activación inmune específica de VIH a través de la estimulación de los receptores tipo Toll (TLR). Estas son proteínas de superficie que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Esta respuesta específica es benéfica ya que suprime la replicación viral, pero, puede servir como fuente de activación inmune crónica una vez que los virus han mutado causando activación inespecífica exacerbada [28].

Existen evidencias que muestran que a pesar de que los TLR 7/8 están asociados con una carga viral menor, su mayor expresión se refleja en un avance más rápido a SIDA [85].

La activación conocida como “bystander” es causada por una producción incrementada de citocinas pro inflamatoria inducidas por células dendríticas y linfocitos. El mecanismo de esta activación tipo “bystander” todavía se encuentra en estudio [86], pero implica receptores diferentes del receptor de células T y su papel en la infección por VIH parece tener gran relevancia.

Las infecciones oportunistas provocadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, que se presentan durante la última etapa de la infección por VIH, también contribuyen de manera importante a la activación inmune a través de sus antígenos, la estimulación de TLR y la producción de citocinas y quimiocinas [28].

Tratamiento Antirretroviral Altamente Activo (HAART)

Hasta el día de hoy la infección por el VIH no es curable, sin embargo, el virus puede ser controlado con tratamientos farmacológicos. Se dispone de cinco clases de fármacos antirretrovirales que actúan en puntos específicos del ciclo de replicación viral: Inhibidores de la transcriptasa inversa viral análogos de Nucleósidos (NRTIs), inhibidores no análogos de Nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTIs), inhibidores de la proteasa viral (PIs), inhibidores de la entrada del virus a la célula blanco (de fusión y antagonistas de CCR5) y un inhibidor de la Integrasa. Actualmente se utilizan más de 20 fármacos[28].En la figura 6 se esquematiza el sitio de acción de los fármacos antirretrovirales.

Los inhibidores de la transcriptasa inversa (NRTIs) actúan deteniendo la producción del DNA viral al competir con los Nucleótidos utilizados por la polimerasa inversa viral [28].

Los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de Nucleósidos (NNRTIs) actúan bloqueando el bolsillo hidrofóbico dentro del dominio de la polimerasa de la subunidad p66 de la transcriptasa inversa del virus [28].

Los inhibidores de la proteasa (PIs) bloquean la acción de otra enzima del VIH, la proteasa. Esta enzima autocataliza su propia proteína precursora y luego escinde otros polipéptidos para favorecer que otras proteínas virales sean funcionales [28].

La integrasa, una tercera enzima viral, es esencial para la infección productiva del virus ayudándolo a integrar el material genético viral al del hospedero. Los fármacos inhibidores de la integrasa la bloquean [28].

Los inhibidores de la entrada bloquean el acoplamiento del receptor viral con el de la célula utilizando CD4 recombinante o compuestos que interrumpen la interacción de la proteína gp120 con la proteína de membrana CD4 [28].

Para obtener mejores resultados del tratamiento y reducir la aparición de virus resistentes se utilizan combinaciones de fármacos conocidas como Tratamiento Antirretroviral Altamente Activo (HAART, por sus siglas en inglés). Un régimen típico de HAART incluye tres fármacos: dos NRTIs y un PI o un NNRTI y este tratamiento se dará de por vida a los individuos infectados. Existen guías medicas, que están en continua mejora, que indican a los médicos el mejor momento para el inicio del tratamiento. En el 2008 se ha determinado que los pacientes con cuentas de linfocitos T CD4 por debajo de 400/ml y con infecciones oportunistas definitorias de SIDA deben comenzar a tomar tratamiento [28].

El lanzamiento de este tratamiento combinado, conocido como HAART ha disminuido en gran medida la tasa de mortalidad por SIDA y ha disminuido los síntomas clínicos de la infección por VIH. También puede reducir considerablemente los niveles virales circulantes en líquidos corporales y las células infectadas por virus tanto en sangre como en tejido linfático [87].

Algunos cambios en el tejido linfoide ocasionados por la infección por VIH pueden ser revertidos de manera favorable con el HAART. El HAART también disminuye

la activación del sistema inmune así como la apoptosis de las células CD4+ de la lámina propia [88, 89].

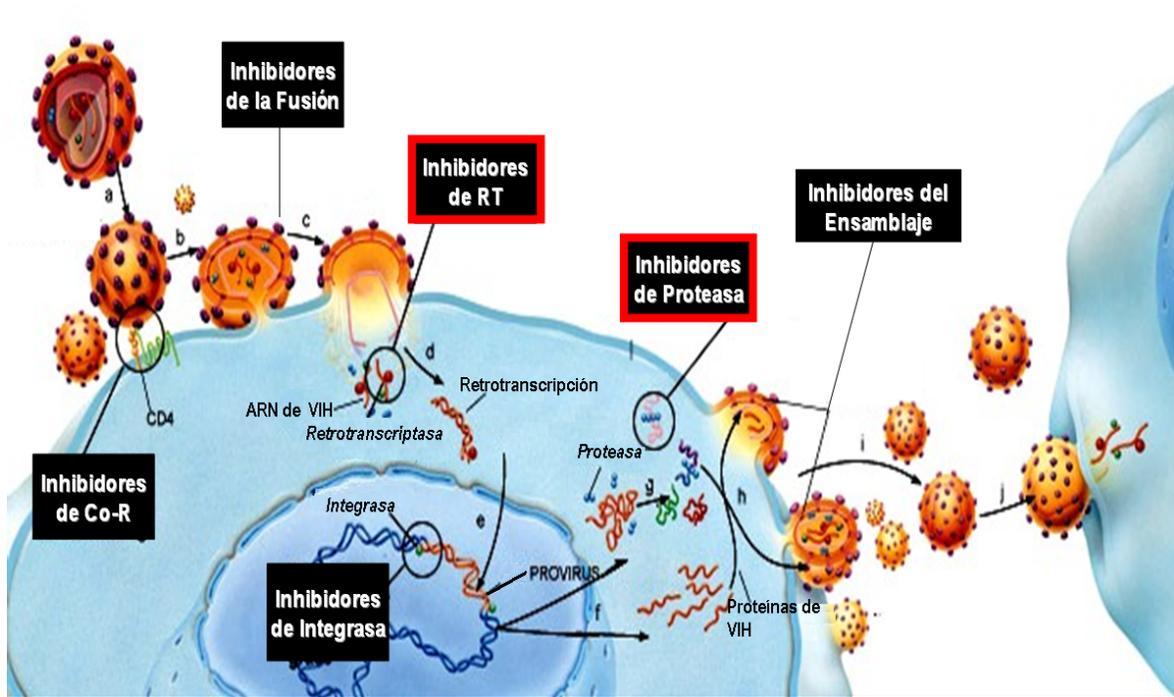


Figura 6 Sitios de acción de los fármacos antirretrovirales

Coinfección tuberculosis-VIH

Datos epidemiológicos de la coinfección tuberculosis-VIH

Tanto la tuberculosis como el VIH son considerados problemas de salud mundial importantes. Se le atribuye a la pandemia del VIH el resurgimiento de la tuberculosis en todo el mundo y los datos epidemiológicos parecen mostrarlo claramente.

La organización mundial de la salud, en su reporte del 2008, estima que en todo el mundo 33 millones de personas están infectadas con VIH, cerca de 15 millones de ellas, están coinfectadas con *MTB*, por lo que a escala mundial, la infección por *MTB* es la coinfección más común en personas infectadas por VIH, especialmente en África, en donde se estima que cerca del 60% de las personas infectadas con VIH también se encuentran infectadas con *MTB*[34, 90, 91].

Anualmente se reportan cerca de 200000 muertes por TB atribuibles al VIH por lo que se estima que una de cada tres personas que fallece infectado con VIH, fallecerá por tuberculosis [91, 92].

Demográficamente coinciden los sitios de mayor prevalencia de tuberculosis y VIH en el mundo. Más de las dos terceras partes de los individuos coinfectados se encuentra en el África Sub-Sahariana, con la mayoría del tercio restante en la India [93]. En la figura 7 se muestra la distribución geográfica de la coinfección.

Los sujetos coinfectados por VIH y *MTB* poseen un riesgo anual de reactivación de infección latente por *M. tuberculosis*, del 5-10%. Los sujetos infectados por VIH también se encuentran en riesgo más alto de desarrollar una nueva infección o reactivación por *M. tuberculosis*, en comparación a la población VIH-negativa. Asimismo, los sujetos VIH+ expuestos a *MTB* tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedad activa y menor probabilidad de desarrollar infección latente [94].

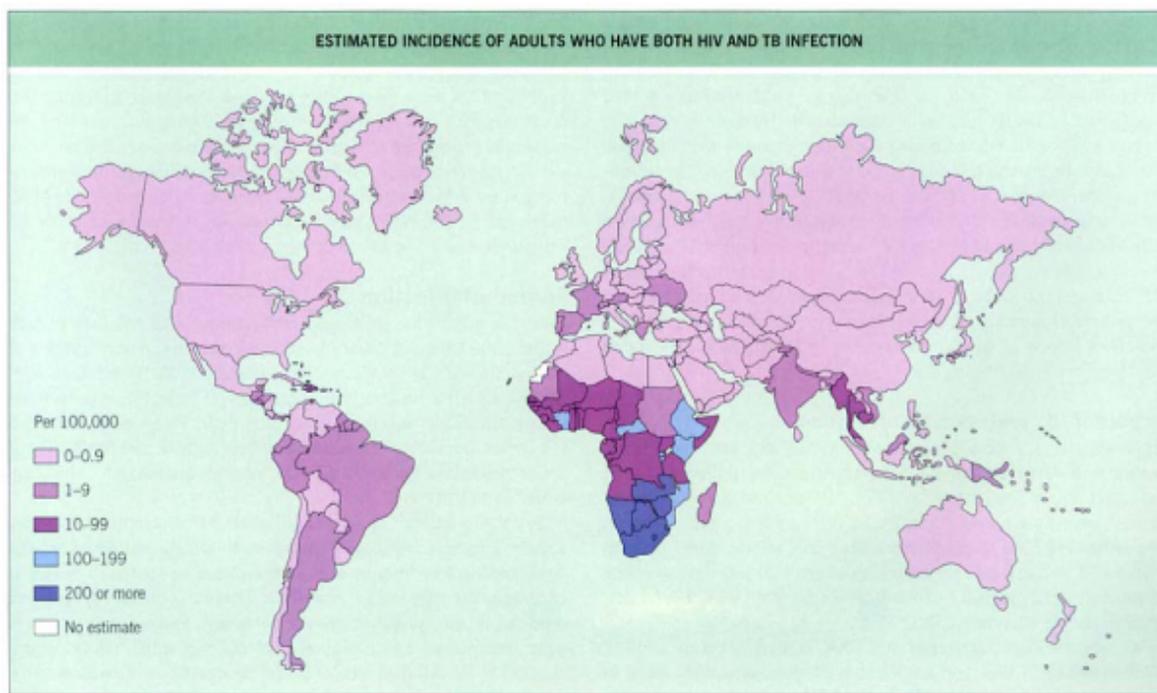


Figura 7 Distribución geográfica de la coinfección tuberculosis-VIH.

Implicaciones clínicas e inmunológicas de la coinfección tuberculosis-VIH

Existen evidencias suficientes para proponer que la infección por MTB altera la historia natural y los mecanismos patogénicos de la infección por VIH ya que ambas infecciones parecen interaccionar de tal modo que el VIH promueve la progresión de una infección por tuberculosis reciente o latente y, la tuberculosis acelera el curso de la enfermedad por VIH alcanzando la etapa SIDA en menor tiempo [90, 95].

La tuberculosis es una de las muchas infecciones bacterianas cuyo control inmune está alterado en la infección por el VIH. Es una infección con características especiales ya que a diferencia de otras infecciones oportunistas, que ocurren frecuentemente en la fase SIDA y con niveles bajos de CD4, la tuberculosis puede ocurrir a cualquier nivel de inmunodeficiencia y ha sido claramente asociada con alta carga viral, morbilidad y mortalidad mayor que otras infecciones [96, 97].

La carga viral es un indicador clínico de importancia y se ha visto que en los pacientes coinfectados, esta es significativamente mayor comparado con pacientes VIH positivos sin TB. Esta diferencia es más evidente en niveles de CD4 por arriba de las 500 células/ μ L. En individuos coinfectados se ha observado que la carga viral se eleva cuando se diagnostica la tuberculosis y que permanece comúnmente elevada durante el tratamiento antituberculoso [98].

Se ha observado en modelos in vitro, que MTB inhibe las funciones específicas de los linfocitos T CD4 y CD8 [99, 100].

Otro parámetro de importancia es la supervivencia, y algunos estudios muestran que los individuos con doble infección por MTB y VIH presentan una menor supervivencia que los que tienen sólo VIH o solo tuberculosis [95, 96].

Las infecciones oportunistas tienen gran relevancia durante la patogénesis de la infección por VIH. Se ha observado que los pacientes coinfectados presentan más enfermedades oportunistas [101] y que cuando reciben profilaxis con isoniazida,

no sólo presentan una menor incidencia de tuberculosis activa, sino también de otras infecciones oportunistas, además de una menor mortalidad [102].

Los sujetos VIH+ tienen mayor probabilidad de desarrollar infección por *M. tuberculosis* en sitios extrapulmonares. Estos individuos son incapaces de formar granulomas para contener la infección y entonces ocurre la diseminación, motivo por el cual, el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes es más complicado [94, 103].

El tratamiento farmacológico de los pacientes coinfectados representa un problema importante debido a varias razones. Entre ellas destacan a) las interacciones medicamentosas que existen entre los principales fármacos (La rifampicina interactúa con el citocromo p450 ocasionando la metabolización acelerada del efavirenz por lo que disminuye su concentración en sangre) [104] b) la posibilidad de desarrollar el síndrome inflamatorio por reconstitución inmunitaria (SIRI, que es un fenómeno inflamatorio exacerbado que ocurre cuando se reconstituyen las respuestas inmunes celulares ante los antígenos microbianos) [105] y c) que no existen lineamientos consenso que muestren claramente las ventajas de tratar primero la tuberculosis y posteriormente administrar antirretrovirales, las dosis y tiempo durante el cual se debe de administrar [24].

En términos de activación inmune, se ha visto que durante la coinfección por MTB y VIH hay un aumento en la expresión de marcadores de activación en las células T, incluso mayores que tener cada una de estas infecciones por separado [106, 107]. Se ha visto que el tratamiento anti TB (sin HAART) disminuye sólo marcadores solubles de la activación [108, 109].

Existen resultados contradictorios con respecto a si la tuberculosis es capaz o no de aumentar la replicación viral. Estudios *in vitro* muestran que MTB puede inhibir la replicación del VIH en monocitos/macrófagos, mientras que otros estudios muestran que los pacientes coinfectados tienen cargas virales mayores que los que solo están infectados con VIH [110, 111].

Se pueden esperar contribuciones diversas y complejas de las distintas células del sistema inmune a la activación en los individuos coinfectados con tuberculosis y VIH. Una manera de definir estas contribuciones podría ser estudiar los cambios en diferentes marcadores celulares y solubles de activación en diferentes células al controlar a la micobacteria en pacientes con VIH.

Planteamiento del problema

Aunque actualmente se reconoce la importancia de la activación inmune durante la infección por VIH, se desconoce si esta es la causa o la consecuencia de la rápida progresión a SIDA de los pacientes coinfectados con tuberculosis, por lo que este estudio contribuye al entendimiento del papel de la activación inmune en la progresión de la enfermedad por VIH.

Hipótesis

Los linfocitos T de pacientes coinfectados con *Mycobacterium tuberculosis* y el virus de la inmunodeficiencia humana, tratados con medicamentos antifímicos presentarán:

- Una disminución en la expresión de marcadores de activación y en la proporción de las subpoblaciones memoria efectora y memoria central.
- Disminución en la entrada a ciclo celular..

Objetivos generales

Estudiar la expresión de los marcadores de activación (CD38 y HLADR) y de entrada a ciclo celular (Ki67) en pacientes coinfectados con VIH y MTB a lo largo de 8 semanas de tratamiento antifímico.

Objetivos particulares

- Evaluar durante las primeras 8 semanas de tratamiento antifímico la activación inmune (CD38 y HLADR) y entrada a ciclo celular (Ki67) de los linfocitos T de pacientes coinfectados con tuberculosis y VIH .
- Cuantificar la carga viral y los linfocitos T CD4+ en estos pacientes durante las primeras 8 semanas de tratamiento antifímico.
- Evaluar la proporción (%) y activación de las subpoblaciones linfocitarias efectoras, memoria central y vírgenes de estos pacientes en dicho periodo de tiempo.
- Evaluar parámetros clínicos de eficacia de tratamiento antifímico (peso, tos, fiebre y presencia de ganglios palpables)

Metodología

Características de los pacientes reclutados, calendario de seguimiento y muestras requeridas.

El presente trabajo es parte de un estudio clínico con muestras de pacientes que participaron en el ensayo clínico C43-06, aprobado por el Comité Científico y de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, el cual fue diseñado para determinar el mejor tiempo y orden de los tratamientos antirretroviral y antifímico. El estudio cuenta con dos brazos, en uno de ellos se inician simultáneamente los tratamientos antirretroviral y antifímico y en el otro de forma diferida, comenzando con el tratamiento antifímico intensivo por 8 semanas, seguido por el HAART.

Para este estudio se requirieron pacientes adultos con infección dual por VIH e infección por tuberculosis activa, que no se encontraran tomando tratamiento antirretroviral ni antifímico y que tuvieran indicación para comenzar a tomarlos. Previa firma del consentimiento informado, se inició tratamiento antifímico por 8 semanas (fase intensiva de tratamiento antifímico) y en la semana 8 se inició el tratamiento antirretroviral. El tratamiento farmacológico más adecuado fue elegido por los médicos tratantes para cada paciente y se basó en isoniazida, pirazinamida y etambutol.

Se tomaron muestras de 42 ml de sangre de una vena del brazo en cada una de las sesiones de toma de muestra cada 2 semanas..

A partir de la sangre se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (de sus siglas en inglés PBMC) para estudiar el fenotipo de los linfocitos T y la cuantificación de linfocitos T CD4+ y se congelaron muestras de plasma para la cuantificación de la carga viral plasmática. En las fechas indicadas se realizó un lavado bronqueoloalveolar para realizar un fenotipo posterior por citometría de flujo de las células obtenidas.

Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) por gradiente de densidad

Se obtuvieron 7 tubos de sangre periférica heparinizada los cuales fueron centrifugados a 2000rpm durante 20 min. Se les extrajo el plasma sobrenadante el cual se congelo en crioviales. El concentrado celular se diluyo 1:2 con medio Hanks (Sigma) a 37°C y se vertió suavemente sobre 10ml de Ficoll (Sigma,) para su posterior centrifugación a 2000rpm durante 20 min. Se recuperaron las células mononucleares y se lavaron en 2 ocasiones centrifugándolas a 2000rpm durante 20 min con medio Hanks (Sigma) para eliminar el lymphoprep que es toxico para las células. Las células fueron contadas al microscopio con la ayuda del colorante vital azul de tripano (Sigma) para su posterior análisis por citometría de flujo.

Determinación de Fenotipo de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) mediante citometría de flujo Multiparamétrica.

Se colocaron 1×10^6 PBMC frescas en tubos de ensayo plásticos (BD) y se lavaron 2 veces con un buffer de tinción PBA (PBS con 5% albúmina bovina (Coulter) y 0.5% de azida de sodio (Sigma). Enseguida se agregó el colorante para viabilidad LIVE/DEAD® Aqua (Invitrogen).

Se incubó 15 min. a temperatura ambiente y se lavó 2 veces con medio PBA. Se agregaron los anticuerpos conjugados con fluorocromos, previamente titulados para optimizar la señal contra el fondo de unión inespecífica: CD4/CD8-PE, CD38-PerCP-Cy5.5, HLADR- APC-Cy7, CD45RA- PE-Cy5, CD62L- APC (todos los anticuerpos fueron de BD Biosciences, San José, EUA). Se incubaron las células 15 min a 2°C y se lavaron 2 veces con PBA. Se permeabilizaron las células y se fijaron con una solución de saponina y paraformaldehido (Cytifix/Cytoperm, BD Biosciences) durante 20 min y se agregó el anticuerpo anti Ki67-FITC (BD) se incubó durante 30 min. a 2°C y se lavaron 3 veces con un PBA. Se volvieron a fijar las células con 300µL de para-formaldehido al 3%. Se midió el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias virgenes (definidas como CD45RA+CD62L+), memoria central (definidas para este estudio como CD45RA-CD62L+) y memoria efectora (definidas como CD45RA-CD62L-). Se determino el grado de activación

de las células T y de cada subpoblación por medio del porcentaje de células que expresaban los marcadores CD38 y HLADR. También se estudio la entrada a ciclo celular de las células T mediante la expresión del marcador Ki67. Se empleó un citómetro de flujo FacsARIA (BD). Como controles negativos para establecer los umbrales entre células positivas y negativas (“gating”) se emplearon controles FMO (“fluorescence minus one”; células sometidas a las mismas condiciones experimentales y teñidas con todos los anticuerpos menos el de interés) mas anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que el marcador de la variable de interés. El análisis de los experimentos fue realizado en el software FloJo 3.7. En la figura 1 se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de gating empleada.

Pruebas estadísticas

Para las comparaciones estadísticas se empleó el software Stat view. Para comparar las semanas de tratamiento se empleo una prueba de Wilcoxon y para comparar los compartimientos de LBA y sangre se utilizo una prueba U-MannWhitney.

Resultados

Se reclutaron 11 pacientes coinfectados con tuberculosis activa y VIH que no estuvieran tomando tratamiento antifímico ni HAART y que tuvieran indicación médica para comenzar a tomarlo al momento del inicio del estudio. Se logró un seguimiento completo a las semanas 0, 2, 4 y 8 con tratamiento antifímico. La tabla 1 muestra la mediana de la cuenta de linfocitos T CD4+ y CD8+ así como la mediana de la carga viral plasmática a lo largo de dicho seguimiento.

Tabla 1. Recuento de linfocitos T CD4+, CD8+ y carga viral de los 11 pacientes reclutados en las semanas de seguimiento.

Semanas de tratamiento	Células T CD4/ μ L	Células T CD8 / μ L	Copias RNA viral /mL
0	35	379	437496.1429
2	58	497	NA
4	73	602	796611.8333
8	49	495	423558.1667

Los datos mostrados corresponden a la mediana de los 11 pacientes estudiados. No se encontró diferencia estadística significativa entre las semanas de seguimiento del recuento de células T CD4+ ni CD8+. Se encontró una $p= 0.042$ entre la semana 0 y 4 de la carga viral plasmática mediana. NA= prueba no realizada.

Citometría de Flujo

En la figura 8 se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de gating empleada, en la que, a partir de células sin agregados celulares, se eligieron las células con morfología de linfocitos y de éstas, las que expresaron CD4 y estaban vivas. Se determinó el grado de activación de las células T y de cada subpoblación analizando la coexpresión de CD38 y HLADR. Se midió el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias vírgenes (CD45RA+CD62L+), memoria central (CD45RA-CD62L+) y memoria efectora (CD45RA-CD62L-). También se estudió la entrada a ciclo celular de las células T mediante la expresión del marcador Ki67.

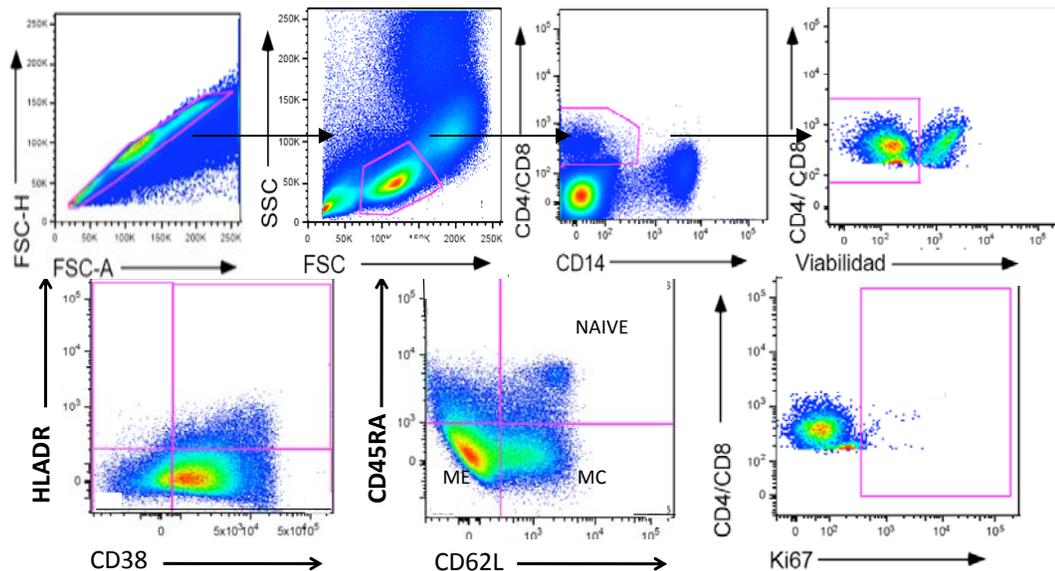


Fig 8. Estrategia de gating. Las muestras fueron analizadas con el software FloJo 3.7.1. muestra el ejemplo representativo de 1 paciente. Se eligieron las células sin agregados celulares, a partir de esas, las que tuvieron morfología de linfocitos y expresaron CD4/C y que fueran viables. A partir de la estrategia anterior se analizaron las células para expresión de marcadores de activación (CD38 y HLADR), Subpoblaciones celular (CD45RA y CD62L) o entrada a ciclo celular (KI67). Como controles de gating se emplear FMOs mas isotipos (no mostrados)

Las células T CD4+ y CD8+ de la sangre y del lavado bronquioloalveolar (LBA) en la semana basal del tratamiento no muestran diferencias en activación y entrada a ciclo celular.

Con la finalidad de saber si hay correspondencia entre el fenotipo de los linfocitos de sangre periférica y los del órgano infectado (pulmón) en términos de activación, entrada a ciclo y proporción de subpoblaciones celulares, comparamos dichas variables en sangre y células de LBA en la semana basal de tratamiento para 6 pacientes. Encontramos que en términos de activación inmune, los linfocitos T CD8+ tienden a estar más activados que los linfocitos T CD4+; sin embargo, los niveles en sangre y en LBA son prácticamente iguales ($p > 0.05$). Al estudiar el patrón de proliferación, se encontró que los linfocitos T CD4+ y CD8+ tienen un patrón de proliferación muy parecido que tiende a ser menor en LBA. En el caso de las subpoblaciones celulares, ambos compartimientos tienen un predominio de células con fenotipo de memoria efectora, con mayor proporción en el LBA.

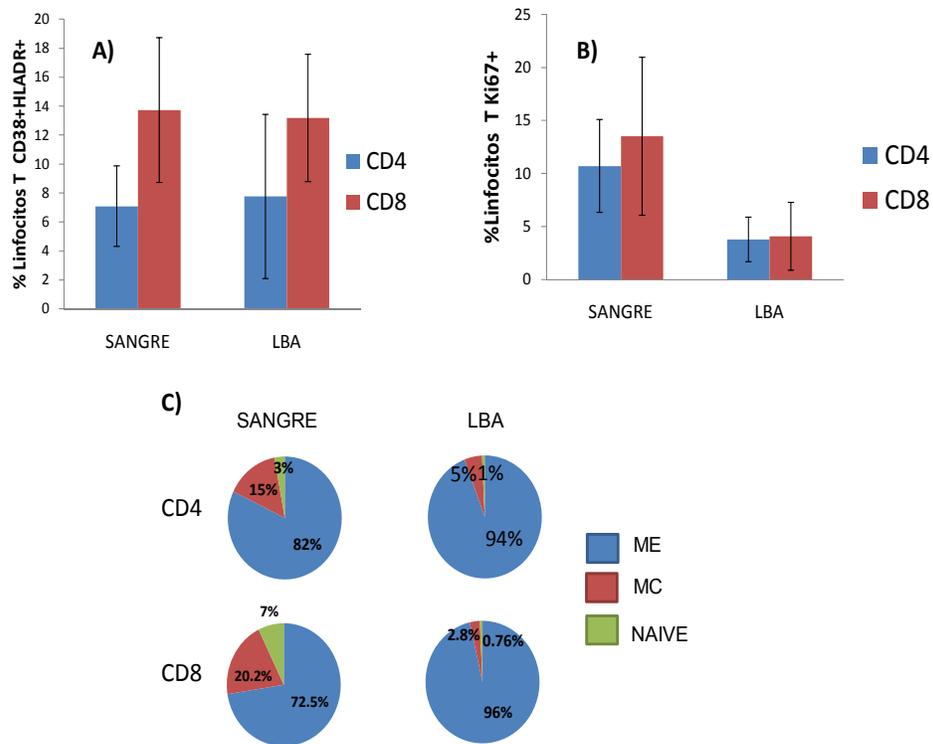


Fig. 9 Comparación entre sangre y LBA en semana basal de tratamiento antifúngico. A) co-expresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR en los linfocitos T CD4+ (azul) y CD8+ (rojo) en sangre (izquierda) y LBA (derecha) de pacientes en semana basal de tratamiento antituberculosis. **B)** Expresión del marcador de entrada a ciclo celular KI67 en las células T CD4+(Azul) y CD8+ (rojo) en sangre (izquierda) y LBA (derecha) de pacientes en semana basal de tratamiento antituberculosis. **C)** Comparación de la proporción (%) de las subpoblaciones celulares ME (Azul) MC (rojo) y naive (verde) entre los linfocitos T CD4+ (arriba) CD8+ (abajo) de sangre (izquierda) y LBA (derecha) de pacientes en semana basal de tratamiento antituberculosis. En ningún caso hubo diferencias significativas entre los grupos.

La activación inmune tiende a aumentar en las primeras 4 semanas de tratamiento antifúngico en las células T CD4+ totales.

Primero evaluamos el perfil de activación de las células T CD4+ y CD8+ mediante la coexpresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR a lo largo del tratamiento antifúngico. Encontramos una tendencia al aumento en la coexpresión de los marcadores de activación ($p= 0.0505$) durante las primeras 4 semanas de tratamiento en los linfocitos T CD4+ (Fig.10A) y que este fenómeno no ocurre en las células T CD8+ (Fig.10C). Con la finalidad de homogeneizar los datos y

disminuir la variación entre pacientes, se normalizaron los datos con respecto al valor inicial, encontrando cambios significativos entre la semana 0-4 ($p= 0.0068$) en las células T CD4+ y no en las células T CD8+ (Fig.10 B y D respectivamente)

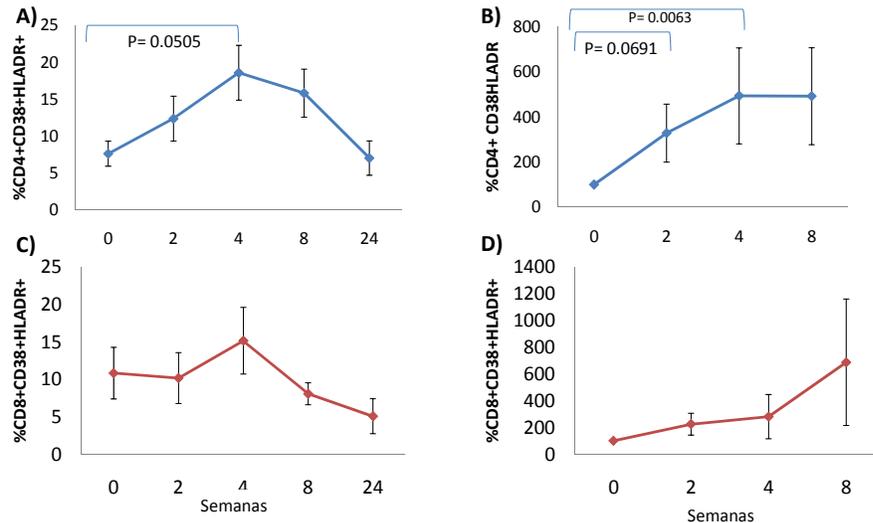


Fig.10 Seguimiento longitudinal de la activación inmune de pacientes con tratamiento antifímico. A) co-expresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR en las células T CD4+ de pacientes con tratamiento antituberculosis. B) Datos normalizados de la co-expresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR en las células T CD4+ de pacientes con tratamiento antituberculosis. C) co-expresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR en las células T CD8+ de pacientes con tratamiento antituberculosis. D) Datos normalizados de la co-expresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR en las células T CD8+ de pacientes con tratamiento antituberculosis.

La activación inmune no parecen tener efecto sobre la frecuencia de las subpoblaciones linfocitarias

Enseguida se analizó el porcentaje de las subpoblaciones celulares ME, MC y vírgenes de los linfocitos T CD4+ y CD8+ para ver si los cambios en activación inmune se reflejaban en cambios en estas debido a un reclutamiento a sitios inflamados. No encontramos cambios significativos en la frecuencia de ninguna de las subpoblaciones mencionadas (Fig. 11). También estudiamos esta variable en las células T CD8+ (Fig. 12), encontrando cambios significativos solamente entre la semana 8-24 (ya bajo tratamiento antirretroviral) en la frecuencia de las células ME que disminuyeron significativamente ($p=0.0425$) y de las vírgenes, que se incrementaron ($p= 0.0425$).

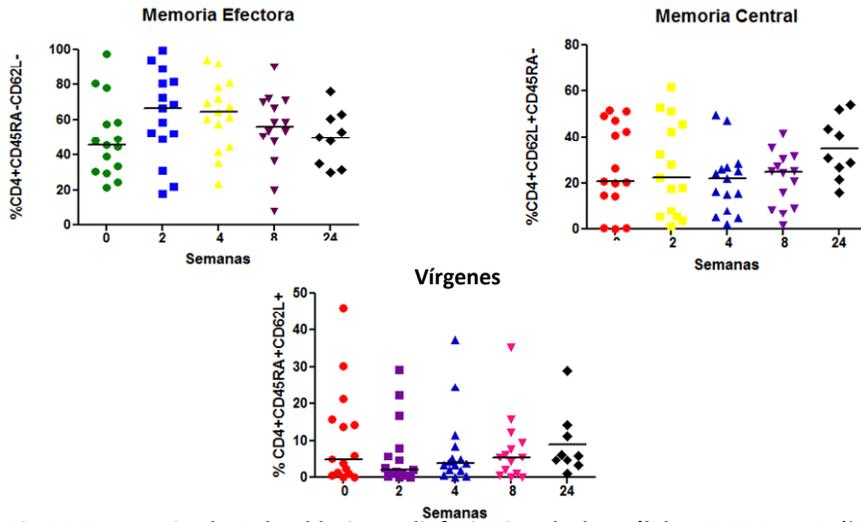


Fig.11 Porcentaje de Subpoblaciones linfocitarias de las células T CD4+. Análisis porcentual de las Subpoblaciones linfocitarias CD4+ Memoria Efectoras (CD45RA-CD62L-), Memoria Central (CD45RA-CD62L+) y naïve (CD45RA+CD62L+). No hubo diferencias significativas entre los puntos de tiempo. Todas las subpoblaciones provienen de las células T CD4+

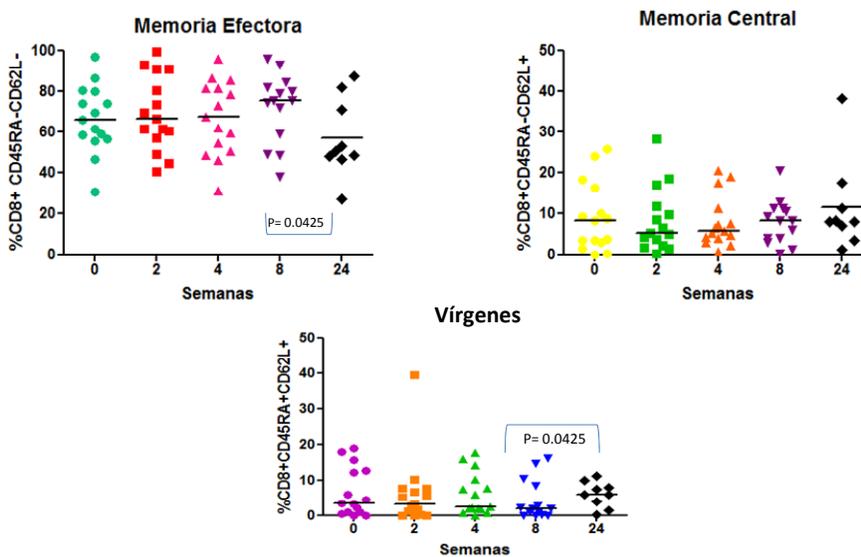


Fig.12 Porcentaje de Subpoblaciones linfocitarias de las células T CD8+. Análisis porcentual de las Subpoblaciones linfocitarias CD8+ Memoria Efectoras (CD45RA-CD62L-), Memoria Central (CD45RA-CD62L+) y naïve (CD45RA+CD62L+). Todas las subpoblaciones provienen de las células T CD8+

La entrada a ciclo celular tiende a aumentar en las células T CD4+ en las primeras 2 semanas de tratamiento antifímico.

Como otro indicador de activación inmune, analizamos la entrada a ciclo celular de las células T CD4+ y CD8+ (Fig. 13 A y B), encontrando una tendencia al aumento en la entrada a ciclo de las células T CD4+ entre las semanas 0 y 2 ($p=0.0619$) no hubo cambios significativos en las células T CD8+.

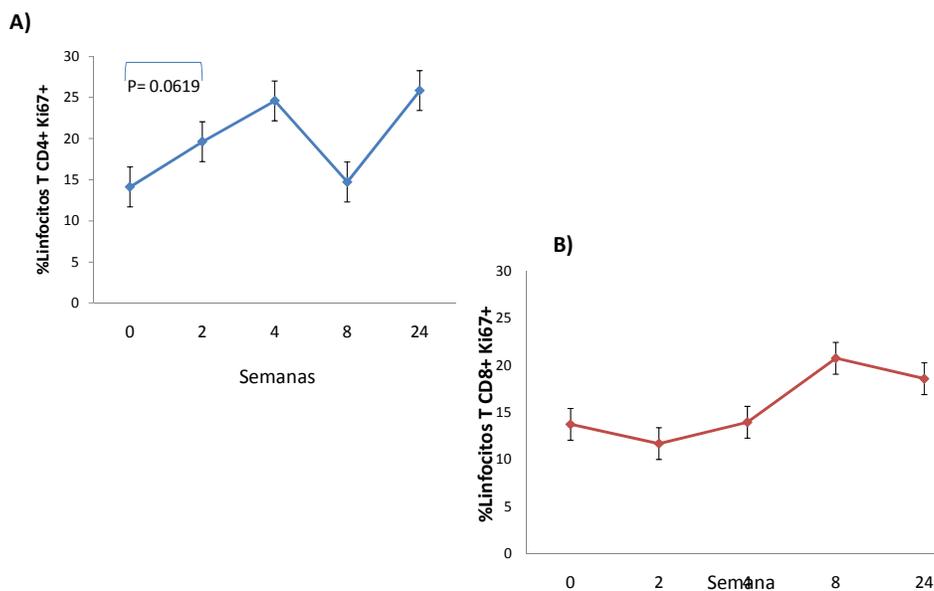


Fig.13 Seguimiento longitudinal de la proliferación celular de pacientes con tratamiento antifímico. A) expresión del marcador de entrada a ciclo celular KI67 en las células T CD4+ de pacientes con tratamiento antituberculosis. B) expresión del marcador de entrada a ciclo celular KI67 en las células T CD8+ de pacientes con tratamiento antituberculosis

Cambios del perfil de activación de células T CD4+ vírgenes y CD8+ ME a lo largo del tratamiento antifímico.

Para determinar si alguna de las subpoblaciones celulares era la responsable del aumento en la activación inmune observada sobre las células T, analizamos la activación inmune de las subpoblaciones vírgenes, ME y MC de las células T CD4+ y CD8+ como la coexpresión de los marcadores CD38 y HLADR.

Encontramos un aumento significativo de la activación de las células T vírgenes CD4+ (Fig. 14) entre las semanas 2-4 ($p=0.0163$) y una tendencia al aumento con respecto a los niveles basales 0-4 ($p=0.0619$) sin cambios en las células ME y MC. Al estudiar las células T CD8+ (Fig. 15) encontramos una disminución significativa de la activación de las células T CD8+ ME entre las semanas 0-8 ($p=0.0218$), y una tendencia al aumento de la activación de las células MC entre la semana 2-4 ($p=0.0619$) sin cambios en las células vírgenes.

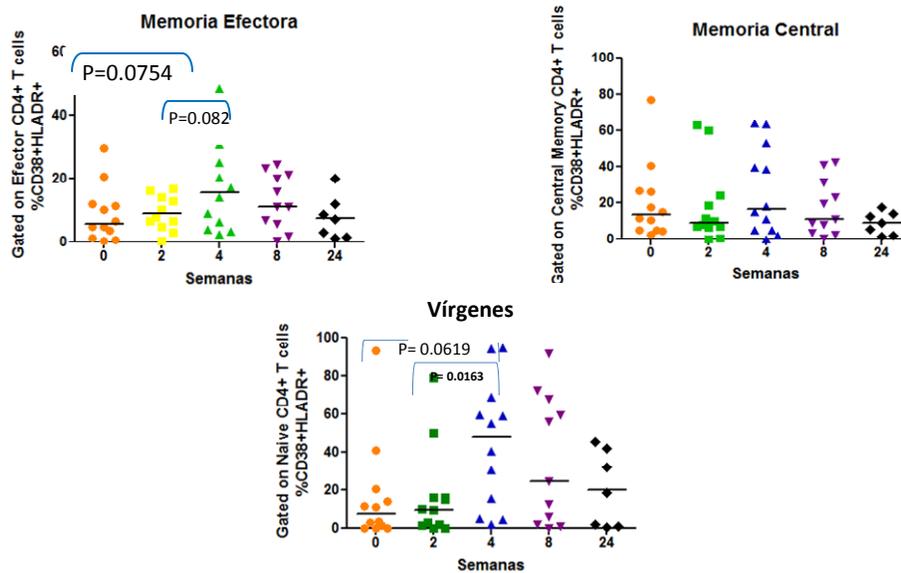


Fig.14 Seguimiento longitudinal de activación inmune de subpoblaciones linfocitarias CD4+. Co- expresión de la los marcadores de activación CD38 y HLADR de las Subpoblaciones linfocitarias CD4+ Memoria Efectoras (CD45RA-CD62L-), Memoria Central (CD45RA-CD62L+) y naive (CD45RA+CD62L+) a lo largo del tratamiento antituberculosis.

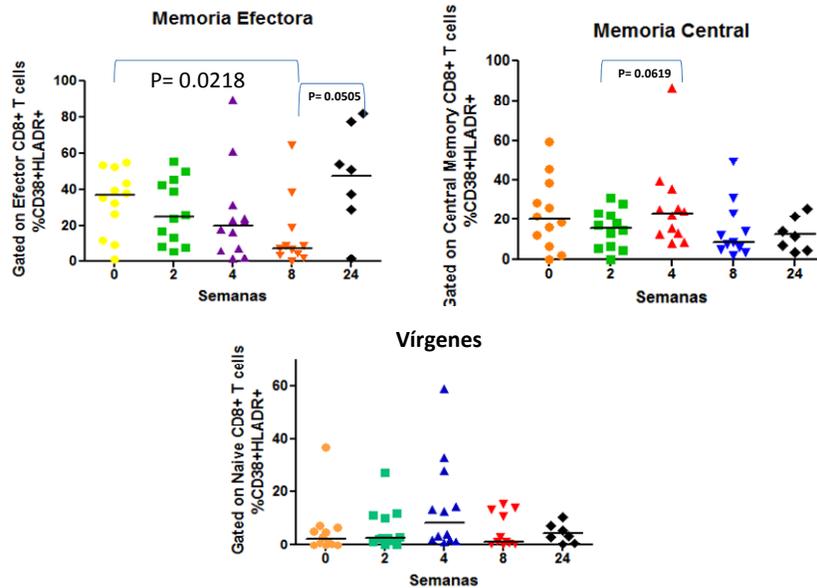


Fig.15 Seguimiento longitudinal de activación inmune de subpoblaciones linfocitarias CD8+. Co-expresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR de las Subpoblaciones linfocitarias CD8+ Memoria Efectoras (CD45RA-CD62L-), Memoria Central (CD45RA-CD62L+) y naive (CD45RA+CD62L+) a lo largo del tratamiento antituberculosis.

La activación de linfocitos T coincide con cambios en la carga viral cuando el tratamiento antifímico es exitoso.

Para ver si los cambios en activación se ven reflejados en los parámetros clínicos de seguimientos de pacientes con VIH más importantes, como son la cuenta de linfocitos T CD4 y la carga viral plasmática, se realizaron dichas mediciones a lo largo del tratamiento antifímico. No encontramos cambios significativos en la cuenta de linfocitos T CD4+, pero sí un aumento significativo en la carga viral entre las semanas 0 y 4 ($p= 0.0499$) y una tendencia a la disminución entre las semanas 4 y 8 ($p= 0.0747$) que coinciden temporalmente con los cambios en activación observados en las células T CD4+, particularmente en sus subpoblaciones vírgenes y de memoria efectora.

Finalmente, con la finalidad de estudiar si estos cambios en activación y carga viral eran atribuibles al control de la infección por MTB, se estudiaron algunos de los parámetros clínicos más empleados para medir la eficacia del tratamiento antifímico como el aumento de peso, la desaparición de ganglios palpables y la disminución de la tos y de la fiebre, encontrando un aumento significativo del peso entre las semanas 2 y 8 ($p= 0.0280$) y 4 y 8 ($p= 0.0180$) y disminuyendo la

frecuencia de los otros parámetros mencionados en las primeras 2 semanas de tratamiento (Fig. 16 C y D), por lo que clínicamente se puede asumir un tratamiento exitoso.

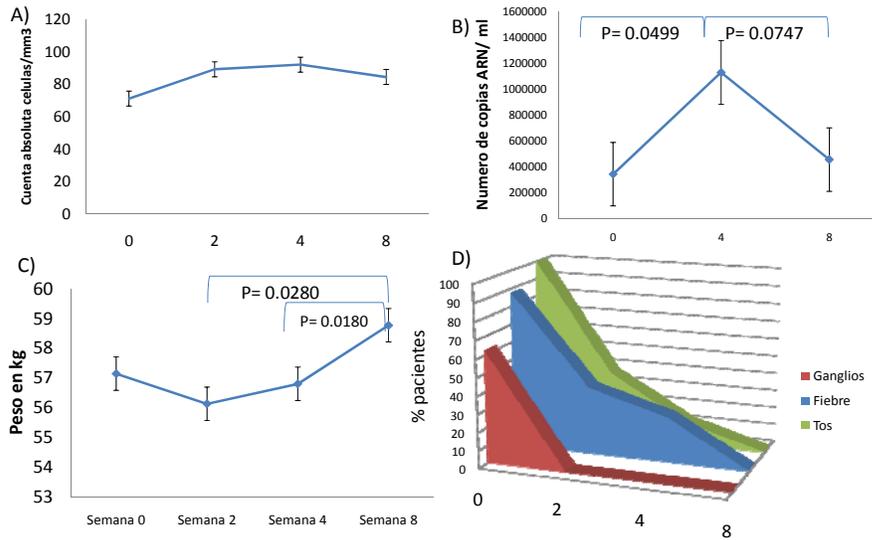


Fig.16. Parámetros clínicos de importancia medica para el seguimiento del tratamiento farmacológico. A) Cuentas absolutas de los linfocitos T CD4+ en sangre a lo largo del tratamiento antituberculosis. **B)** Carga viral plasmática a lo largo del tratamiento antituberculosis sin HAART. **C)** Peso en Kilogramos a lo largo del tratamiento antituberculosis. **D)** Frecuencia de los pacientes que presentan ganglios palpables(rojo,) fiebre(azul y) tos (verde) a lo largo del tratamiento antituberculosis.

Discusión

Nuestro abordaje metodológico nos brinda la oportunidad de estudiar la contribución de MTB *in vivo* a la activación inmune, la replicación viral y la dinámica de subpoblaciones linfocitarias en pacientes coinfectados con tuberculosis y VIH y con ello, tratar de entender los mecanismos que hacen que estos pacientes progresen más rápidamente a SIDA.

El sitio de entrada al cuerpo de MTB son los pulmones, por lo que lo ideal al tratar de estudiar su interacción con las células inmunes sería hacerlo en LBA. Dado que los LBA implican procedimientos invasivos y algunas veces peligrosos y que los pacientes VIH+ suelen tener infecciones por tuberculosis diseminadas [112], decidimos hacer este estudio en sangre, pero no sin antes comparar activación, entrada a ciclo y proporción de Subpoblaciones celulares en ambos compartimientos con la finalidad de saber si la sangre podría representar en estos términos el sitio de infección. Encontramos que en la activación inmune (Fig. 9 A), y el patrón de proliferación (Fig.9 B), los niveles en sangre y LBA son prácticamente iguales. La proliferación parece ser menor en LBA lo cual concuerda con el hecho de que el pulmón es un sitio donde, en su mayoría, migran células de vida media corta con poca capacidad proliferativa, células de ME. En el caso de las Subpoblaciones celulares ambos compartimientos tienen un predominio de células con fenotipo de memoria efectora, lo cual valida la distribución esperada de subpoblaciones, con mayor proporción en el LBA, lo cual es coherente con el hecho de que el pulmón es un sitio efector. Esto concuerda con el reclutamiento reportado de células T CD4 y CD8 efectoras de memoria hacia los sitios infectados con MTB, lo que adicionalmente podría facilitar la infección por VIH [113]. No se han realizado estudios que comparen estos dos compartimientos en pacientes coinfectados con tuberculosis y VIH; sin embargo, existe un estudio que muestra que los pacientes coinfectados, tienen menos células T CD4+ y más CD8+ en pulmón que donadores sanos y que estas células están más activadas que en los individuos sin VIH [114].

Para comprobar nuestra hipótesis de que cuando se controlara MTB veríamos una disminución de la activación, evaluamos el perfil de activación de las células T CD4+ y CD8+ mediante la coexpresión de los marcadores de activación CD38 y HLADR a lo largo del tratamiento antifímico (8 semanas) antes de iniciar el HAART. Algunos estudios reportan que la expresión de HLADR y CD38 sobre las células T CD4+ y CD8+ esta aumentada en los pacientes coinfectados en comparación con solo estar infectado con alguna de las dos infecciones [106, 107]. Otros estudios con marcadores solubles de activación inmune como β 2-microglobulina, neopterinina y receptor de TNF- α también observan concentraciones elevadas de éstos en comparación con donadores sanos, siendo más marcada la diferencia en pacientes con niveles de CD4 por debajo de los 200 μ l. También se ha visto que después de 6 meses de tratamiento antifímico, estos marcadores de activación disminuyeron significativamente pero no a niveles de donador sano [115]. Contrario a lo que esperábamos, encontramos una tendencia al aumento en la coexpresión de los marcadores de activación ($p= 0.0505$) durante las primeras 4 semanas de tratamiento antifímico en los linfocitos T CD4+ totales (Fig.10A). Este fenómeno podría explicarse en términos de un efecto supresor de la respuesta inmune por parte de MTB o a la liberación de antígenos producto de la muerte de la micobacteria. Se ha descrito que la micobacteria es capaz de reducir la expresión de HLADR en los monocitos-macrófagos así como impedir la maduración de células dendríticas [116] esto tendría como consecuencia, menos presentación de antígenos a las células T y por tanto, menos respuesta. Creemos que al ir disminuyendo la carga antigénica de MTB, el sistema inmune es capaz de montar una respuesta y con ello, un aumento en los marcadores de activación de las células T. Cabe mencionar que este aumento en la activación no ocurre en los linfocitos T CD8+ (Fig.10C) lo cual podría deberse a que está afectada la presentación a los linfocitos T CD4+ que son especialmente importantes en la respuesta contra TB y que se lleva a cabo través de MHC clase II por parte de los monocitos-macrófagos a través de HLADR. También es posible que aunque la micobacteria ya no sea viable, debido a un tratamiento eficaz, sus antígenos estén

disponibles para montar respuestas. Estas dos explicaciones necesitan de comprobación experimental posterior.

Posteriormente estudiamos el porcentaje de las subpoblaciones celulares ME, MC y vírgenes de los linfocitos T CD4+ y CD8+ para ver si los cambios en activación inmune, provocado por el tratamiento antifímico, se reflejaban en cambios en estas subpoblaciones. Algunos estudios muestran que los pacientes coinfectados con tuberculosis y VIH tienen un recuento de linfocitos T CD4+ menor a solo tener alguna de las dos infecciones [117], incluso otros han demostrado una depleción severa de células vírgenes, efectoras y de memoria en pacientes VIH+ con tuberculosis diseminada [117], sin embargo, no hay estudios que muestren el impacto que el tratamiento antifímico pudiera tener sobre ellas, lo cual daría una idea de la contribución particular de la micobacteria a estos efectos. Los porcentajes de las distintas subpoblaciones encontradas en este estudio corresponden a los reportados por otros autores para pacientes con recuento de células T CD4+ por debajo de 200 μ L [118]. En contraste con las células T CD4+, en las que no encontramos cambios en las frecuencias de subpoblaciones a lo largo del tratamiento antifímico, en las células T CD8+ encontramos una disminución significativa entre las semanas 8 y 24 en las células ME, las cuales disminuyen ($p=0.0425$) y vírgenes que aumentan ($p= 0.0425$). Los efectos en las subpoblaciones celulares CD8+ podrían atribuirse a la respuesta específica de linfocitos T CD8, la cual desciende al descender el antígeno, lo cual explicaría un menor reclutamiento de células de memoria efectoras. Si bien hay cambios interesantes en la activación, esta no se refleja en las frecuencias de las distintas subpoblaciones. Sólo al controlar al virus se modificaron las frecuencias de subpoblaciones y sólo entre las células T CD8+. Esperábamos que, al haber menos reclutamiento de células T ME a los sitios infectados por MTB al controlar la infección, daría lugar a una menor presión homeostática que se vería reflejada en una mayor frecuencia MC y una menor de ME. Dado que no lo encontramos, pero sí se observan cambios al controlar al VIH, podemos pensar que el mayor secuestro de células T ME en sitios diferentes a la sangre se debe a VIH [119].

Al estudiar la entrada a ciclo celular de las células T CD4⁺ y CD8⁺ encontramos una tendencia al aumento en la entrada a ciclo de las células T CD4⁺, coincidente en el tiempo, con la tendencia al aumento en la expresión de marcadores de activación inmune. Esto es congruente con el hecho de que por lo regular la activación de una célula desencadena su proliferación. No encontramos cambios en las células T CD8⁺, en las que coincidentemente no se encontraron cambios en activación tampoco. Existe un estudio que muestra que la capacidad proliferativa con estímulos a MTB de los pacientes coinfectados se encuentra disminuida en comparación con donadores sanos, pero, que los pacientes VIH⁺ tienen todavía menor capacidad proliferativa que los coinfectados [120]. También se ha demostrado que los pacientes con VIH que reciben HAART pueden recuperar su capacidad proliferativa cuando son estimulados con antígenos de MTB [121]. Por ello pensamos que los efectos sobre la proliferación de las células T encontrados en los pacientes coinfectados con VIH y tuberculosis se encuentran más relacionados a procesos de la replicación viral que a la infección por tuberculosis, ya que su control específico no la altera significativamente.

Posteriormente determinamos si alguna de las subpoblaciones celulares específicas presentaba un aumento en la activación inmune, o si la contribución de alguna era relevante para la tendencia al aumento en la activación observado en las células T totales. Encontramos un aumento significativo de la activación de las células T vírgenes CD4⁺ (Fig. 14) entre las semanas 2 y 4 lo cual sugiere un primer contacto con un antígeno y/o un proceso de diferenciación de estas células. Creemos, que este fenómeno podría deberse a dos motivos: 1) ocurre como consecuencia de la disminución de la carga antigénica de MTB, lo que disminuye su efecto supresor de la respuesta inmune, particularmente en los monocitos/macrófagos, capaces de presentar antígeno a las células T vírgenes [12] 2) hay mas antígenos micobacterianos que pueden desencadenar mayor presentación de antígeno a las células vírgenes.

Se sabe que el virus del VIH infecta principalmente a las células T CD4+ de memoria efectora con fenotipo activado [122]. Al ver cambios en la carga viral esperábamos encontrar cambios en la subpoblación ME encontrando sólo una tendencia al aumento entre la semana 0 y 4 ($p=0.0754$) lo que corresponde temporalmente al aumento de la carga viral y la tendencia en la activación general de las células T. Se puede pensar que probablemente la activación de esta subpoblación está alimentando la replicación viral al proporcionar células blanco al virus. Dado que sólo vimos una tendencia, requeriremos una muestra mayor para aclarar este posible efecto. No encontramos cambios en las células MC.

Se sabe que el papel principal de las células T CD8+ en la infección por tuberculosis es a través de sus moléculas citotóxicas que matan a las células infectadas [123]. Al estudiar las células T CD8+ encontramos una disminución significativa de la activación de las células T CD8+ ME entre las semanas 0-8 paralelo al control de la tuberculosis por el tratamiento y una tendencia al aumento de la activación de las células MC entre las semanas 2 y 4, que es el momento clave del control de la infección, sin cambios en las células vírgenes. Este cambio en las subpoblaciones nos muestra nuevamente los efectos diferenciales de la micobacteria sobre las células T CD4+ y CD8+.

Se ha visto que MTB puede aumentar la replicación viral *in vitro* [124] y que la carga viral de los individuos VIH+ aumenta en el momento del diagnóstico de una infección activa por MTB especialmente en las etapas tempranas de la infección [98] y en el sitio de infección [125]. En un estudio en el que tratan de estudiar el impacto del tratamiento antifímico en pacientes coinfectados muestran que la carga viral no cambia durante los primeros tres meses de tratamiento antifímico [126], sin embargo, existe otro que si encuentran una disminución de la carga viral en pacientes con recuento de CD4 elevados [98], por lo que hay controversia sobre la contribución de MTB a la carga viral. Nosotros encontramos un aumento significativo en la carga viral entre las semanas 0 y 4 ($p= 0.0499$) la cual fue transitoria y coincidía con los cambios en activación observados en las células T CD4+.

Probablemente la diferencia en los hallazgos se deba a que su seguimiento es cada mes y no cada semana o a que los pacientes del presente protocolo se encuentran en etapas de la infección avanzadas. No encontramos cambios en el recuento de linfocitos T CD4+ probablemente debido a que los pacientes empleados para este estudio se encontraban en niveles de inmunosupresión muy avanzados, con niveles de linfocitos T CD4+ por debajo de 200 células/ μ L, y ya no era posible una redistribución de linfocitos desde los nódulos linfoides y tejidos hacia la circulación con sólo controlar la infección oportunista [127]. En este sentido, es importante tomar en cuenta que en 8 de los 11 pacientes estudiados, el principal sitio de infección eran los ganglios linfáticos, sitio donde el VIH secuestra un gran porcentaje de células T [128].

Finalmente, los cambios en activación celular y C.V. se pueden considerar consecuencia de un control exitoso de la tuberculosis, pues los parámetros clínicos más empleados para medir la eficacia del tratamiento antifímico como el aumento de peso, desaparición de ganglios palpables y disminución de tos y fiebre se vieron reducidos también en forma paralela a los efectos observados. Se sabe que a las 2 semanas de tratamiento antifímico las mejorías clínicas son importantes e incluso las expectoraciones se vuelven negativas [129].

Esto es de especial importancia porque la principal célula blanco del VIH, el linfocito T CD4, es una pieza clave del control de la infección por MTB [130, 131]. De este modo, una manera en la que TB podría estar empeorando la infección por VIH es reclutando células CD4 de memoria efectoras activadas a los sitios de infección, lo que facilitaría su infección [113] .

Conclusiones

En individuos con coinfección tuberculosis-VIH:

- *Mycobacterium tuberculosis* ocasiona activación inmune de las células T CD4, que se reduce al controlar la infección micobacteriana.
- Los cambios en la celularidad de las subpoblaciones linfocitarias y la proliferación de las células T pueden atribuirse más a fenómenos relacionados con la replicación viral que a la activación inmune por sí misma.
- El control de la infección activa por MTB en individuos coinfectados con VIH genera un aumento transitorio en la carga viral, asociado al aumento en la activación de algunas subpoblaciones de células T. Esto podría deberse a un aumento en las funciones de monocitos y a respuestas inespecíficas a componentes liberados de las micobacterias destruidas por el tratamiento así como a un mayor reclutamiento de células susceptibles de infección por VIH.

Abreviaturas

BRDU: Bromo desoxiuridina

CV: Carga viral plasmática

HAART: Tratamiento antirretroviral altamente activo

LBA: Lavado bronquiolo alveolar

LPS: Lipopolisacárido

MC: Células T de memoria central

ME: Células T de memoria efectora

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

NRTIs: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

NNRTIs: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PIs: Inhibidores de la proteasa

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIRI: Síndrome Inflamatorio por reconstitución inmunitaria

SIV: Virus de la inmunodeficiencia del simio

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Lista de Figuras y Cuadros

Figura 1. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

Figura 2. Mecanismo de acción de los fármacos antifímicos

Figura 3. GenomadeVIH

Figura 4. Ciclo de Replicación del VIH

Figura 5. Historia Natural de la infección por VIH

Figura 6. Sitios de acción de los fármacos antirretrovirales

Figura 7. Distribución Geográfica de la coinfección tuberculosis-VIH

Figura 8. Estrategia de gating

Figura 9. Comparación entre sangre y LBA en semana basal de tratamiento antifímico

Figura 10. Seguimiento longitudinal de la activación inmune de pacientes con tratamiento antifímico

Figura 11. Porcentaje de Subpoblaciones linfocitarias de las células T CD4+

Figura 12. Porcentaje de Subpoblaciones linfocitarias de las células T CD8+

Figura 13. Seguimiento longitudinal de la proliferación celular de pacientes con tratamiento antifímico

Figura 14. Seguimiento longitudinal de activación inmune de subpoblaciones linfocitarias CD4+

Figura 15. Seguimiento longitudinal de activación inmune de subpoblaciones linfocitarias CD8

Figura 16. Parámetros clínicos de importancia medica para el seguimiento del tratamiento farmacológico

Tabla 1. Recuento de linfocitos T CD4+, CD8+ y carga viral de los 11 pacientes reclutados en las semanas de seguimiento

Bibliografía

1. Chauhan, A., et al., *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J Bacteriol*, 2006. **188**(5): p. 1856-65.
2. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*, 2003. **16**(3): p. 463-96.
3. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. *Nature*, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
4. Collins, H.L. and S.H. Kaufmann, *The many faces of host responses to tuberculosis*. *Immunology*, 2001. **103**(1): p. 1-9.
5. Dye, C., *India's leading role in tuberculosis epidemiology & control*. *Indian J Med Res*, 2006. **123**(4): p. 481-4.
6. Moore, D., et al., *Prevalence, incidence and mortality associated with tuberculosis in HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy in rural Uganda*. *AIDS*, 2007. **21**(6): p. 713-9.
7. Flynn, J.L. and J. Chan, *Immunology of tuberculosis*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 93-129.
8. James, B.W., A. Williams, and P.D. Marsh, *The physiology and pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis grown under controlled conditions in a defined medium*. *J Appl Microbiol*, 2000. **88**(4): p. 669-77.
9. Korbil, D.S., B.E. Schneider, and U.E. Schaible, *Innate immunity in tuberculosis: myths and truth*. *Microbes Infect*, 2008. **10**(9): p. 995-1004.
10. van Crevel, R., T.H. Ottenhoff, and J.W. van der Meer, *Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(2): p. 294-309.
11. Kawamura, I., *[Protective immunity against Mycobacterium tuberculosis]*. *Kekkaku*, 2006. **81**(11): p. 687-91.
12. Hernandez-Pando, R., H. Orozco, and D. Aguilar, *Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009. **57**(5): p. 355-67.
13. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 593-623.
14. Lugos, M.D., et al., *Evaluation of the contribution of major T cell subsets to IFN-gamma production in TB infection by ELISPOT*. *Immunol Invest*, 2009. **38**(5): p. 341-9.
15. Kaufmann, S.H., *Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61 Suppl 2**: p. ii54-8.
16. Tan, J.S., et al., *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*, 1997. **159**(1): p. 290-7.
17. Raja, A., *Immunology of tuberculosis*. *Indian J Med Res*, 2004. **120**(4): p. 213-32.
18. Saunders, B.M. and W.J. Britton, *Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(2): p. 103-11.

19. Schluger, N.W., *Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis*. *Respir Res*, 2001. **2**(3): p. 157-63.
20. Seah, G.T., G.M. Scott, and G.A. Rook, *Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(1): p. 385-9.
21. Palomino, J.C., *Immunology, Pathogenesis, Virulence*, in *Tuberculosis 2007 From basic science to patient care* S.C. Leão, Editor. 2007, Bourcillier Kamps: BRAZIL. p. 686.
22. Fretheim, A., *Current medical treatment for tuberculosis. More weight was given to observational studies than randomised controlled trials*. *BMJ*, 2003. **326**(7388): p. 550; author reply 550.
23. Blasi, P., et al., *Fighting tuberculosis: old drugs, new formulations*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009. **6**(9): p. 977-93.
24. Whitfield, R.J., et al., *Current medical treatment for tuberculosis. Resources used for screening could be spent more usefully elsewhere*. *BMJ*, 2003. **326**(7388): p. 550.
25. Ormerod, L.P., I.A. Campbell, and P.D. Davies, *Current medical treatment for tuberculosis. Aspects of chemotherapy and management need clarifying*. *BMJ*, 2003. **326**(7388): p. 550; author reply 550.
26. Greene, W.C. and B.M. Peterlin, *Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy*. *Nat Med*, 2002. **8**(7): p. 673-80.
27. Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 681-4.
28. Levy, J.A., *El VIH y la patogénesis del SIDA*. Primera edición ed. 2008, México D.F.: Fondo de Cultura Económica. 749.
29. Azevedo-Pereira, J.M. and Q. Santos-Costa, *[Chemokine receptors and its importance in the replication cycle of human immunodeficiency virus: clinical and therapeutic implications]*. *Acta Med Port*, 2008. **21**(5): p. 497-504.
30. Li, L., et al., *Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection*. *EMBO J*, 2001. **20**(12): p. 3272-81.
31. Wilk, T., et al., *Organization of immature human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 2001. **75**(2): p. 759-71.
32. Mirambeau, G., *[How proviral DNA is integrated into the host cell DNA and how this process can be inhibited]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2008. **26 Suppl 12**: p. 11-6.
33. Alcami, J., *[The HIV replication cycle. Established therapeutic targets and potential targets]*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2008. **26 Suppl 12**: p. 3-10.
34. WHO. www.unaids.org. 2008 [cited].
35. Arici, C., et al., *Long-term clinical benefit after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 infection, even in patients without immune reconstitution*. *Int J STD AIDS*, 2001. **12**(9): p. 573-81.
36. Salud, S.d., www.censida.salud.gob.mx, 2009.
37. Mexicana, S.d.S., www.censida.salud.gob.mx, 2009.
38. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 749-59.

39. Deeks, S.G., et al., *Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load*. Blood, 2004. **104**(4): p. 942-7.
40. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
41. Brenchley, J.M., D.A. Price, and D.C. Douek, *HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?* Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 235-9.
42. Douek, D., *HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut*. Top HIV Med, 2007. **15**(4): p. 114-7.
43. Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1365-71.
44. Grossman, Z., et al., *Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 289-95.
45. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med, 1993. **328**(5): p. 327-35.
46. Douek, D.C., M. Roederer, and R.A. Koup, *Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 471-84.
47. Lawn, S.D., S.T. Butera, and T.M. Folks, *Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 753-77, table of contents.
48. Picker, L.J., *Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 399-405.
49. Levy, J.A., *Surrogate markers in AIDS research. Is there truth in numbers?* JAMA, 1996. **276**(2): p. 161-2.
50. Douek, D.C., *Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease*. AIDS Rev, 2003. **5**(3): p. 172-7.
51. Gougeon, M.L., et al., *Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression*. J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3509-20.
52. Gougeon, M.L. and M. Piacentini, *New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis*. Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 501-8.
53. Giorgi, J.V., et al., *Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 859-70.
54. Sieg, S.F., D.A. Bazdar, and M.M. Lederman, *Impaired TCR-mediated induction of Ki67 by virgines CD4+ T cells is only occasionally corrected by exogenous IL-2 in HIV-1 infection*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5208-14.
55. Luciano, A.A., et al., *Impaired induction of CD27 and CD28 predicts virgines CD4 T cell proliferation defects in HIV disease*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3543-9.
56. Di Mascio, M., et al., *Virgines T-cell dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection: effects of highly active antiretroviral therapy provide*

- insights into the mechanisms of virgines T-cell depletion.* J Virol, 2006. **80**(6): p. 2665-74.
57. Okoye, A., et al., *Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection.* J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2171-85.
 58. Sieg, S.F., et al., *Peripheral S-phase T cells in HIV disease have a central memory phenotype and rarely have evidence of recent T cell receptor engagement.* J Infect Dis, 2005. **192**(1): p. 62-70.
 59. Sieg, S.F., D.A. Bazdar, and M.M. Lederman, *S-phase entry leads to cell death in circulating T cells from HIV-infected persons.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1382-7.
 60. Martin, J.C. and J.C. Bandres, *Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection.* J Acquir Immune Defic Syndr, 1999. **22**(5): p. 413-29.
 61. Douek, D.C., et al., *Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection.* J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6663-8.
 62. Biancotto, A., et al., *HIV-1 induced activation of CD4+ T cells creates new targets for HIV-1 infection in human lymphoid tissue ex vivo.* Blood, 2008. **111**(2): p. 699-704.
 63. Amirayan-Chevillard, N., et al., *Impact of highly active anti-retroviral therapy (HAART) on cytokine production and monocyte subsets in HIV-infected patients.* Clin Exp Immunol, 2000. **120**(1): p. 107-12.
 64. Chi, B.H., et al., *CD4+ response and subsequent risk of death among patients on antiretroviral therapy in Lusaka, Zambia.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2009. **52**(1): p. 125-31.
 65. Jansen, C.A., et al., *Analysis of the effect of highly active antiretroviral therapy during acute HIV-1 infection on HIV-specific CD4 T cell functions.* AIDS, 2005. **19**(11): p. 1145-54.
 66. Milush, J.M., et al., *Virally induced CD4+ T cell depletion is not sufficient to induce AIDS in a natural host.* J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3047-56.
 67. Hunt, P.W., et al., *T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy.* J Infect Dis, 2003. **187**(10): p. 1534-43.
 68. Giorgi, J.V., et al., *Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study.* J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. **6**(8): p. 904-12.
 69. Al-Harhi, L., et al., *Immunophenotypic alterations in acute and early HIV infection.* Clin Immunol, 2007. **125**(3): p. 299-308.
 70. Carbonari, M., et al., *Death of bystander cells by a novel pathway involving early mitochondrial damage in human immunodeficiency virus-related lymphadenopathy.* Blood, 1997. **90**(1): p. 209-16.
 71. Asmuth, D.M., et al., *Cell cycle kinetic dysregulation in HIV-infected normal lymphocytes.* Cytometry A, 2005. **66**(1): p. 41-51.
 72. Deaglio, S., et al., *CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target.* Trends Mol Med, 2008. **14**(5): p. 210-8.

73. Paul, W.E., *Fundamental Immunology*. 2003: p. 1701.
74. Malavasi, F., et al., *Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(3): p. 841-86.
75. Dockrell, D.H., et al., *Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. **15**(17): p. 1509-18.
76. Paiardini, M., et al., *Perturbations of cell cycle control in T cells contribute to the different outcomes of simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques and sooty mangabeys*. *J Virol*, 2006. **80**(2): p. 634-42.
77. Giorgi, J.V., et al., *Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002. **29**(4): p. 346-55.
78. Silvestri, G., et al., *Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia*. *Immunity*, 2003. **18**(3): p. 441-52.
79. Spiegel, H., et al., *Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(1): p. 15-22.
80. Lederman, M.M. and L. Margolis, *The lymph node in HIV pathogenesis*. *Semin Immunol*, 2008. **20**(3): p. 187-95.
81. Rosignoli, G., et al., *Programmed death (PD)-1 molecule and its ligand PD-L1 distribution among memory CD4 and CD8 T cell subsets in human immunodeficiency virus-1-infected individuals*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **157**(1): p. 90-7.
82. Hunt, P.W., *Role of immune activation in HIV pathogenesis*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2007. **4**(1): p. 42-7.
83. van Baarle, D., et al., *Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system*. *Immunol Lett*, 2005. **97**(1): p. 19-29.
84. Jiang, W., et al., *Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection*. *J Infect Dis*, 2009. **199**(8): p. 1177-85.
85. Meier, A., et al., *Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 955-9.
86. Bangs, S.C., A.J. McMichael, and X.N. Xu, *Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(11): p. 518-24.
87. Chan, K.C., et al., *Survival rates after the initiation of antiretroviral therapy stratified by CD4 cell counts in two cohorts in Canada and the United States*. *AIDS*, 2002. **16**(12): p. 1693-5.
88. Andersson, J., et al., *Early reduction of immune activation in lymphoid tissue following highly active HIV therapy*. *AIDS*, 1998. **12**(11): p. F123-9.
89. Garcia, F., et al., *Comparison of immunologic restoration and virologic response in plasma, tonsillar tissue, and cerebrospinal fluid in HIV-1-infected patients treated with double versus triple antiretroviral therapy in*

- very early stages: *The Spanish EARTH-2 Study. Early Anti-Retroviral Therapy Study.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **25**(1): p. 26-35.
90. McShane, H., *Co-infection with HIV and TB: double trouble.* Int J STD AIDS, 2005. **16**(2): p. 95-100; quiz 101.
 91. Lopez-Gatell, H., et al., *Effect of tuberculosis on the survival of HIV-infected men in a country with low tuberculosis incidence.* AIDS, 2008. **22**(14): p. 1869-73.
 92. Lawn, S.D. and G. Churchyard, *Epidemiology of HIV-associated tuberculosis.* Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(4): p. 325-33.
 93. Zumla, A., et al., *Impact of HIV infection on tuberculosis.* Postgrad Med J, 2000. **76**(895): p. 259-68.
 94. Warren, R.M. and P.D. van Helden, *HIV-1 and tuberculosis infection.* Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1618-9; author reply 1619-20.
 95. Whalen, C.C., et al., *Impact of pulmonary tuberculosis on survival of HIV-infected adults: a prospective epidemiologic study in Uganda.* AIDS, 2000. **14**(9): p. 1219-28.
 96. Whalen, C., et al., *Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis.* Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(1): p. 129-35.
 97. Subramanyam, S., et al., *HIV alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis.* J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(2): p. 101-6.
 98. Toossi, Z., et al., *Impact of tuberculosis (TB) on HIV-1 activity in dually infected patients.* Clin Exp Immunol, 2001. **123**(2): p. 233-8.
 99. Mahon, R.N., et al., *Mycobacterium tuberculosis cell wall glycolipids directly inhibit CD4+ T-cell activation by interfering with proximal T-cell-receptor signaling.* Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4574-83.
 100. Kovalchuk, L.V., et al., *Pulmonary Tuberculosis: Decreased Activation of T lymphocyte Subsets in vitro.* Russ J Immunol, 1996. **1**(1): p. 23-28.
 101. Brooks, J.T., J.E. Kaplan, and H. Masur, *What's new in the 2009 US guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections among adults and adolescents with HIV?* Top HIV Med, 2009. **17**(3): p. 109-14.
 102. Goletti, D., et al., *Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation.* J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1271-8.
 103. Corbett, E.L. and K.M. De Cock, *Tuberculosis in the HIV-positive patient.* Br J Hosp Med, 1996. **56**(5): p. 200-4.
 104. Coyne, K.M., et al., *Pharmacology of second-line antifimico drugs and potential for interactions with antiretroviral agents.* AIDS, 2009. **23**(4): p. 437-46.
 105. Meintjes, G., et al., *Novel relationship between tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome and antitubercular drug resistance.* Clin Infect Dis, 2009. **48**(5): p. 667-76.
 106. Vanham, G., et al., *Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection.* Clin Exp Immunol, 1996. **103**(1): p. 30-4.

107. Hertoghe, T., et al., *T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB)*. Clin Exp Immunol, 2000. **122**(3): p. 350-7.
108. Hawken, M.P., et al., *Isoniazid preventive therapy for tuberculosis in HIV-1-infected adults: results of a randomized controlled trial*. AIDS, 1997. **11**(7): p. 875-82.
109. Hanna, L.E., et al., *Incomplete immunological recovery following anti-tuberculosis treatment in HIV-infected individuals with active tuberculosis*. Indian J Med Res, 2009. **129**(5): p. 548-54.
110. Weiden, M., et al., *Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein beta expression*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 2028-39.
111. Goletti, D., et al., *Inhibition of HIV-1 replication in monocyte-derived macrophages by Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 2004. **189**(4): p. 624-33.
112. Shafer, R.W., et al., *Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection*. Medicine (Baltimore), 1991. **70**(6): p. 384-97.
113. Santucci, M.B., et al., *Expansion of CCR5+ CD4+ T-lymphocytes in the course of active pulmonary tuberculosis*. Eur Respir J, 2004. **24**(4): p. 638-43.
114. Law, K.F., et al., *Tuberculosis in HIV-positive patients: cellular response and immune activation in the lung*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(4 Pt 1): p. 1377-84.
115. Wanchu, A., et al., *Decline in beta-2 microglobulin levels after antitubercular therapy in tubercular patients with HIV infection*. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2001. **43**(4): p. 211-5.
116. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
117. Rodrigues, D.S., R. Salomao, and E.G. Kallas, *Profound peripheral T-lymphocyte depletion and activation in disseminated tuberculosis*. Braz J Infect Dis, 2006. **10**(1): p. 59-61.
118. Murdoch, D.M., et al., *Polychromatic immunophenotypic characterization of T cell profiles among HIV-infected patients experiencing immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS)*. AIDS Res Ther, 2009. **6**: p. 16.
119. Lederman, M.M., *Immune restoration and CD4+ T-cell function with antiretroviral therapies*. AIDS, 2001. **15 Suppl 2**: p. S11-5.
120. Villacian, J.S., et al., *The effect of infection with Mycobacterium tuberculosis on T-cell activation and proliferation in patients with and without HIV co-infection*. J Infect, 2005. **51**(5): p. 408-12.
121. Schluger, N.W., D. Perez, and Y.M. Liu, *Reconstitution of immune responses to tuberculosis in patients with HIV infection who receive antiretroviral therapy*. Chest, 2002. **122**(2): p. 597-602.
122. Dai, J., et al., *Human immunodeficiency virus integrates directly into virgines resting CD4+ T cells but enters virgines cells less efficiently than memory cells*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4528-37.

123. Einarsdottir, T., E. Lockhart, and J.L. Flynn, *Cytotoxicity and secretion of gamma interferon are carried out by distinct CD8 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. *Infect Immun*, 2009. **77**(10): p. 4621-30.
124. Toossi, Z., et al., *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*, 1997. **15**(5): p. 325-31.
125. Nakata, K., et al., *Mycobacterium tuberculosis enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **155**(3): p. 996-1003.
126. Lawn, S.D., et al., *Sustained plasma TNF-alpha and HIV-1 load despite resolution of other parameters of immune activation during treatment of tuberculosis in Africans*. *AIDS*, 1999. **13**(16): p. 2231-7.
127. Sereti, I., *Where have all the T cells gone?* *Blood*, 2009. **114**(4): p. 751-2.
128. Decrion, A.Z., et al., *HIV and inflammation*. *Curr HIV Res*, 2005. **3**(3): p. 243-59.
129. Jindani, A., et al., *The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis*, 1980. **121**(6): p. 939-49.
130. Kapina, M.A., et al., *CD27^{low} CD4⁺ T lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27^{high} precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection*. *J Immunol*, 2007. **178**(2): p. 976-85.
131. Winslow, G.M., et al., *Persistence and turnover of antigen-specific CD4 T cells during chronic tuberculosis infection in the mouse*. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 2046-52.