



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPROMISO DE LAS CÉLULAS T DE MEMORIA CENTRAL EN LA
PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR VIH**

TESIS

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

PRESENTA

ULISES ORBE ARTEAGA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE DEL 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: SATURNINO DE LEON CHAPA**
VOCAL: **Profesor: IGNACIO CAMACHO ARROYO**
SECRETARIO: **Profesor: HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA**
1er. SUPLENTE: **Profesor: ROCIO GABRIELA TIRADO MENDOZA**
2° SUPLENTE: **Profesor: MARIO ADAN MORENO EUTIMIO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

ASESOR DEL TEMA:

DR. HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA

SUSTENTANTE:

ULISES ORBE ARTEAGA

„Wovon man nicht sprechen kann, darüber muss man schweigen.“

Ludwig Wittgenstein

Agradecimientos

Gracias al Dr. Enrique Espinosa, asesor de tesis, por depositar su confianza en mí y por sus valiosas contribuciones científicas y filosóficas que han ayudado a consolidar mi visión científica así como por su disponibilidad en la corrección de este manuscrito. Al Dr. Santiago Pérez Patrigeon, que hizo posible la obtención de muestras de pacientes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán y al Mtro. Gustavo Olvera, sin cuya participación en el trabajo de laboratorio y adquisición de datos no hubiera sido posible realizar el presente trabajo. También me gustaría agradecer al Dr. Saturnino por mostrarme el maravilloso universo de la inmunología.

A mi padre, incansable viajero del conocimiento, amante de la vida y maestro, cuya lucha por rebasar sus propias metas ha sido un referente necesario para mí. A mi madre y mis hermanos David y César, quienes con su apoyo y cariño han contribuido directa o indirectamente a seguir preparándome.

A mis profesores de la Facultad de Química, que dedican gran parte de su vida a compartir no sólo sus conocimientos, sino su pasión por las Ciencias Químicas. Finalmente a todos los colegas y amigos de la universidad, que me acompañaron en la aventura de estudiar en la Facultad de Química y han contribuido a formarme no sólo como científico, sino como ser humano. A Emmanuel, que me ha enseñado a no rendirme en la búsqueda de mis sueños. A Pablo, quien me ha enseñado a poner en práctica su filosofía proactiva. Y finalmente a Jnn, de quien aprendí a ser un buen observador y apreciar esos pequeños detalles que hacen a la vida ser tan asombrosa.

Índice

Abreviaturas y nomenclatura.....	7
1 Introducción	8
2 Marco teórico	9
2.1 Epidemiología de la infección por VIH.....	9
2.2 Historia natural de la infección por VIH.....	10
2.2.1 Infección primaria	10
2.2.2 Período asintomático	11
2.2.3 Periodo sintomático.....	11
2.3 Destrucción de los linfocitos T CD4 ⁺ en la infección por VIH.....	12
2.3.1 Efecto citopático de la replicación viral y pérdida progresiva de linfocitos T CD4 ⁺ .	12
2.3.2 Dinámica de recambio de las células T en la infección por VIH	13
2.3.3 Respuestas proliferativas en la infección por VIH.....	14
2.3.4 Activación inmune crónica, disminución de células T CD4 ⁺ y carga viral	14
2.4 Fenotipo, funcionalidad y diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T de memoria.....	16
3 Hipótesis y justificación	20
4 Objetivos.....	23
4.1 Objetivos generales	23
4.2 Objetivos particulares	23
5 Metodología.....	24
5.1 Sujetos de estudio.....	24
5.2 Separación de PBMC	24
5.3 Tinciones.....	24
5.3 Diseño de paneles de anticuerpos para citometría multiparamétrica.....	25
5.4 Inmunofenotipificación <i>ex vivo</i>	30
5.5 Controles de isotipo	30
5.6 Compensación.....	31
5.7 Análisis de datos citométricos.....	31
5.8 Estrategias de análisis o <i>gating</i>	31
5.8.1 Estrategia de gating de compromiso para células CD4 ⁺	32

5.8.2 Estrategia de gating de compromiso para células CD8 ⁺	34
5.8.3 Estrategia de gating de activación para células CD4 ⁺	37
5.8.4 Estrategia de gating de activación para células CD8 ⁺	39
5.9 Análisis estadístico.....	41
6 Resultados.....	43
6.1 Células T CD4 ⁺ en la infección por VIH	43
6.1.1 Disminución de células T CD4 ⁺ en la infección por VIH	43
6.1.2 Compromiso Th1/Th2 y diferenciación de células T CD4 ⁺	45
6.1.3 Compromiso Th1/Th2 y activación de células T CD4 ⁺	48
6.1.4 Compromiso Th1/Th2 y senescencia en células T CD4 ⁺	51
6.1.5 Compromiso y activación de las células T CD4 ⁺ de memoria centrales	54
6.2 Células T CD8 ⁺ en la infección por VIH	63
6.2.1 Aumento de células T CD8 ⁺ en la infección por VIH.....	63
6.2.2 Activación en células T CD8 ⁺	64
6.2.3 Activación en células T de memoria centrales CD8 ⁺	64
6.2.4 Activación en células T comprometidas	66
6.2.5 Activación en células pre Th1	67
6.2.6 Activación y compromiso de las células T de memoria centrales CD8 ⁺	70
7 Discusión	76
8 Conclusiones	84
9 Referencias	85

Abreviaturas y nomenclatura

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention) Atlanta, GA, USA.

Célula activada: Célula T en estado reactivo, capaz de participar en la respuesta inmune; se caracterizaron en el presente estudio por la expresión del marcador CD38

Célula comprometida: Célula T con fenotipo CD45RA⁻ CCR7⁺ CXCR5⁻

Célula T de memoria central (T_{cm}): Célula T con fenotipo CD45RA⁻ CCR7⁺

CMV: Citomegalovirus

CV: Carga viral. Copias de ARN de VIH/mL de sangre.

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

IFN γ : Interferón gamma

LTC: Linfocito T citotóxico

NK: Células “asesinas naturales” (Natural Killer)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS: Tampón salino-fosfato (Phosphate Buffer Saline)

PE: Ficoeritrina

PerCP: Proteína peridinín clorofila

Pre Th1: Célula T con fenotipo CD45RA⁻ CCR7⁺ CXCR5⁻ CXCR3⁺ CCR4⁻

Pre Th2: Células T con fenotipo CD45RA⁻ CCR7⁺ CXCR5⁻ CXCR3⁻ CCR4⁺

ARN: Ácido ribonucleico

SIDA (sida) Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIV: Virus de la inmunodeficiencia en simios

SRA: Síndrome retroviral agudo

TARAE Terapia antirretroviral altamente efectiva

TCR Receptor de la célula T (T-cell Receptor)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (Tumor Necrosis Factor α)

1 Introducción

Una de las características más relevantes de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es la pérdida gradual de las células T CD4+ en sangre periférica, el cual predice el avance de la enfermedad, que culmina con la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Actualmente se desconocen con exactitud los mecanismos mediante los cuales el VIH origina esta pérdida en los pacientes infectados. Uno de los posibles mecanismos que podría estar participando en la patogénesis de la infección es la pérdida de la capacidad regenerativa de las células T CD4+. Se ha descrito que las células T de memoria central (Tcm) cumplen esa función regenerativa, renovando continuamente el repertorio de linfocitos T de memoria. En el presente trabajo se estudiaron las células Tcm CD4+ de pacientes infectados por VIH. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica por gradiente de Ficoll y se realizaron seis tinciones *ex vivo*. Cada una de las tinciones consistió de una combinación de siete marcadores. Un marcador para definir la población en estudio (CD4+ o CD8+), dos para definir la población de memoria central (CD45RA y CCR7), un marcador para definir el fenotipo de compromiso a funciones efectoras (CXCR5), dos para definir el perfil pre Th1 o pre Th2 de las células T de memoria central (CXCR3 y CCR4, respectivamente) y finalmente un marcador para evaluar el grado de diferenciación, activación o senescencia de las Tcm CD4+ (CD27, CD38 o CD57, respectivamente). Se encontró que las células activadas, con fenotipo de compromiso a funciones efectoras Th1 y Th2 (células pre Th1 y pre Th2), se encuentran sobre representadas dentro de las células Tcm CD4+, lo cual podría estar contribuyendo al desgaste de la capacidad regenerativa y a la pérdida paulatina de linfocitos T CD4+ en la infección por VIH. Adicionalmente se encontró que en pacientes VIH+ se presentan múltiples subpoblaciones de linfocitos T CD8+ notablemente activadas, sin afectar la distribución de las células comprometidas a funciones efectoras dentro de las células Tcm CD8+. Finalmente se encontró que en la infección por VIH también se ven alterados los patrones normales de diferenciación y senescencia dentro de las células pre Th1 y pre Th2.

2.1 Epidemiología de la infección por VIH

Desde su descripción en 1981 hasta la actualidad, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha causado más de 25 millones de muertes [1]. De acuerdo a las cifras publicadas por ONUSIDA/OMS en el 2009, a nivel mundial cerca de 33.3 millones de personas se encontraban infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del SIDA, de las cuales 2.6 millones habían adquirido la infección recientemente; ese mismo año 1.8 millones murieron a causa del SIDA. Se estima que en América latina el SIDA causó alrededor de 58,000 muertes en el 2009 y 92,000 personas fueron infectadas ese año [1]. Con una prevalencia actual cercana al 0.8% a nivel mundial [1], la infección por el VIH constituye un grave problema de salud pública que requiere la atención conjunta de los profesionales de la salud, gobiernos y organizaciones civiles.

A 30 años de los primeros reportes de SIDA se han obtenido avances importantes que han permitido conocer mejor la naturaleza de la infección por VIH así como la respuesta del hospedero y los mecanismos de patogénesis del virus. Se ha definido la estructura y naturaleza molecular del VIH, su ciclo de replicación [2] así como las moléculas que participan en la respuesta inmune contra la infección [3]. Se han identificado diferentes puntos clave en el ciclo de replicación viral, lo cual ha permitido desarrollar estrategias farmacoterapéuticas para actuar de manera simultánea sobre diferentes blancos potencialmente vulnerables del VIH [4]. A pesar de todos estos avances no existe tratamiento efectivo para la infección o vacuna efectiva para prevenir la infección por VIH [5]. Con la finalidad de desarrollar mejores estrategias terapéuticas y preventivas, es necesario comprender los puntos clave del desarrollo de la enfermedad por VIH. Uno de esos aspectos fundamentales lo constituyen los mecanismos mediante los cuales la infección por VIH origina la pérdida progresiva e irreversible de células T CD4⁺ en ausencia de tratamiento antirretroviral, induciendo un estado de inmunodepresión que condiciona la aparición de infecciones oportunistas y diferentes tipos de cáncer que eventualmente terminarán con la vida del individuo infectado.

2.2 Historia natural de la infección por VIH

El proceso patogénico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1) y tipo II (VIH-2) se caracteriza por tres etapas: la etapa inicial o infección primaria, la fase intermedia o asintomática y finalmente la etapa sintomática en la que se desarrolla SIDA.

2.2.1 Infección primaria

La primera etapa de la infección se caracteriza por una rápida disminución de las células T CD4⁺ y una acelerada tasa de replicación viral. Durante esta primera fase de la infección (infección primaria) el virus infecta principalmente células T CD4⁺, células dendríticas, macrófagos y células de las mucosas de las cavidades rectal o cervicovaginal [6]. Durante la fase aguda, las células efectoras de las mucosas son especialmente susceptibles de ser infectadas por el VIH y son preferencialmente destruidas en comparación con los linfocitos T de sangre periférica [7]; dicho fenómeno podría estar asociado a la alta expresión del correceptor de entrada viral CCR5 y al estado de activación de las células T de memoria efectoras en mucosas que facilitan la propagación viral [8]. Alrededor de 7 días después de la entrada del virus al organismo el número de partículas infecciosas (PI) asciende hasta 5 000 PI/mL de plasma o más de 100 000 copias de ARN/mL de plasma [9]. Luego de 10 a 14 días, cerca de 200 mil millones de células T CD4⁺ han sido infectadas [10]. Cerca del 85% de los individuos recién infectados manifiestan durante esta primera fase una variedad de síntomas no específicos que suelen ser confundidos con otras infecciones virales (síndrome retroviral agudo). Los síntomas típicos del síndrome retroviral agudo (SRA) son fiebre, linfadenopatía, faringitis, exantema, mialgia, diarrea y lesiones mucocutáneas [11]. Durante la infección aguda el número de células T CD8⁺ se eleva, como sucede comúnmente en las infecciones virales y se lleva a cabo una producción importante de citocinas proinflamatorias y quimiocinas [3], lo que podría explicar los síntomas del SRA. De 3 a 6 meses después de la infección primaria, los niveles de viremia disminuyen sustancialmente y se mantiene una replicación episódica con niveles variables de producción viral [12]. Una vez que la infección viral se traslada del sitio inicial de entrada a los ganglios linfáticos locales, la infección crónica ha quedado establecida [13].

2.2.2 Período asintomático

Después de 4 a 8 semanas después de la infección primaria por el virus, el número de células T CD4⁺ se recupera hasta alcanzar niveles cercanos a los basales, aunque por debajo de lo normal. Posteriormente la pérdida de células T CD4⁺ se produce de manera constante a una tasa estimada de 25 a 60 células/ μ L de sangre por año [12]. Esta pérdida gradual es característica de la fase crónica y suele ser asintomática. Debido a que durante esta fase no se presentan manifestaciones clínicas evidentes también se conoce como latencia clínica, aunque el virus no se encuentra en un estado de latencia ya que continúa replicándose, a una tasa baja, particularmente en ganglios linfáticos [14]. La población creciente de virus es heterogénea y refleja las variantes generadas como respuesta a la presión selectiva de la respuesta específica del sistema inmune [15]. La frecuencia de células T CD4⁺ infectadas durante la fase crónica es de 0.01-1% [16, 17], lo cual, como se verá más adelante descarta el efecto citopático directo del virus como causa proximal de la disminución progresiva de la cuenta de células T CD4⁺ durante la infección.

2.2.3 Período sintomático

Después de 8 a 12 años después de la infección primaria, la mayoría de los individuos infectados desarrolla síntomas, la cuenta de células T CD4⁺ caen por debajo de las 350 células/ μ L, la carga viral se ve incrementada drásticamente y permanece elevada durante la fase avanzada (desarrollo de SIDA) y las respuestas antivirales de las células T CD8⁺ disminuyen. En esta etapa la carga viral en sangre periférica y tejido linfoide alcanza niveles similares y las respuestas inmunes humorales se ven disminuidas. Los linfocitos B muestran una expresión incrementada de marcadores de activación y proliferación [18]. Adicionalmente las células B tienden a encontrarse en estados terminales de diferenciación, dando lugar a una secreción aumentada de inmunoglobulinas (hipergammaglobulinemia)[19]. La gran mayoría de los anticuerpos producidos en esta etapa son inespecíficos, lo cual podría explicar por qué se presenta una inmunidad humoral deficiente al mismo tiempo que se encuentran elevados los niveles de anticuerpos en sangre [20].

El periodo sintomático de la infección se divide en dos etapas: la etapa sintomática temprana y SIDA. A la etapa sintomática temprana, también conocida como

Categoría B dentro del sistema de clasificación de los *Centres for Disease Control* (CDC), se le da el nombre de “complejo asociado a SIDA”. Ejemplos de condiciones que se incluyen en la categoría clínica B son la candidiasis oral, leucoplasia oral vellosa, Herpes Zoster que se presenta como dos episodios o más de un dermatoma, neuropatía periférica, listeriosis y displasia cervical [21]. Aunque estas condiciones clínicas se encuentran asociadas a muchos otros trastornos, son más frecuentes y severas durante la infección por VIH.

Actualmente los CDC consideran la aparición de SIDA en todo individuo adulto infectado con VIH, si se presenta cualquiera de los siguientes signos clínicos: a) Una cuenta de linfocitos T CD4⁺ < 200/μL, b) Un porcentaje de linfocitos T CD4⁺ respecto a los linfocitos totales menor a 14% o c) Cualquiera de las tres condiciones clínicas: tuberculosis pulmonar, neumonía recurrente o cáncer cervical invasivo [22]

2.3 Destrucción de los linfocitos T CD4⁺ en la infección por VIH

El fenómeno más representativo de la infección por VIH es la disminución progresiva e irreversible de células T CD4⁺ [23]. La causa de esta pérdida paulatina es uno de los temas más fundamentales y controversiales de la investigación del SIDA. Inicialmente se había postulado, dada la agresiva cinética de replicación viral, que la destrucción de los linfocitos T CD4⁺ se debía al efecto citopático directo sobre sus células blanco, las células CD4⁺ [24]. Sin embargo, el efecto citopático no explica por sí solo todos los trastornos inmunitarios que originan la pérdida gradual de linfocitos T CD4⁺ en pacientes infectados [25].

2.3.1 Efecto citopático de la replicación viral y pérdida progresiva de linfocitos T CD4⁺

El modelo de la destrucción viral directa como único factor causal de la disminución progresiva de linfocitos T CD4⁺ presenta críticas importantes. El VIH infecta de manera productiva sólo al 0.01-1% de los linfocitos totales [16, 17], lo que sugiere que la destrucción de la mayoría de las células CD4⁺ e inducción de SIDA no se debe únicamente al efecto citopático de la replicación viral. De cualquier forma el VIH infecta principalmente células CD4⁺ activadas [26], de las cuales una fracción muere por efecto citopático y otro tanto por la acción de linfocitos T citotóxicos (LTC)

específicos. Sin embargo, resulta irrelevante que las células activadas sean eliminadas por causa directa del virus, acción de LTC o por muerte celular inducida por activación (MCIA) ya que estas células son de todas formas de vida corta [26]. Adicionalmente se ha encontrado que la tasa de muerte celular en pacientes con terapia antirretroviral altamente efectiva (TARAE) no es significativamente diferente en pacientes sin tratamiento [27]. De acuerdo a estos estudios, la destrucción celular es independiente de la carga viral, lo cual no sucede con la tasa de proliferación celular, la cual se ve significativamente incrementada en pacientes no tratados en comparación con pacientes con TARAE [27]. Se han reportado casos de pacientes controladores élite, capaces de mantener cargas virales hasta niveles indetectables en ausencia de tratamiento antirretroviral, que presentan una pérdida gradual de células T CD4⁺ y progreso a SIDA [28] y en los cuales esa pérdida celular está asociada a grados de activación de células T CD8⁺ notablemente elevados [28]. Finalmente se ha visto que los niveles de replicación viral explican menos de la mitad de la variabilidad de las tasas de disminución de células T CD4⁺ y progresión a SIDA [29, 30]. Todas estas evidencias experimentales sugieren que el virus por sí solo no es responsable de las alteraciones de la función inmune que determinan la aparición de SIDA y que otros factores, como la activación crónica o pérdida de la capacidad regenerativa podrían desempeñar un papel importante en la pérdida de células T CD4⁺.

2.3.2 Dinámica de recambio de las células T en la infección por VIH

Diversos estudios de cinética de linfocitos T circulantes en individuos infectados por VIH y donadores sanos demuestran que existe un incremento en el recambio celular de las células T en los pacientes infectados por el VIH-1 [31]. Tanto la tasa de proliferación como la tasa de muerte celular se ven incrementadas durante la infección [32]. Se ha propuesto que para compensar la pérdida linfocitaria debe existir una fuente regenerativa masiva [32]. El suministro celular podría provenir del timo o de las células T de memoria. Existen modelos de infección en macacos con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) en los que se ha observado que la timectomía no tiene ningún efecto discernible en la progresión a SIDA, es decir, no presentan la fase final de la infección observada en humanos [33]; de acuerdo con estos

resultados es poco probable que el suministro celular compensatorio provenga del timo, con lo cual es plausible considerar que las células T de memoria participen de manera importante en la regeneración celular durante la fase crónica de la infección.

2.3.3 Respuestas proliferativas en la infección por VIH

Junto con el modelo de pérdida gradual de células T CD4⁺, basado primordialmente en la infección directa del virus, se postuló inicialmente que el sistema inmune desarrollaba una respuesta homeostática proliferativa para compensar la muerte celular durante la fase crónica [24, 34]. Este segundo modelo, conocido como “tap and drain” [35], sostiene que la progresión a SIDA es fundamentalmente el resultado del deterioro de la respuesta homeostática proliferativa del sistema inmune para compensar la pérdida de células T CD4⁺ [24, 34]. Sin embargo, este modelo representa una visión simplista y limitada, ya que no considera que la respuesta proliferativa podría no deberse exclusivamente a respuestas inmunes homeostáticas, sino que podría tratarse de una respuesta relacionada a un estímulo antigénico o señales pro inflamatorias, es decir, activación inmune [36]. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y lo más probable es que se encuentren interrelacionados [37]. Es posible imaginar un panorama en el cual la activación favorece la respuesta proliferativa ante estímulos homeostáticos en el compartimento regenerativo de las células T, sin descartar que pueda ser esta misma activación crónica la responsable de la pérdida de estas células con capacidad regenerativa en lugar de la replicación viral o que ambas se encuentren participando en el mecanismo inmunopatogénico de destrucción de las células T CD4⁺.

2.3.4 Activación inmune crónica, disminución de células T CD4⁺ y carga viral

Los primeros estudios que consideraron a la activación crónica como un factor importante en la patogénesis del SIDA fueron publicados por Ascher, Sheppard [38] y de forma paralela por el equipo de Grossman [39]. Más tarde Giorgi y sus colaboradores publicaron una serie de estudios clínicos en los cuales observaron que el nivel de activación de las células T CD8⁺, determinado por la expresión de los antígenos CD38 y HLA-DR, correlaciona mejor con el progreso de la enfermedad que la carga viral [40-42]. Dichas descripciones constituyen pruebas correlativas que señalan la importancia de la activación crónica en el progreso de la enfermedad. Otro

hallazgo trascendental que apoya la visión de la activación crónica como factor crucial en el desarrollo de SIDA es proporcionado por diversos estudios de infección con el SIV en sus huéspedes naturales, el mono verde africano y el mangabey, en los cuales la infección por SIV es incapaz de inducir SIDA, a pesar de las altas tasas de replicación viral, en ausencia de elevados niveles de activación inmune [43-45]. Adicionalmente se ha visto en modelos animales murinos que la activación inmune crónica, en ausencia de infección vírica, parece ser suficiente para generar una disminución de células T, disfunción inmune severa y susceptibilidad a infecciones oportunistas [46]. Sousa A. E. et al. estudiaron las relaciones existentes entre recambio celular, activación y carga viral, encontrando que tanto los niveles de activación como la disminución de células CD4⁺ son independientes de la carga viral, lo cual sugiere algún tipo de relación causal entre la activación crónica y la destrucción celular [47].

Los mecanismos exactos por los cuales la activación inmune crónica induce la pérdida progresiva de células CD4⁺, disfunción inmune y finalmente progresión a SIDA permanecen aún desconocidos; sin embargo, desde que se asoció la activación inmune crónica a la progresión de la enfermedad por VIH se han planteado diferentes posibilidades, de la cuales se revisarán a continuación las más importantes.

El VIH se replica de manera más eficiente en linfocitos T CD4⁺ activados [48], por lo cual la activación inmune crónica se encontraría facilitando la replicación viral generando una mayor cantidad de células blanco de infección. En este contexto, la activación preferencial, infección y muerte de las células T CD4⁺ VIH-específicas [48] podría contribuir a la reducción de las respuestas cooperadoras de los linfocitos T CD4⁺, participando de manera indirecta en el detrimento de las respuestas citotóxicas mediadas por los linfocitos T CD8⁺ contra el VIH. Otra consecuencia de la activación crónica que puede tener efectos negativos a largo plazo es la expansión de células T efectoras activadas (TE), tanto CD4⁺ como CD8⁺. La expansión de una población celular de vida corta a expensas de los reservorios de células vírgenes y de memoria puede deteriorar la capacidad regenerativa, originando de manera indirecta la pérdida de células CD4⁺[26, 48, 49]. La activación inmune crónica también puede dar origen a

una senescencia proliferativa a nivel de las células T de memoria central [50]. Adicionalmente la expansión de células T efectoras puede estar acompañada de la producción de citocinas pro-inflamatorias y pro-apoptóticas que cierran el círculo vicioso de mantenimiento de un estado de activación inmune generalizada asociada a la infección por VIH [36]. Finalmente un ambiente proinflamatorio crónico, como el de la activación inmune en la infección por VIH, interfiere con la función celular de múltiples tipos celulares, incluyendo linfocitos B, células NK, células dendríticas, células T $\gamma\delta$ y monocitos [51-55], y puede deteriorar la capacidad regenerativa a nivel de médula ósea, timo y nódulos linfáticos [56-59]. Es de particular interés el hecho de que el incremento en la cuenta de células T CD4⁺, posterior al tratamiento antirretroviral altamente efectivo, correlaciona mejor con la disminución de la activación inmune y apoptosis, asociada a la TARAE, que con la supresión de la replicación del VIH [60-62]. En resumen la activación inmune crónica podría estar participando en el progreso a SIDA en la infección por VIH ya sea promoviendo la replicación viral y el desgaste de la respuesta inmune específica, deteriorando la capacidad regenerativa y de esta forma originando una pérdida progresiva de las células T CD4⁺, inducir una respuesta regenerativa senescente o alterando la función de múltiples tipos celulares.

2.4 Fenotipo, funcionalidad y diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos T de memoria.

Los linfocitos T de memoria constituyen una población celular fenotípica y funcionalmente heterogénea que se puede dividir a grandes rasgos en dos grupos de acuerdo a su capacidad para alojarse en diferentes tejidos y sus funciones efectoras [63-65] en células T de memoria centrales (T_{cm}) y células T de memoria efectoras (T_{em}). Las células T de memoria centrales circulan a través del tejido linfático secundario a través de la sangre y canales linfáticos. Expresan los antígenos CCR7 y CD62L, los cuales les permiten situarse en tejido linfático secundario y recircular [66-68]. Las células T de memoria efectora se localizan en tejidos efectores extralinfoides, tales como la lámina propia y el epitelio [63], no expresan CCR7 ni CD62L y responden activamente frente a un estímulo antigénico, volviéndose células efectoras;

luego de perder contacto con el antígeno, estas células pueden sobrevivir hasta una semana o volverse células Tcm [69].

Luego de tener contacto con el antígeno, las células Tcm producen citocinas rápidamente, reducen su expresión de CCR7 y se desplazan a los órganos periféricos, diferenciándose a células Tem. Las células Tem permanecen en los tejidos periféricos para llevar a cabo su actividad efectora secretando citocinas como IFN- γ y TNF- α [70] ante un estímulo antigénico. Las Tem poseen capacidades proliferativas limitadas, a diferencia de las Tcm, las cuales tienen más ciclos replicativos y viven más tiempo [71]. Acerca del origen de las células T de memoria centrales, existen diversos estudios que sostienen que éstas son el producto de intermediarios en diferentes estados de diferenciación [72].

Las células T de memoria centrales se pueden dividir a su vez en aquellas que pueden diferenciarse, en respuesta a estímulos homeostáticos (IL-7 e IL15), a células Th1 o Th2 y aquellas que pueden diferenciarse sólo en presencia de citocinas polarizantes y un estímulo antigénico [73]. Aquellas células que pueden diferenciarse, en ausencia de citocinas polarizantes, a células Th1 y Th2 se distinguen por la expresión de los antígenos CXCR3 y CCR4 y se denominan pre-Th1 y pre-Th2, respectivamente [73]. Se dice que las células pre-Th1 y pre-Th2 son células polarizadas; se encuentran comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras (producción de IFN- γ e IL-4, respectivamente) y pueden distinguirse de acuerdo a la expresión de CXCR3 o CCR4. Las células que carecen de propiedades Th1 y Th2 se caracterizan por la expresión de CXCR5, el receptor de CXCL13, una quimiocina presente en los folículos de los linfocitos B [74] y se dice de ellas que se encuentran no polarizadas. Estas células no comprometidas proliferan y se diferencian a Th1 o Th2 en respuesta a un estímulo antigénico determinado y citocinas polarizantes. Las células T de memoria efectoras (Th1 o Th2), al ser reestimuladas *in vitro* bajo condiciones polarizantes opuestas, conservan el perfil de expresión de citocinas Th1 o Th2, pero adquieren la expresión de genes de citocinas opuestas [75].

Las células T de memoria se encuentran distribuidas entre las diferentes subpoblaciones (pre-Th1, pre-Th2, no polarizadas, Tem Th1 y Tem Th2) dependiendo

de la naturaleza de la respuesta inmune generada [71]. Lozza y su equipo encontraron que afinidad con la que se unen las células T a su antígeno puede determinar la capacidad proliferativa ante estímulos homeostáticos y la capacidad de respuesta ante estímulos antigénicos posteriores de las células T de memoria [76]. Es así como la naturaleza de diferentes respuestas inmunes pueden dar como resultado distribuciones diferentes entre las distintas subpoblaciones de memoria central. Los resultados de Lozza sugieren que el origen de las diferentes subpoblaciones de memoria dependen tanto de la naturaleza de la respuesta inmune como del rapto de clonas en distintos grados de diferenciación. El modelo que más se ajusta a estas evidencias es el de diferenciación progresiva, propuesto por Sallusto *et al.* [77], el cual considera que la generación de las subpoblaciones de memoria representa un proceso de diferenciación gradual. Existen otros modelos de diferenciación que tratan de explicar el surgimiento de diferentes subpoblaciones dentro de las células T de memoria; el modelo de diferenciación asimétrica contempla que diferentes subpoblaciones de células T de memoria pueden surgir a partir de células vírgenes [78-80] y que las diferencias en el destino que éstas tengan después del encuentro con el antígeno dependen de la fuerza con la que el TCR se una al antígeno en contexto del MHC, de la concentración del antígeno, acceso a citocinas, señales coestimuladoras y el tiempo de contacto con el antígeno [76, 81]. La variedad de las subpoblaciones de memoria dependerá, en última instancia, del estado de diferenciación en el que sean reclutadas las células después del encuentro con el antígeno.

Las células T de memoria son capaces de persistir por mucho tiempo en ausencia del antígeno. Uno de estos ejemplos es la persistencia de células Tcm CD4⁺ específicas de virus vaccinia por más de 70 años después de la vacunación [82]. El mantenimiento de las células T de memoria central depende de la expresión de moléculas antiapoptóticas (p. ej., Bcl_{xL}) y su capacidad de responder ante citocinas homeostáticas (p. ej., IL-15, IL-7) [83, 84]. En vista de que algunas Tcm pierden la expresión de CCR7, adquieren receptores de alojamiento en tejidos periféricos y funciones efectoras, se ha sugerido que las Tcm pueden estar funcionando como células troncales capaces de auto renovarse y contribuir al mantenimiento de las

células Tem, produciendo continuamente células capaces de diferenciarse a funciones efectoras [77].

Actualmente no existe consenso general respecto a la relación ontogénica existente entre las células Tcm y Tem. Un estudio realizado en células de ratón T CD8⁺ específicas para el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) documentó una reversión de las células Tem a Tcm, las cuales se mantenían estables [85]. En un estudio de la respuesta de las células T frente al antígeno H-Y se demostró que sólo una fracción de las células Tem revertía al fenotipo Tcm. Esta reversión dependía de la expresión de L-selectina y las células nunca recuperaron el potencial proliferativo característico de las Tcm [86]. En ambos estudios los autores coinciden en que las células T CD8⁺ Tem de ratón no son una población estable, ya sea porque mueren o reversionan a Tcm. A diferencia de lo reportado en ratones, en humanos las células T CD4⁺ y CD8⁺ Tem pueden ser encontradas varios años después del encuentro con el antígeno [73, 87]; esto sugiere dos alternativas: 1) Las células Tem de humano son intrínsecamente estables o 2) Las células Tem de humano son continuamente suministradas por las Tcm reguladas homeostáticamente. Puesto que las células Tem tienen una limitada capacidad proliferativa y son de vida corta [73, 88], lo más probable es que las Tcm sean las encargadas de suministrar continuamente a las Tem.

3 Hipótesis y justificación

El origen de la pérdida gradual de células T CD4⁺ durante la infección crónica por VIH, que da lugar al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en su última etapa, permanece desconocido. El modelo que propone que la pérdida celular se debe solamente al desgaste de la capacidad proliferativa del organismo, frente a estímulos homeostáticos, para compensar la pérdida masiva de células T CD4⁺ durante la infección aguda presenta una visión sobresimplificada que no es capaz de describir con precisión la fase crónica de la infección. Existen cada vez más evidencias que vinculan la pérdida de células T CD4⁺ con la activación crónica [89-93]. La hipótesis propuesta en el presente estudio sostiene que la activación crónica participa y dirige la pérdida de la capacidad regenerativa del sistema inmune, comprometiendo la función regenerativa de las células T de memoria centrales CD4⁺, dando lugar a la pérdida paulatina de células T CD4⁺ que caracteriza a la patogénesis de la infección por VIH.

Las células T de memoria centrales poseen muchas características que son normalmente asociadas a las células troncales [94]. Una de ellas es la capacidad de autorenovarse. Las células T de memoria centrales proliferan en respuesta a señales homeostáticas, manteniendo el número de células de memoria casi constante [95]. Es esta capacidad regenerativa la que permite mantener la memoria inmunológica por periodos prolongados de tiempo. Aparentemente las citocinas IL-2, IL-7 e IL-15 participan en la proliferación celular regenerativa de las células T de memoria centrales [95]. Como las células troncales, las células T de memoria centrales poseen una relativa pluripotencialidad, ya que en respuesta a estímulos antigénicos son capaces de diferenciarse rápidamente a células con funciones efectoras de vida corta, las cuales serán eliminadas conforme desaparece el estímulo antigénico [71]. La naturaleza del origen de las subpoblaciones de células T de memoria central y memoria efectora, así como sus relaciones ontogénicas, permanece controversial ya que se han reportado reversiones entre los dos fenotipos tanto en modelos animales como en humanos [63, 85, 86]; sin embargo, independientemente de que las células T de memoria centrales sean el producto de la reversión de células T de memoria

efectoras o que se generen desde el primer encuentro con el antígeno, se ha observado que las células T de memoria efectoras son inherentemente inestables [50, 85, 86], lo que sugiere que el mantenimiento de éstas últimas esté en función de la proliferación y diferenciación de las células T de memoria centrales. Es de esta forma como el mantenimiento de las células T de memoria efectoras, que constituyen la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, depende en última instancia de la capacidad regenerativa e influjo de las células T de memoria centrales. Dentro de las múltiples subpoblaciones de células T de memoria centrales CD4⁺ es posible distinguir a dos subpoblaciones celulares identificadas como células T CD4⁺ pre Th1 y pre Th2 [96], las cuales se caracterizan por poseer capacidades replicativas limitadas y producir en baja cantidad IFN- γ e IL-4, respectivamente. Las células que presentan fenotipo pre Th1 o pre Th2 son capaces de diferenciarse a células Th1 o Th2 en ausencia de estímulos antigénicos [73] y en respuesta a estímulos homeostáticos. Se dice de las células pre Th1 y pre Th2 que se encuentran comprometidas, ya que al enfrentarse a un estímulo homeostático o antigénico, se diferenciarán a células con funciones efectoras, perdiendo las características propias de las células T de memoria centrales. Las células no comprometidas, a diferencia de las células comprometidas, necesitan además de un estímulo antigénico un ambiente de citocinas polarizantes para poder diferenciarse a células con funciones efectoras [73], por lo cual retienen aquellas características propias de las células T de memoria centrales tan importantes para regenerar la memoria inmunológica. Una vez que las células se han diferenciado a tener funciones efectoras pasan a ser células de vida corta, con limitados ciclos replicativos y más susceptibles a experimentar procesos apoptóticos [71]. En el presente trabajo se plantea la hipótesis de que las células pre Th1 y pre Th2 se encuentran incrementadas dentro de las células T de memoria centrales CD4⁺ y activadas durante la infección por VIH.

Las células T CD8⁺ poseen una organización, a nivel de células T de memoria centrales, muy similar a las células T CD4⁺. El hecho de que durante la fase asintomática de la infección por VIH no se presenta una pérdida progresiva de células T CD8⁺, sino que por el contrario, se observa una expansión de células T citotóxicas, ayudará a entender la relación existente entre composición de las células T de

memoria centrales en células T CD8+ y CD4+ y el mantenimiento de la capacidad regenerativa.

Hipótesis central

En la infección por VIH, las células T de memoria centrales CD4+ se encuentran activadas y comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras, lo cual disminuye su capacidad regenerativa, contribuyendo a la pérdida progresiva de linfocitos T CD4+ en los pacientes VIH+.

4 Objetivos

4.1 Objetivos generales

- Determinar el grado de compromiso a diferenciarse a funciones efectoras y activación de las células T CD4⁺ de memoria centrales en la infección por VIH
- Describir el grado de compromiso a diferenciarse a funciones efectoras y activación de las células T CD8⁺ de memoria centrales en la infección por VIH
- Caracterizar a las células comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras CD4⁺ y CD8⁺ con fenotipo pre Th1 y pre Th2 en términos de diferenciación, activación y senescencia en la infección por VIH

4.2 Objetivos particulares

- Comparar el grado de diferenciación en las células comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras con fenotipo pre Th1 y pre Th2 en células CD4⁺ y CD8⁺ de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺
- Determinar el grado de activación de las células comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras con fenotipo pre Th1 y pre Th2 en células CD4⁺ y CD8⁺ de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺
- Examinar el grado de senescencia de las células comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras con fenotipo pre Th1 y pre Th2 en células CD4⁺ y CD8⁺ de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺
- Estudiar el grado de compromiso a diferenciarse a funciones efectoras y activación en las células T CD4⁺ de memoria centrales de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺
- Caracterizar el grado de compromiso a diferenciarse a funciones efectoras y activación en las células T CD8⁺ de memoria centrales de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺

5 Metodología

5.1 Sujetos de estudio

Los estudios se realizaron en muestras procedentes de 6 pacientes adultos diagnosticados con la infección por VIH en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los pacientes no se encontraban recibiendo tratamiento antirretroviral y ninguno presentó síntomas asociados a infecciones oportunistas. Como grupo control se estudiaron muestras provenientes de 6 donadores adultos no infectados por el VIH y con un diagnóstico serológico de la infección por citomegalovirus. Todos los sujetos que decidieron participar en el estudio firmaron carta de consentimiento informado previamente aprobada por el comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

5.2 Separación de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron separadas por centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll [97] y resuspendidas en medio RPMI completo con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomina) y glutamina [97].

5.3 Tinciones

Se llevaron a cabo seis tinciones. Tres tinciones para células T CD4+ y tres para células CD8+. Se determinó el grado de diferenciación, activación y senescencia de acuerdo a la siguiente tabla:

Tinción	Atribución y población en estudio
1	Grado de diferenciación en células T CD4+
2	Grado de diferenciación en células T CD8+
3	Activación en células T CD4+
4	Activación en células T CD8+
5	Senescencia en células T CD4+
6	Senescencia en células T CD8+

Tabla 1

5.3 Diseño de paneles de anticuerpos para citometría multiparamétrica

Para caracterizar a cada una de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ así como los diferentes marcadores que expresan se diseñaron paneles o combinaciones de anticuerpos dirigidos contra diferentes moléculas de superficie celular. Cada anticuerpo está asociado de manera directa a un fluorocromo o se encuentra conjugado con biotina para su posterior unión con estreptavidina marcada con un fluorocromo. El empleo de múltiples fluorocromos en los paneles permite analizar la coexpresión de varios marcadores. Para cada panel se emplearon 7 anticuerpos asociados directa o indirectamente a un fluorocromo. La selección de los fluorocromos se llevó a cabo tomando en cuenta el espectro de absorción y de emisión de cada fluorocromo así como los canales de detección en el citómetro, para evitar la interferencia entre las señales obtenidas.

A continuación se muestra una tabla con el nombre del marcador (Tabla 2.1 y 2.2), el uso que se le dio en el estudio, la función que desempeña en el organismo y las células que lo expresan [98-100]

Marcador	Uso	Función	Células que lo expresan
CD4	Marcador para las células T cooperadoras	Correceptor en la unión a moléculas MHC clase II. Participa en la diferenciación tímica. Receptor primario en la infección por VIH.	Subpoblaciones de timocitos, células T que reconocen péptidos en el contexto de moléculas del MHC clase II (células T cooperadoras) y monocitos de sangre periférica.
CD8	Marcador para las células T citotóxicas	Correceptor en la unión a moléculas MHC clase I.	Subpoblaciones de timocitos, células T que reconocen péptidos en el contexto de moléculas del MHC clase I (células T citotóxicas), algunas células T $\gamma\delta$ y células NK
CD45RA	Marcador para las células T vírgenes o "naïve"	Es una molécula con función tirosina fosfatasa que participa en la activación celular.	Se expresa en los linfocitos T vírgenes y las células B

Tabla 2.1 Usos y funciones de los marcadores empleados

CCR7	Marcador para células T de memoria centrales	Receptor de quimiocinas ELC (CCL19) y SLC (CCL21).	Células T de memoria y células dendríticas activadas
CXCR5	Marcador para células T de memoria no polarizadas	Receptor de quimiocina BCL (CXCL13)	Células B y células T de memoria no polarizadas
CXCR3	Marcador para células T de memoria PreTh1	Receptor de quimiocinas Mig (CXCL9), IP-10 (CXCL10), e I-TAC (CXCL11)	Células T Pre Th1, células NK activadas y células B transformadas.
CCR4	Marcador para células T de memoria PreTh2	Receptor de quimiocinas MIP-1, RANTES, TARC y MCP-1	Células B, células T de memoria PreTh2, astrocitos, basófilos, células dendríticas, células endoteliales, enterocitos, eosinófilos, macrófagos y células NK
CD27	Grado de diferenciación. Se pierde a medida que las células se encuentran en un estado de diferenciación avanzado	Ligando de CD70. La unión CD27-CD70 representa una señal estimuladora crítica para la activación de linfocitos T	Linfocitos. Puede encontrarse de forma soluble (sCD27) en fluidos biológicos de personas sanas
CD38	Marcador de activación. Las células T lo expresan cuando se encuentran activadas.	Molécula de adhesión, se une a CD31. La unión CD38-CD31 induce activación celular y proliferación o muerte. Tiene actividad NAD ⁺ glicohidrolasa, ADP ⁻ ribosil ciclasa y ADP ⁻ ribosa hidrolasa. Es un marcador fenotípico en infección por VIH y en leucemia.	Células B y T recientemente activadas, células B de centros germinales y progenitores hematopoyéticos en algunos estados de diferenciación.
CD57	Marcador de envejecimiento. Las células T lo expresan a medida que se encuentran en estados senescentes avanzados.	Participa en reacciones de adhesión vía laminina y selectinas P y L. Su expresión correlaciona negativamente con el tamaño de los telómeros.	Subpoblaciones de células NK y células T. Tejido neuronal.

Tabla 2.2 Usos y funciones de los marcadores empleados

Panel de tinción 1. Polarización y grado de diferenciación en CD4⁺

En el panel de la tinción 1 (Tabla 3) se emplearon los marcadores CD4, CD45RA, CCR7, CXCR5, CXCR3, CCR4 para definir las distintas subpoblaciones de memoria en células T CD4⁺, grado de polarización (pre-Th1 y pre-Th2) y CD27 para evaluar el grado de diferenciación en las distintas subpoblaciones de memoria.

Marcador	Fluorocromo
CD4	APC-Cy7
CD45RA	Biotina- Estreptavidina-PE- Texas Red
CCR7	PE-Cy7
CXCR5	Alexa Fluor 488
CXCR3	PE
CCR4	Alexa Fluor 647
CD27	Per CP-Cy5.5

Tabla 3 Panel de tinción 1

Panel de tinción 2. Polarización y grado de diferenciación en CD8⁺

De forma análoga al panel de la tinción 1, en el panel de la tinción 2 (Tabla 4) se emplearon los marcadores CD45RA, CCR7, CXCR5, CXCR3, CCR4 para definir las distintas subpoblaciones de memoria en células T CD8⁺, grado de polarización (pre-Th1 y pre-Th2) y CD27 para evaluar el grado de diferenciación en las distintas subpoblaciones de memoria.

Marcador	Fluorocromo
CD8	APC-Cy7
CD45RA	Biotina- Estreptavidina-PE- Texas Red
CCR7	PE-Cy7
CXCR5	Alexa Fluor 488
CXCR3	PE
CCR4	Alexa Fluor 647
CD27	Per CP-Cy5.5

Tabla 4 Panel de tinción 2

Panel de tinción 3. Relación entre polarización y activación CD4⁺

Para el panel de la tinción 3 (Tabla 5) se utilizaron los marcadores CD45RA, CCR7, CXCR5, CXCR3, CCR4 para definir las subpoblaciones en células T CD4⁺ así como grado de polarización y CD38 para valorar activación en las subpoblaciones identificadas.

Marcador	Fluorocromo
CD4	APC-Cy7
CD45RA	Biotina- Estreptavidina-PE- Texas Red
CCR7	PE-Cy7
CXCR5	Alexa Fluor 488
CXCR3	PE
CCR4	Alexa Fluor 647
CD38	Per CP-Cy5.5

Tabla 5 Panel de tinción 3

Panel de tinción 4. Relación entre polarización y activación en CD8⁺

En el panel de la tinción 4 (Tabla 6) se emplearon los marcadores CD45RA, CCR7, CXCR5, CXCR3, CCR4 para definir las subpoblaciones en células T CD8⁺ así como grado de polarización y CD38 para valorar activación en las subpoblaciones identificadas.

Marcador	Fluorocromo
CD8	APC-Cy7
CD45RA	Biotina- Estreptavidina-PE- Texas Red
CCR7	PE-Cy7
CXCR5	Alexa Fluor 488
CXCR3	PE
CCR4	Alexa Fluor 647
CD38	Per CP-Cy5.5

Tabla 6 Panel de tinción 4

Panel de tinción 5. Polarización y grado de diferenciación en CD4⁺

En el panel de la tinción 5 (Tabla 7) se emplearon los marcadores CD45RA, CCR7, CXCR5, CXCR3, CCR4 para definir las subpoblaciones en células T CD4⁺ así como polarización y CD57 para evaluar el grado de senescencia en las subpoblaciones identificadas.

Marcador	Fluorocromo
CD4	APC-Cy7
CD45RA	PE-Texas Red
CCR7	PE-Cy7
CXCR5	Alexa Fluor 488
CXCR3	PE
CCR4	Alexa Fluor 647
CD57	Biotina- Estreptavidina-Per CP-Cy5.5

Tabla 7 Panel de tinción 5

Panel de tinción 6. Polarización y grado de diferenciación en CD4⁺

En el panel de la tinción 6 (Tabla 8) se emplearon los marcadores CD45RA, CCR7, CXCR5, CXCR3, CCR4 para definir las subpoblaciones en células T CD8⁺ así como polarización y CD57 para evaluar el grado de senescencia en las subpoblaciones identificadas.

Marcador	Fluorocromo
CD8	APC-Cy7
CD45RA	PE-Texas Red
CCR7	PE-Cy7
CXCR5	Alexa Fluor 488
CXCR3	PE
CCR4	Alexa Fluor 647
CD57	Biotina- Estreptavidina-Per CP-Cy5.5

Tabla 8 Panel de tinción 6

5.4 Inmunofenotipificación *ex vivo*

Se tomaron 1×10^6 PBMC de la suspensión celular en RPMI completo para cada tinción y se realizó un lavado con PBA (buffer salino de fosfatos que contiene 0.1% de azida de sodio y 1% de albúmina sérica bovina). Se incubaron las células 15 minutos a 4°C en la oscuridad, con los anticuerpos monoclonales específicos frente la molécula CD45RA (BD Pharmingen™) para las cuatro primeras tinciones y anticuerpos monoclonales biotinilados específicos frente al marcador CD57 (Biolegend®) para las dos restantes. Se realizó un lavado con PBA para retirar el exceso de anticuerpos no unidos y posteriormente se agregó la estreptavidina conjugada con PE-Texas Red (BD Pharmingen™) (diluida 1:1000) para las cuatro primeras tinciones y conjugada con PerCP-Cy-5.5 (Biolegend®) (diluida 1:1000) para las dos últimas tinciones; se incubaron las células 15 minutos a 4°C en la oscuridad. Se realizó un lavado más con PBA y se agregaron los anticuerpos específicos CD4-APC-Cy7 (BD Pharmingen™), CD8-APC-Cy7 (BD Pharmingen™), CCR4-AF647 (BD Pharmingen™), CCR7-PE-Cy7 (BD Pharmingen™), CXCR3-PE (BD Pharmingen™), CXCR5-AF488 (BD Pharmingen™), CD27-PerCP-Cy-5.5 (BD Pharmingen™), CD38-PerCP-Cy-5.5 (BD Pharmingen™) y CD45RA-PE-Texas Red (Invitrogen™) de acuerdo a la tinción correspondiente. Se incubaron las células 15 minutos a 4°C en la oscuridad y se llevó a cabo un último lavado con PBA. Finalmente se fijaron las células resuspendiéndolas en paraformaldehído al 1%. Los datos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACS-Canto con un mínimo de 5×10^4 eventos. Las cantidades empleadas de anticuerpos fueron las obtenidas al titular y calcular el mejor índice de tinción obtenido [101, 102], es decir, las óptimas para poder distinguir una señal positiva de una señal negativa.

5.5 Controles de isotipo

Para aquellos marcadores en los que no es posible discriminar con facilidad la señal positiva (debida a la unión específica del anticuerpo marcado) de la negativa (asociada a uniones inespecíficas) se emplearon controles negativos. Estos controles negativos consisten en inmunoglobulinas de la misma variante isotópica de las inmunoglobulinas empleadas para detectar los marcadores deseados, pero de unión

inespecífica o irrelevante, unidas covalentemente a un fluorocromo. La señal generada con el control de isotipo permite discriminar la señal de fondo (debida principalmente a células con receptores para el Fc de los anticuerpos, autofluorescencia o interacciones del anticuerpo marcado con proteínas, carbohidratos o lípidos de algunas células) de la señal positiva para el marcador deseado. Es importante señalar que el uso de dichos marcadores no fue necesario para los anticuerpos frente a CD4, CD8, CD27 ni CD38.

5.6 Compensación

Con la finalidad de eliminar cualquier interferencia generada por empalmes en los espectros de emisión y detección de señales de los fluorocromos se generó una matriz de compensación por cada panel de tinción en donde las señales interferentes fueron restadas. Cada matriz estaba constituida por monotinciones realizadas en perlas de compensación *BD™ CompBeads* con los anticuerpos empleados en cada panel. Las perlas de compensación son microesferas de poliestireno que tienen acoplados anticuerpos dirigidos contra la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas provenientes de ratón o rata. Estas perlas se tiñen fácilmente y proveen una señal robusta con cualquier anticuerpo de ratón o rata que posea la cadena ligera κ .

5.7 Análisis de datos citométricos

Los datos citométricos fueron analizados con el programa FlowJo 7.6.4 para determinar frecuencias de subpoblaciones y frecuencias de células expresadoras de cada marcador.

5.8 Estrategias de análisis o *gating*

Con la finalidad de estudiar todas las variables de interés se diseñaron dos estrategias de análisis o *gating*. La estrategia de *gating* es la secuencia de pasos que permite seleccionar las poblaciones de interés. La primera estrategia, denominada “estrategia de *gating* de compromiso” permite obtener las variables relacionadas con el grado de polarización y su relación con el grado de diferenciación, activación y senescencia de las células T de memoria centrales en células CD4⁺ y CD8⁺. La segunda estrategia, denominada “estrategia de *gating* de activación” permite obtener

información acerca del grado de polarización de las células T de memoria centrales activadas en CD4⁺ y CD8⁺.

5.8.1 Estrategia de gating de compromiso para células CD4⁺

En un gráfico de puntos o *dot plot* (Fig.1), en donde la dispersión frontal o *forward scatter* se grafica en el eje de las abscisas y la dispersión lateral o *side-scatter* en el eje de las ordenadas, se seleccionó a la población de linfocitos de acuerdo a sus características morfológicas de tamaño relativo y granularidad celular. Una vez seleccionada la población de linfocitos, se realizó un histograma para poder seleccionar a la población de células CD4⁺ (Fig. 1). El siguiente paso fue seleccionar a la población celular CD4⁺ con fenotipo de memoria central, es decir, aquellas células que no expresan el marcador CD45RA pero que sí expresan el marcador CCR7 (Fig.1). A continuación se realizó un histograma para la señal del marcador CXCR5, obteniendo dos poblaciones: células no comprometidas (CXCR5⁺) y células comprometidas (CXCR5⁻) (Fig.1). A continuación se realizó un dot plot en la población de células comprometidas para seleccionar a las células CXCR5⁻ con fenotipo pre Th1 (CXCR3⁺ CCR4⁻) y pre Th2 (CXCR3⁻ CCR4⁺) (Fig.2). Finalmente se determinaron las variables de CD27, CD38 y CD57 para cada población de interés (Fig.2).

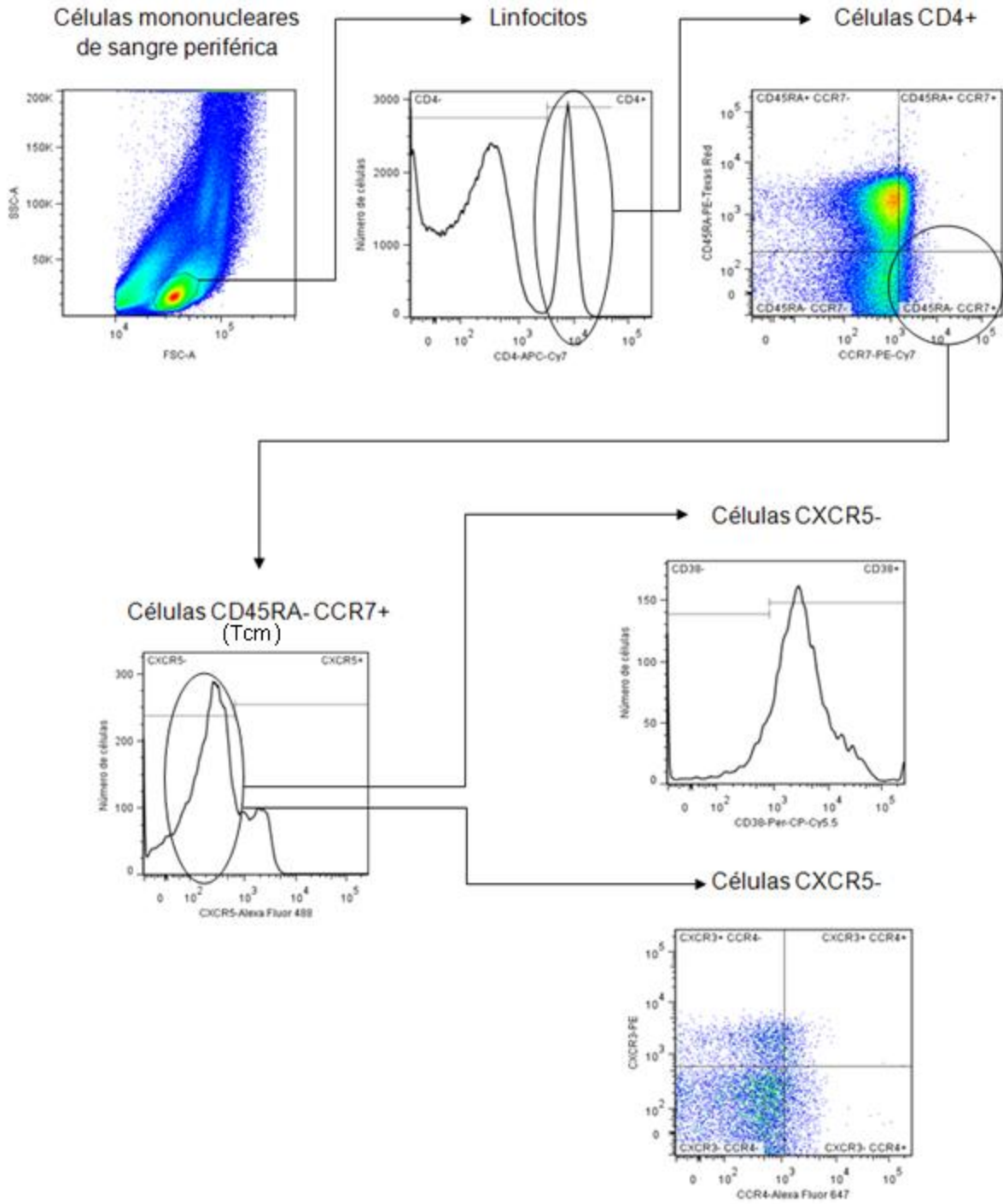


Fig. 1 Estrategia de análisis de compromiso para células CD4⁺

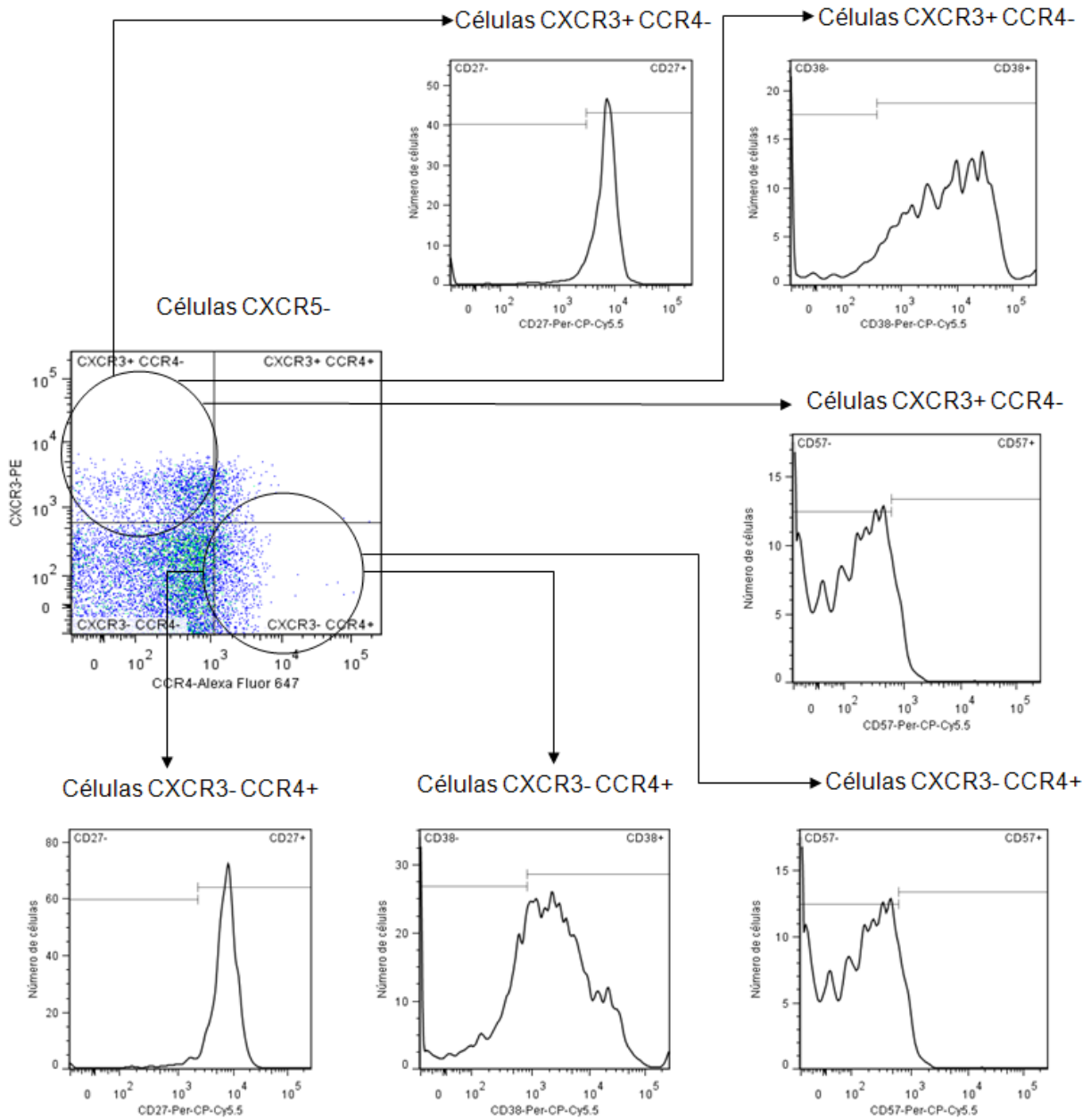


Fig. 2 Estrategia de análisis de compromiso para células CD4⁺

5.8.2 Estrategia de gating de compromiso para células CD8⁺

En un gráfico de puntos o *dot plot* (Fig.3), en donde la dispersión frontal o *forward-scatter* se grafica en el eje de las abscisas y la dispersión lateral o *side-scatter* en el eje de las ordenadas, se seleccionó a la población de linfocitos de acuerdo a sus características morfológicas de tamaño relativo y granularidad celular. Una vez seleccionada la población de linfocitos, se realizó un histograma para poder

seleccionar a la población de células $CD8^+$ (Fig.3). El siguiente paso fue seleccionar a la población celular $CD8^+$ con fenotipo de memoria central, es decir, aquellas células que no expresan el marcador CD45RA pero que sí expresan el marcador CCR7 (Fig.3). A continuación se realizó un histograma para el marcador CXCR5, obteniendo dos poblaciones: células no comprometidas ($CXCR5^+$) y células comprometidas ($CXCR5^-$) (Fig.3). El siguiente paso consistió en realizar un dot plot en la población de células comprometidas para seleccionar a las células $CXCR5^-$ con fenotipo pre Th1 ($CXCR3^+ CCR4^-$) y pre Th2 ($CXCR3^- CCR4^+$) (Fig.4). Finalmente se determinaron las variables de CD27, CD38 y CD57 para cada población de interés (Fig.4).

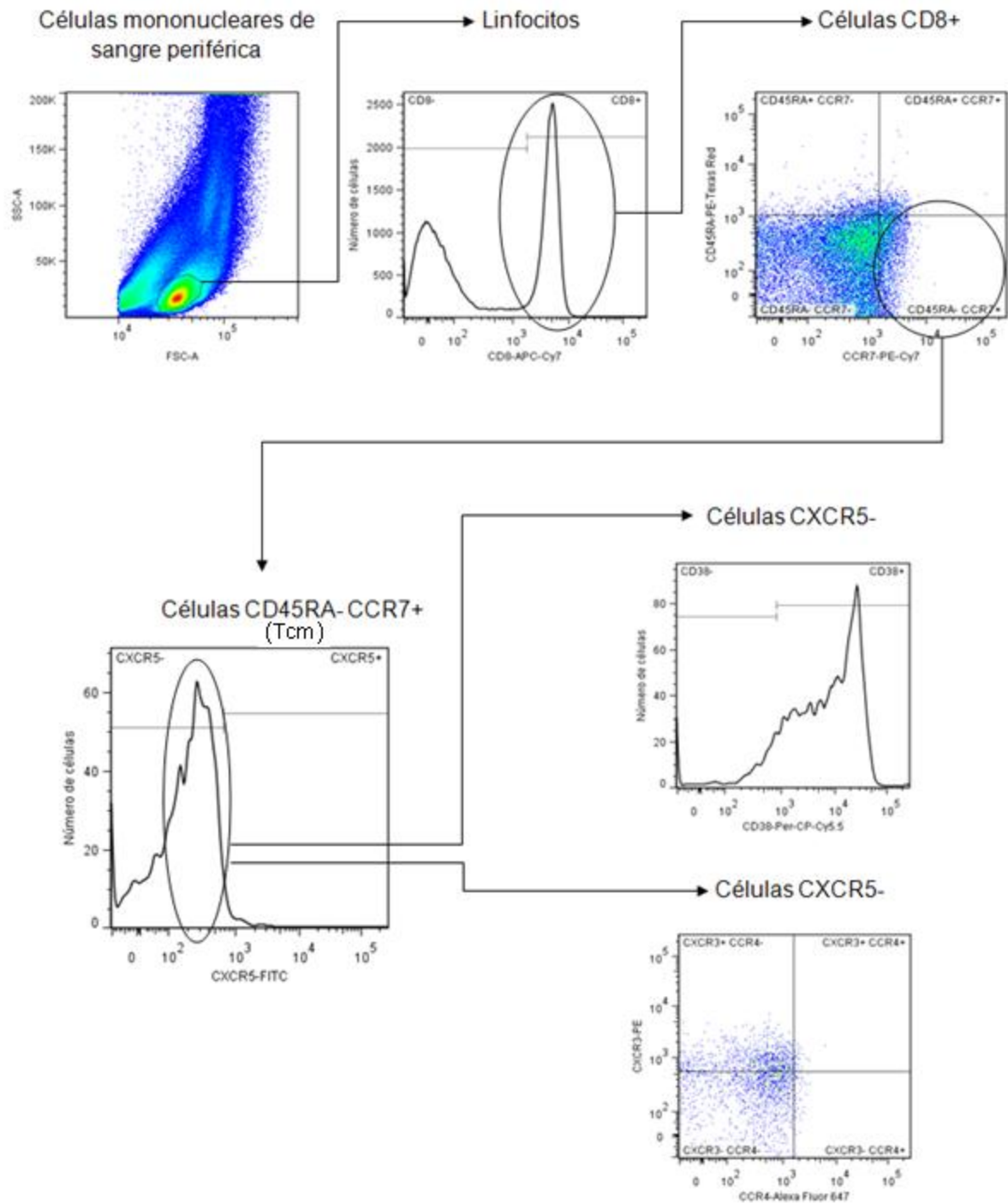


Fig. 3 Estrategia de análisis de compromiso para células CD8⁺

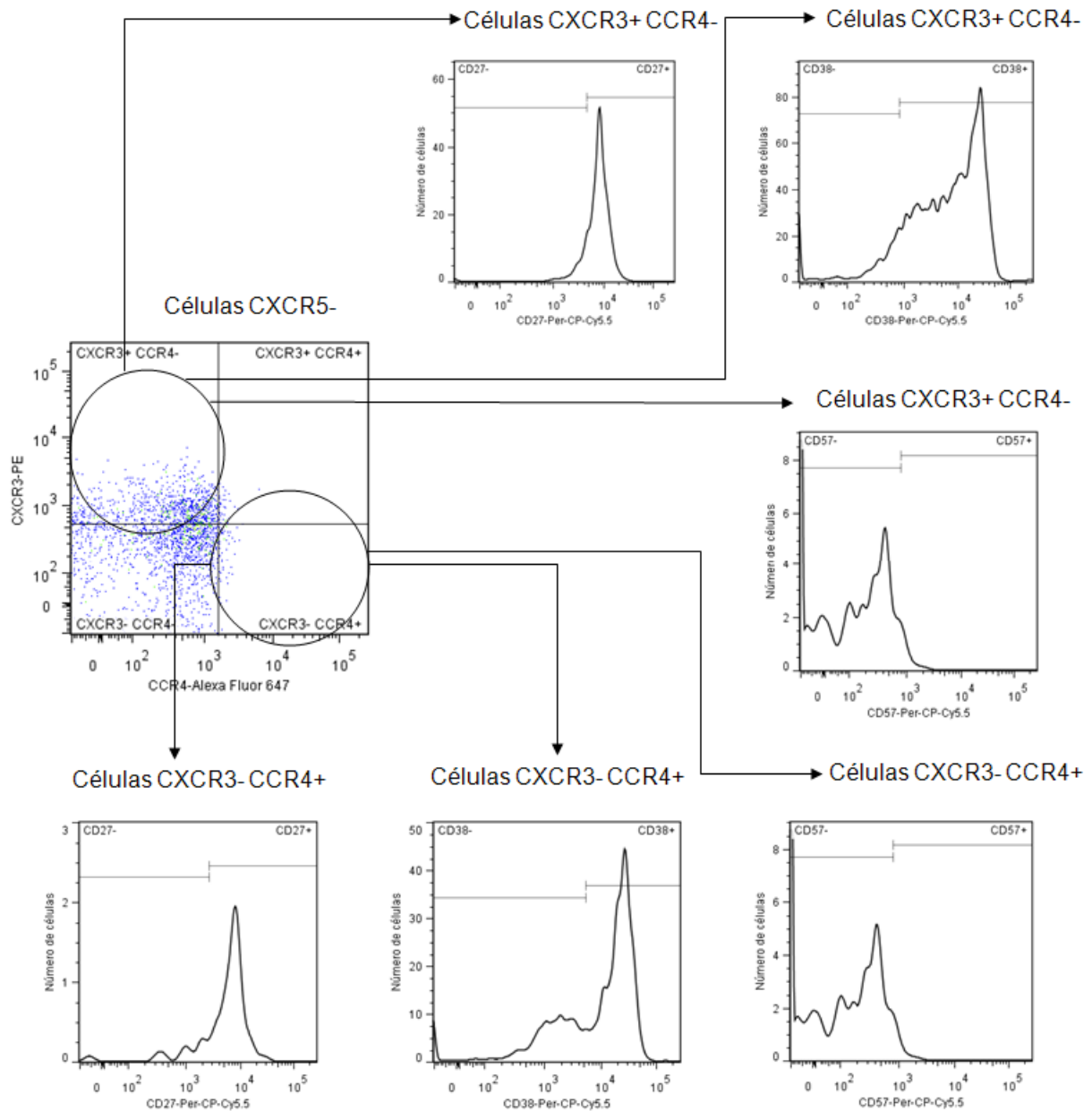


Fig. 4 Estrategia de análisis de compromiso para células CD8⁺

5.8.3 Estrategia de gating de activación para células CD4⁺

En un gráfico de puntos o *dot plot* (Fig.5), en donde la dispersión frontal o *forward scatter* se grafica en el eje de las abscisas y la dispersión lateral o *side scatter* en el eje de las ordenadas, se seleccionó a la población de linfocitos de acuerdo a sus características morfológicas de tamaño relativo y granularidad celular. Una vez seleccionada la población de linfocitos, se realizó un histograma para poder

seleccionar a la población de células $CD4^+$ (Fig.5). El siguiente paso fue seleccionar a la población celular $CD4^+$ con fenotipo de memoria central, es decir, aquellas células que no expresan el marcador CD45RA pero que sí expresan el marcador CCR7 (Fig.5). A continuación se realizó un histograma para el marcador CD38, obteniendo dos poblaciones: células no activadas ($CD38^-$) y células activadas ($CD38^+$) (Fig.5). El marcador CXCR5 fue medido tanto en células activadas como en células no activadas; de esta forma fue posible obtener células no comprometidas ($CXCR5^+$) y células comprometidas ($CXCR5^-$) para las células $CD38^-$ y $CD38^+$ (Fig.5). Finalmente se realizó un dot plot en las poblaciones de células comprometidas para seleccionar a las células $CXCR5^-$ con fenotipo pre Th1 ($CXCR3^+ CCR4^-$) y pre Th2 ($CXCR3^- CCR4^+$) (Fig.5).

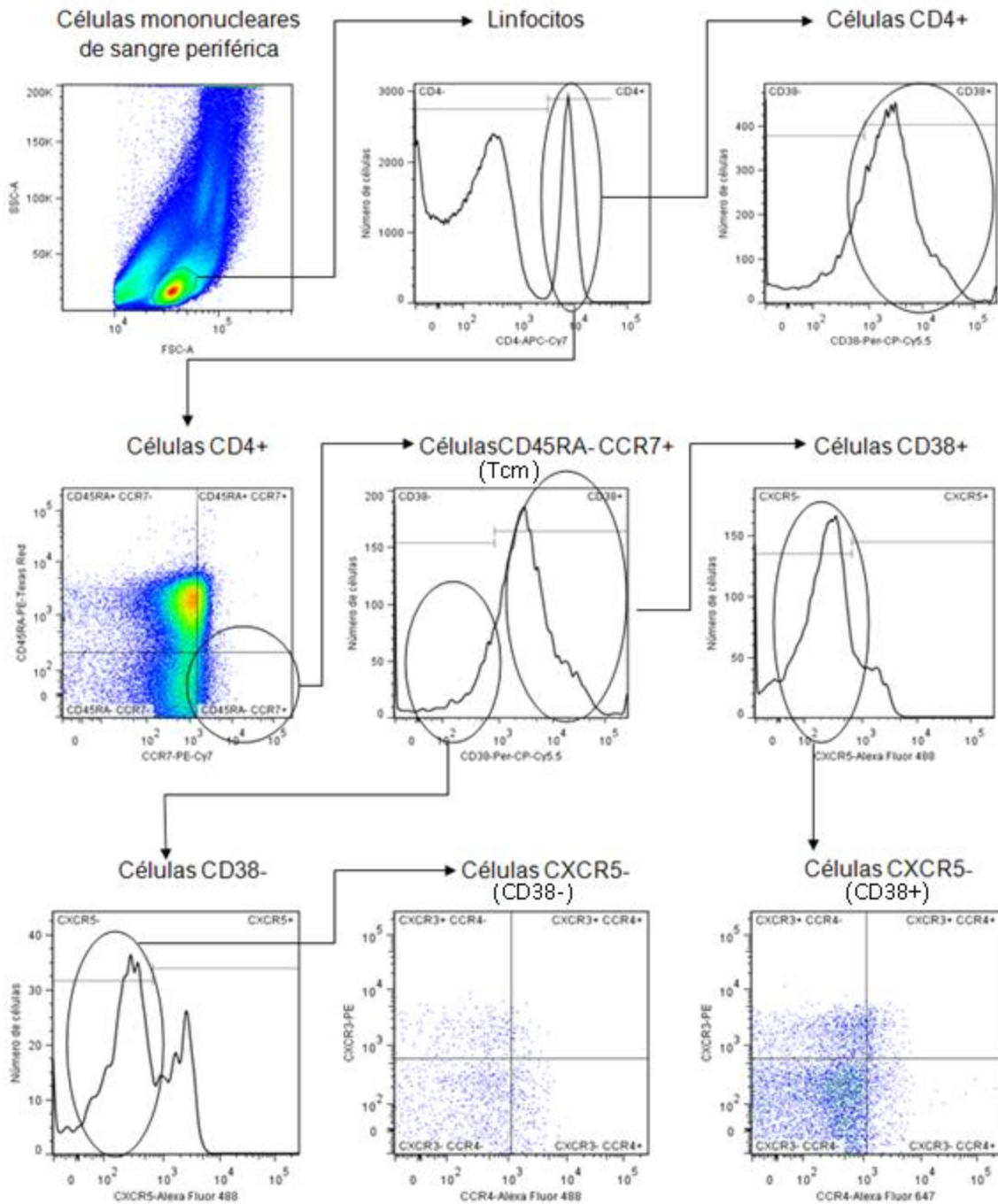


Fig. 5 Estrategia de análisis de activación para células CD4⁺

5.8.4 Estrategia de gating de activación para células CD8⁺

En un gráfico de puntos o *dot plot* (Fig.6), en donde la dispersión frontal o *forward-scatter* se grafica en el eje de las abscisas y la dispersión lateral o *side-scatter* en el eje de las ordenadas, se seleccionó a la población de linfocitos de acuerdo a sus

características morfológicas de tamaño relativo y granularidad celular. Una vez seleccionada la población de linfocitos, se realizó un histograma para poder seleccionar a la población de células CD8⁺ (Fig.6). El siguiente paso fue seleccionar a la población celular CD8⁺ con fenotipo de memoria central, es decir, aquellas células que no expresan el marcador CD45RA pero que sí expresan el marcador CCR7 (Fig.6). A continuación se realizó un histograma para el marcador CD38, obteniendo dos poblaciones: células no activadas (CD38⁻) y células activadas (CD38⁺). El marcador CXCR5 fue medido tanto en células activadas como en células no activadas; de esta forma fue posible obtener células no comprometidas (CXCR5⁺) y células comprometidas (CXCR5⁻) para las células CD38⁻ y CD38⁺ (Fig.6). Finalmente se realizó un dot plot en las poblaciones de células comprometidas para seleccionar a las células CXCR5⁻ con fenotipo pre Th1 (CXCR3⁺ CCR4⁻) y pre Th2 (CXCR3⁻ CCR4⁺) (Fig.6).

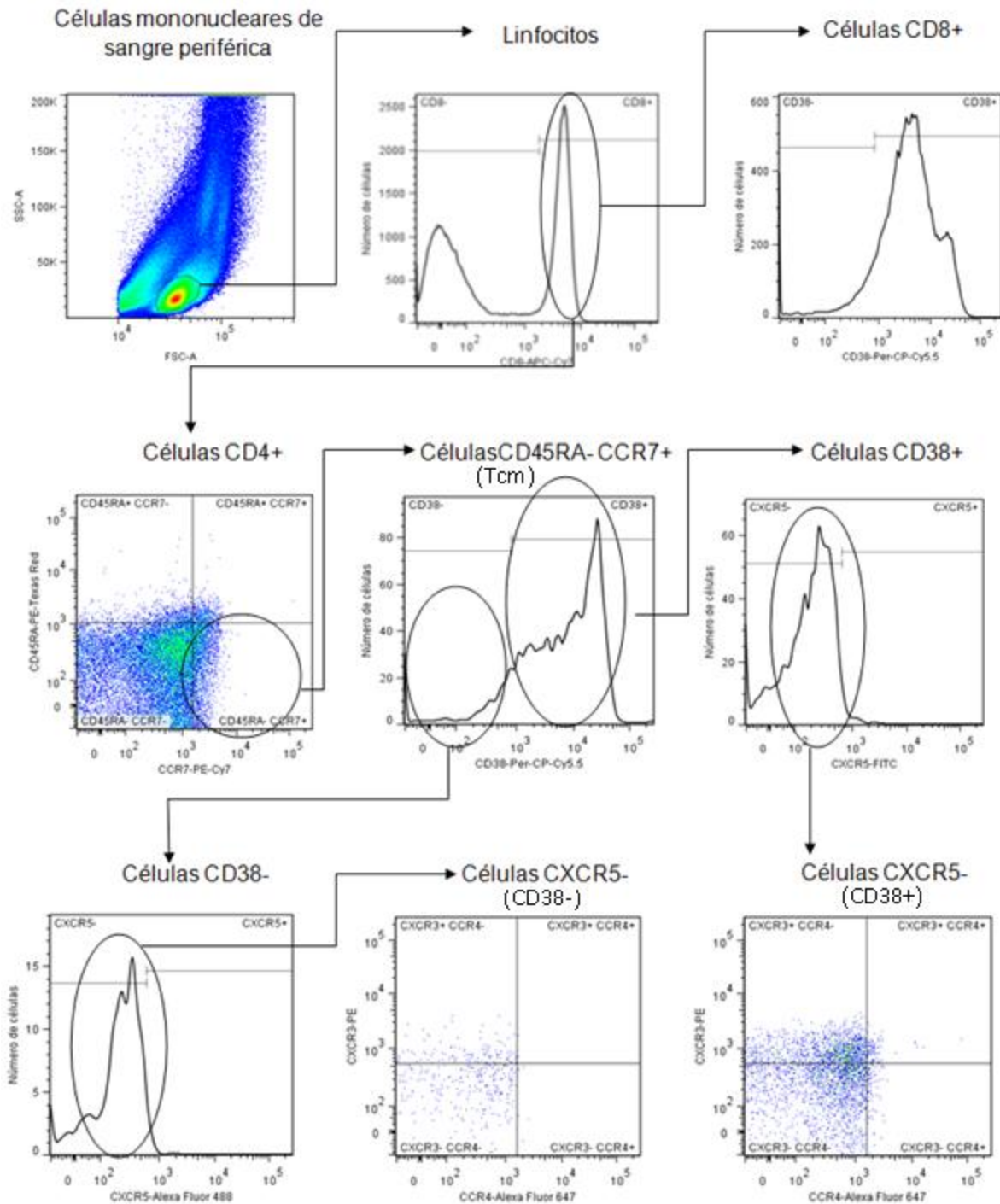


Fig. 6 Estrategia de análisis de activación para células CD8⁺

5.9 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para corroborar que los datos no siguieran una distribución normal y se efectuaron pruebas estadísticas no

paramétricas para aquellos datos que no se ajustaron a un modelo de distribución normal. Valores de $p < 0.05$ en la prueba de Kolmogorov-Smirnov se consideraron significativos para poder rechazar que los datos se distribuían normalmente. Se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Mann Whitney para identificar diferencias con base en el análisis de muestras independientes (donadores sanos y pacientes VIH⁺). Las comparaciones dentro del mismo grupo se hicieron utilizando la prueba estadística no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los datos fueron analizados con ayuda del programa StatView versión 4.57.

6 Resultados

6.1 Células T CD4⁺ en la infección por VIH

A continuación se resumen los datos clínicos de cinco de los pacientes reclutados en donde se muestra la información acerca del conteo de células T CD4⁺, porcentaje de células T CD4⁺ y células T CD8⁺, radio CD4/CD8 así como carga viral (Tabla9).

Paciente	Células T CD4 ⁺ /mL sangre	%Células T CD4 ⁺	Células T CD8 ⁺ /mL sangre	Radio CD4/CD8	Carga viral (copias/mL plasma)
Pt260111	260	18	857	0.30	74600
Pt150311	320	8	2474	0.13	23501
Pt290311	352	21	858	0.41	39541
Pt130411	349	14	1753	0.20	73305
Pt090511	370	26	874	0.42	26613

Tabla 9 Datos clínicos de pacientes VIH+

6.1.1 Disminución de células T CD4⁺ en la infección por VIH

La destrucción de las células T CD4⁺ representa el evento más característico de la infección por VIH [23]; tal y como se observó en las frecuencias de células T CD4⁺ en pacientes y donadores sanos (Fig.7), en donde se encontró una tendencia en pacientes a tener una menor frecuencia de células T CD4⁺ entre los linfocitos en comparación con los donadores sanos ($p=0.0547$). La mediana de las frecuencias de células T CD4⁺ en pacientes fue de 16.8% en tanto que en donadores sanos fue de 35.3%. Los datos de los pacientes mostraron una mayor dispersión de acuerdo con los intervalos intercuartil (3.2 en donadores sanos y 16.1 en pacientes). Esta diferencia en la dispersión de datos puede ser observada en un diagrama de dispersión (Fig.8), en donde se aprecia que los valores de los pacientes se alejan del promedio total de los datos, mientras que los valores de los donadores sanos se encuentran agrupados entre el promedio y el promedio más la desviación estándar.

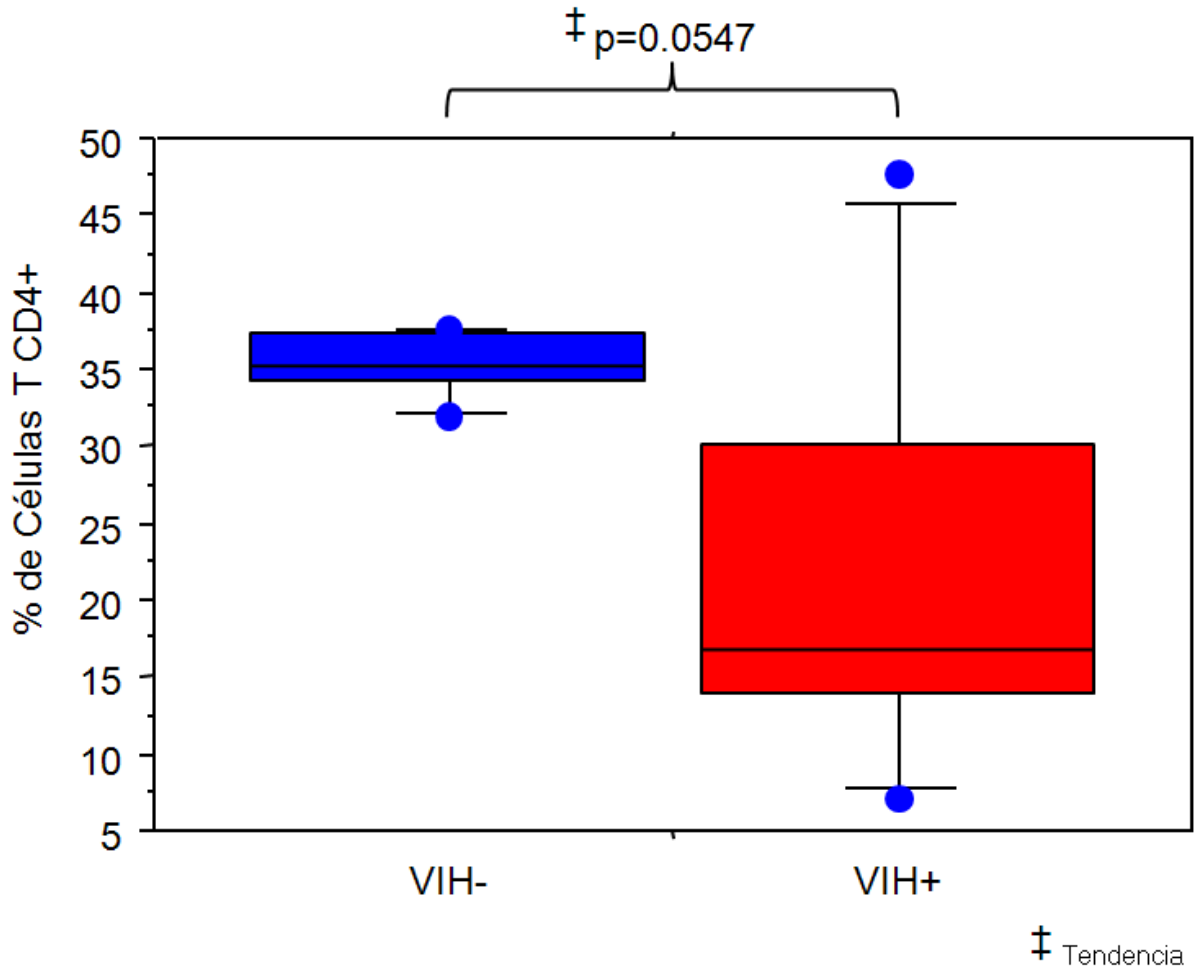


Fig. 7 Frecuencia de células CD4⁺ en controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺

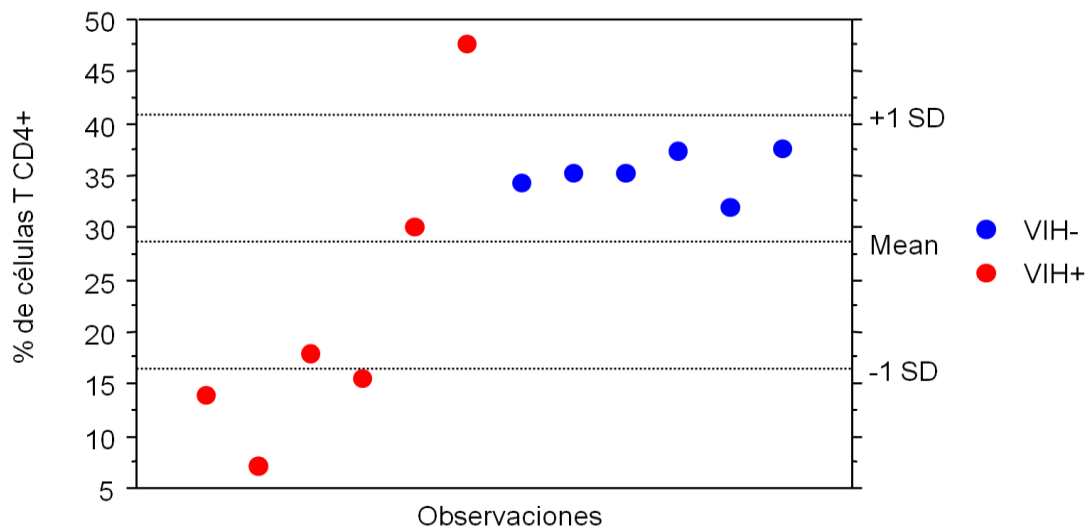


Fig. 8 Diagrama de dispersión de frecuencias de células T CD4⁺

6.1.2 Compromiso Th1/Th2 y diferenciación de células T CD4⁺

Se ha reportado que la expresión del antígeno CD27 en linfocitos es un marcador de diferenciación, es decir, a medida que las células se encuentran en estados de diferenciación más avanzados, se pierde la expresión de CD27 [96]. Se determinó la expresión de CD27 con la finalidad de evaluar el grado de diferenciación de las subpoblaciones en estudio.

Se midió la expresión del marcador de CD27 en células CD4⁺ con fenotipo no comprometido (CXCR5⁺) y células CD4⁺ con fenotipo pre Th1 (CXCR3⁺ CCR4⁻), tanto en donadores sanos como en pacientes VIH⁺. Se llevó a cabo una prueba de rangos con signo de Wilcoxon para identificar diferencias en la expresión de este marcador entre las células no comprometidas y las células pre Th1 dentro del mismo grupo con base en el análisis de muestras pareadas (Fig.9). Las células pre Th1 mostraron una menor expresión de CD27 que las células no comprometidas ($p=0.0277$) en los donadores sanos, siendo la mediana del porcentaje de células CD27⁺ de 56.9% entre las células no comprometidas y 30.7% en las células pre Th1 de donadores sanos; en los pacientes VIH⁺ no se observó diferencia significativa en la expresión de CD27 entre las células no comprometidas y las células pre Th1. Los datos provenientes de los pacientes mostraron una mayor dispersión que aquellos procedentes de los donadores sanos.

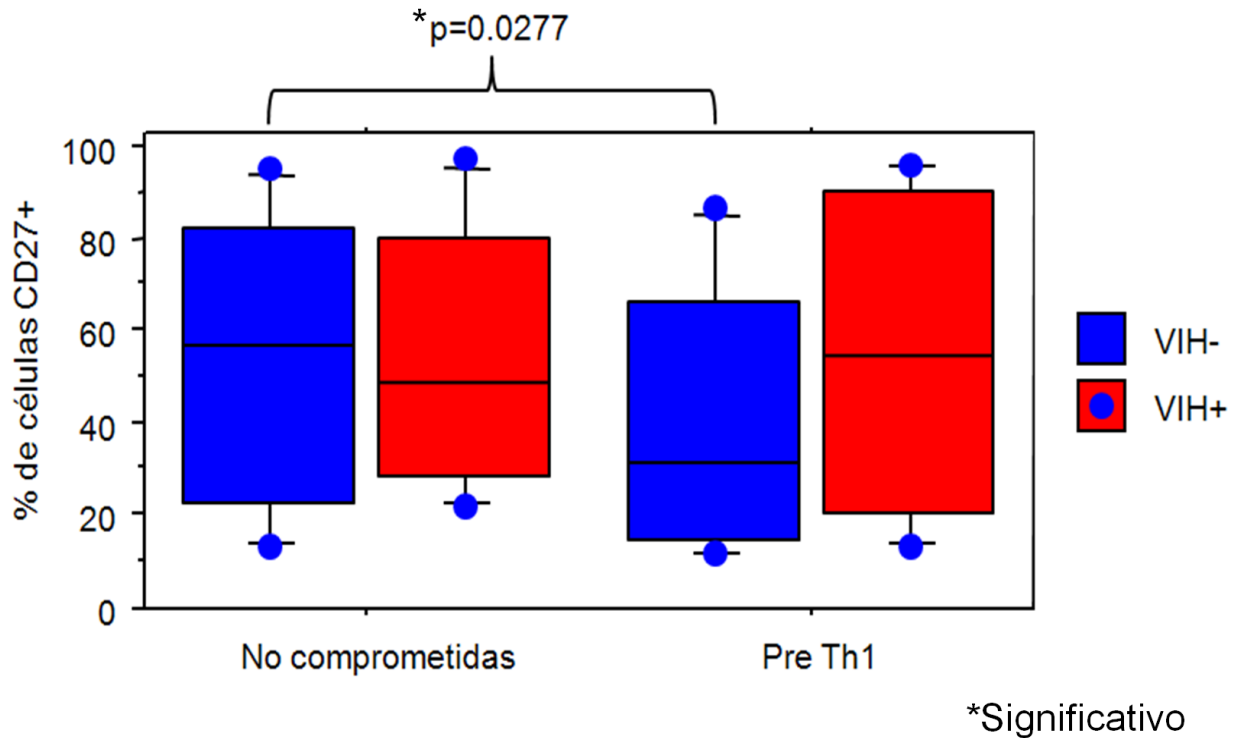


Fig. 9 Porcentaje de células CD27+ en células no comprometidas (CXCR5+) y pre Th1 (CXCR3+ CCR4-) de donadores sanos y pacientes VIH

La expresión del marcador CD27 también fue medida en las células CD4+ con fenotipo pre Th2 (CXCR3- CCR4+) y comparada con aquella de las células con fenotipo no comprometido en donadores sanos y pacientes VIH+ (Fig.10). Las células con fenotipo pre Th2 exhiben una menor expresión de CD27 que las células no comprometidas en donadores sanos ($p=0.0277$); la mediana de células CD27+ en células pre Th1 fue de 32.6% y de 56.9% en células no comprometidas de los controles VIH-. En los pacientes VIH+ no se observó ninguna diferencia significativa.

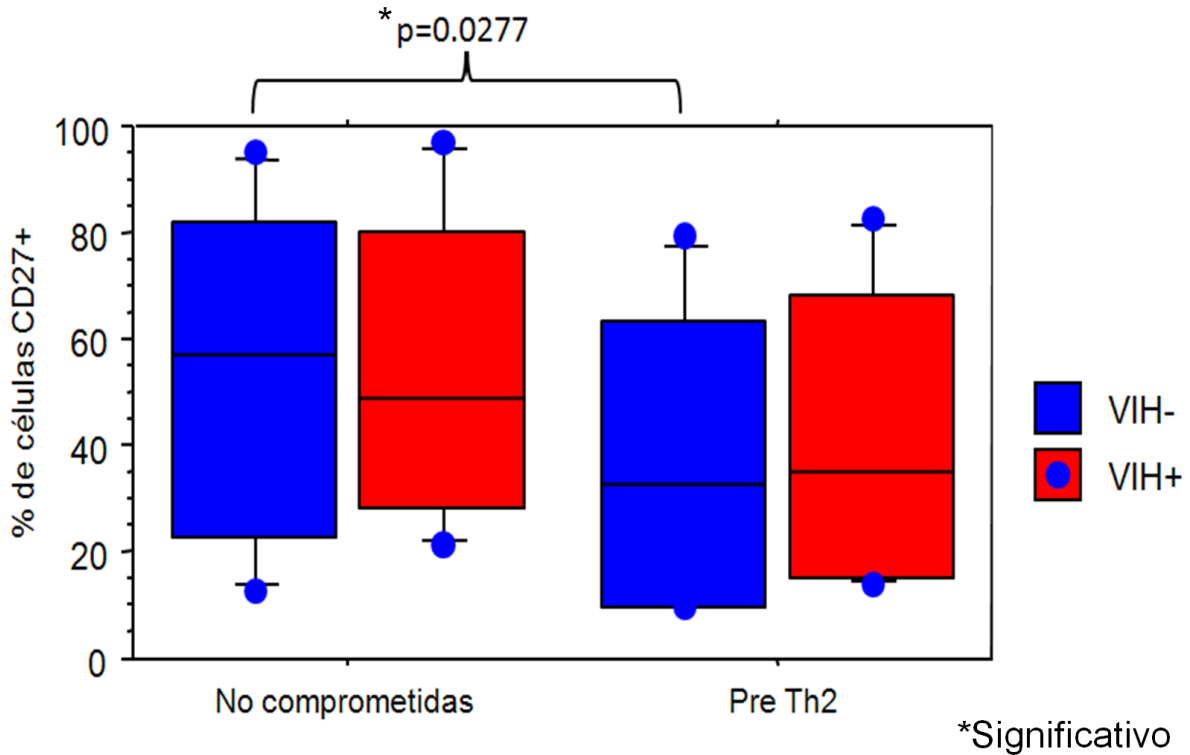


Fig. 10 Porcentaje de células CD27⁺ en células no comprometidas y pre Th2 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

La expresión de CD27 fue comparada entre células CD4⁺ pre Th1 y pre Th2 de donadores sanos y pacientes VIH⁺ (Fig.11). Después de realizar la prueba estadística de Wilcoxon para muestras pareadas se encontró que las células pre Th1 y pre Th2, de donadores sanos, no mostraron diferencias significativas. En pacientes se encontró que las células pre Th1 expresaron significativamente más CD27 que las células pre Th2 ($p=0.0464$).

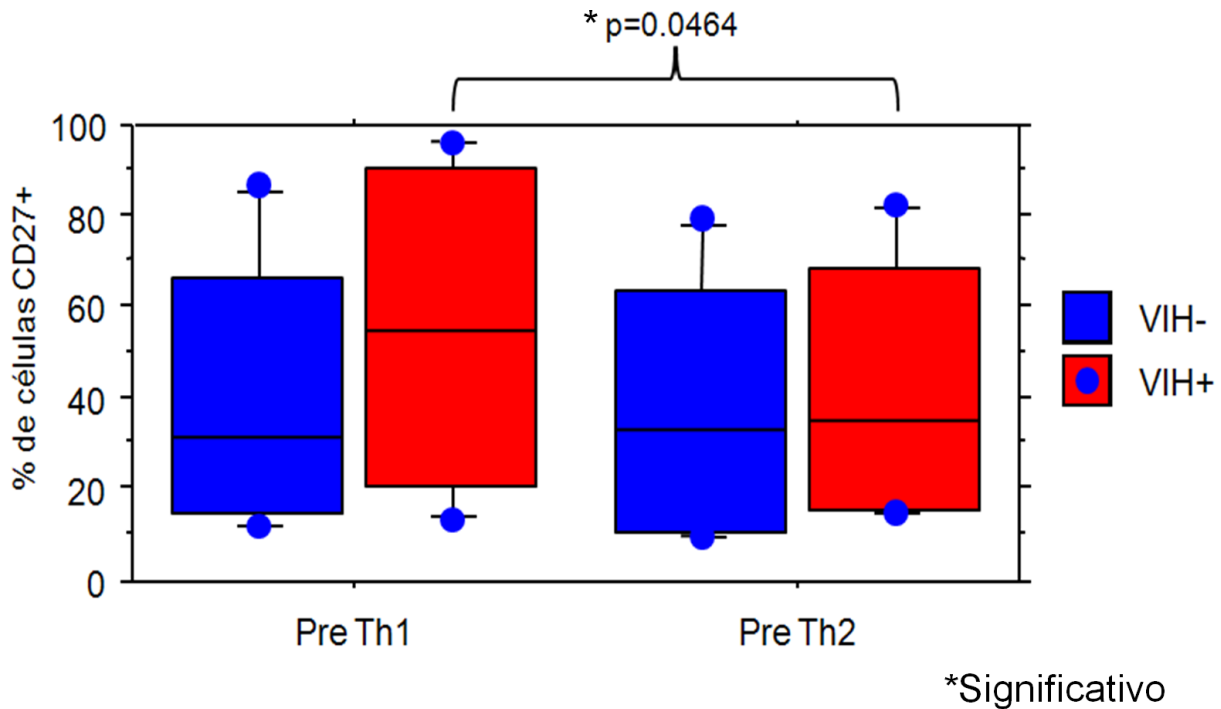


Fig. 11 Porcentaje de células CD27⁺ en células pre Th1 y pre Th2 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

6.1.3 Compromiso Th1/Th2 y activación de células T CD4⁺

La expresión de CD38 es un marcador de activación e importante predictor del avance de la enfermedad [103]. La frecuencia de células CD38⁺ fue medida en células CD4⁺ pre Th1, pre Th2 así como en células no comprometidas de donadores sanos y pacientes. Se encontró que la expresión de CD38 en las células pre Th1 fue significativamente mayor que en las células no comprometidas ($p=0.0464$) en los pacientes VIH⁺ (Fig.12); la mediana de células CD38⁺ en células pre Th1 fue de 85.9% mientras que en no comprometidas fue de 76.6%. En los donadores sanos no se observó dicho efecto.

Se comparó la expresión de CD38 entre células pre Th1 y pre Th2 de donadores sanos y pacientes infectados con VIH (Fig.13). En donadores sanos la proporción de células que expresaron CD38 fue significativamente mayor entre las células pre Th1 que en las células pre Th2 que ($p=0.0277$); el porcentaje de células que expresaron CD38 fue de 34.9% en células pre Th1 y 21.8% en células pre Th2 de los controles

sin la infección por VIH. En los pacientes no se observó dicho efecto ($p=0.0747$); sin embargo, los datos provenientes de la expresión de CD38 en células pre Th2 de pacientes mostraron una gran dispersión, lo cual puede explicar la pérdida del efecto observado en donadores sanos.

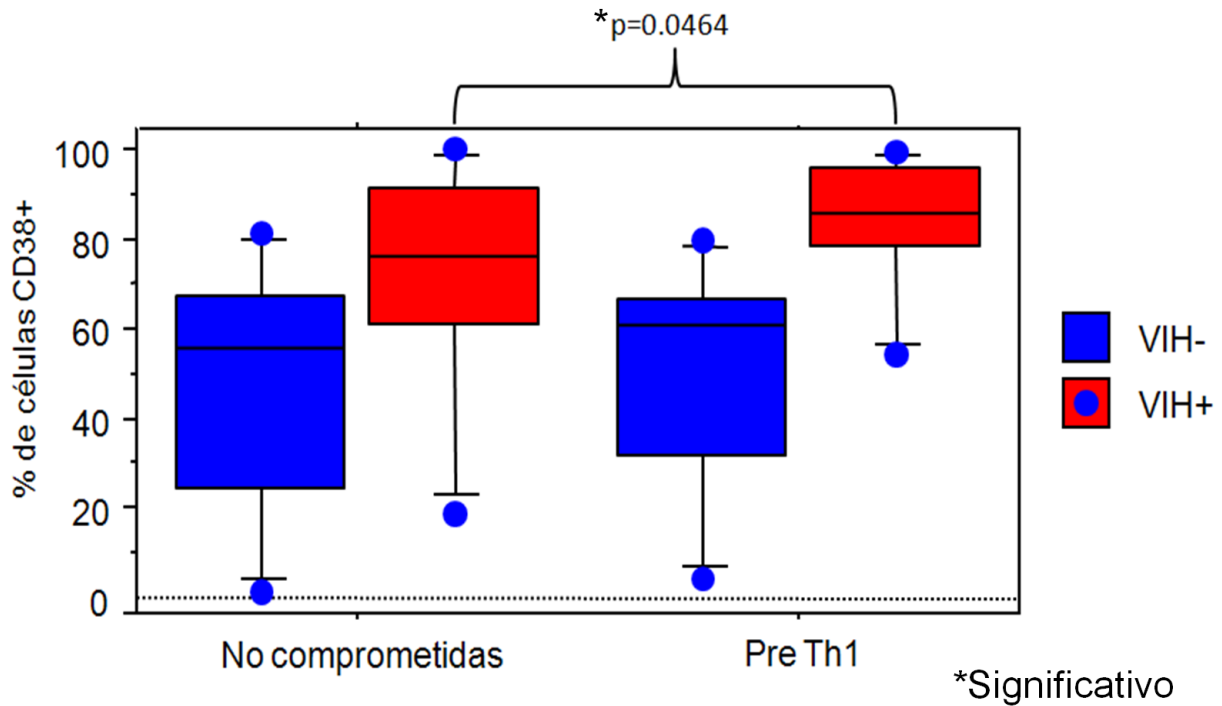


Fig. 12 Porcentaje de células CD38⁺ en células no comprometidas y pre Th1 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

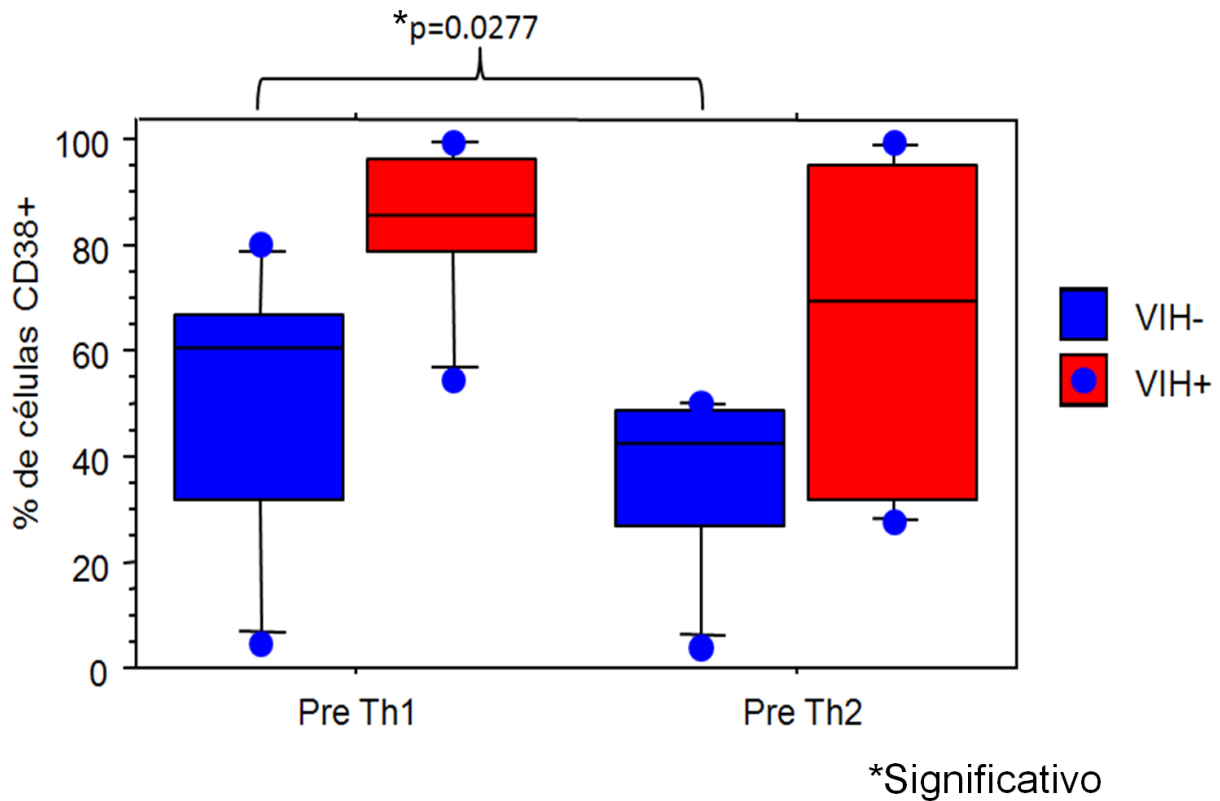


Fig. 13 Porcentaje de células CD38+ en células pre Th1 y pre Th2 de donadores sanos y pacientes infectados con VIH.

Como se puede observar en la Fig.13, la frecuencia de células pre Th1 que expresan CD38 aparentemente es mayor en pacientes que en controles. Se llevó a cabo una prueba no pareada de Mann-Whitney para investigar si existía alguna diferencia significativa y no fue posible observar algún efecto; sin embargo, se obtuvo una $p=0.0547$, lo cual se encuentra en el límite de lo considerado en este estudio como significativo, en donde las células pre Th1 de pacientes VIH⁺ tienden a expresar más CD38 que las células pre Th1 de donadores sanos (Fig.14). Tampoco se observaron diferencias significativas de grupo en la expresión de CD38 en células pre Th2 ni en células no comprometidas.

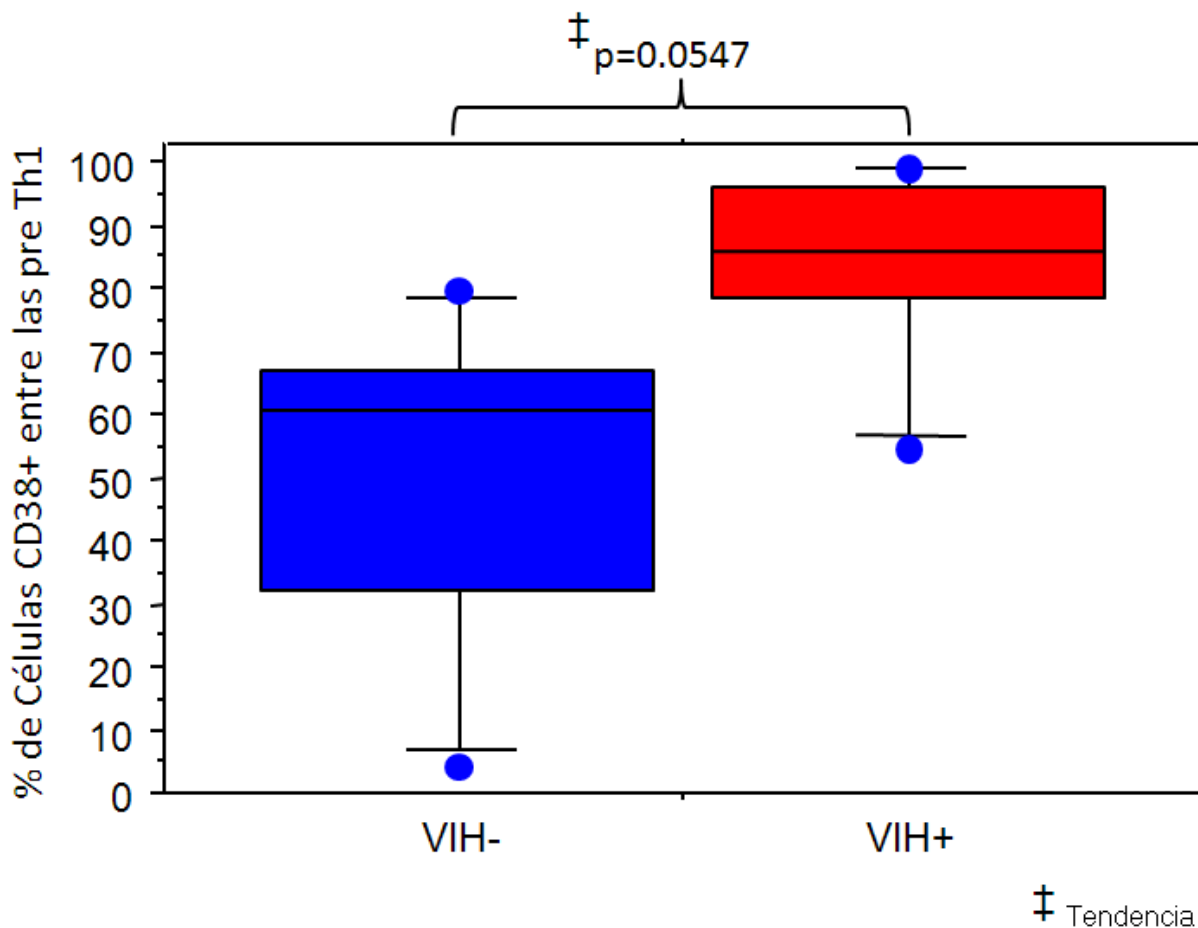


Fig. 14 Frecuencia de células pre Th1 que expresan CD38 en donadores no infectados por VIH y pacientes VIH⁺

6.1.4 Compromiso Th1/Th2 y senescencia en células T CD4⁺

La expresión del marcador CD57 se ha asociado a la senescencia replicativa tanto en células CD4⁺ como en CD8⁺ [96, 104, 105]. Se midió la expresión de CD57 en células CD4⁺ pre Th1 y células no comprometidas de controles no infectados y pacientes VIH⁺ (Fig.15). Se encontró que la expresión de CD57 en las células pre Th1 era significativamente mayor que en células no comprometidas, tanto en donadores sanos ($p=0.0277$) como en pacientes ($p=0.0464$). Las medianas de frecuencias de expresión de CD57 fueron de 5.0% en no comprometidas y 8.7% pre Th1 de donadores sanos, mientras que en pacientes fueron de 7% en no comprometidas y 10.7% en células pre Th1.

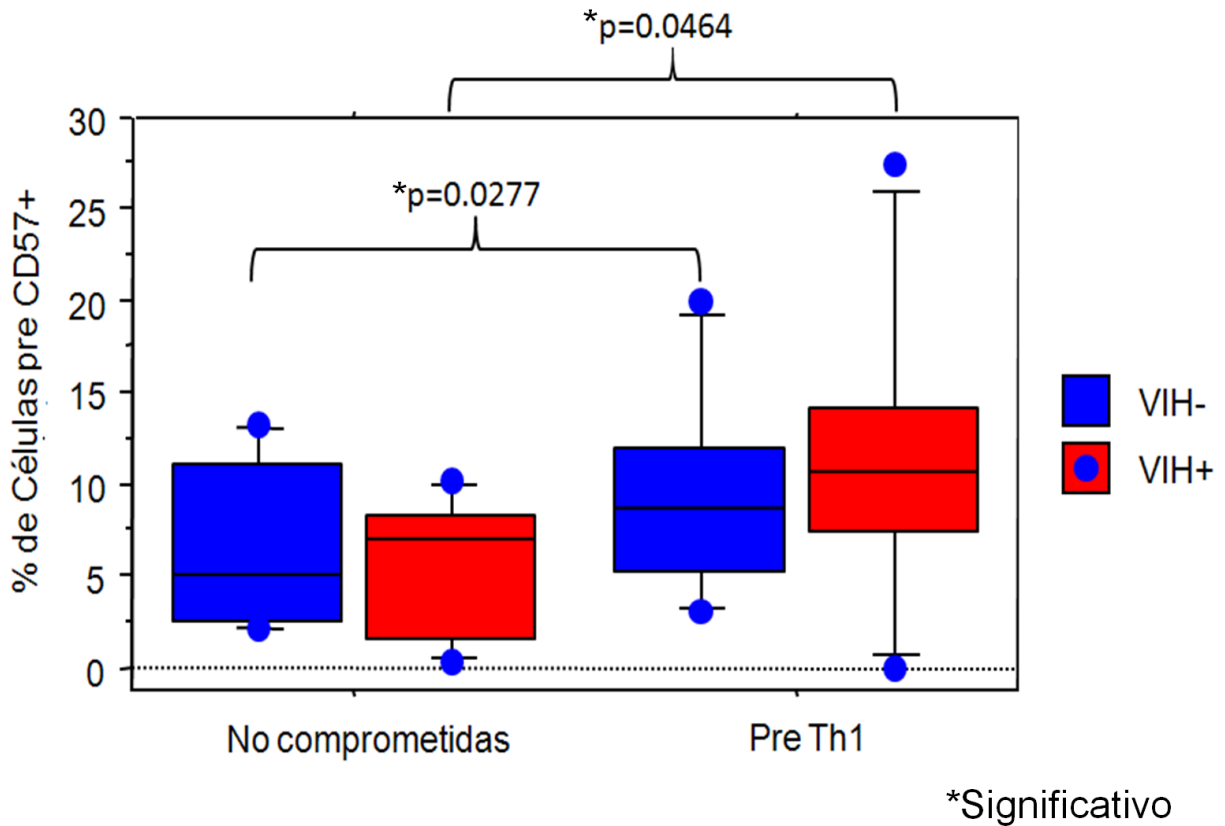


Fig. 15 Porcentaje de células CD57⁺ en células no comprometidas y células pre Th1 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

La expresión de CD57 fue medida en células no comprometidas y células pre Th2 de donadores sanos y pacientes VIH⁺ (Fig.16). Se encontró que las células pre Th2 de los donadores sanos expresan significativamente menos CD57 que las células no comprometidas ($p=0.0277$); en los pacientes no se observó dicho efecto. La mediana de expresión de CD57 en las células no comprometidas fue de 5.0% y de 1.9% en células pre Th2.

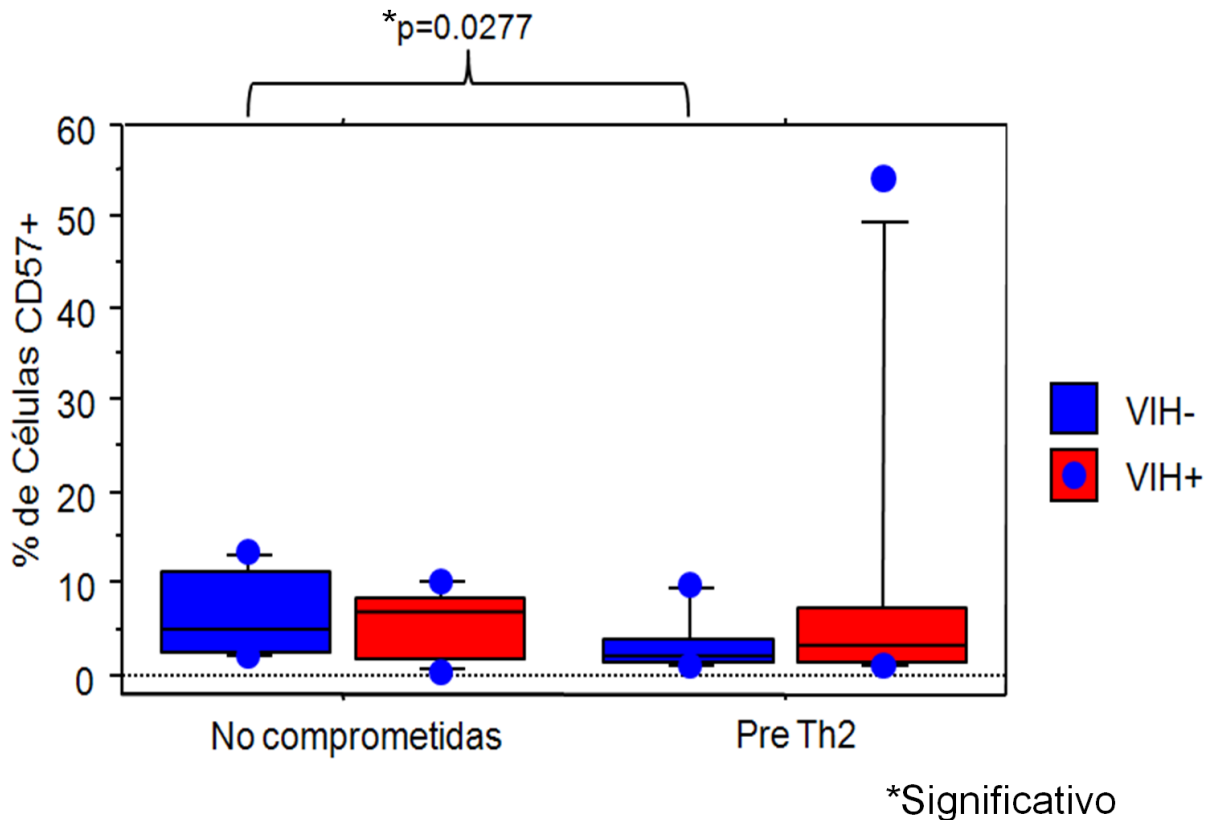


Fig. 16 Porcentaje de células CD57⁺ en células no comprometidas y células pre Th2 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

Con la finalidad de comparar el grado de senescencia de las células pre Th1 y pre Th2, se midió y comparó la expresión del marcador CD57 en estas dos poblaciones celulares (Fig.17). Se encontró que las células pre Th2 expresan significativamente menos CD57 que las células pre Th1 ($p=0.0277$) en donadores sanos. Las medianas correspondientes fueron de 8.7% en pre Th1 y 1.9% en pre Th2. En pacientes no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de este marcador. No se observaron diferencias significativas de grupo en la expresión de CD57 entre células pre Th1, pre Th2 o no comprometidas de controles sanos y pacientes VIH⁺.

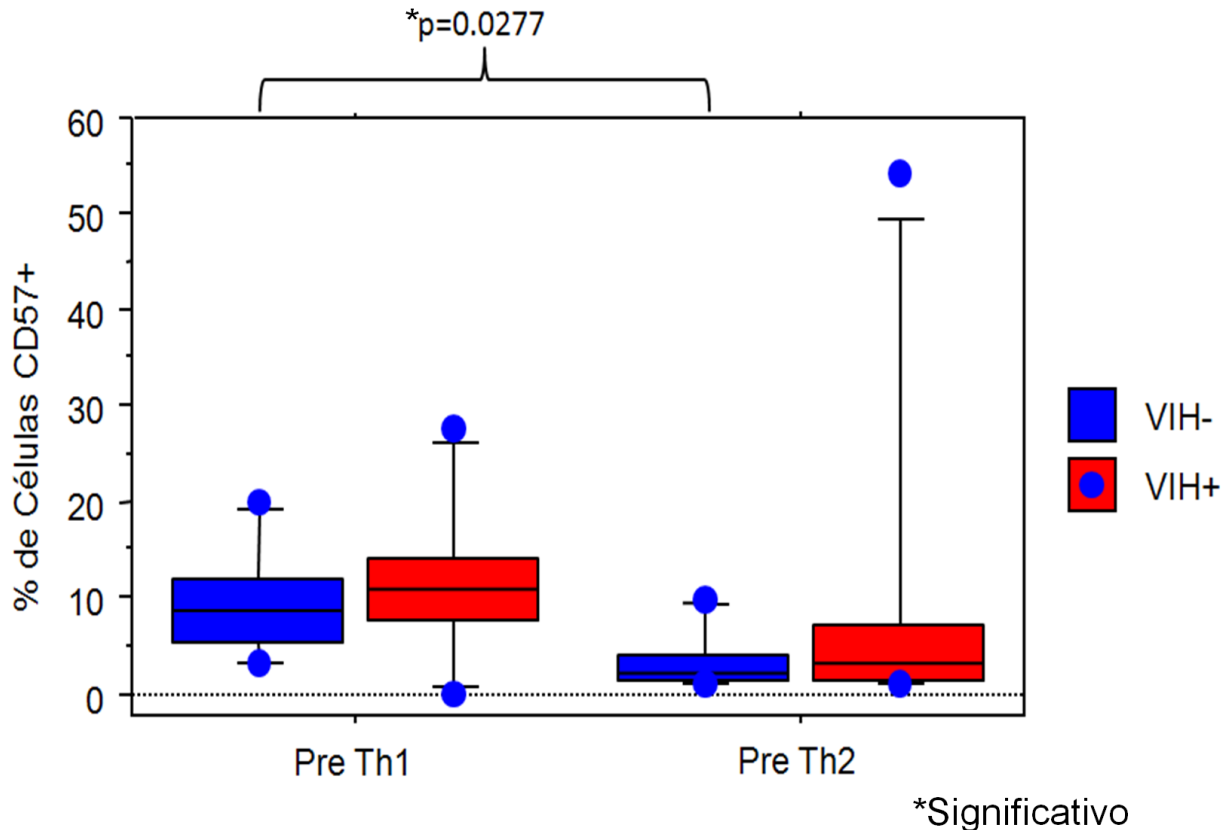


Fig. 17 Porcentaje de células CD57⁺ en células pre Th1 y pre Th2 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

6.1.5 Compromiso y activación de las células T CD4⁺ de memoria centrales

Uno de los eventos centrales en la infección por VIH es la pérdida gradual de células T CD4⁺ [26]. El mecanismo preciso mediante el cual la infección por VIH origina esta pérdida permanece desconocido. Una explicación potencial puede encontrarse en la pérdida de la capacidad regenerativa de las células T de memoria centrales (Tcm) asociada al compromiso a funciones Th1/Th2 dirigido por la activación crónica durante la infección. Los siguientes resultados se enfocan en el estudio de las células T de memoria centrales en la infección por VIH; se determinaron las frecuencias de subpoblaciones pre Th1 y pre Th2 tomando como referencia a las células Tcm CD4⁺ para evaluar el grado de compromiso a funciones Th1/Th2 en donadores sanos y pacientes. El marcador de activación CD38 fue medido en cada subpoblación para evaluar el grado de activación.

6.1.5.1 Compromiso de células T de memoria centrales CD4⁺

Se llevaron a cabo comparaciones entre pacientes VIH⁺ y controles VIH⁻ de las frecuencias de células pre Th1 y pre Th2 en las células Tcm CD4⁺ para evaluar el grado de compromiso a diferenciarse a funciones efectoras (Fig.20). Se encontró que las células Tcm CD4⁺ de los pacientes VIH⁺ tienden a tener una mayor proporción de células pre Th2 que las células Tcm CD4⁺ de donadores sanos ($p=0.0547$) (Fig.18). El valor obtenido de p se encuentra por encima del límite definido como significativo para este estudio, pero es suficiente para afirmar la existencia de una clara tendencia. Los datos provenientes de los pacientes VIH⁺ mostraron una mayor dispersión; es posible observar en la Fig. 19 que mientras los datos provenientes de donadores sanos se sitúan por debajo de la media de frecuencias, en los pacientes es posible observar datos por encima de la media. No se observó ninguna diferencia significativa o tendencia en la proporción de células pre Th1. En la Fig.20 se puede observar la distribución de las Tcm CD4⁺ entre las subpoblaciones pre Th1, pre Th2 y otras subpoblaciones celulares dentro de las Tcm CD4⁺.

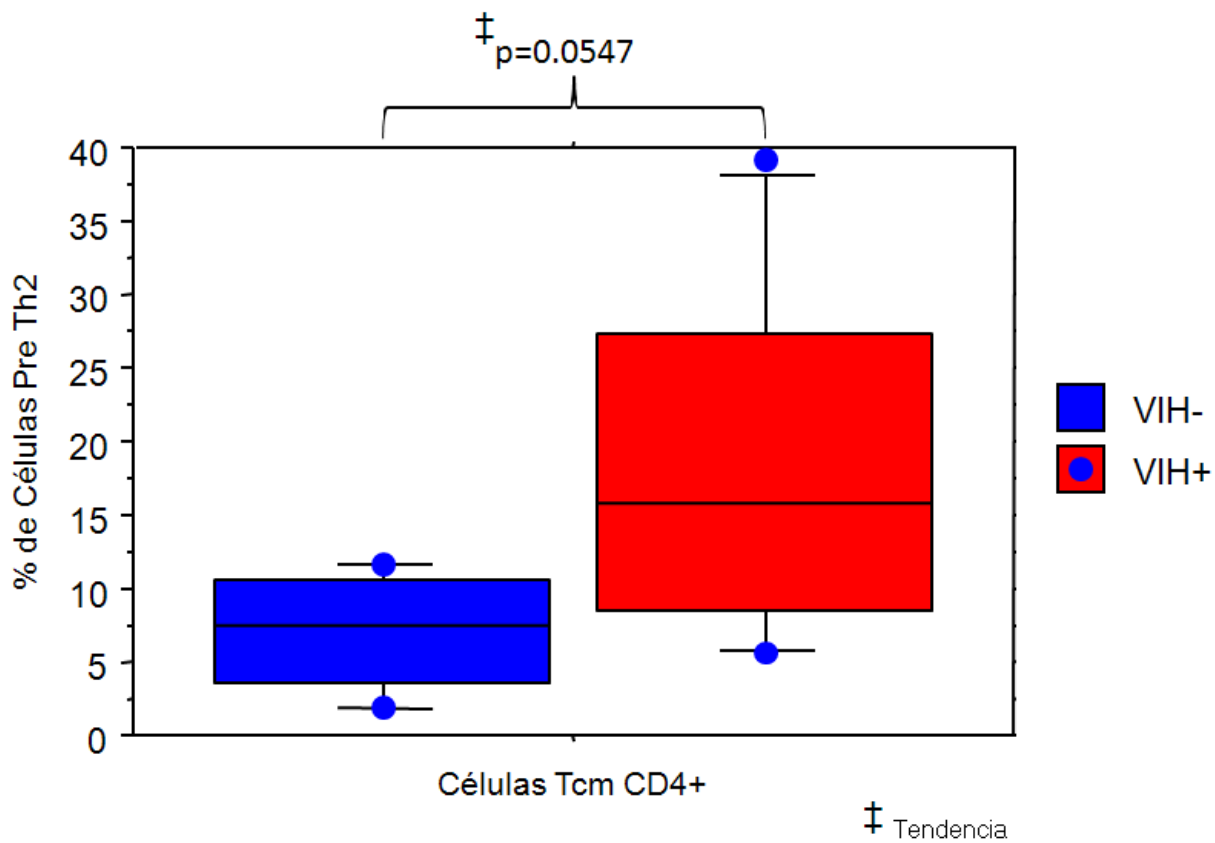


Fig. 18 Proporción de células pre Th2 entre las células Tcm CD4⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

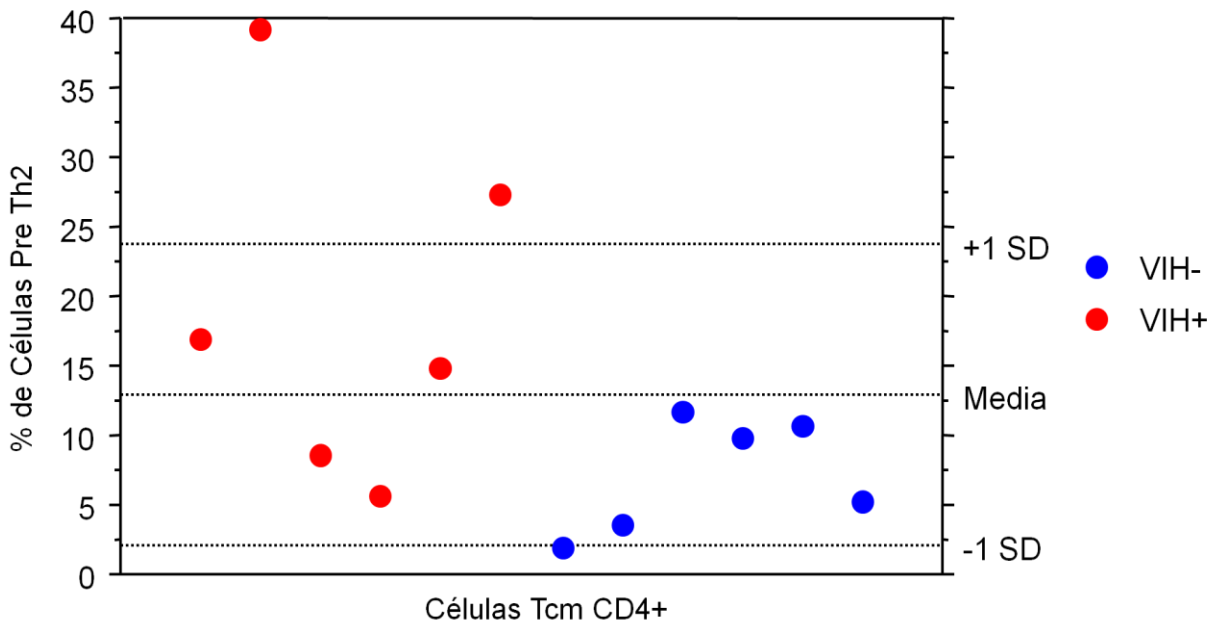


Fig. 19 Diagrama de dispersión de frecuencias de células pre Th2 entre las células Tcm CD4⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

Células T de memoria centrales CD4+

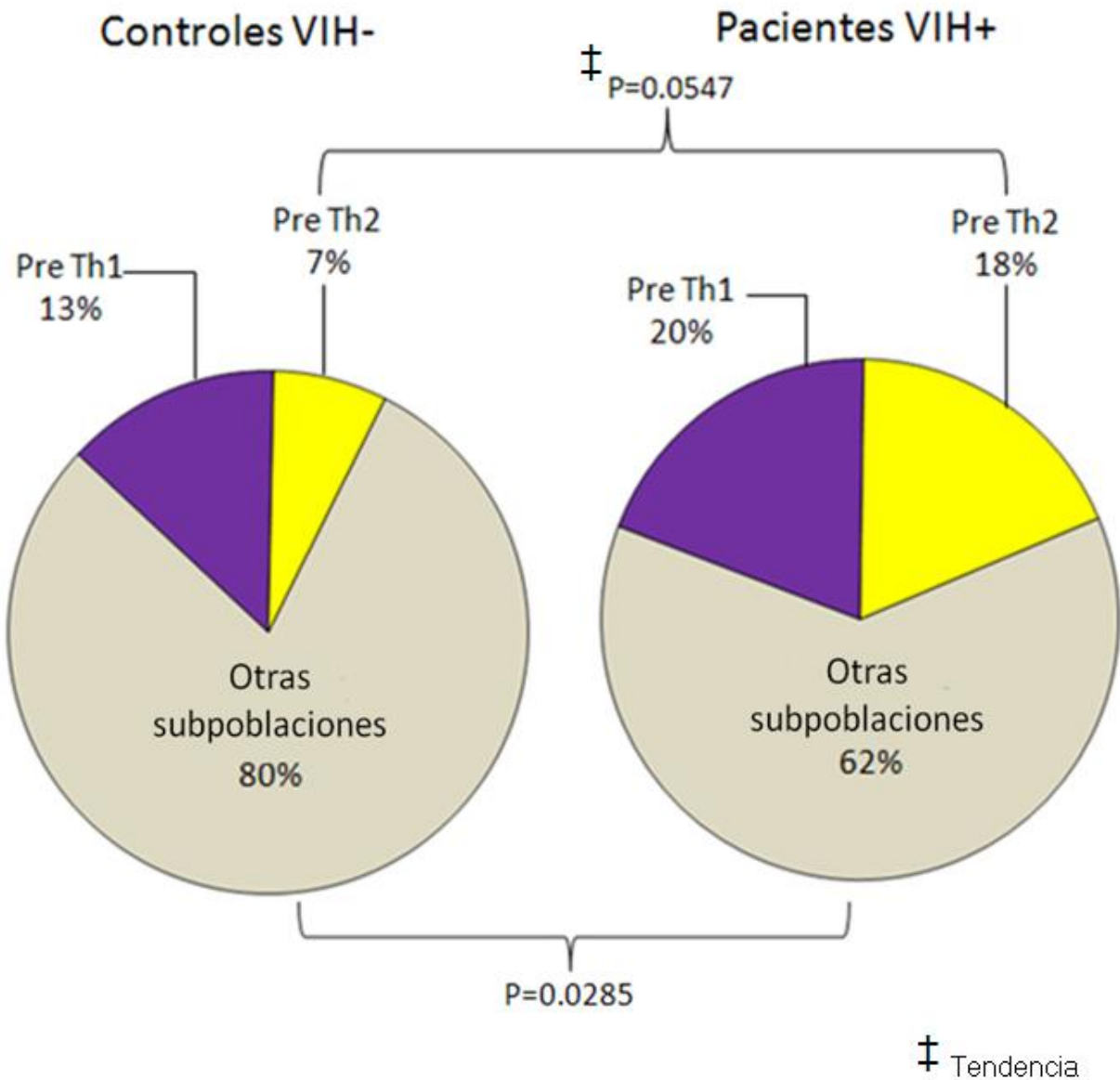


Fig. 20 Distribución de frecuencias de Tcm CD4⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

6.1.5.2 Compromiso y activación de células T de memoria centrales CD4⁺

Las células T de memoria pueden ser divididas en: células pre Th1 activadas, pre Th1 no activadas, pre Th2 activadas, pre Th2 no activadas, otras subpoblaciones celulares activadas y finalmente otras subpoblaciones celulares no activadas. Se

estudió la proporción de cada una de estas subpoblaciones dentro de las células Tcm CD4⁺ de pacientes VIH⁺ y controles VIH⁻.

La proporción de células pre Th1 activadas, es decir, que expresaron el marcador CD38, fue mayor en las células Tcm CD4⁺ de pacientes VIH⁺ que en las células Tcm CD4⁺ de donadores sanos (p=0.0250) (Fig.21).

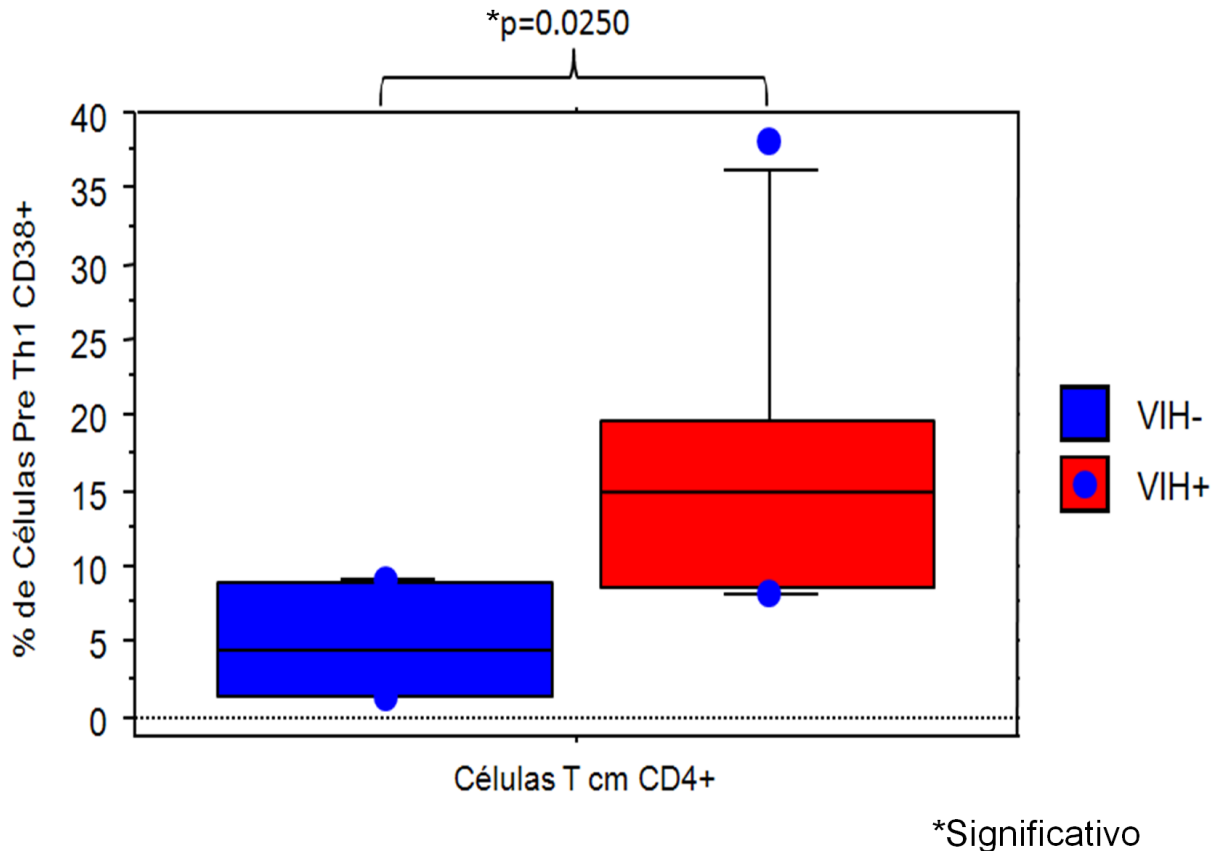


Fig. 21 Frecuencia de células pre Th1 activadas dentro de las células Tcm CD4⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

La proporción de células pre Th2 activadas es mayor dentro de las Tcm CD4⁺ de pacientes VIH⁺ que en las células Tcm CD4⁺ de donadores VIH⁻(Fig.22). No se encontró ninguna diferencia significativa de grupo en las proporciones de las células pre Th1 ni pre Th2 no activadas.

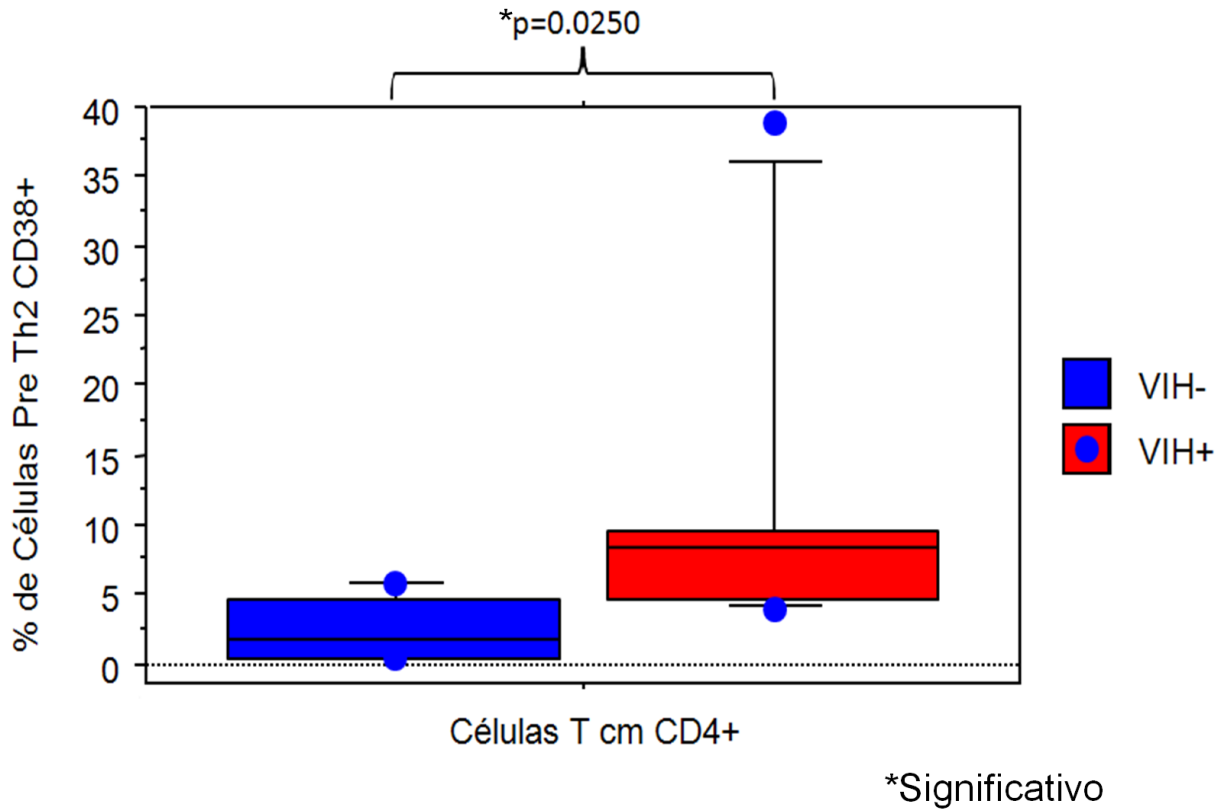


Fig. 22 Frecuencia de células pre Th2 activadas dentro de las células Tcm CD4⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

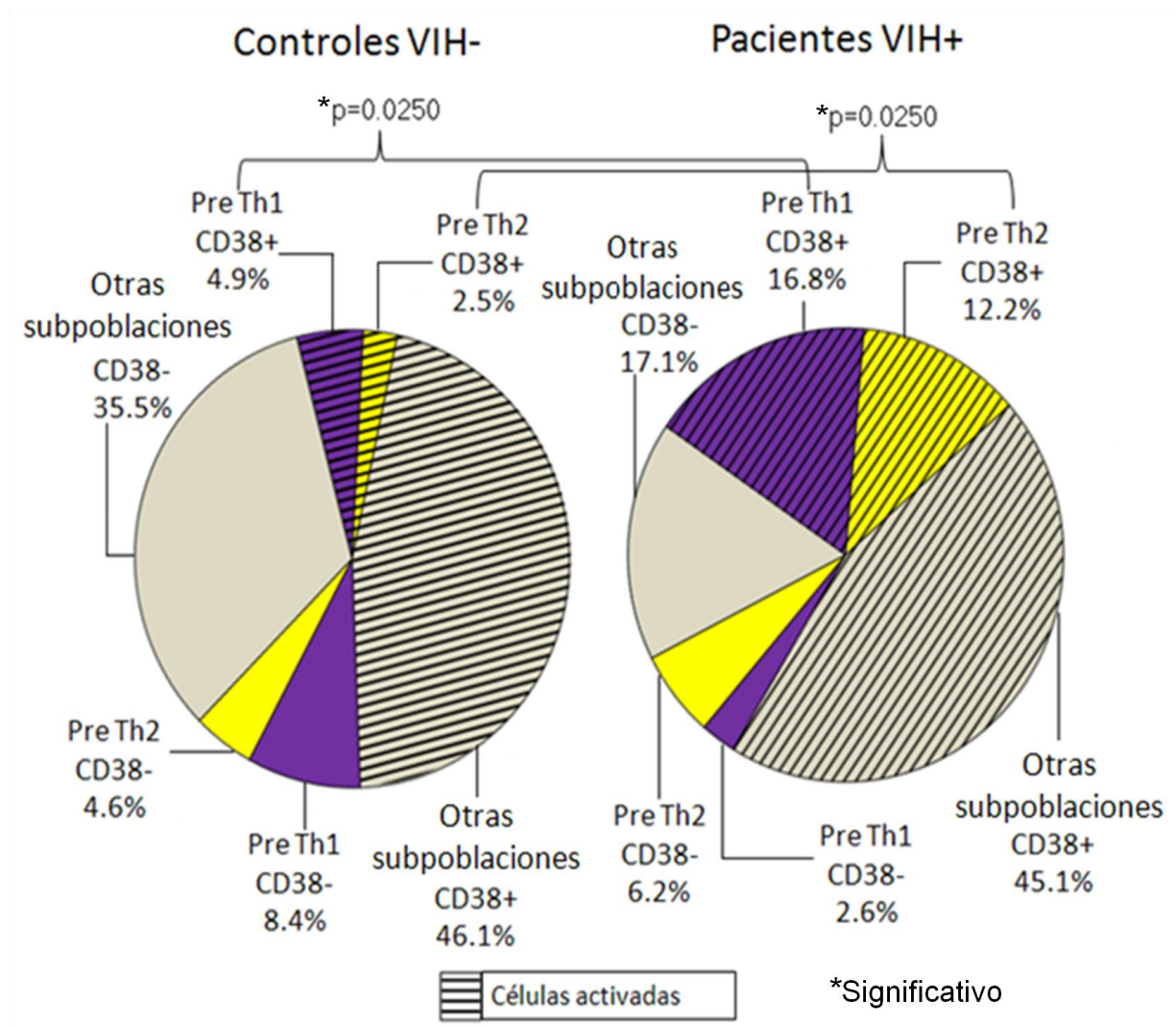


Fig. 23 Distribución de las células T CD4⁺ de memoria centrales. Los gráficos de pastel representan al total de las células Tcm CD4⁺ de los donadores sanos y de los pacientes VIH⁺. Las células Tcm CD4⁺ de memoria centrales fueron divididas en las: células pre Th1 activadas, pre Th1 no activadas, pre Th2 activadas, pre Th2 no activadas, otras subpoblaciones activadas y otras subpoblaciones no activadas.

Se analizaron separadamente las fracciones correspondientes a las células activadas de las Tcm CD4⁺ y se compararon las frecuencias de las subpoblaciones activadas: pre Th1, pre Th2 y otras subpoblaciones (Fig.24). La proporción de células pre Th2 activadas tiende a ser mayor entre las Tcm activadas de pacientes VIH⁺ (p=0.0547);

el valor obtenido de p se encuentra por arriba de lo establecido como significativo (0.05), pero es destacable la tendencia observada. Las frecuencias de las otras subpoblaciones no mostraron diferencias significativas ni tendencias.

Células T de memoria centrales CD4+ activadas

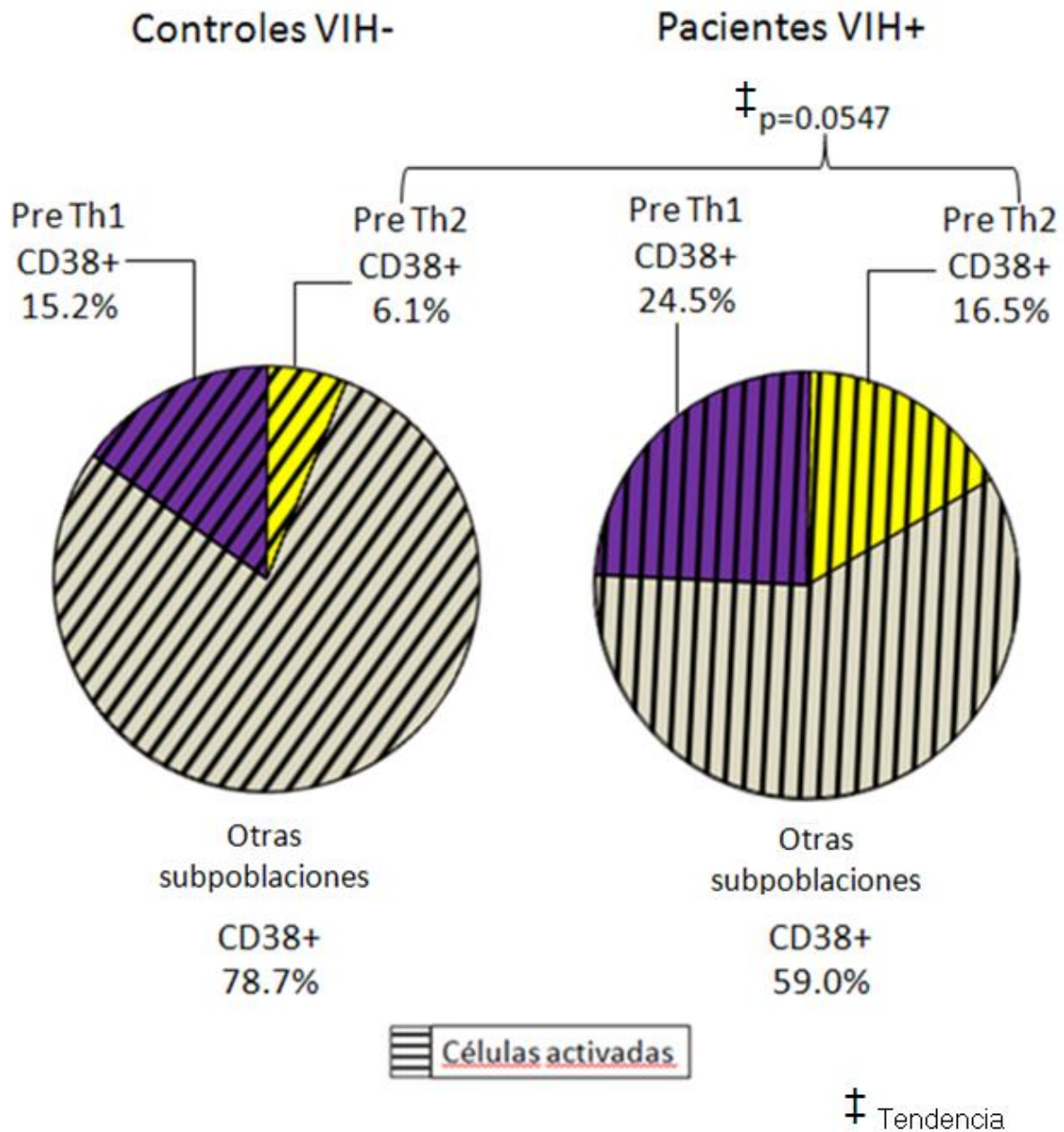


Fig. 24 Distribución de frecuencias de células Tcm activadas. Los gráficos de pastel representan al total de las células Tcm CD4+ activadas de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺.

6.2 Células T CD8⁺ en la infección por VIH

6.2.1 Aumento de células T CD8⁺ en la infección por VIH

Se ha descrito que durante la infección por VIH se presenta una expansión policlonal masiva de células T CD8⁺ [106]. Dicho fenómeno se encuentra en consonancia con los resultados obtenidos al comparar las frecuencias de células T CD8⁺ en donadores sanos y pacientes VIH⁺ (Fig.25); la frecuencia de células T CD8⁺ es significativamente mayor en pacientes VIH⁺ (aproximadamente el doble) que en donadores sanos ($p=0.0105$), obteniéndose una mediana de 26.6% en donadores sanos y de 51.9% en pacientes infectados por VIH.

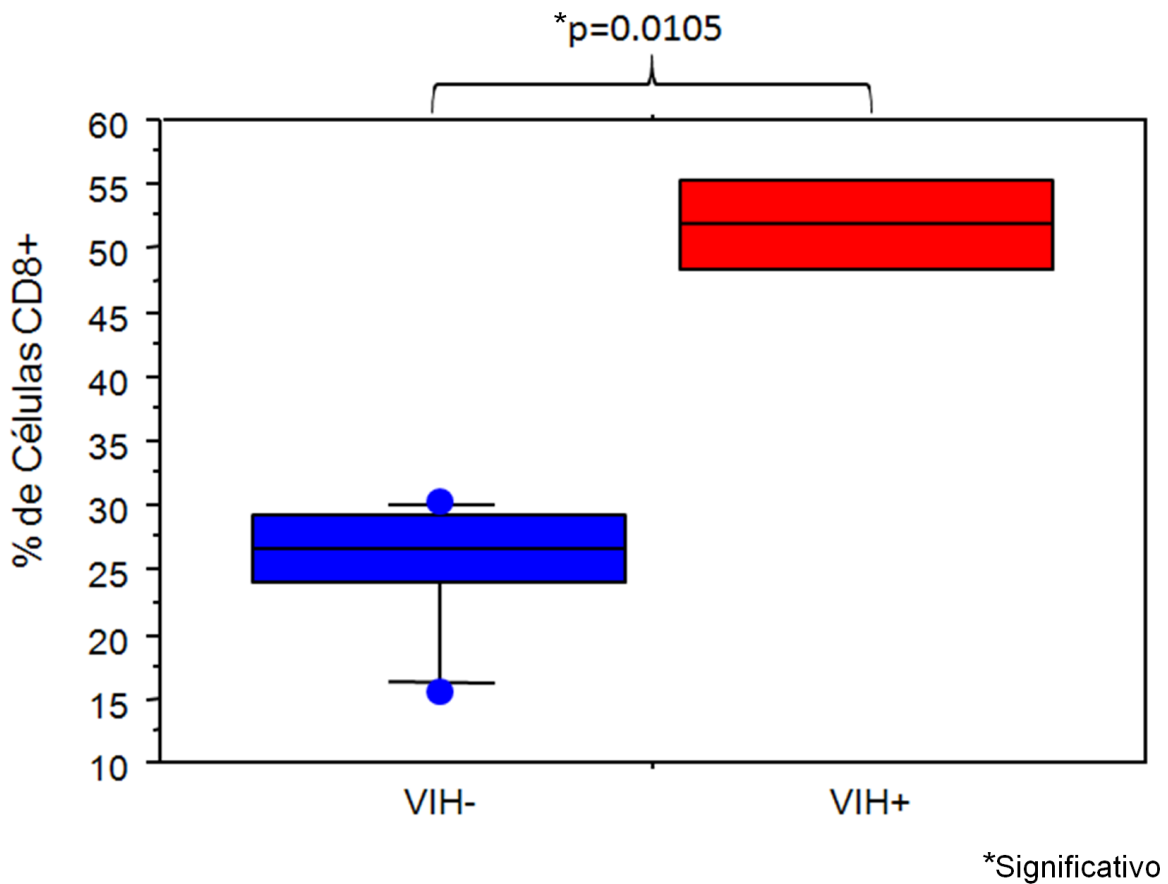


Fig. 25 Porcentaje de células CD8⁺ entre los linfocitos de donadores sanos y pacientes VIH⁺

6.2.2 Activación en células T CD8⁺

Se ha encontrado que la expresión del marcador de activación CD38 en células T CD8⁺ es un excelente predictor del progreso de la enfermedad [40, 42]. En este estudio se midieron las frecuencias de células T CD8⁺ que expresaban el marcador de activación CD38 en donadores sanos y pacientes VIH⁺ (Fig.26). En conformidad con lo reportado, las células T CD8⁺ de pacientes VIH⁺ expresaron más frecuentemente el marcador de activación CD38 que las células T CD8⁺ de donadores sanos ($p=0.0446$). La frecuencia de células T CD8⁺ que expresaron CD38, en forma de mediana, fue de 42.8% en donadores sanos y 85.8% en pacientes VIH⁺.

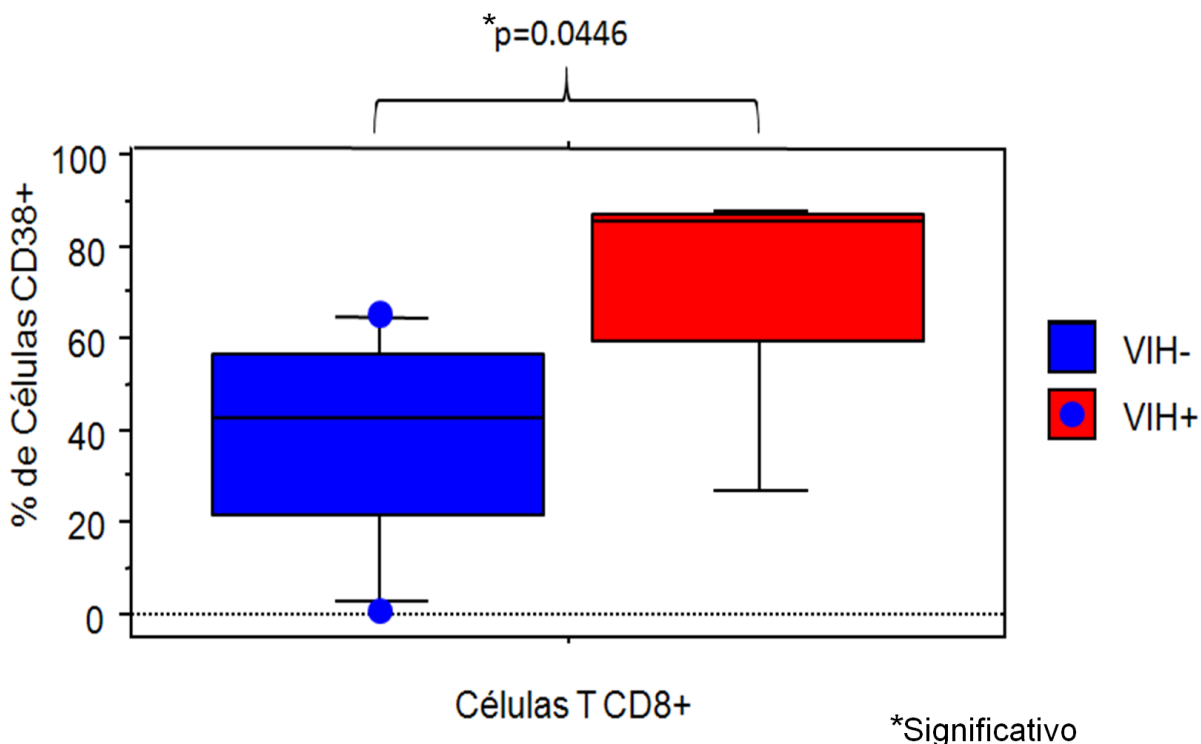


Fig. 26 Frecuencia de células T CD8⁺ que expresan CD38 en pacientes controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺.

6.2.3 Activación en células T de memoria centrales CD8⁺

Se midió la expresión de CD38 en las células con fenotipo de memoria central (CD45RA⁻ CCR7⁺) de donadores sanos y pacientes VIH⁺ (Fig.27). Se encontró que la

expresión de CD38 es significativamente mayor en las células T CD8⁺ de memoria centrales de pacientes VIH⁺ que en aquellas provenientes de donadores sanos (p=0.0446). Los datos provenientes de donadores sanos mostraron una mayor dispersión, medida como intervalo intercuartil (ICR), que los datos de los pacientes; lo cual indica que en los donadores sanos existen diferentes grados de activación, mientras que en los pacientes VIH⁺ las frecuencias de células T de memoria centrales activadas muestran menor dispersión y con porcentajes elevados en comparación con los donadores sanos.

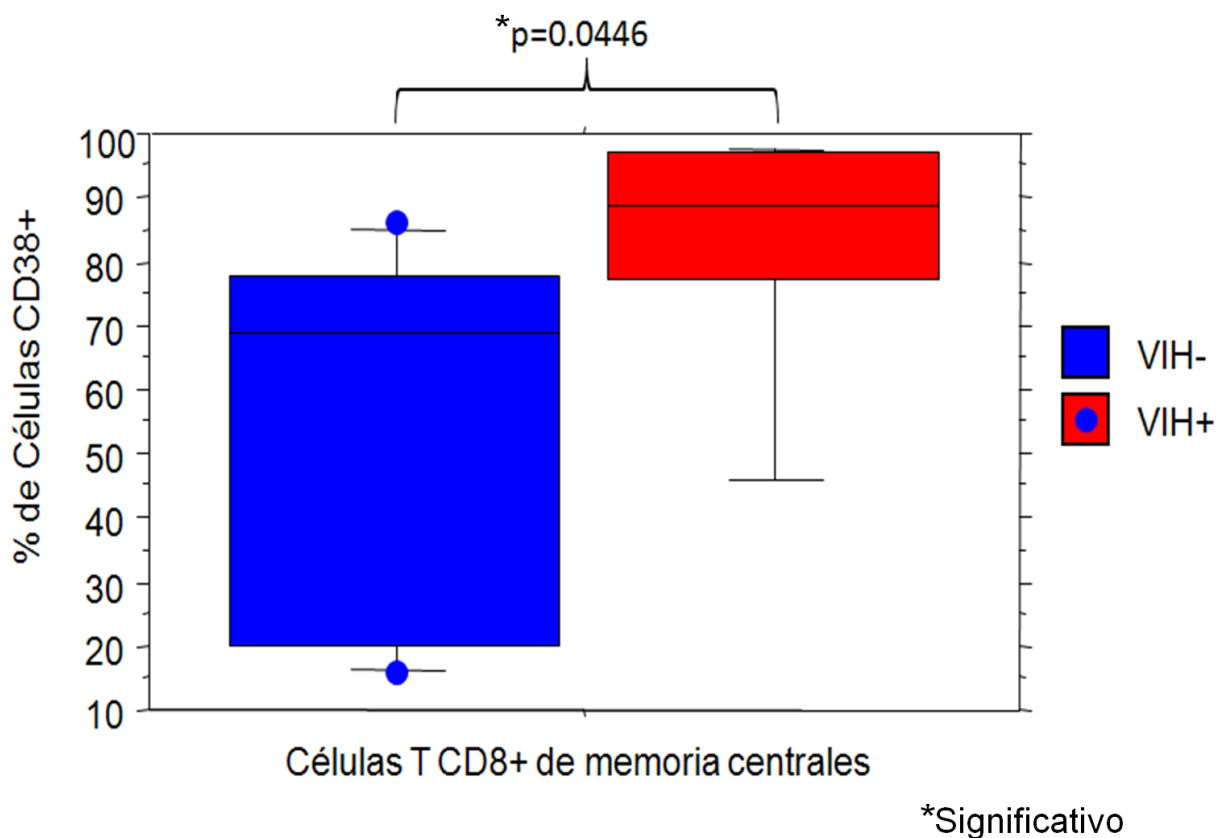


Fig. 27 Porcentaje de células T CD8⁺ de memoria centrales que expresan CD38 en donadores sanos y pacientes VIH⁺.

El siguiente gráfico de pastel muestra al total de las células T CD8⁺ de memoria centrales de controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺ así como la proporción correspondiente a las células activadas (Fig.28). Se puede observar que la mayoría de las células Tcm

CD8⁺ de pacientes VIH⁺ se encuentran activadas, es decir, expresan el marcador CD38.

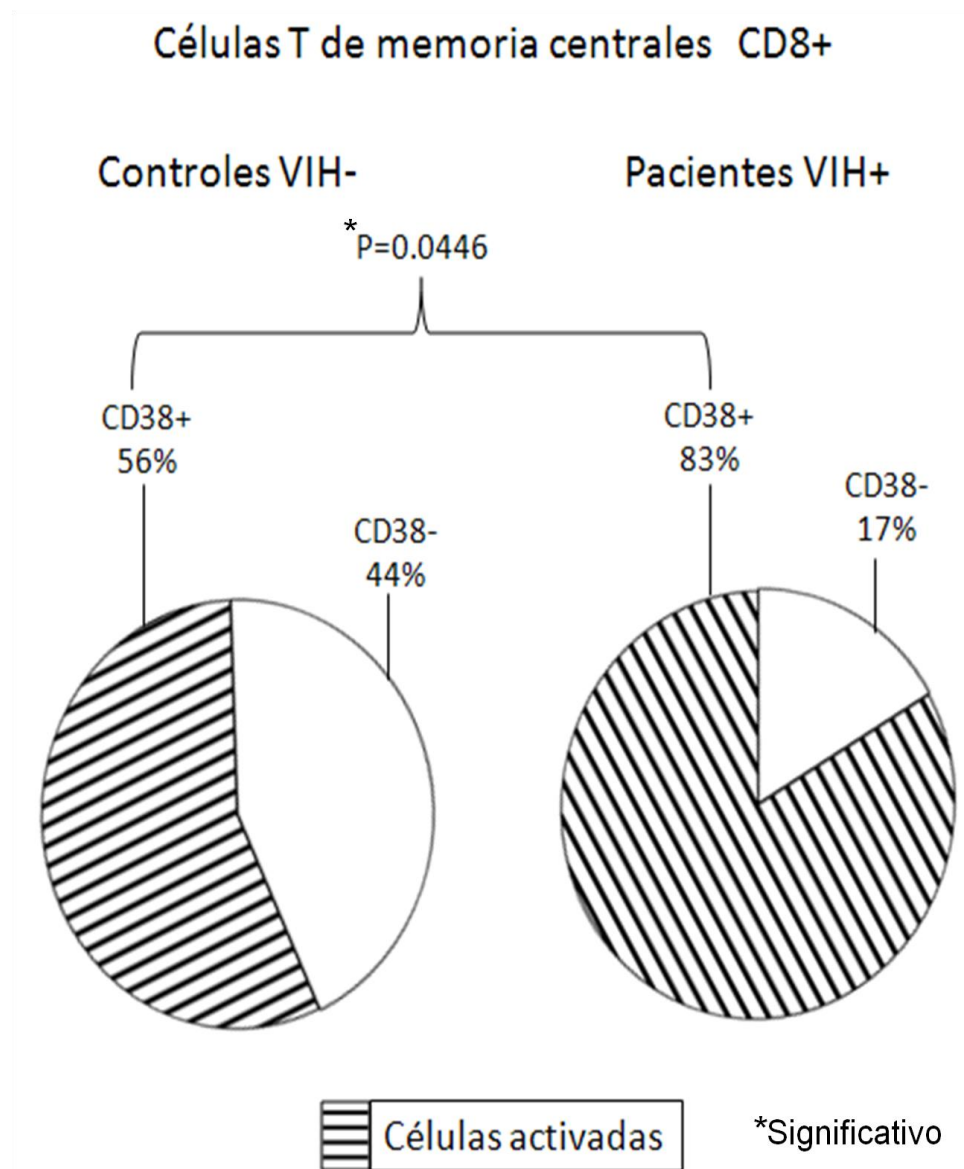


Fig. 28 Activación en células Tcm CD8⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

6.2.4 Activación en células T comprometidas

El grado de activación o expresión del marcador CD38 también fue medida en las células T CD8⁺ con fenotipo comprometido, es decir, que no expresan CXCR5 (Fig.29). Se encontró que la proporción de células que expresan CD38 es significativamente mayor entre las células comprometidas de los pacientes VIH⁺ que

en los donadores sanos ($p=0.0446$). Al igual que la activación en las células T de memoria centrales $CD8^+$, en el subconjunto de células comprometidas se observa que los datos provenientes de donadores sanos poseen una mayor dispersión, lo cual concuerda con el hecho de que en los pacientes la activación constituye un fenómeno definido capaz de agrupar la mayor parte de las frecuencias de células comprometidas activadas dentro de valores altos, en comparación con los donadores sanos.

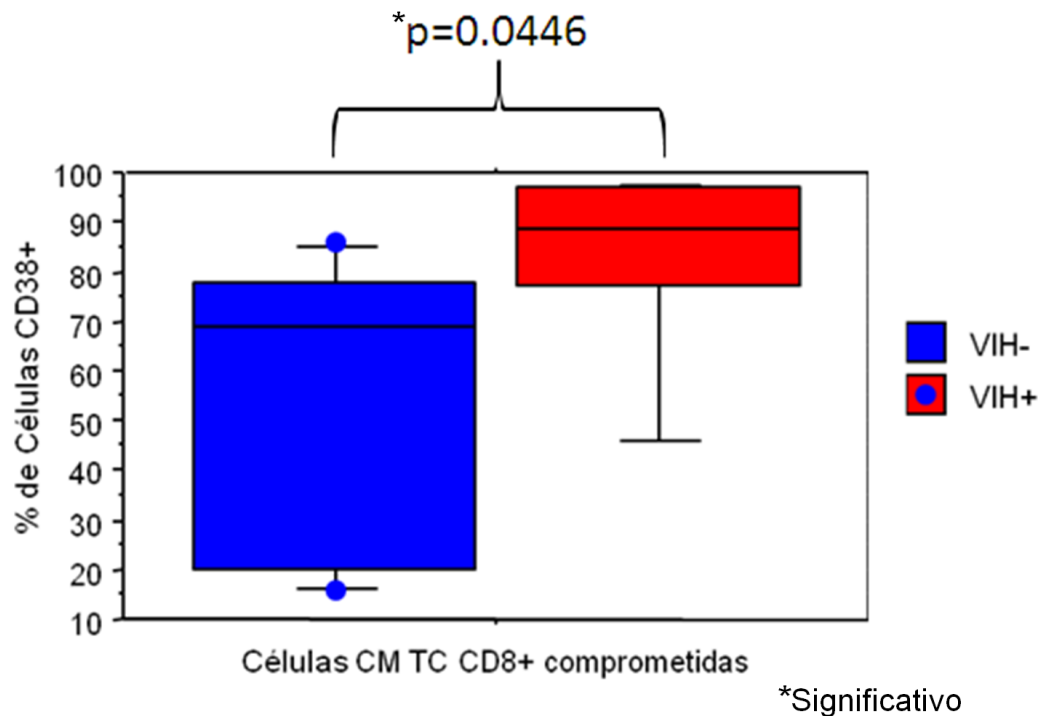


Fig. 29 Expresión de CD38 en las células T $CD8^+$ de memoria centrales comprometidas ($CXCR5^-$) de donadores sanos y pacientes VIH⁺

6.2.5 Activación en células pre Th1

Se midió la expresión de CD38 en las células T $CD8^+$ pre Th1 de donadores sanos y pacientes VIH⁺ (Fig.30). Se encontró una marcada activación de las células pre Th1 de pacientes VIH⁺ ($p=0.0106$); las células pre Th1 de los donadores sanos muestran una mayor dispersión en los datos y no alcanzaron frecuencias de activación tan elevadas como las encontradas en los pacientes. Nuevamente el fenómeno de la activación se presenta de forma definida, es decir, con menor dispersión en los datos

de las células provenientes de pacientes VIH⁺ y con los valores más altos (Fig.31). La mediana de células pre Th1 activadas de donadores sanos fue de 25.0% mientras que en paciente infectados con VIH fue de 90.5%.

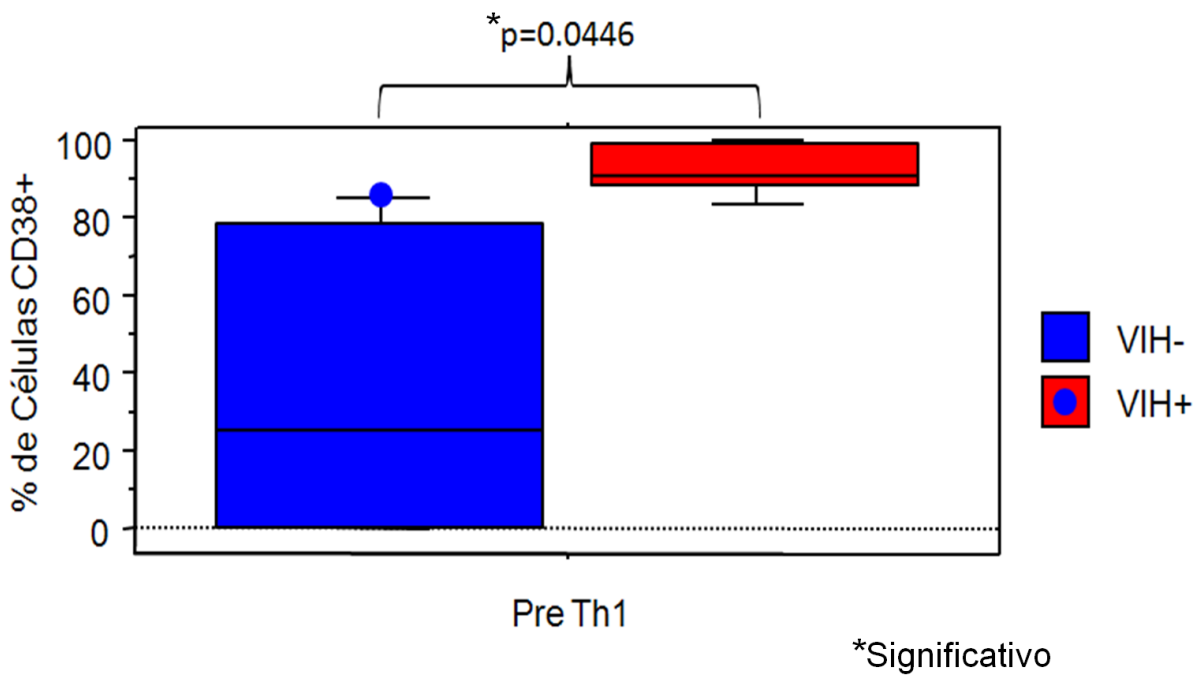


Fig. 30 Expresión de CD38 en células pre Th1 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

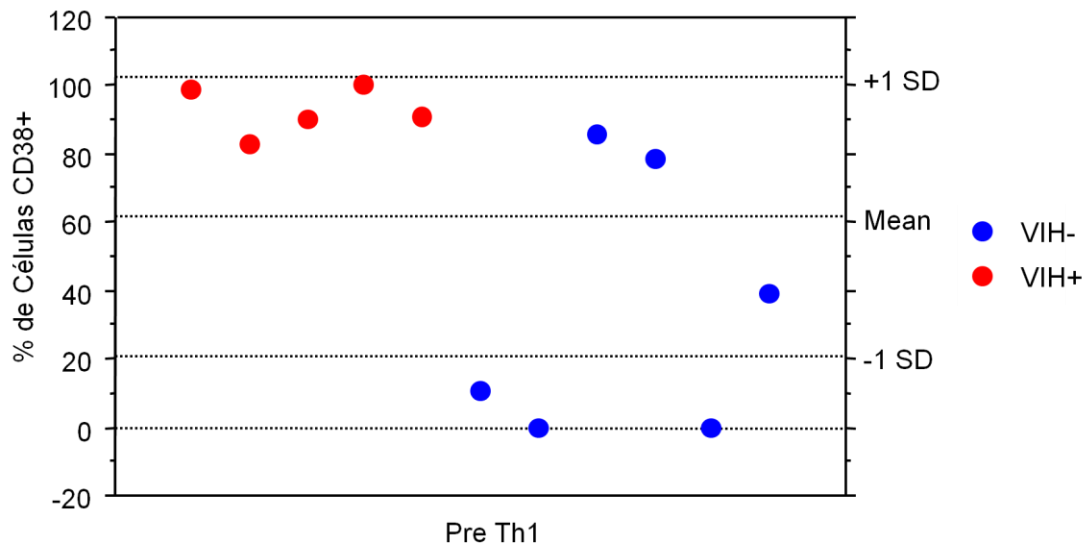


Fig. 31 Diagrama de dispersión de frecuencias de células pre Th1 que expresan CD38 (activadas) de donadores sanos y pacientes VIH⁺

Se llevó a cabo una prueba pareada para comparar las frecuencias de activación de las células pre Th1 con las frecuencias de activación de las células no comprometidas de donadores sanos y pacientes (Fig.32). En donadores sanos se encontró que la frecuencia de células pre Th1 activadas es significativamente menor que la frecuencia de células no comprometidas activadas ($p=0.0431$). Dicha diferencia en las frecuencias de activación no se observó en pacientes ($p=0.5002$); la ausencia de dicho efecto se puede explicar por el aumento en las frecuencias de activación de las células pre Th1 de pacientes.

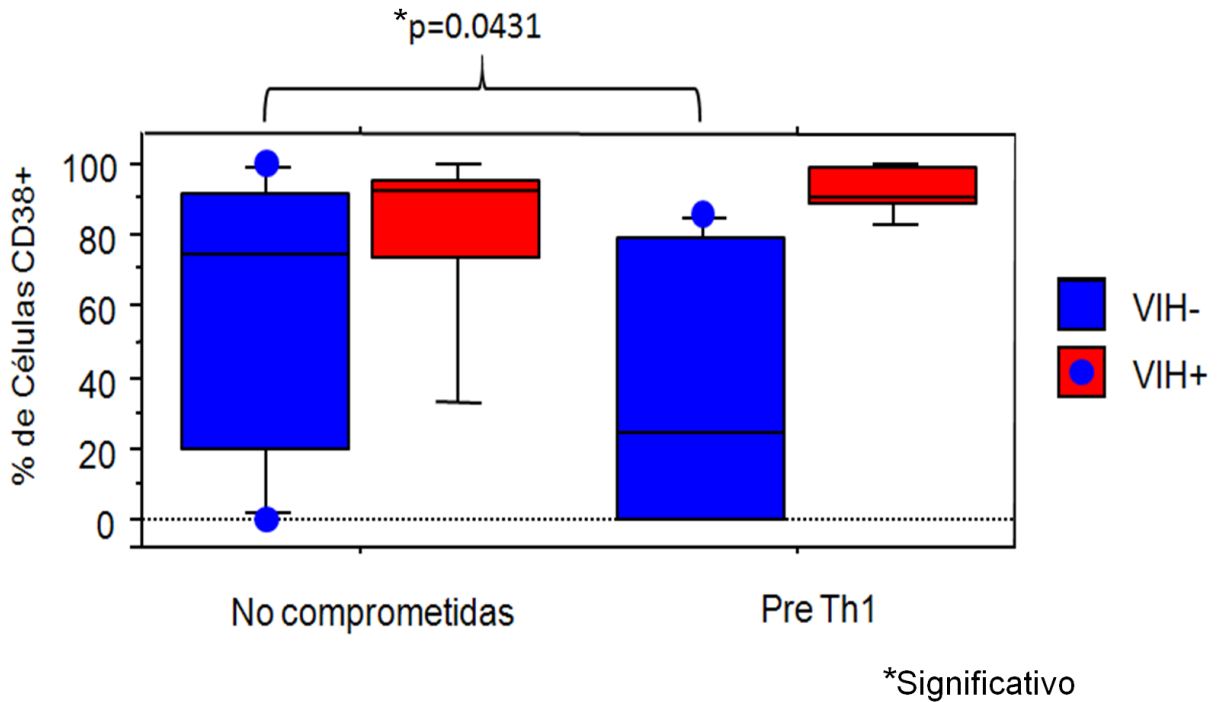


Fig. 32 Expresión de CD38 en células no comprometidas y pre Th1 de donadores sanos y pacientes VIH⁺

La frecuencia de células pre Th2 activadas provenientes de donadores sanos no mostraron diferencias significativas con el porcentaje de células pre Th2 activadas procedentes de pacientes infectados con VIH.

6.2.6 Activación y compromiso de las células T de memoria centrales CD8⁺

Se estudiaron las proporciones de células pre Th1, pre Th2 y demás subpoblaciones dentro de las células Tcm CD8⁺ en controles VIH⁻ y pacientes VIH⁺. No se encontraron diferencias significativas entre los donadores sanos y pacientes VIH⁺ en las frecuencias de las subpoblaciones pre Th1, pre Th2 o en las demás subpoblaciones dentro de las células Tcm CD8⁺.

Se realizaron comparaciones pareadas dentro de cada grupo para indagar si existían diferencias entre las frecuencias de células pre Th1 y pre Th2 dentro de las Tcm CD8⁺ y si dichas diferencias se conservaban en los donadores sanos y pacientes VIH⁺. Como se puede apreciar en la siguiente figura, se encontró que la proporción de células pre Th1 es significativamente mayor que la proporción de células pre Th2

entre las Tcm CD8⁺ en pacientes VIH⁺ (p=0.0431), dicha diferencia no se observó en los donadores sanos (Fig.33).

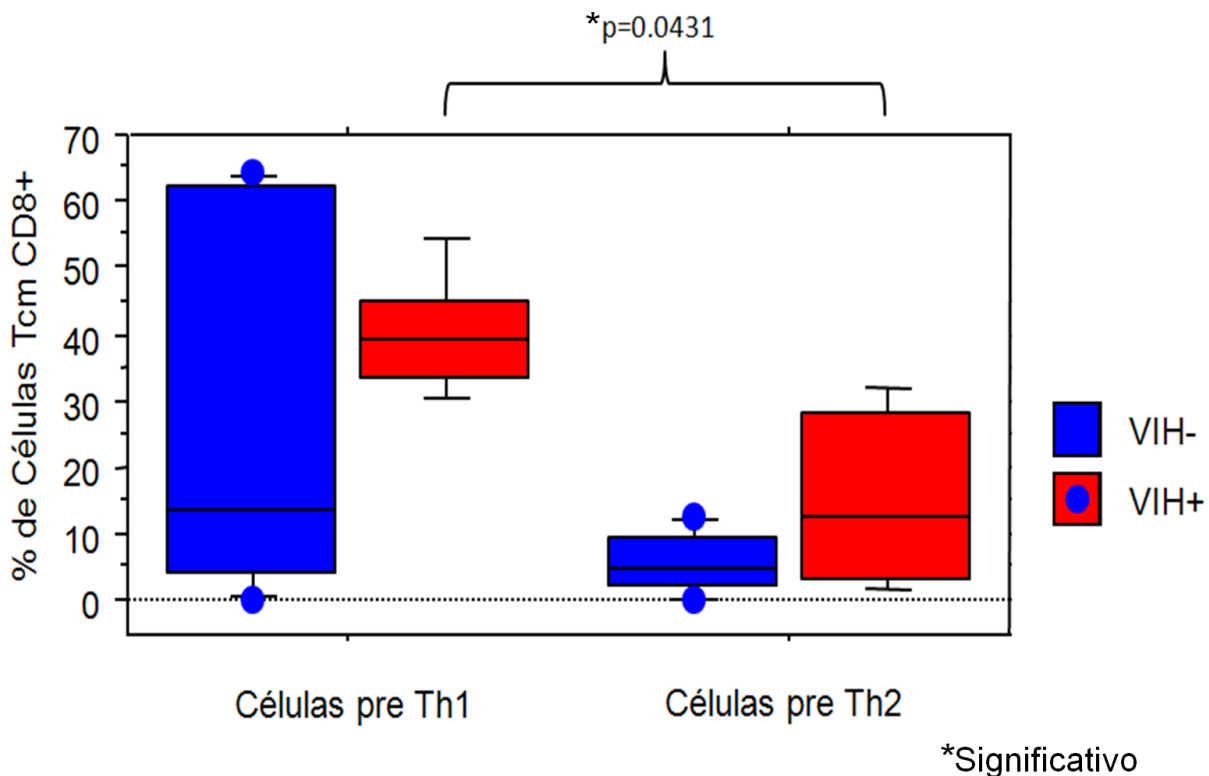


Fig. 33 Frecuencia de células pre Th1 y pre Th2 dentro de las Tcm CD8⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

En el siguiente diagrama de pastel se representa el total de células Tcm CD8⁺ y las porciones correspondientes a las células pre Th1, pre Th2 y otras subpoblaciones. En pacientes infectados con VIH, la frecuencia de células pre Th1 es mayor que la frecuencia de células pre Th2 entre las Tcm CD8⁺.

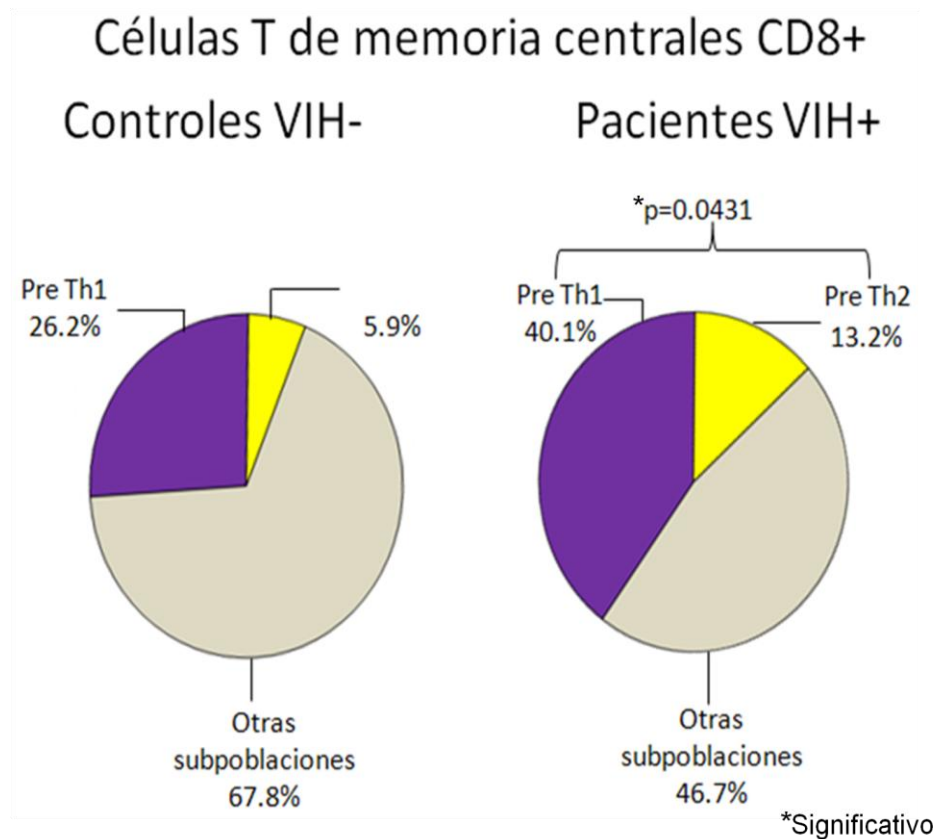


Fig. 34 Distribución de las Tcm CD8+ en las células pre Th1, pre Th2 y otras subpoblaciones de controles VIH- y pacientes VIH+.

Se realizaron pruebas pareadas para comparar las frecuencias de células pre Th1 y pre Th2 activadas y no activadas dentro de las células Tcm CD8+ de donadores sanos y pacientes VIH+ (Fig.34). Se encontró que las células pre Th1 activadas tienen una mayor proporción que las células pre Th2 activadas dentro de las Tcm CD8+ de pacientes VIH+ ($p=0.0431$); en donadores sanos no se aprecia ésta diferencia ($p=0.4631$) (Fig.35).

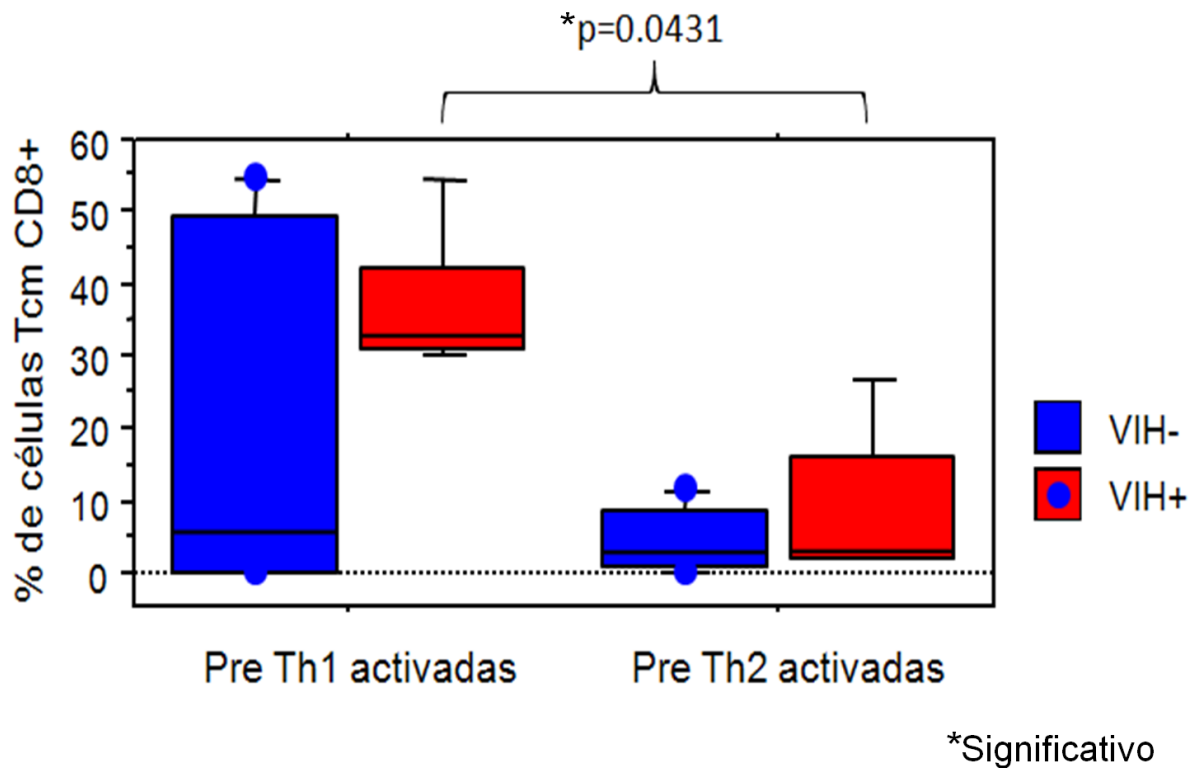


Fig. 35 Porcentaje de células pre Th1 y pre Th2 dentro de las Tcm CD8⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺.

Como se puede observar en la siguiente figura, la proporción de células pre Th1 no activadas es mayor que la proporción de células pre Th2 no activadas entre las células Tcm CD8⁺ de donadores sanos (p=0.0277); dicha diferencia no se observó en los pacientes VIH⁺ (Fig.36).

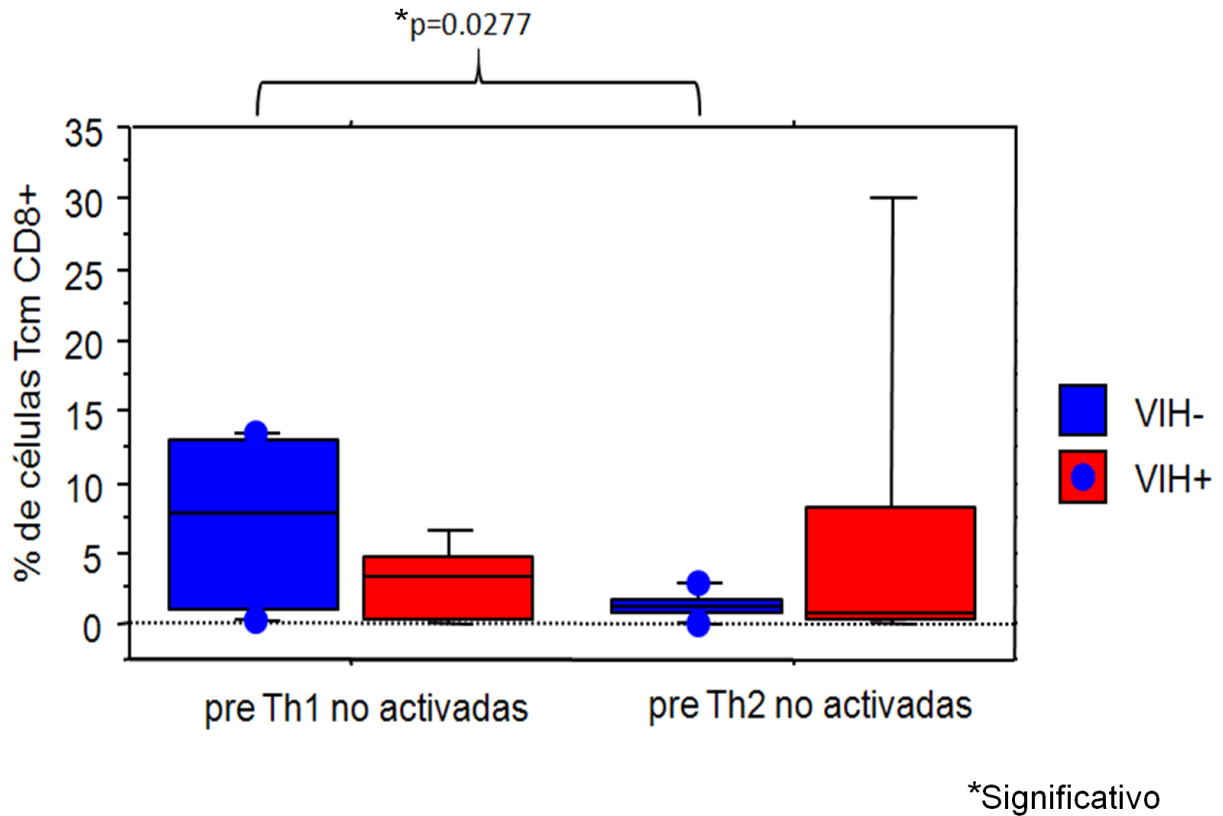
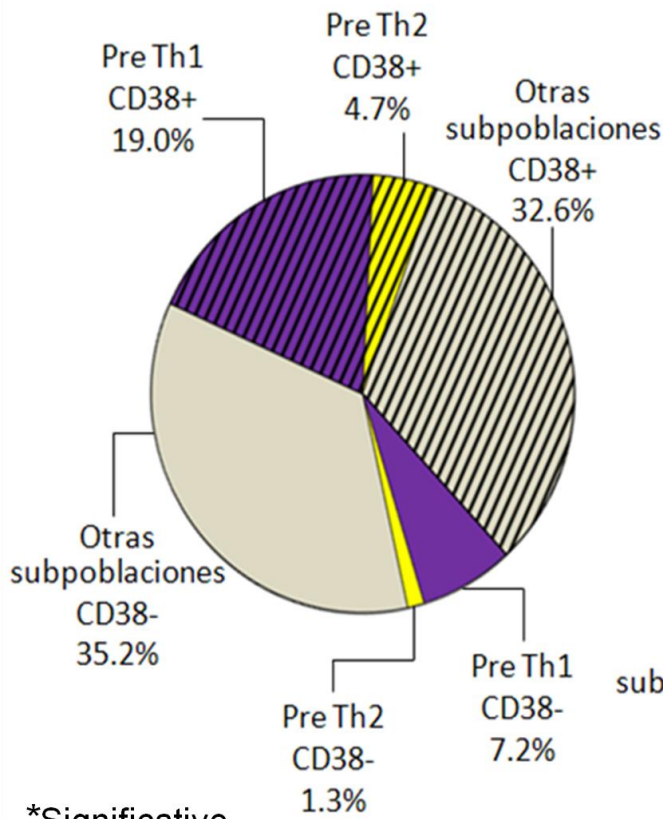


Fig. 36 Frecuencia de células pre Th1 no activadas y pre Th2 no activadas dentro de las Tcm CD8⁺ de donadores sanos y pacientes VIH⁺

En la siguiente figura se resume la distribución de las Tcm CD8⁺ entre las diferentes subpoblaciones activadas y no activadas (Fig.37).

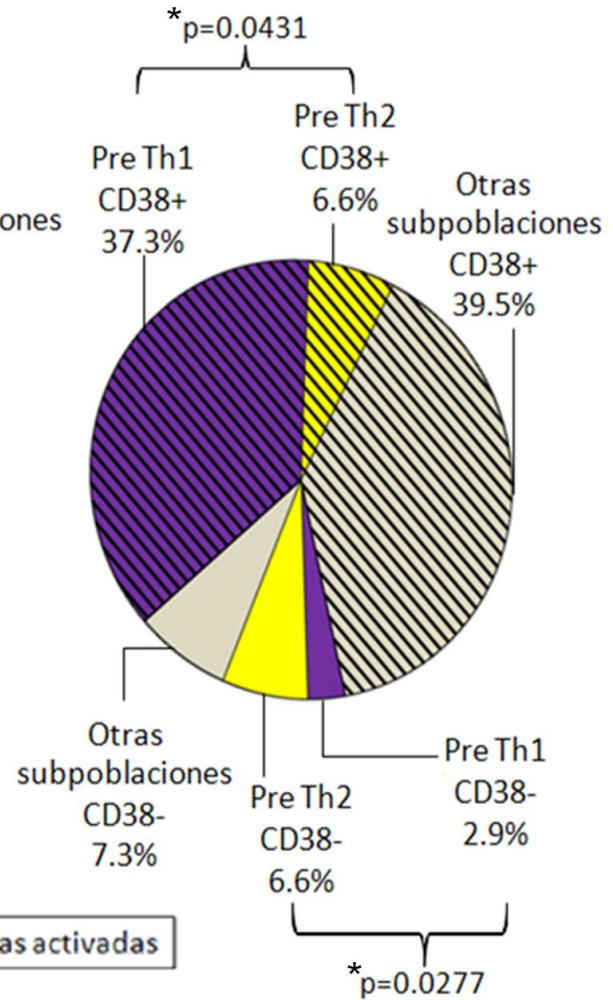
Células T de memoria centrales CD8+

Controles VIH-



*Significativo

Pacientes VIH+



*p=0.0431

*p=0.0277

Fig. 37 Distribución de frecuencias de las células Tcm CD8⁺ entre las diferentes subpoblaciones activadas y no activadas.

7 Discusión

Las células T de memoria centrales CD4⁺ (Tcm CD4⁺) constituyen una población heterogénea que puede ser dividida en diferentes subpoblaciones basándose en la expresión de los marcadores CXCR5, CXCR3 y CCR4. En el presente estudio se encontró que en pacientes infectados por VIH, las células Tcm CD4⁺ con fenotipo pre Th1 activadas (CXCR5⁻ CXCR3⁺ CCR4⁻ CD38⁺) y pre Th2 activadas (CXCR5⁻ CXCR3⁻ CCR4⁺ CD38⁺) se encuentran aumentadas significativamente dentro de las células T de memoria centrales CD4⁺ totales. Ya se ha reportado que las células Tcm CD4⁺ con fenotipo pre Th1 y pre Th2 poseen un potencial replicativo limitado y se diferencian a funciones efectoras Th1 y Th2, respectivamente, cuando son expuestas ante un estímulo homeostático [73]. El hecho de que estas dos subpoblaciones activadas se encuentren sobrerrepresentadas dentro de las Tcm CD4⁺ implica dos aspectos. El primer aspecto reside en el impacto negativo sobre la capacidad regenerativa de las Tcm CD4⁺ y su contribución a la pérdida progresiva de células T CD4⁺ en la infección por VIH. El segundo aspecto lo constituye el vínculo existente entre la activación y el compromiso de las células Tcm CD4⁺ a diferenciarse a funciones efectoras. Es posible visualizar un panorama en el cual la activación crónica dirige el reclutamiento de células a las subpoblaciones pre Th1 y pre Th2 dentro de las células Tcm CD4⁺.

Es de particular interés el hecho de que las células con fenotipo pre Th2 tienden a estar sobrerrepresentadas dentro de las células Tcm CD4⁺ totales. De acuerdo con esto, el fenómeno de compromiso de las células Tcm CD4⁺ en la infección por VIH tiende a favorecer la presencia de células pre Th2 dentro del grupo de células Tcm CD4⁺. Si se analizan de manera independiente sólo a las células Tcm CD4⁺ activadas, también es posible encontrar que las células con fenotipo pre Th2 tienden a estar aumentadas. De acuerdo con esto, la activación de las células Tcm CD4⁺, en la infección por VIH, tiende a ser más franca para las células con fenotipo pre Th2. Estas tendencias sugieren que tanto el compromiso como la activación de las células Tcm CD4⁺ en pacientes infectados por VIH, se encuentran dirigidos preferencialmente

a las células con fenotipo pre Th2. Si bien las células T CD4+ con fenotipo pre Th1 no se encuentran sobrerrepresentadas dentro de las Tcm CD4+, sí se encuentran significativamente más activadas, lo cual sugiere que sean estas células pre Th1 activadas las que se encuentren sobrerrepresentadas dentro de las células Tcm CD4+.

Las implicaciones relacionadas con la fuerte tendencia las células pre Th2 a encontrarse sobrerrepresentadas dentro de las Tcm CD4+ totales y activadas y su efecto sobre el tipo de respuesta inmune contra el VIH son diversas. Existen numerosas evidencias que reportan el papel dual de las respuestas tipo Th2 y también Th1 en la infección por VIH. Mientras que la producción de algunas citocinas tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) pueden reforzar e intensificar las respuestas inmunes celulares anti-VIH, esos mismos factores pueden estar favoreciendo la producción de VIH [107-109]. Por otra parte, la producción de citocinas tipo Th2 (IL-4 e IL-10) pueden suprimir la producción de VIH [107-109]. Jay A. Levy propone que el efecto supresor de la IL-10 podría estar vinculado al efecto inhibitorio que tiene sobre la producción de TNF- α , un regulador positivo de la replicación del VIH. Estudios realizados en individuos infectados por VIH a lo largo del tiempo sugieren que las citocinas tipo Th1 y Th2 pueden estar involucradas en el avance de la enfermedad [110-113]. Las evidencias de dichos estudios muestran que las respuestas tipo Th1 se encuentran asociadas a individuos infectados por VIH asintomáticos saludables, mientras que las respuestas tipo Th2 tienen un mayor predominio durante el estadio sintomático de la enfermedad [112, 114, 115]. Estos resultados, sugieren un cambio en la producción de citocinas del tipo Th1 al tipo Th2 con el avance de la enfermedad. Es así como la respuesta tipo Th1 es vinculada a la protección del individuo infectado [115, 116] mientras que la respuesta tipo Th2 se asocia al avance de la enfermedad [117-119]; lo cual se encuentra en consonancia con el tipo de función a la que son comprometidas principalmente las células Tcm CD4+ en los individuos infectados con el VIH.

El evento más característico de la infección por VIH es la pérdida progresiva e irreversible de células T CD4+ en ausencia de tratamiento antirretroviral [23]. Dicho

fenómeno fue confirmado en el presente estudio, encontrándose que la proporción de células T CD4⁺, respecto a los linfocitos totales, en pacientes VIH⁺ es aproximadamente dos veces menor que la observada en donadores sanos. Fue posible observar que los datos provenientes de pacientes VIH⁺ mostraban una mayor dispersión, lo cual sugiere diferentes grados de avance de la enfermedad en los pacientes, tal y como se puede observar en la cuenta de células T CD4⁺ en los individuos infectados con VIH.

Los siguientes hallazgos trascendentales versan sobre la activación en células T CD8⁺ en la infección por VIH. Ya se ha reportado que durante la fase asintomática de la infección por VIH, los niveles de células T CD8⁺ se ven incrementados y particularmente aumentan los niveles de células T CD8⁺ activadas, determinados por la expresión del marcador CD38⁺ [42]; también se ha descrito que la activación de las células T CD8⁺ medida con la expresión de CD38 constituye un excelente predictor del progreso a SIDA [42]. En el presente estudio se encontró que el porcentaje de células T CD8⁺ se encuentra significativamente aumentado en pacientes infectados por VIH; asimismo fue posible encontrar que las células T CD8⁺ se encuentran significativamente más activadas, lo cual se encuentra en consonancia con lo reportado.

El efecto de la activación en células T CD8⁺ en pacientes infectados por VIH se presentó de forma muy marcada en las células con fenotipo pre Th1. Mientras que en donadores sanos se observaron porcentajes cercanos al 30% de células pre Th1 expresadoras del marcador de activación CD38, en pacientes más del 90% de las células T CD8⁺ con fenotipo pre Th1 se encuentran expresando CD38. Para estudiar la relevancia de las células pre Th1 así como de las células pre Th2 en el contexto de las células T de memoria centrales CD8⁺ en la infección por VIH, se determinaron los porcentajes de células pre Th1 y pre Th2 dentro de las células Tcm CD8⁺ de pacientes VIH⁺. Se llevó a cabo una prueba pareada para comparar la proporción de células pre Th1 con la proporción de células pre Th2 dentro de las células Tcm CD8⁺ y se encontró que la proporción de células pre Th1 es mayor que la proporción de células pre Th2 entre las Tcm CD8⁺ de pacientes VIH⁺; dicha diferencia no se observó

en donadores sanos; de forma inversa se encontró que la proporción de células pre Th2 fue significativamente menor que la proporción de células pre Th1 en donadores sanos lo cual no se observó en pacientes VIH⁺. También se observó que hay significativamente más células pre Th1 activadas que células pre Th2 activadas dentro de las Tcm CD8⁺ de pacientes VIH⁺, lo cual no se observó en donadores sanos. Estas evidencias sugieren que en la infección por VIH, la activación de las células Tcm CD8⁺ afecta preferencialmente a las células con fenotipo pre Th1, lo cual podría estar relacionado con el tipo de respuesta CTL favorecido en el control de la replicación viral. Otra de las implicaciones que se desprende de estas evidencias es que las células Tcm CD8⁺, en el contexto de la infección por VIH, no se ven comprometidas a diferenciarse a funciones efectoras Th1 o Th2 por efecto de la activación, ya que no se observaron diferencias de grupo en la proporción de células pre Th1 o pre Th2 dentro de las Tcm CD8⁺ en pacientes VIH⁺.

Las células T de memoria centrales CD8⁺ también mostraron niveles de activación elevados en los pacientes VIH⁺. No se observaron cambios en la composición de las células Tcm CD8⁺ de los pacientes VIH⁺. No se encontró aumentada ninguna subpoblación activada dentro de las células Tcm CD8⁺ a la que se le pueda atribuir el aumento de activación en la infección por VIH⁺, lo cual sugiere que el fenómeno de activación es generalizado y se encuentra distribuido en varias subpoblaciones de células Tcm CD8⁺.

Laura Papagno y su equipo han descrito que existe una correlación positiva entre el estado de diferenciación avanzado de las células T CD8⁺ y el progreso de la enfermedad por VIH. También se ha descrito que existe un estrecho vínculo entre la activación crónica presente en la infección por VIH y el nivel de diferenciación de las células T CD8⁺; de tal forma que en la infección por VIH, la senescencia replicativa asociada a estados de diferenciación avanzados podría ser impulsada por efecto de la activación crónica, contribuyendo al desgaste de la función del sistema inmune [55].

Otro de los hallazgos pertenecientes al presente estudio lo constituyen las diferencias en la expresión de marcadores de diferenciación y senescencia en células T CD4⁺ de

pacientes VIH⁺. En el presente estudio fue posible observar que tanto las células T CD4⁺ con fenotipo comprometido pre Th1 (CXCR3⁺ CCR4⁻) como pre Th2 (CXCR3⁻ CCR4⁺) expresan menos CD27 que las células con fenotipo no comprometido (CXCR5⁺) en los donadores sanos mientras que en los pacientes no se observó dicha diferencia. Se ha reportado que, en las células T de memoria de donadores sanos, la expresión de CD27 se encuentra vinculada a una mejor respuesta proliferativa y de diferenciación [120]. Fritsch y colaboradores encontraron múltiples relaciones entre la expresión de CD27, en diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺ de memoria, y sobrevida, capacidad proliferativa, senescencia, actividad de telomerasa así como perfil de secreción de citocinas [121], en donde se encontró que a medida que se pierde la expresión de la molécula CD27 las células T CD4⁺ de memoria tienen una menor sobrevida, disminuye la capacidad proliferativa, se encuentran en estados de senescencia más avanzados y poseen menor actividad de telomerasa. Los resultados provenientes de donadores sanos en el presente trabajo se encuentran en consonancia con los del equipo de Fritsch, ya que de acuerdo al modelo de diferenciación propuesto, las células comprometidas a funciones efectoras (pre Th1 y pre Th2) se encuentran en estados de diferenciación más avanzados y son éstas las que expresan menos CD27 en los controles VIH⁻; sin embargo, esto no se observó en pacientes, lo cual sugiere que en la infección por VIH las vías de diferenciación se encuentran alteradas. En múltiples estudios se ha demostrado que la estimulación antigénica constante en las infecciones crónicas promueve la pérdida de la expresión de CD27 [73, 120], lo cual en el contexto de la infección por VIH podría estar implicado. Adicionalmente se encontró que las células pre Th1 expresan más CD27 que las células pre Th2 en pacientes VIH⁺, lo cual no se observó en donadores sanos en donde no hay diferencias significativas en los estados de diferenciación entre las células pre Th1 y pre Th2; de acuerdo a lo reportado por Fritsch, se espera que las células pre Th1 que expresan CD27 tengan un perfil de expresión de citocinas que favorece la producción de IFN- γ lo cual sugiere un vínculo entre la infección por VIH y el tipo de respuesta a la que están predispuestas las células T de memoria centrales.

Es posible que la activación desempeñe un papel homeostático que se ve alterado en la infección por VIH, ya que en los donadores sanos se observa que las células pre

Th1 se encuentran más activadas que las células pre Th2, lo cual no se observa en pacientes. Es posible que dicha diferencia se deba al aumento en la activación de células pre Th2 en pacientes. Se realizó una prueba no pareada para examinar si existían diferencias en el grado de activación de las células pre Th2 y no se observaron diferencias significativas; sin embargo, los datos provenientes de pacientes VIH⁺ presentaron mayor dispersión que los datos provenientes de donadores sanos y los valores de activación más altos se encontraron en los pacientes.

De acuerdo al marcador CD57, el cual correlaciona negativamente con el tamaño de telómeros y permite definir la senescencia replicativa de las células en que se expresa [104], se encontró que las células T CD4⁺ pre Th1, tanto de donadores sanos como de pacientes, se encuentran en un estado senescente más avanzado que las células no comprometidas, lo cual concuerda con el modelo lineal de diferenciación celular que propone que las células comprometidas poseen una historia replicativa mayor que las células no comprometidas. Contrario a lo que Fritsch y su equipo han reportado, se encontró que las células T CD4⁺ con fenotipo pre Th2 expresan menos CD57 que las células no comprometidas en donadores sanos, lo cual indica que las células T CD4⁺ pre Th2 tienen menos ciclos de replicación que las células no comprometidas. Dicha diferencia no se observó en pacientes VIH⁺, lo cual sugiere que la infección pueda alterar las vías de diferenciación de las células T CD4⁺ de memoria y su relación con los ciclos de replicación tanto de las células no comprometidas como de las células comprometidas a funciones Th2. Adicionalmente se observó en donadores sanos que las células T CD4⁺ pre Th1 expresan más CD57 que las células T CD4⁺ pre Th2; nuevamente esta diferencia no fue observada en pacientes VIH⁺. Estas evidencias sugieren que las células T CD4⁺ pre Th2 en la infección por VIH alcanzan niveles senescentes similares a los de las células T CD4⁺ pre Th1. Hay que recordar que las células T CD4⁺ pre Th2 no mostraron diferencias significativas en la expresión del marcador CD27 ni en la historia replicativa con las células no comprometidas en pacientes VIH⁺, lo cual sugiere que en la infección por VIH las células no comprometidas podrían ser arrestadas dentro de un fenotipo

comprometido a funciones pre Th2 prematuramente, es decir, sin cambiar los niveles de expresión de CD27 o CD57.

Uno de los hallazgos llamativos es el hecho de que las otras subpoblaciones celulares dentro de las células Tcm CD4⁺ (que no tienen fenotipo pre Th1 o pre Th2) se encuentran en una proporción significativamente menor entre las Tcm CD4⁺ de los pacientes VIH⁺. Aquellas células que no presentan fenotipo comprometido se encuentran disminuidas en pacientes VIH⁺, lo cual podría reflejar de manera indirecta que una porción importante de las Tcm de pacientes podría estar siendo reclutada dentro de las células comprometidas a diferenciarse a células con funciones efectoras (que producen IFN- γ e IL-4).

Sobre el origen del fenómeno de activación asociada a la infección por VIH en células CD4⁺ y CD8⁺ se ha propuesto que podrían estar implicados tanto mecanismos homeostáticos compensatorios de la pérdida de células T CD4⁺ como mecanismos dependientes de estímulos antigénicos [36]. Existen evidencias que asocian la activación y proliferación de células T CD4⁺ a la pérdida misma de células T CD4⁺ y al mecanismo homeostático de compensación concomitante, mientras que la activación y expansión de células T CD8⁺ se encuentran vinculadas a estímulos antigénicos (carga viral, p.ej.) [122, 123], implicando que las células T CD4⁺ son más sensibles a la regulación homeostática que las células CD8⁺ y que éstas últimas son impulsadas a proliferar en respuesta a estímulos antigénicos [122, 123]. En el presente estudio se encontró que la activación asociada a la infección por VIH afecta de manera distinta a las células T CD4⁺ y a las células T CD8⁺. El hecho de que la población de células T de memoria centrales CD4⁺ se vea afectada en su composición podría estar vinculada a la pérdida de células T CD4⁺ durante la fase asintomática de la infección por VIH.

Es probable que, a diferencia del origen de la activación en células T CD4⁺ en la infección por VIH, la marcada activación de las células T CD8⁺ en pacientes VIH⁺ se encuentre relacionada con estímulos antigénicos. Douek y su equipo han propuesto que la pérdida masiva de células T CD4⁺ en mucosas, durante la fase aguda de la infección, tiene por efecto la pérdida de la integridad de mucosas, promoviendo

fenómenos de translocación bacteriana que contribuyen a alcanzar niveles anormales de activación en los individuos infectados con VIH [89, 124]. Otros factores asociados al VIH podrían estar implicados en la activación crónica presente en la infección, entre ellos se cuentan proteínas virales (gp120/160, p.ej.) [125-127], activación a nivel de la respuesta inmune innata (a través de la estimulación de receptores tipo Toll) [128, 129], involucrando células dendríticas plasmacitoides, así como la presencia de otros patógenos, además de los agentes causales de las infecciones oportunistas en la fase final de la infección por VIH [130-132]. Independientemente del origen de la activación en células T CD4⁺ y CD8⁺, se logró observar en el presente estudio que sus subpoblaciones, y en particular las células T de memoria centrales, son afectadas de manera distinta.

Serán de gran relevancia los resultados futuros que permitan evaluar la capacidad proliferativa, tendencia a apoptosis así como capacidad de producción de citocinas como IFN γ e IL γ 4, de las células activadas y comprometidas pre Th1 y pre Th2 para evaluar el impacto a nivel funcional de su sobre representación dentro de las células T de memoria centrales CD4⁺.

8 Conclusiones

La primera conclusión que se puede extraer de los resultados obtenidos en el presente trabajo es que en la infección por VIH las células T de memoria centrales CD4⁺ son modificadas en su composición, encontrándose sobrerrepresentadas a las células comprometidas y activadas con fenotipo pre Th1 y pre Th2, lo cual podría estar vinculado a la pérdida de la capacidad regenerativa de las células T de memoria y contribuir a la pérdida progresiva de las células T CD4⁺ durante la fase asintomática de la infección por VIH.

La segunda conclusión obtenida a partir de este trabajo, es que la activación es un fenómeno que se presenta de en múltiples subpoblaciones de células T CD8⁺, incluyendo a las células Tcm CD8⁺, sin que se observe algún cambio en la distribución de sus subpoblaciones.

De acuerdo a los resultados de activación en células T de memoria centrales CD8⁺, es posible concluir que se favorece la respuesta Th1 sobre la respuesta Th2 en la infección por VIH.

La tercera conclusión reside en que la activación asociada a la infección por VIH altera las vías de diferenciación de las células T de memoria centrales CD4⁺.

9 Referencias

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS., *Global report : UNAIDS report on the global AIDS epidemic*. 2010, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS: Geneva, Switzerland. p. v.
2. Nielsen, M.H., F.S. Pedersen, and J. Kjemis, *Molecular strategies to inhibit HIV-1 replication*. *Retrovirology*, 2005. **2**: p. 10.
3. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(1): p. 11-23.
4. Fauci, A.S., *HIV and AIDS: 20 years of science*. *Nat Med*, 2003. **9**(7): p. 839-43.
5. Ainsworth, M. and W. Teokul, *Breaking the silence: setting realistic priorities for AIDS control in less-developed countries*. *Lancet*, 2000. **356**(9223): p. 55-60.
6. Zhang, Z., et al., *Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells*. *Science*, 1999. **286**(5443): p. 1353-7.
7. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 761-70.
8. Mattapallil, J.J., et al., *Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection*. *Nature*, 2005. **434**(7037): p. 1093-7.
9. Levy, J.A., *HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research*. *Adv Dent Res*, 2006. **19**(1): p. 10-6.
10. Embretson, J., et al., *Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS*. *Nature*, 1993. **362**(6418): p. 359-62.
11. Machala, L. and R. Cerny, *[Acute HIV infection]*. *Cas Lek Cesk*, 2004. **143**(9): p. 584-7; discussion 587-8.
12. Lang, W., et al., *Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1989. **2**(1): p. 63-9.
13. Haase, A.T., *Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(10): p. 783-92.
14. Pantaleo, G., et al., *Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy*. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 341-5.
15. McDonald, R.A., et al., *Evolution of human immunodeficiency virus type 1 env sequence variation in patients with diverse rates of disease progression and T-cell function*. *J Virol*, 1997. **71**(3): p. 1871-9.
16. Lassen, K., et al., *The multifactorial nature of HIV-1 latency*. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(11): p. 525-31.
17. Douek, D.C., et al., *HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells*. *Nature*, 2002. **417**(6884): p. 95-8.
18. Moir, S., et al., *Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily*. *J Exp Med*, 2004. **200**(7): p. 587-99.
19. Moir, S., et al., *HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10362-7.
20. De Milito, A., et al., *Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2180-6.
21. *1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults*. *MMWR Recomm Rep*, 1992. **41**(RR-17): p. 1-19.

22. *Guidelines for national human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome.* Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep, 1999. **48**(RR-13): p. 1-27, 29-31.
23. McCune, J.M., *The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease.* Nature, 2001. **410**(6831): p. 974-9.
24. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.* Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-6.
25. Alcamí, J., [*Advances in the immunopathology of HIV infection*]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004. **22**(8): p. 486-96.
26. Grossman, Z., et al., *CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause?* Nat Med, 2002. **8**(4): p. 319-23.
27. Kovacs, J.A., et al., *Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV.* J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1731-41.
28. Hunt, P.W., et al., *Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy.* J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 126-33.
29. Mellors, J.W., et al., *Prognostic value of HIV-1 RNA, CD4 cell count, and CD4 Cell count slope for progression to AIDS and death in untreated HIV-1 infection.* JAMA, 2007. **297**(21): p. 2349-50.
30. Henry, W.K., P. Tebas, and H.C. Lane, *Explaining, predicting, and treating HIV-associated CD4 cell loss: after 25 years still a puzzle.* JAMA, 2006. **296**(12): p. 1523-5.
31. Hellerstein, M., et al., *Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans.* Nat Med, 1999. **5**(1): p. 83-9.
32. Mohri, H., et al., *Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy.* J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1277-87.
33. Arron, S.T., et al., *Impact of thymectomy on the peripheral T cell pool in rhesus macaques before and after infection with simian immunodeficiency virus.* Eur J Immunol, 2005. **35**(1): p. 46-55.
34. Wei, X., et al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.* Nature, 1995. **373**(6510): p. 117-22.
35. Amadori, A., R. Zamarchi, and L. Chieco-Bianchi, *CD4: CD8 ratio and HIV infection: the "tap-and-drain" hypothesis.* Immunol Today, 1996. **17**(9): p. 414-7.
36. Sodora, D.L. and G. Silvestri, *Immune activation and AIDS pathogenesis.* AIDS, 2008. **22**(4): p. 439-46.
37. Hellerstein, M., *HIV tropism and CD4+ T-cell depletion.* Nat Med, 2002. **8**(6): p. 537-8.
38. Ascher, M.S. and H.W. Sheppard, *AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis.* Clin Exp Immunol, 1988. **73**(2): p. 165-7.
39. Grossman, Z., Z. Bentwich, and R.B. Herberman, *From HIV infection to AIDS: are the manifestations of effective immune resistance misinterpreted?* Clin Immunol Immunopathol, 1993. **69**(2): p. 123-35.
40. Liu, Z., et al., *Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **16**(2): p. 83-92.
41. 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.

42. 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.
43. Chakrabarti, L.A., et al., *Normal T-cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection.* J Virol, 2000. **74**(3): p. 1209-23.
44. 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.
45. Broussard, S.R., et al., *Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease.* J Virol, 2001. **75**(5): p. 2262-75.
46. Tesselaar, K., et al., *Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions.* Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 49-54.
47. Sousa, A.E., et al., *CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load.* J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3400-6.
48. Cullen, B.R. and W.C. Greene, *Regulatory pathways governing HIV-1 replication.* Cell, 1989. **58**(3): p. 423-6.
49. Silvestri, G. and M.B. Feinberg, *Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection.* J Clin Invest, 2003. **112**(6): p. 821-4.
50. 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.
51. Martinez-Maza, O., et al., *Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity.* J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3720-4.
52. Lane, H.C., et al., *Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome.* N Engl J Med, 1983. **309**(8): p. 453-8.
53. Braun, D.P., et al., *Monocyte functional studies in asymptomatic, human immunodeficiency disease virus (HIV)-infected individuals.* J Clin Immunol, 1988. **8**(6): p. 486-94.
54. Crowe, S.M. and R.S. Kornbluth, *Overview of HIV interactions with macrophages and dendritic cells: the other infection in AIDS.* J Leukoc Biol, 1994. **56**(3): p. 215-7.
55. Poccia, F., et al., *Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons.* J Immunol, 1996. **157**(1): p. 449-61.
56. Schacker, T.W., et al., *Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis.* J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1133-9.
57. Haynes, B.F., et al., *Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection.* J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 921.
58. Dion, M.L., et al., *HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation.* Immunity, 2004. **21**(6): p. 757-68.
59. Estes, J.D., et al., *Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection.* J Infect Dis, 2007. **195**(4): p. 551-61.
60. Hazenberg, M.D., et al., *Discordant responses during antiretroviral therapy: role of immune activation and T cell redistribution rather than true CD4 T cell loss.* AIDS, 2002. **16**(9): p. 1287-9.

61. Anthony, K.B., et al., *Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **33**(2): p. 125-33.
62. Paiardini, M., et al., *Early correction of cell cycle perturbations predicts the immunological response to therapy in HIV-infected patients*. AIDS, 2004. **18**(3): p. 393-402.
63. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
64. Masopust, D., et al., *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
65. Reinhardt, R.L., et al., *Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 101-5.
66. Bromley, S.K., S.Y. Thomas, and A.D. Luster, *Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 895-901.
67. Debes, G.F., et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-94.
68. Unsoeld, H. and H. Pircher, *Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4510-3.
69. Miller, J.D., et al., *Differentiation of CD8 T cells in response to acute and chronic viral infections: implications for HIV vaccine development*. Curr Drug Targets Infect Disord, 2005. **5**(2): p. 121-9.
70. Amyes, E., A.J. McMichael, and M.F. Callan, *Human CD4+ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5765-73.
71. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Understanding the generation and function of memory T cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 326-32.
72. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. Science, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
73. Rivino, L., et al., *Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 725-35.
74. Moser, B., P. Schaerli, and P. Loetscher, *CXCR5(+) T cells: follicular homing takes center stage in T-helper-cell responses*. Trends Immunol, 2002. **23**(5): p. 250-4.
75. Messi, M., et al., *Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 78-86.
76. Lozza, L., et al., *The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4+IL-7Rhi T cells*. Eur J Immunol, 2008. **38**(1): p. 30-9.
77. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
78. Badovinac, V.P., et al., *Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 748-56.
79. Chang, J.T., et al., *Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses*. Science, 2007. **315**(5819): p. 1687-91.
80. Oliaro, J., et al., *Asymmetric cell division of T cells upon antigen presentation uses multiple conserved mechanisms*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 367-75.
81. Kalia, V., S. Sarkar, and R. Ahmed, *Fine-tuning CD4+ central memory T cell heterogeneity by strength of stimulation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(1): p. 15-9.

82. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1131-7.
83. Rathmell, J.C. and C.B. Thompson, *Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S97-107.
84. Schluns, K.S. and L. Lefrancois, *Cytokine control of memory T-cell development and survival*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 269-79.
85. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 225-34.
86. Bouneaud, C., et al., *Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 579-90.
87. Baron, V., et al., *The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 193-204.
88. Macallan, D.C., et al., *Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 255-60.
89. 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.
90. Hazenberg, M.D., et al., *Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1881-8.
91. Eggena, M.P., et al., *Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4407-14.
92. Bandera, A., et al., *CD4+ T cell depletion, immune activation and increased production of regulatory T cells in the thymus of HIV-infected individuals*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10788.
93. Boasso, A. and G.M. Shearer, *Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis*. Clin Immunol, 2008. **126**(3): p. 235-42.
94. Watt, F.M. and B.L. Hogan, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1427-30.
95. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
96. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
97. McCoy, J.P., Jr., *Handling, storage, and preparation of human blood cells*. Curr Protoc Cytom, 2001. **Chapter 5**: p. Unit 5 1.
98. Sagawa, K., *[Human leukocyte differentiation antigens and the International CD (cluster of differentiation) classification]*. Nihon Rinsho, 1987. **45**(12): p. 2804-13.
99. Koubek, K., *[Human leukocyte differentiation antigens and CD classification]*. Vnitr Lek, 2008. **54**(4): p. 402-9.
100. Zola, H., *Medical applications of leukocyte surface molecules--the CD molecules*. Mol Med, 2006. **12**(11-12): p. 312-6.
101. Maecker, H. and J. Trotter, *[Selecting reagents for multicolor BD flow cytometry]*. Postepy Biochem, 2009. **55**(4): p. 461-7.
102. Stewart, C.C. and S.J. Stewart, *Cell preparation for the identification of leukocytes*. Methods Cell Biol, 2001. **63**: p. 217-51.
103. Levacher, M., et al., *The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(3): p. 376-82.
104. Brenchley, J.M., et al., *Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2711-20.

105. Palmer, B.E., et al., *Functional and phenotypic characterization of CD57+CD4+ T cells and their association with HIV-1-induced T cell dysfunction*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8415-23.
106. Pantaleo, G., et al., *Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV*. Nature, 1994. **370**(6489): p. 463-7.
107. Kontorinis, N., K. Agarwal, and D.T. Dieterich, *Treatment of hepatitis C virus in HIV patients: a review*. AIDS, 2005. **19 Suppl 3**: p. S166-73.
108. Matsuyama, T., N. Kobayashi, and N. Yamamoto, *Cytokines and HIV infection: is AIDS a tumor necrosis factor disease?* AIDS, 1991. **5**(12): p. 1405-17.
109. Poli, G. and A.S. Fauci, *Cytokine modulation of HIV expression*. Semin Immunol, 1993. **5**(3): p. 165-73.
110. Sher, A., et al., *Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection*. Immunol Rev, 1992. **127**: p. 183-204.
111. Maggi, E., et al., *Reduced production of interleukin 2 and interferon-gamma and enhanced helper activity for IgG synthesis by cloned CD4+ T cells from patients with AIDS*. Eur J Immunol, 1987. **17**(12): p. 1685-90.
112. Shearer, G.M. and M. Clerici, *Early T-helper cell defects in HIV infection*. AIDS, 1991. **5**(3): p. 245-53.
113. Gazzinelli, R.T., et al., *CD4+ subset regulation in viral infection. Preferential activation of Th2 cells during progression of retrovirus-induced immunodeficiency in mice*. J Immunol, 1992. **148**(1): p. 182-8.
114. Clerici, M., et al., *Circumvention of defective CD4 T helper cell function in HIV-infected individuals by stimulation with HLA alloantigens*. J Immunol, 1990. **144**(9): p. 3266-71.
115. Clerici, M., et al., *Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 759-65.
116. Clerici, M. and G.M. Shearer, *The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights*. Immunol Today, 1994. **15**(12): p. 575-81.
117. Hyjek, E., et al., *Cytokine patterns during progression to AIDS in children with perinatal HIV infection*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 4060-71.
118. Romagnani, S., *Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response?* Immunol Today, 1992. **13**(10): p. 379-81.
119. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology*. Int Arch Allergy Immunol, 1992. **98**(4): p. 279-85.
120. van Gisbergen, K.P., et al., *The costimulatory molecule CD27 maintains clonally diverse CD8(+) T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants*. Immunity, 2011. **35**(1): p. 97-108.
121. Fritsch, R.D., et al., *Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6489-97.
122. Catalfamo, M., et al., *CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2106-16.
123. Catalfamo, M., et al., *HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19851-6.
124. 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.
125. Sailaja, G., et al., *Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells*. Virology, 2007. **362**(2): p. 331-41.

126. Herbeuval, J.P., et al., *Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13974-9.
127. Ascher, M.S. and H.W. Sheppard, *A unified hypothesis for three cardinal features of HIV immunology*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1991. **4**(1): p. 97-8.
128. Fonteneau, J.F., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5223-32.
129. Beignon, A.S., et al., *Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3265-75.
130. Bafica, A., et al., *Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7229-34.
131. 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.
132. Borkow, G., C. Teicher, and Z. Bentwich, *Helminth-HIV coinfection: should we deworm?* PLoS Negl Trop Dis, 2007. **1**(3): p. e160.