



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización de linfocitos T CD4+ CD32+ como  
potenciales reservorios de VIH en recién nacidos e  
infantes.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RODRIGO TONALLI CAMACHO PACHECO



Cd. Universitaria, Ciudad de México, 2019



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: Mario Adán Moreno Eutimio**

**VOCAL: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS**

**SECRETARIO: ISMAEL MANCILLA HERRERA**

**1er. SUPLENTE: ROSA CAMACHO SANDOVAL**

**2° SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES**

**ASESOR DEL TEMA: DR. ISMAEL MACILLA HERRERA**

**SUSTENTANTE: RODRIGO TONALLI CAMACHO PACHECO**

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	V
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	VI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	VII
<b>RESUMEN</b>	VIII
<b>ANTECEDENTES</b>	
➤ El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)	1
➤ Ciclo de replicación viral	2
➤ El virus latente	5
➤ Formación de partículas virales	7
➤ Mecanismos de transmisión perinatal	8
➤ Factores maternos que contribuyen en la transmisión vertical	11
➤ La infección por VIH en el contexto perinatal	12
➤ Los niños expuestos no infectados (ENI)	16
➤ Diversidad fenotípica de linfocitos T CD4+	18
➤ Linfocitos T CD4 como reservorios virales	21
➤ CD32a como un marcador de reservorios de VIH	25
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	28
<b>HIPÓTESIS</b>	29
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	30
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
➤ Pacientes y grupos de estudio	31
➤ Clasificación del riesgo de transmisión vertical	33

➤ Procesamiento de las muestras e inmunomarcaje de superficie	34
➤ Algoritmos para la determinación de las poblaciones naive y memoria.	36
➤ Algoritmos para la determinación de las subpoblaciones Th1/Th2/Th17/Treg	36
➤ Análisis Estadístico	37
<b>RESULTADOS</b>	
➤ Estandarización del panel de inmunomarcaje y del algoritmo para el análisis de linfocitos T CD4+ CD32+	38
➤ Los IEV presentan altas frecuencias de Lc T CD4+ CD32+	40
➤ Alta expresión de CD69 en linfocitos T CD4+ CD32+	43
➤ Los linfocitos T CD4+ CD32+ muestran un fenotipo predominantemente “naive”	44
➤ El perfil Th1 y Th2 predomina en las células T CD4+ CD32+ de infantes IEV	45
<b>DISCUSIÓN</b>	46
<b>CONCLUSIONES</b>	50
<b>REFERENCIAS</b>	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

1) Resumen del ciclo de replicación del virus de inmunodeficiencia humana-1.	3
2) Nuevas infecciones globales en menores de 14 años y cobertura de la terapia antiretroviral durante el siglo XXI.	13
3) Riesgo de transmisión vertical de VIH in utero y en la edad temprana.	15
4) La exposición al VIH y la terapia antiretroviral afectan el ambiente gestacional y consecuentemente al sistema inmune del neonato potencialmente llevándolo a un incremento en la morbilidad y mortalidad.	18
5) Rutas de diferenciación y plasticidad de los linfocitos T CD4+	21
6) El curso natural de la infección por VIH-1 se basa en la evolución longitudinal de dos marcadores interrelacionados, la viremia plasmática y el conteo de linfocitos T CD4+	22
7) Seguimiento de la carga viral y esquema de tratamiento antirretroviral en el caso Mississippi.	24
8) CD32a identifica a linfocitos T CD4 reservorios de VIH-1 replicativamente competente e inducible en pacientes con TAR.	27
9) Algoritmo 2 empleado para la identificación de Lc T CD4+ CD32+ CD45RA- con fenotipos Th1, Th2, Th17, Th1/17 o Treg.	37
10) Identificación de LC T CD4+ CD32+.	38
11) El panel de inmunomarcaje 1 para la identificación de Lc T CD4+ CD32+.	39
12) Altas frecuencias de Lc T CD4+ CD32+ en IEV.	41
13) Alta expresión de CD69 en linfocitos T CD4+CD32+.	43
14) El fenotipo naive predomina en células T CD4 CD32+.	44
15) El perfil Th1 y Th2 predomina en las células T CD4+ CD32+ de infantes IEV.	45

## ÍNDICE DE TABLAS

1) Principales vías de infección del VIH y probabilidad estimada de infección.	11
2) Distribución de los casos notificados que continúan como seropositivos a VIH según grupo de edad y categoría de transmisión; México, 1984-2017.	14
3) Características de las poblaciones de estudio.	33
4) Paneles de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para el inmunomarcaje superficial de linfocitos humanos.	35
5) Frecuencias de Lc T CD4+ CD32+ en IEV divididos en grupos de edad y subgrupos de riesgo de trasmisión vertical.	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNPol II	ARN polimerasa II
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
EBS	Enterotoxina B estafilococcica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENI	Expuestos al VIH No Infectados
gp	Glicoproteínas virales
HRP-2	Proteína rica en histidina 2
IEV	Infantes expuestos a VIH
IFN	Interferón
IL	Interleucina
INEV	Infantes no expuestos a VIH
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
Lc T CD4+	Linfocitos T CD4+
LEDGF	Factor de crecimiento derivado del epitelio (por sus siglas en inglés)
LTR	Repetidos largos terminales
NE	No Expuestos
Nef	Factor de regulación negativo (por sus siglas en inglés)
NFAT	Factor nuclear de células activadas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear- $\kappa$ B
Qvoa	Ensayo de expansión viral cuantitativa (por sus siglas en inglés)
Rev	Proteína reguladora de la expresión de virones
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SP1	Proteína de especificidad 1 (por sus siglas en inglés)
Tat	Proteína transactivadora
UIMC	Unidades infecciosas por millón de células
Vif	Factor de infectividad viral (por sus siglas en inglés)
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
Vpr	Proteína viral R (por sus siglas en inglés)
Vpu	Proteína viral U (por sus siglas en inglés)
YY1	Factores Ying y Yang



## RESUMEN

Después de 30 años desde la identificación del VIH la infección no ha sido posible de erradicar debido a la presencia de reservorios virales no detectables y resistentes a los tratamientos farmacológicos. La transmisión vertical, gracias a los tratamientos, se ha logrado llevar las tasas de transmisión a menos del 1% de los casos. Sin embargo, en los casos exitosos, a pesar de ser considerados no infectados, los infantes expuestos a VIH+ , a través de sus madres, experimentan mayores tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas durante los primeros meses de vida comparados con infantes no expuestos. También, se han descrito alteraciones inmunológicas como altas frecuencias de linfocitos T CD4+ con fenotipos “activados” y con pocos marcadores de memoria inmune. Dichas alteraciones son muy similares a las observadas en infantes que sí se encuentran infectados por VIH. Recientemente se ha descrito que uno de los reservorios en sangre periférica de adultos VIH+ bajo terapia antiretroviral son linfocitos T CD4+ con alta expresión de CD32, alcanzando hasta el 5% de células dentro los linfocitos T CD4+. Sin embargo, se desconoce si estas células se encuentran presentes en circulación de infantes que tuvieron riesgo por transmisión vertical, así como su perfil de diferenciación, estado memoria y de activación. Por lo que este trabajo se enfocó en cuantificar el número de linfocitos T CD4+CD32+ en infantes expuestos a VIH, y se profundizar en el fenotipo de estas células. Para ello se obtuvieron células de sangre periférica de infantes de madres VIH+ y de controles sin exposición al virus, las cuales fueron inmunomarcadas con anticuerpos monoclonales fluorocromados (anti-CD45, -CD3, -CD4 y -CD32, -CD69, -CD45RA, -CD45RO, -CXCR3, -CCR4, -CCR6), contadas y analizadas por citometría de flujo. De un total de 62 muestras de infantes, encontramos que la frecuencia de Lc T CD4+ CD32+, es mayor en infantes expuestos respecto a los controles (8.1+/-4.3, infantes vs 5.8+/-2.5% P<0.0087). Aunque al evaluar los factores de riesgo de transmisión vertical y comparar por grupos de riesgo, la frecuencia de los Lc T CD4+ CD32+ no mostró diferencias significativas. También, observamos que en las células T CD4+CD32+

de esta población predomina el fenotipo naive (CD45RA+), y en las de fenotipo de memoria (CD45RO+) los perfiles Th1 (CXCR3+CCR4-CCR6-), Th2 (CXCR3-CCR4+CCR6-) y Treg (CD4<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup>). Además, el marcador activación CD69 es fuertemente expresado en los linfocitos T CD4+CD32+, respecto a las células CD4+CD32- (177+/-86 vs 80+/-20 IMF P<0.001). Nuestros resultados muestran números elevados de linfocitos T CD4+ CD32+, con fenotipo naive y alta expresión de CD69, en sangre periférica de infantes de madres VIH+, sin embargo, estudios futuros deben de establecerse para determinar si estas células podrían ser reservorios del VIH.

# ANTECEDENTES

## El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

La infección por el VIH-1 y el conjunto de manifestaciones clínicas que lo caracteriza, son uno de los grandes retos clínicos de los tiempos modernos y una de las mayores pandemias del último siglo. Aunque el virus fue aislado por primera vez en 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983), 30 años después solo se ha logrado reducir el impacto del síndrome, llevándolo de una enfermedad mortal a un padecimiento crónico. En este sentido, aún no ha sido posible erradicar completamente al virus debido a la presencia de reservorios virales no detectados y que son resistentes a los tratamientos farmacológicos (Barton, Burch, Soriano-Sarabia, & Margolis, 2013).

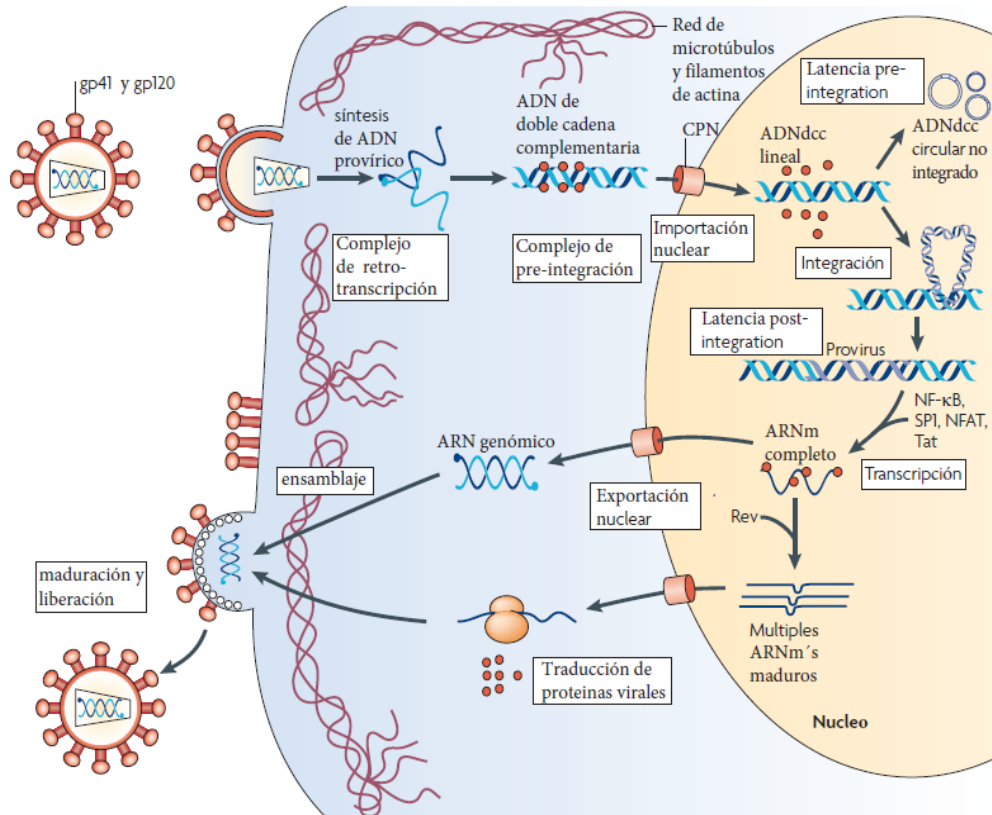
El VIH está clasificado como un retrovirus, del género *lentivirinae* envuelto de doble cadena de ácido ribonucleico (ARN) perteneciente al género de los lentivirus, y su forma madura está conformado por la envoltura de bicapa lipídica obtenida de la célula, junto con las glicoproteínas virales (gp120 y gp41), proteínas estructurales (p6, de nucleocápside, de cápside y de matriz), proteínas con función homóloga (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa), proteínas accesorias [proteína viral R (por sus siglas en inglés Vpr, factor de infectividad viral (por sus siglas en inglés Vif), factor de regulación negativo (por sus siglas en inglés Nef) y la doble cadena de material genético basado en ARN. Esta última además de contener la codificación para todas las proteínas anteriormente mencionadas, contiene las secuencias de las proteínas reguladoras: proteína transactivadora (Tat), proteína reguladora de la expresión de virones (Rev), proteína viral U (por sus siglas en inglés Vpu) (Freed, 2015) (Kirchhoff, 2021)

Aunque, la mayoría de virus del género *lentivirinae* infectan macrófagos, el VIH muestra tropismo por linfocitos T CD4+ (Lc T CD4+) donde llevan a cabo la gran mayoría de su ciclo de replicación y, conforme la infección avanza, provoca un descenso progresivo en el número estas células, pudiendo llegar al estado de inmunodeficiencia y generando el denominado Síndrome de Inmunodeficiencia

Adquirida (SIDA) (Stevenson, 2003). Estos último ocurre porque los Lc T CD4+ juegan un papel muy importante en la inmunidad de los individuos al mediar la activación del sistema inmunológico, en respuesta a antígenos específicos, por su capacidad de modificar al microambiente a través de la producción de citocinas específicas o a la activación de receptores por contacto célula-célula (Luckheeram, Zhou, Verma, & Xia, 2012)

### Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación del virus se lleva a cabo en dos etapas: la primera comprende la entrada del virus a la célula hospedera hasta la integración de su material genético al ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico, y la segunda la transcripción del ARN viral hasta la liberación del virus circulación sanguínea periférica y su posterior maduración y transmisión (Figura 1) (Coiras et al., 2009).



**Figura 1.- Resumen del ciclo de replicación del virus de inmunodeficiencia humana-1.** Se muestra la entrada del virus por fusión de membranas, el proceso de retrotranscripción; la movilización del ADN al núcleo y su integración al DNA genómico. También se representa la síntesis de las nuevas proteínas virales y por splicing alternativo el nuevo ARN viral, para finalmente ensamblar al virión y permitir su maduración.

Modificado de: (Coiras, Lopez-Huertas, Perez-Olmeda, & Alcami, 2009)

Durante la primera etapa, el reconocimiento de las células hospederas está mediado por las interacciones sucesivas de los receptores CD4, CCR5 y CXCR4 con la proteína viral gp120 y gp41 (Rizzuto et al., 1998; Wu et al., 1996). La interacción de gp120 con el CD4 y CCR5 o CXCR4 induce cambios conformacionales en estos últimos que permiten la interacción con gp41. Con este múltiple anclaje, la región hidrofóbica de gp120 se puede fusionar con la membrana celular, permitiendo el primer contacto directo con la célula. Posteriormente, un complejo trimétrico de gp41 forma un haz helicoidal que retrae

la membrana viral y celular permitiendo su fusión y la internalización de la cápside vírica al citoplasma (Kirchhoff, 2021). Una vez dentro de la célula, la cápside se apoya de las proteínas endógenas ciclofilina A para prevenir su desensamblaje prematuro, y de la transportina 3 para dirigirse a una zona cercana a un poro nuclear, donde las proteínas del poro nuclear 153 y 358 facilitan el desensamblaje de la cápside. Es en este punto donde la retrotranscriptasa vírica utiliza los dinucleótidostrifosfato de la célula hospedera para sintetizar una doble hebra de ADN con el ARN viral como molde (Ambrose & Aiken, 2014).

Una vez completada la retrotranscripción el complejo de la transcriptasa reversa se desensambla progresivamente para formar el complejo de pre-integración (CIP), compuesto por el ADN de doble cadena lineal, la integrasa viral, proteínas de matriz, la retrotranscriptasa, la Vpr y algunas proteínas de la célula hospedera, como el factor de crecimiento derivado del epitelio (por sus siglas en inglés LEDGF) o la proteína B1 del grupo de alta movilidad (Arhel et al., 2007; Farnet & Bushman, 1997; Piller, Caly, & Jans, 2003), quienes facilitan el transporte del complejo a través de los microtúbulos y los poros nucleares (McDonald et al., 2002). Cuando el material genético ha sido introducido al núcleo celular, puede mantenerse como material extracromosómico en forma circular o integrarse al ADN cromosómico. El proceso de integración ocurre gracias a la acción conjunta de todo el CIP, primero la integrasa corta dos nucleótidos en los extremos 3' del ADN viral. Los extremos 3' resultantes son unidos covalentemente a la secuencia diana a una distancia de 5 nucleótidos entre cada extremo. La integrasa corta el otro extremo de la cadena diana, y las dos bases desapareadas de la cadena viral. Finalmente enzimas celulares reparan y ligan los nucleótidos faltante (Craigie & Bushman, 2012). Factores intrínsecos del hospedero, como la emerina o LEDGF, son clave para reconocer y facilitar la integración en los sitios específicos (Jacque & Stevenson, 2006; Llano et al., 2006).

Una vez completada la integración de esta forma denominada provirus, junto con sus extremos repetidos largos terminales (LTR, por sus siglas en inglés), el ADN viral se conduce por la maquinaria de replicación y duplicación de la célula

hospedera. A partir de este punto inicia la etapa de latencia; que es el periodo en el que el ahora provirus puede permanecer silenciado transcripcionalmente e inerte para todo el sistema inmunológico hasta su reactivación dependiente de diversos factores que involucran al estado de salud del hospedero (Dahabieh, Battivelli, & Verdin, 2015).

### El virus latente

Diversos factores están involucrados en el tiempo de latencia. Estos incluyen desde la forma en que se integra el virus y la región cromosómica que ocupa hasta mecanismos de índole epigenética o incluso el control post-transcripcional por ARNs de interferencia (Coiras et al., 2009). También se ha reconocido que la integración de la secuencia vírica al ADN genómico debe ser direccionada en cierta medida hacia los sitios de inserción. Un ejemplo claro son el factor LEDGF y la proteína rica en histidina 2 (por sus siglas en inglés HRP-2) que dirigen el complejo de pre-integración hacia intrones de genes transcripcionalmente activos facilitando su integración en estos sitios (Ciuffi et al., 2005; Schrijvers et al., 2012). Interesantemente, la latencia depende en gran medida de que los genes en los que se integró el ADN viral no se transcriban. Por lo que se ha propuesto, con base modelos de latencia de VIH-1 en células Jurkat, que una fracción de eventos de integración ocurren de manera aleatoria en regiones donde la cromatina se encuentra reprimida, promoviendo la latencia del virus por tiempos prolongados (Jordan, Defechereux, & Verdin, 2001). Además, se ha demostrado que otro factor de suma importancia es la situación topológica del núcleo al momento de la integración y que en lugar de ser eventos aleatorios regulados negativamente por factores como LEDGF, son favorecidos por la cercanía de la cromatina al poro nuclear (Marini et al., 2015).

Otro mecanismo de latencia es la ausencia o disminución de factores necesarios para la transcripción de la secuencia vírica tales como el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Nabel & Baltimore, 1987), el factor nuclear de células activadas (NFAT)

(Corthesy & Kao, 1994), o la proteína de especificidad 1 (SP1), (Jones, Kadonaga, Luciw, & Tjian, 1986). Debido a que dichos factores son producidos cuando las células hospederas inician estados de activación celular; se ha propuesto que la latencia del VIH se establece cuando una célula infectada pasa a un estado de inactividad celular frente a un estímulo, o también denominado “quiescencia”. (Weinberger, Burnett, Toettcher, Arkin, & Schaffer, 2005).

Sumado a lo anterior diversos factores promueven este estado de quiescencia. Tal es el caso de FOXO3a, un factor que participa en la regulación del ciclo celular, la diferenciación, apoptosis y metabolismo de las células T quiescentes. Diversos trabajos han mostrado que la forma fosforilada (inactiva) de FOXO3a se encuentra en altas cantidades en células T de memoria central (linfocitos que han alcanzado un alto grado de maduración y han disminuido su metabolismo al mínimo) durante la infección por VIH lo que promueve su supervivencia mediante la represión de genes proapoptóticos (Van Der Heide, Hoekman, & Smidt, 2004).

En cuanto a la regulación epigenética que ocurre durante el periodo de latencia, tal como ocurre con el resto de los genes, las modificaciones a las histonas modulan la expresión del material genético; de este modo dirigir una hipoacetilación hacia las histonas en las que se compacta un gen particular reprime su expresión. Ejemplo de ello son los factores Ying y Yang (YY1) (Gordon, Akopyan, Garban, & Bonavida, 2006) y el factor tardío SV40 (Ylisastigui et al., 2004) quienes reprimen la expresión del provirus por el reclutamiento de la desacetilasa de histonas HDAC1, hacia el complejo represor situado entre los nucleótidos -10 y +27 del LTR. En contraste, factores como la proteína viral Tat y varias citocinas inhiben la interacción de HDAC1 con el complejo represor induciendo un rearrreglo del nucleosoma 1 lo que permite la transcripción del 5´LTR (Lenasi, Contreras, & Peterlin, 2008). Sin embargo, se ha observado que la inhibición de las desacetilasas no es suficiente para la transcripción del provirus, y es necesaria la presencia factores transcripcionales como NF- $\kappa$ B, NFAT y la SP1 (Jiang, Espeseth, Hazuda, & Margolis, 2007).



## Formación de partículas virales

Los factores NF- $\kappa$ B, NFAT y la SP1 son elementos promotores de activación celular que, además de formar parte de CIP, transmiten señales de activación que promueven la transcripción del provirus. En un primer paso los factores mencionados promueven la unión de la ARN polimerasa II (ARNPol II) a la caja TATA para iniciar la transcripción del ARN mensajero. Seguidamente un asa de 59 nucleótidos, denominada elemento responsivo transactivacional, se forma en el extremo 5' creando un sitio de unión para el factor TAT (Dingwall et al., 1990). Esta interacción promueve la elongación eficiente del transcrito, reclutando factores como el factor de elongación de la transcripción positivo y la ciclina dependiente de cinasas 9 que incrementan la capacidad funcional de la ARNPol II. El producto, una vez completado, pasa por un proceso de splicing y modificaciones post transcripcionales para poder ser exportado del núcleo. Los fragmentos maduros codifican la síntesis de las proteínas regulatorias Rev, Tat y Nef provenientes del virus (Garber, Wei, & Jones, 1998; Zhou et al., 2000).

Una vez generadas las proteínas víricas, Rev se une al ARN viral favoreciendo el corte y empalme o "splicing" alternativo para formar nuevos productos completos (Pollard & Malim, 1998). En conjunto, estos componentes son exportados al citoplasma donde son utilizados como moldes para sintetizar dos precursores de la proteína Gag, uno de 55 kDa que contiene los péptidos que formarán la partícula viral (dominios de matriz, de la cápside y la nucleocápside y el dominio p6) y otro de 160 kDa que contiene el resto de las enzimas virales (la proteasa, la transcriptasa reversa y la integrasa) llamado poliproteína Gag (Freed, 2015). Simultáneamente, copias de ARN con intrones que no son empleadas para traducción, también son movilizadas hacia la membrana debido a la proteína Rev (Zapp & Green, 1989). Una vez en membrana, la proteína Rev se dimeriza para dar la señal de inicio de ensamblaje de un nuevo virión (Nikolaitchik et al., 2013). Esta señal es reconocida por el dominio de la nucleocápside de la proteína Gag desencadenando la multimerización del dominio de la cápside que se alinea junto con otras proteínas Gag radialmente; a la vez que el dominio de matriz se une a la

membrana celular que ahora formará la envoltura viral (Briggs et al., 2009). Para completar la envoltura viral, se debe incorporar el complejo glicoprotéico Env y co-señalar con Gag hacia un sitio común en la membrana plasmática (como una balsa lipídica) o bien, por reclutamiento tanto directo como indirecto entre las proteínas (Checkley, Luttge, & Freed, 2011).

Finalmente ocurre la liberación de la partícula a la circulación. Esta última etapa inicia con la escisión del dominio p6 de Gag, deteniendo la acumulación de más proteínas que se unan al complejo anclado en la membrana (Gottlinger, Dorfman, Sodroski, & Haseltine, 1991). Está demostrado que el último paso para la liberación está mediado por la maquinaria de complejos de clasificación endosómicos requeridos para el transporte de la propia célula; la cual es reclutada también por la misma proteína Gag, sin embargo, el mecanismo no ha sido totalmente elucidado (Morita et al., 2011; Sette, Nagashima, Piper, & Bouamr, 2013).

Para que la partícula viral sea infecciosa requiere de un proceso de maduración que consiste en el cambio conformacional de la agrupación radial de las proteínas Gag, mediado por la actividad proteolítica del precursor GagPol, para formar el núcleo cónico de la cápside. Este proceso también libera a la transcriptasa reversa y la integrasa, de GagPol para tener la capacidad de infectar una nueva célula (Frank et al., 2015).

### **Mecanismos de transmisión perinatal**

Como la mayoría de los virus envueltos, el VIH tiene poca a nula capacidad de perdurar viable en contacto con el medio ambiente. Es por ello que todas las vías de transmisión requieren el contacto de mucosas o inoculación percutánea (Miller et al., 1989; Restrepo et al., 2011). Dichas vías se pueden clasificar de acuerdo al sitio de invasión, ya sea tracto genital, intestinal o placenta, y su localización anatómica, además es sumamente importante el medio de transmisión por el que se moviliza el virus. Como se resume en la tabla 1 todos los factores implicados en

cada una de las vías tienen diferentes riesgos de contagio, siendo que las vías de transmisión vertical, incluyendo intrauterina, intraparto o postparto, tienen mayor riesgo de transmisión al neonato, en comparación a las otras vías de contagio (Shaw & Hunter, 2012).

De la misma manera que los adultos, para que la infección sea transmitida a un recién nacido o infante requiere el contacto de mucosas con partículas infectivas, ej. Tracto gastrointestinal o nasofaríngeo como un medio en el que pueda viajar el virus, ya sea libre o dentro de un reservorio. Medios con estas características son todos los fluidos maternos durante la gestación, el canal vaginal y la leche materna. Aunque las barreras epiteliales de las mucosas deberían evitar la entrada del virus, se han mostrado varias formas en que se puede producir la infección. Por ejemplo, se ha reportado un número importante de linfocitos T CD4+CCR5+, susceptibles de ser infectados, en el epitelio intestinal de fetos e infantes. Lo que proporciona una excelente vía de contagio si entra en contacto con fluidos que puedan acarrear el virus (Bunders et al., 2012). También se ha propuesto que la vía puede ser a través de transcitosis, este mecanismo permitiría el transporte del virus mediante vesículas desde el lumen intestinal a través de las células de epitelio hasta la cara basolateral del recién nacido, donde se encuentra una alta cantidad de células susceptibles a la infección (Alfsen, Yu, Magerus-Chatinet, Schmitt, & Bomsel, 2005). Además, estudios *in vitro* en tejidos orales e intestinales de fetos han mostrado que tanto virus libres, así como en reservorios, pueden cruzar estas barreras y permanecer altamente infecciosos (Tugizov et al., 2011, 2012).

A pesar de que *in utero* es la vía menos probable de transmisión vertical, existen diversos casos reportados, siendo que condiciones como altas cargas virales y bajos conteos maternos son factores que favorecen este desenlace (Barral et al., 2014). Si bien los trofoblastos no pueden ser infectados productivamente por el VIH en su forma libre, si pueden hacerlo a través de la transcitosis de células reservorio (Dolcini, Derrien, Chaouat, Barre-Sinoussi, & Menu, 2003; Lagaye et al., 2001).

Por otra parte, durante el nacimiento, el recién nacido se expone al canal vaginal, donde la frecuencia de transmisión se ha estimado ocurren de un tercio a la mitad de todos los contagios de VIH a neonatos. Se cree que el primer momento de riesgo en esta etapa, es durante las primeras contracciones de la labor de parto debido a que pueden generar microtransfusiones de sangre materna al feto, proveyendo del medio necesario para la transición del virus (Kaneda, Shiraki, Hirano, & Nagata, 1997). Más adelante, durante el parto, el neonato está expuesto a ingerir fluidos cervicales o vaginales con altas cargas virales. Prueba de ello es que el virus ha sido aislado de aspirados gástricos u orofaríngeos de recién nacidos por vía vaginal (Mandelbrot et al., 1999). De hecho, se ha observado que en el caso de gemelos, el primero tiene mayor probabilidad de infección que el segundo por pasar más tiempo en el canal vaginal y estar en contacto con dichos fluidos (Duliege, Amos, Felton, Biggar, & Goedert, 1995; Goedert, Duliege, Amos, Felton, & Biggar, 1991).

El amamantamiento también ha contribuido con gran cantidad de contagios de VIH; algunas estimaciones llegan hasta el 40% de infecciones infantiles en el mundo (Tabla 1). Existen múltiples reportes de la detección de VIH en leche materna tanto en su forma libre como en reservorios normalmente correspondiendo los niveles de ARN viral en leche con los del plasma (Lewis et al., 1998; Thiry et al., 1985). También el ADN del virus se ha detectado en los linfocitos T CD4+ y macrófagos presentes en la leche de madres infectadas (Van de Perre et al., 2012), y al menos existen 2 reportes de cultivos exitosos de VIH a partir de muestras de leche materna, demostrando así su viabilidad (Gray, Fiscus, & Shugars, 2007).

**Tabla 1.- Principales vías de infección del VIH y probabilidad estimada de infección.**

Sitio de invasión	Localización anatómica	Tipo de epitelio	Medio de transmisión	Probabilidad de transmisión por evento de exposición por año	Contribución mundial estimada
Tracto genital femenino	Vagina	Escamoso no queratinizado	Semen; sangre	1 en 200; 1 en 2000	12.6 millones
	Ectocervix	Escamoso no queratinizado			
	Endocervix	Columnar monocapa			
Tracto genital masculino	Prepucio interno	Escamoso poco queratinizado	Secreciones cervicovaginales y rectales; sangre	1 en 700; 1 en 3000	10.2 millones
	Uretra	Columnar estratificado			
Tracto Intestinal	Recto	Columnar, monocapa	Semen; sangre	1 en 20; 1 en 300	3.9 millones
	Tracto gastrointestinal superior	Varios	Semen; sangre	1 en 2500	1.5 millones
			Sangre materna; secreciones genitales (intraparto)	1 en 5; 1 en 10	960,000
			Leche materna (postparto)	1 en 5; 1 en 10	960,000
Placenta	Vellosidades coriónicas	Dos capas (cito- y sincitio-trofoblástico)	Sangre materna (Intrauterina)	1 en 10; 1 en 20	480,000
Torrente sanguíneo			Productos sanguíneos; objetos punzantes	95 en 100; 1 en 150	2.6 millones

\*Traducido de (Shaw & Hunter, 2012)

### **Factores maternos que contribuyen en la transmisión vertical**

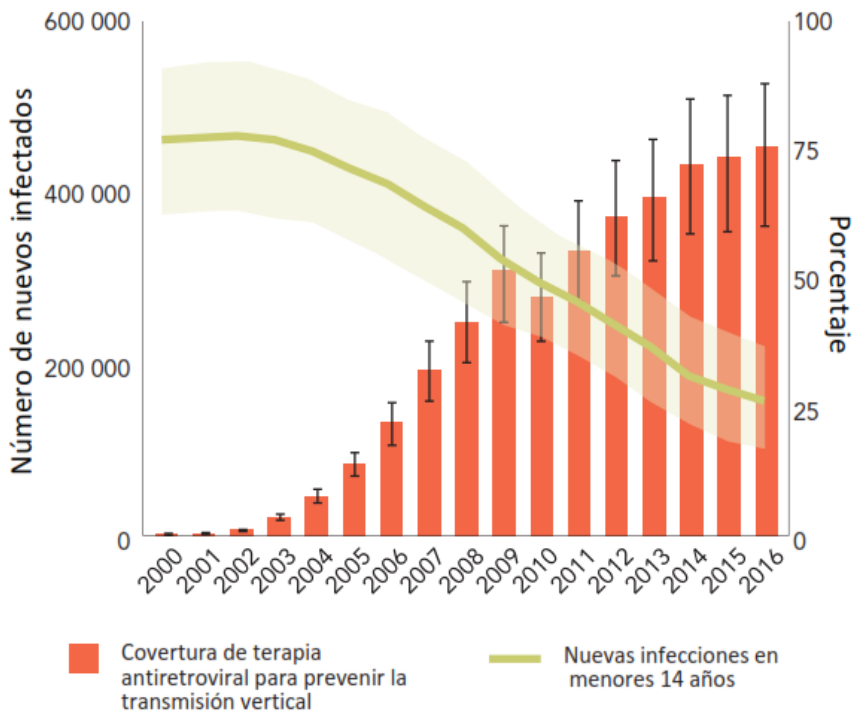
Existen también una serie de factores asociados a la transmisión vertical propios del estado de salud de la madre como el neonato. Eventos como infecciones concomitantes o el grado de infección por VIH pueden aumentar las probabilidades de transmitir el virus al recién nacido (Barral et al., 2014).

Los factores maternos más importantes en el riesgo de infección son aquellos que se refieren al grado de la infección en la madre, relacionados a la carga viral y el conteo de linfocitos T CD4+ en circulación periférica. De esta manera, un estudio de cohorte brasileño demostró que cargas virales de más de 1000 copias del virus por mililitro de sangre y/o un conteo de menos de 350 Lc T CD4+ por microlitro de sangre periférica están directamente asociados con mayor probabilidad de transmitir el virus. Otro factor importante es la falta de apego al tratamiento antirretroviral, es algo influye en la probabilidad de transmisión vertical. Interesantemente no encuentran asociación entre la vía de nacimiento, cesárea o parto natural, o el género del recién nacido y la incidencia de trasmisión vertical. (Rosa et al., 2015). Otro estudio, también confirma la influencia de la carga viral y conteo de Lc T CD4+, con resultados muy similares, y la continuidad de la terapia antirretroviral. En este apartado también observan que, no solo influye la continuidad de la terapia, sino también el momento del inicio del tratamiento antirretroviral durante el embarazo; siendo que, si este no fuese administrado desde antes a 9 semanas al parto, puede incrementar el riesgo significativamente. De la misma manera, este reporte muestra influencia en la vía de nacimiento, pero sí en el número de partos que la madre haya tenido previamente, siendo que más de 3 partos favorece la transmisión vertical (Barral et al., 2014).

### **La infección por VIH en el contexto perinatal**

Evitar de trasmisión vertical ha sido una de las grandes prioridades en la lucha contra el VIH. A nivel mundial se estima que más de 2 millones de niños viven con VIH, de los cuales 160 000 son casos nuevos, reporta la comisión de la Organización de las Naciones Unidas para la lucha contra el SIDA (UNAIDS) en su último corte (2017). En este reporte, se muestra también, el gran avance que ha habido, durante el último siglo, en expandir la cobertura de terapias antirretrovirales para prevenir la transmisión vertical y como consecuentemente se ha observado una importante disminución en la incidencia de nuevos casos en niños (Figura 2). Sin embargo la mayoría de las infecciones pediátricas ocurren en

países con recursos limitados, particularmente en el África sub-sahariana (>90%) donde no hay acceso a la terapia antiretroviral (Luzuriaga & Mofenson, 2016).



**Figura 2.- Nuevas infecciones globales en menores de 14 años y cobertura de la terapia antiretroviral durante el siglo XXI.**

Traducido de: (UNAIDS, 2017)

En México, el registro del Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH (CENSIDA) reporta un total de 1140 casos de seroconversión en menores de 14 años desde su inicio de labores en 1984 hasta su último corte el año pasado, incluyendo los 55 nuevos casos 2017. De ellos se determinó que 1041 casos fueron infectados por transmisión vertical, representando el 91.3 % del total de casos reportados. Esto lo convierte en la vía primaria de transmisión del virus en menores de 14 años, de hecho, para los casos de menores de 9 años es prácticamente la única vía de transmisión reportada con un 98.7 % de los casos (Tabla 2).

**Tabla 2.- Distribución de los casos notificados que continúan como seropositivos a VIH según grupo de edad y categoría de transmisión; México, 1984-2017**

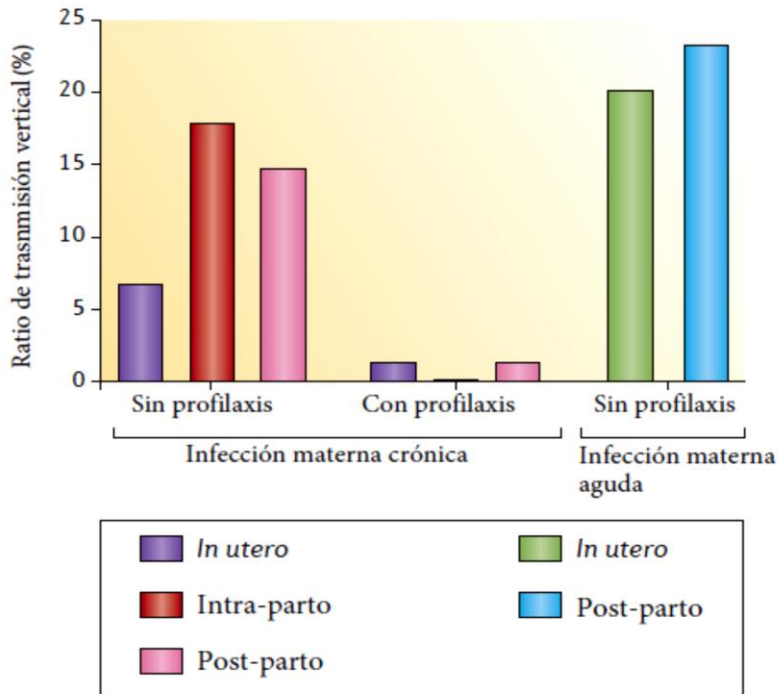
Grupo de Edad	Categoría de Transmisión										Total	
	Sexual		Sanguínea**		UDI		Perinatal		No especificado			
	Acumulados	2017	Acumulados	2017	Acumulados	2017	Acumulados	2017	Acumulados	2017	Acumulados	2017
< de 1	0	0	0	0	0	0	186	7	0	0	186	7
1 - 4	0	0	0	0	0	0	542	24	4	0	546	24
5 - 9	0	0	2	0	0	0	263	6	7	0	272	6
10 - 14	71	12	4	1	0	0	50	3	11	2	136	18
15 - 19	3,969	524	5	0	50	6	0	0	69	5	4,093	535
20 - 24	14,717	1,861	0	0	127	10	0	0	290	5	15,134	1,876
25 - 29	15,953	2,024	1	0	141	4	0	0	342	10	16,437	2,038
30 - 34	12,196	1,302	1	0	156	9	0	0	325	11	12,678	1,322
35 - 39	8,701	821	2	0	120	5	0	0	210	6	9,033	832
40 - 44	6,000	554	3	0	60	2	0	0	138	2	6,201	558
45 - 49	3,866	390	3	0	45	4	0	0	112	2	4,026	396
50 - 54	2,368	233	0	0	21	1	0	0	62	6	2,451	240
55 - 59	1,281	130	0	0	8	0	0	0	30	1	1,319	131
60 - 64	697	74	0	0	1	0	0	0	18	1	716	75
65 y +	596	55	0	0	1	0	0	0	25	1	622	56
Ignorado	60	0	0	0	2	0	4	0	159	0	225	0
<b>Total</b>	<b>70,475</b>	<b>7,980</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>732</b>	<b>41</b>	<b>1,045</b>	<b>40</b>	<b>1,802</b>	<b>52</b>	<b>74,075</b>	<b>8,114</b>

(CENSA, 2018)

Como se mencionó, entre los grandes avances en la lucha contra el VIH, está el desarrollo de los protocolos con terapia antirretroviral (TAR), tanto para el tratamiento de la infección una vez establecida, como práctica profiláctica para evitar la transmisión del virus a un nuevo hospedero. Desde su descubrimiento en 1986, el fármaco de elección ha sido la ziduvina, un análogo de timidina que detiene el ciclo de replicación viral en la etapa de retrotranscripción (Yarchoan et al., 1986). A la fecha se emplean combinaciones de al menos 3 fármacos sinérgicos, incluyendo indinavir (inhibidor enzimático de la proteasa) y lamivudina (análogo de citidina inhibidor de la transcriptasa reversa) (Gulick et al., 1997; Hammer et al., 1997).

Goulder y colaboradores, demuestran que la sola administración de la terapia antiretroviral disminuye el riesgo de transmisión de un 7% *in-utero*, 18% *intra-parto*, o 15% *post-parto* a 1-2% en todas las vías (Figura 3) (Goulder et al., 2016).





**Figura 3.- Riesgo de transmisión vertical de VIH *in utero* y en la edad temprana.** Se muestra que el riesgo de transmisión vertical disminuye de 7% (*in utero*), 18% (*intra parto*) y 15% (*post parto*) a 1-2% en todas las vías al administrar TAR profiláctica.

Traducido de: (Goulder, Lewin, & Leitman, 2016)

Si bien, la implementación de mejores prácticas perinatales en las mujeres embarazadas con VIH se han ampliado alrededor del mundo para evitar la transmisión vertical, el número de infantes que estuvieron expuestos al virus *in utero*, pero que no fueron infectados (ENI, expuestos al VIH No Infectados) ha incrementado significativamente (Evans, Jones, & Prendergast, 2016). Sin embargo, y a pesar de que los infantes ENI, no presentan cargas virales, incluso ni en la adolescencia, presentan mayores índices de mortalidad y morbilidad relacionados con enfermedades principalmente de carácter infeccioso comparados con infantes no expuestos (NE). Es por ello que la población de infantes ENI son reconocidos como un grupo de necesidades de salud especiales que requieren atención para su mejor cuidado.

## Los niños expuestos no infectados

A partir de la implementación de los programas de prevención de la transmisión vertical y la terapia antiretroviral profiláctica, se ha disminuido la transmisión vertical a neonatos con exposición al VIH desde sus madres. Sin embargo, este grupo de niños presenta diferencias importantes con aquellos que no han tenido exposición al virus, como se resume en la figura 4, al grado de aumentar su tasa de mortalidad a los dos años de vida en comparación con los neonatos no expuestos (9.2% vs 2.9%) (Marinda et al., 2007). Koyanagi y colaboradores describen que también los infantes ENI acuden sensiblemente con mayor frecuencia a clínicas u hospitales que los infantes NE, correspondiendo inversamente con el conteo de CD4's de sus madres (Koyanagi et al., 2011). Otro estudio de caso en el sureste de África, también observa que los ENI tienen significativamente más posibilidades de ser internados en un hospital durante su primer año de vida que su contraparte NE (Slogrove, Cotton, & Esser, 2010).

Se ha asociado el aumento en la mortalidad de este grupo de infantes, principalmente a infecciones del tracto respiratorio inferior de etiología variada (Liu et al., 2012). Interesantemente, los agentes infecciosos son parecidos a los encontrados en niños que si fueron infectados (ej. *Pneumocystis jirovecii* y citomegalovirus) (McNally et al., 2007); y en algunas ocasiones las infecciones se acompañaban de características similares a la inmunodeficiencia (Slogrove, Cotton, & Esser, 2010). Estas observaciones sugieren que el incremento en los índices de morbilidad/mortalidad por infecciones en los infantes ENI, está potencialmente mediado por un sistema inmunitario afectado.

Estas observaciones epidemiológicas han sido relacionadas a alteraciones fisiológicas. Así por ejemplo, el tamaño del timo es menor, respecto a infantes controles, lo que pudiera sugerir que la actividad de maduración de progenitores linfoides de células T pudiera verse afectado (Kolte et al., 2011). Las diferencias de los infantes ENI son tales que se ha encontrado alteraciones tanto en las células del sistema inmunológico, ej. conteos de células de Lc T CD4+ y CD8+, como plaquetas, e incluso la hemoglobina, se encuentran disminuida en

comparación con infantes no expuestos (Le Chenadec, Mayaux, Guihenneuc-Jouyau, Blanche, & Enquete Perinatale Francaise Study, 2003). También se han encontrado otras diferencias importantes en el fenotipo leucocitos de sangre periférica entre los infantes expuestos y los no expuestos. Una de ellas es que en los infantes ENI se pueden encontrar mayor cantidad de células T con un fenotipos asociados a la memoria inmunológica, es decir que previamente han tenido encuentro antigénico (células CD45RO+), el cual se cree puede deberse a la exposición temprana a los antígenos del virus que se ha propuesto pueden pasar hacia circulación fetal desde la madre infectada (Ono et al., 2008). Otra diferencia de suma importancia es una reducción significativa de los anticuerpos transferidos en el último trimestre del embarazo al neonato, los cuales normalmente dan protección durante varios meses de acuerdo a las experiencias antigénicas de la madre (de Moraes-Pinto et al., 1998). Incluso se ha reportado en infantes ENI alteración en el número de células que expresan receptores de quimiocinas, como aquellas asociadas al perfil Th2 (Bunders et al., 2014). Esto resulta interesante ya que también se ha demostrado que alteraciones de este tipo pueden generar mayor susceptibilidad a la infección por VIH (Monteiro et al., 2011). Estos datos sugieren que la exposición al VIH podría tener un impacto directo en la diferenciación de las células T, apoyando esta idea, se ha observado que la respuesta a la vacuna Bacillus Calmette-Guerin (BCG) en ENI se encuentra limitada por su capacidad de proliferación y tendencias a menor producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  frente a la re-exposición (Miles et al., 2010; Ota et al., 1999).

A nivel funcional se ha observado que los Lc T CD4+ y CD8+ de pacientes ENI, vacunados contra la enterotoxina B estafilococcica (EBS) o la BCG, al ser estimulados, *ex vivo*, específicamente con *Bordetella pertussis* o la EBS, proliferan de manera incrementada pero con hiporespuesta en cuanto a la producción de citocinas como interferón (IFN)- $\gamma$ , IL-2, IL-13 e IL-17 (Kidzeru et al., 2014). Cabe resaltar, que la magnitud y diversidad de este tipo de citocinas está estrechamente relacionada con la diferenciación de células de tipo Th1/Th2/Th17/Treg que se encargan del amplio espectro de mecanismos de defensa/regulación inmunológica de los individuos.

Madre:

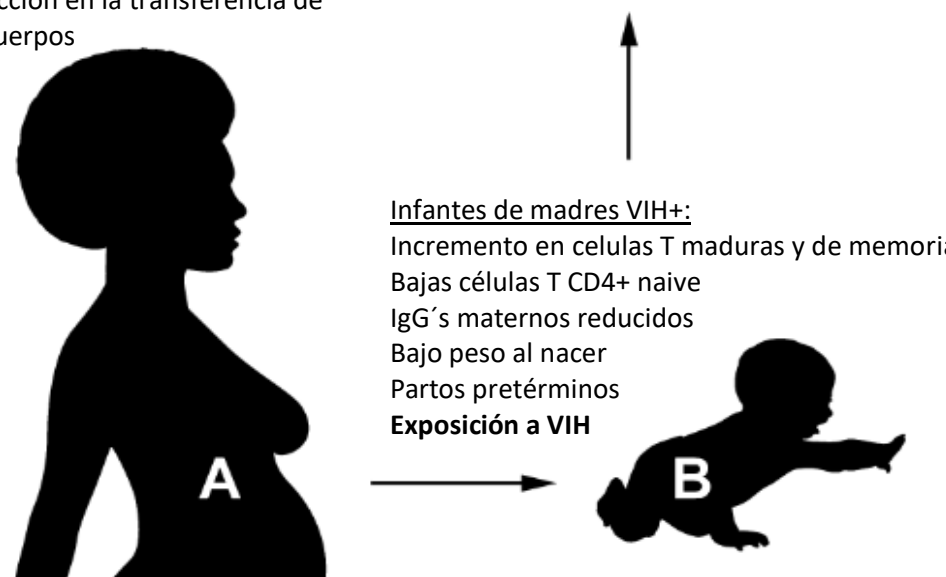
Exposición a TAR  
Deficiencia de nutrientes  
Activación inmune  
Exposición a citocinas clase 1

**Exposición a VIH**

Reducción en la transferencia de anticuerpos

Resultados funcionales:

Incremento en las infecciones bacterianas  
Incremento de la mortalidad  
Poco tiempo de duración de la memoria inmune en respuesta a vacunas.



Infantes de madres VIH+:

Incremento en células T maduras y de memoria  
Bajas células T CD4+ naive  
IgG's maternos reducidos  
Bajo peso al nacer  
Partos pretérminos  
**Exposición a VIH**

**Figura 4.- La exposición al VIH y la terapia antiretroviral afectan el ambiente gestacional y consecuentemente al sistema inmunológico del neonato potencialmente llevándolo a un incremento en la morbilidad y mortalidad.**

Traducido de (Afran et al., 2014)

### **Diversidad fenotípica de linfocitos T CD4+**

En el estudio de los Linfocitos T CD4+ (también llamados cooperadores) se clasifica a las células de acuerdo al tipo de moléculas efectoras, así como en los procesos (salud/enfermedad) en los que participan. La denominación Th1/Th2/Th17 o Treg, entre otras, está definido por el grupo de citocinas que producen, los factores transcripcionales que dirigen su diferenciación y los receptores que quimiocinas que expresan (Sallusto, Mackay, & Lanzavecchia, 2000). Para que una célula que aún no ha tenido experiencias antigénicas (denominado como virgen o naive) se diferencie a un perfil dado, necesita la

estimulación antigénica resultante de la interacción de su TCR con el antígeno mostrado en contexto de las moléculas del complejo antígeno MHC-II por parte de la célula presentadora de antígeno profesional. Esta interacción activa cascadas de señalización que propician la proliferación y diferenciarse en diferentes células efectoras dependiendo del microambiente de citocinas presente, las moléculas de coestimulación, la concentración del antígeno, y el tipo de célula presentadora de antígeno implicada (Rudolph, Stanfield, & Wilson, 2006). Dentro de las moléculas que se ha observado tienen alta expresión en tiempos tempranos posteriores a este primer encuentro antigénico destacan CD69 y CD71, mismos que han servido como moléculas referentes a los estados de activación (Motamedi, Xu, & Elahi, 2016).

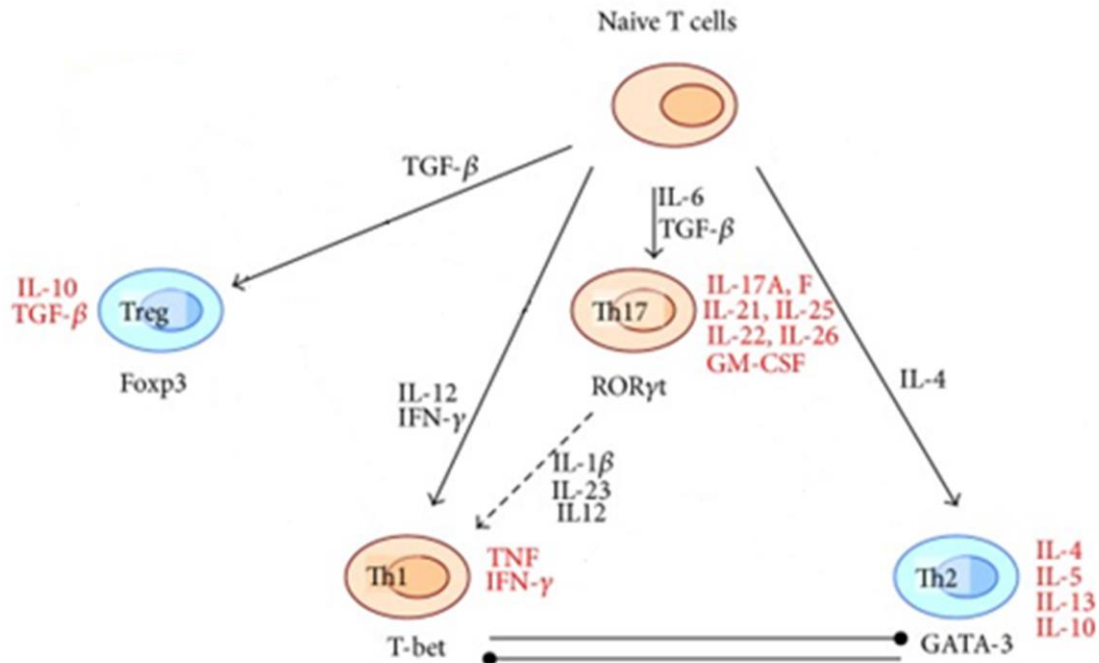
De esta forma, si el Lc T CD4+ naive, se encuentra expuesto a citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$ , el perfil que desarrollará será Th1 (Trinchieri, Pflanz, & Kastelein, 2003). El factor clave para el desarrollo de este perfil es T-bet; el cual permite la producción de IFN- $\gamma$  a su vez que suprime genes relacionados con otros perfiles (Lugo-Villarino, Maldonado-Lopez, Possemato, Penaranda, & Glimcher, 2003). La producción de INF- $\gamma$  junto con la propia IL-12 y la linfotoxina  $\alpha$  está relacionada con la eliminación de patógenos intracelulares, o en el caso patológico de autoinmunidades (Del Prete, 1992). Además el perfil Th1 se caracteriza por expresar los receptores de quimocinas CXCR3, CCR5 y CCR1 (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998; Sallusto, Lenig, Mackay, & Lanzavecchia, 1998).

Ahora bien, si en el ambiente de citocinas predominan IL-2 e IL-4 la célula naive se diferencia a un fenotipo Th2. La IL-4 induce el factor STAT6 que regula a la alta la expresión del factor maestro GATA3, característico de este perfil (Kaplan, Schindler, Smiley, & Grusby, 1996). Este factor permite la producción de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10 e IL-25; las cuales están implicadas en respuesta a parásitos extracelulares como helmintos, o bien en la generación y persistencia del asma (Del Prete, 1992). En la cuestión superficial, la célula diferenciada a Th2 expresa los receptores CCR4, CCR3 y CCR8 (Bonecchi et al., 1998; D'Ambrosio et al., 1998).

Cuando el microambiente en que se desarrolla el LC T CD4+ naive se encuentra cargado de IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ , por sus siglas en inglés) el perfil al que se diferencia es Th17, gracias a la activación del factor maestro ROR $\gamma$ t (Manel, Unutmaz, & Littman, 2008; Volpe et al., 2008). El perfil Th17 se ha reconocido como responsable de montar respuesta contra bacterias y hongos extracelulares; esto gracias a la producción de las características IL-17A e IL-17F, además de IL-21 e IL-22 (Annunziato et al., 2007). El fenotipo superficial de este perfil se caracteriza por presentar los receptores de quimocinas CCR4 y CCR6 (Acosta-Rodriguez et al., 2007).

Ahora, bien sin la orientación proinflamatoria provista por IL-6, IL-21, IL-23, y únicamente bajo el estímulo de TGF- $\beta$  la célula naive se diferenciará un perfil regulador conocido como Treg. Este se caracteriza por la expresión del factor de transcripción FOXP3, además del marcador de superficie CD25, y como su nombre lo indica regula la respuesta inmune del resto de las células con citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  (Chen et al., 2003).

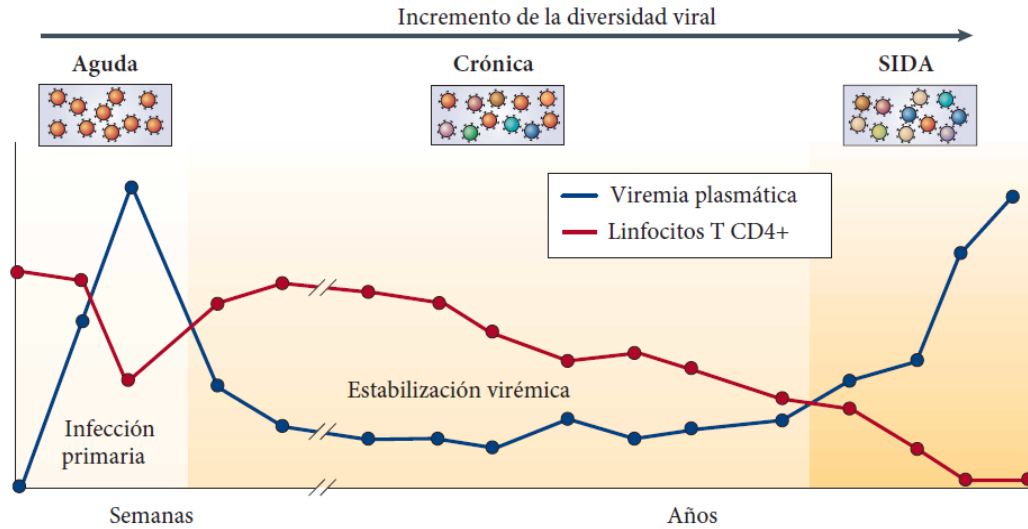
Una particularidad de los linfocitos T CD4+ diferenciados es su capacidad de plasticidad. Es decir, el cambiar sus características fenotípicas y funcionales, adaptándose a al ambiente que requiere el organismo. Esto se observa por ejemplo en los linfocitos Th17, que en presencia de IL-12, pueden adquirir un fenotipo Th1 o bien con IL-4 a Th2. Incluso se ha descrito una subpoblación con fenotipo mixto Th1 y Th17 (nombrado Th1/17) con características propias de ambos perfiles, como expresar simultáneamente CXCR3 y CCR6 o producir IFN- $\gamma$  e IL-17 (Annunziato et al., 2007).



**Figura 5.- Rutas de diferenciación y plasticidad de los linfocitos T CD4+.** Citocinas inductoras en negro, citocinas secretadas en rojo y factores de transcripción en negro debajo de la célula representada. Modificado de: (Ivanova & Orekhov, 2015)

## Linfocitos T CD4 como reservorios virales

Para el seguimiento de la infección y posteriormente del síndrome, se recurre a dos parámetros, la carga viral y el conteo de linfocitos T CD4+. Ya que está bien caracterizado el comportamiento que tienen ambos valores en el curso natural de la enfermedad (Figura 6). Lo que permite predecir el estado del paciente y el momento de aparición del Síndrome de inmunodeficiencia humana, definido como la aparición de infecciones oportunistas o patologías asociadas al VIH por el Centro de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos. El riesgo de presentar el síndrome aumenta significativamente cuando la cuenta de Lc T CD4+ cae por debajo de 200 células/ $\mu$ l. ("From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults," 1993)



**Figura 6.- El curso natural de la infección por VIH-1 se basa en la evolución longitudinal de dos marcadores interrelacionados, la viremia plasmática y el conteo de linfocitos T CD4+.** La fase primaria de la infección se asocia a los síntomas de inmunodeficiencia aguda. A los pocos meses, la viremia plasmática se estabiliza y el nivel de Lc T CD4+ se normaliza. La fase crónica ocurre silenciosamente, aunque el virus continúe replicándose activamente. El SIDA se define cuando ocurren infecciones oportunistas.

Traducido de: (Simon & Ho, 2003)

Por otro lado, como ya se describió, el estado de latencia del VIH está sustentado por linfocitos CD4+ que perduran inactivos por periodos muy prolongados con el provirus replicativamente competente insertado en su material genético. Además, se ha demostrado que es posible aislar dichos reservorios, e incluso inducir su producción de viriones, de prácticamente cualquier paciente con VIH aunque se encuentre bajo terapia antiretroviral (Finzi et al., 1997). De hecho es la principal razón por la cual los individuos que han estado controlados con TAR y las determinaciones de cargas virales se encuentran por debajo de los límites de detección de las pruebas, al suspender el tratamiento, unos pocos meses después muestran altas cargas virales (Chun et al., 1997).

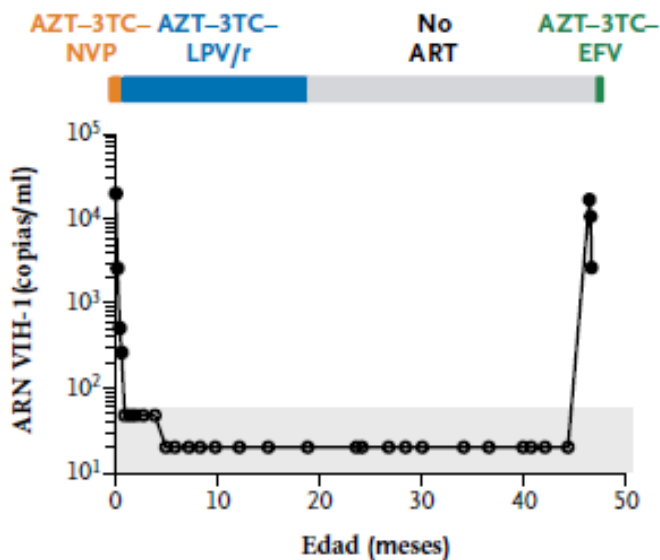


El hecho de iniciar tempranamente la terapia antiretroviral reduce la cantidad de células con la infección latente, tanto en pacientes adultos como pediátricos. Además, se ha demostrado en pacientes adultos, que si la terapia inicia durante la fase crónica de la infección los reservorios persisten una vida media de 44 meses, y si se inicia durante la fase aguda, esta vida media decae de 10 a 100 veces, esto medido en términos de ADN viral o la viabilidad de replicación (Hocqueloux et al., 2013). Sin embargo prácticamente todos los estudios coinciden en que la erradicación total de los reservorios hasta el momento es virtualmente imposible en términos humanos, ya que se requeriría de un periodo de aproximadamente 73 años bajo terapia para lograrlo (Finzi et al., 1999).

En los pacientes pediátricos infectados la historia es muy similar, se ha observado que iniciar la terapia antiretroviral antes de los 3 meses de vida, logra reducir la carga viral y los niveles de ADN viral en células mononucleares de sangre periférica después de uno a cuatro años de tratamiento, sin lograr eliminar por completo los reservorios (Persaud et al., 2012).

Como ejemplo de la problemática que supone la estabilidad de los reservorios está el caso del niño Mississippi. En el primer reporte, publicado en el 2013, se informa el nacimiento de un bebe, por parto vaginal espontaneo a las 35 semanas de gestación, de una madre VIH+ que no recibió atención prenatal. La carga viral de la madre se encontraba en 2423 copias/mL y el conteo de Lc T CD4+ en 644 células/mm<sup>3</sup>. A las 30 horas del parto se confirma la infección en el neonato con una carga viral de 19.812 copias/mL y se inicia el tratamiento con ziduvina, lamivudina y nevirapina. A la semana del parto se sustituye la nevirapina, por ritonavir con lopinavir para reducir el riesgo de generar resistencia, en caso de falta de adherencia al tratamiento. Para este punto se observa una disminución a 2617 copias/mL, la carga viral continua en descenso hasta que a los 29 días después del parto la carga es indetectable. Después de dos periodos de falta de adherencia en los meses 15 y 18 tras los cuales no se detectó repuntes en la carga viral, se decide la suspensión total del tratamiento a los 30 meses de edad. Es de mencionar que los conteos de Lc T CD4+ y CD8+ se mantuvieron normales

para a edad del paciente durante todo este tiempo (Persaud et al., 2013). Sin embargo, para el 2015, se reporta que después a los 46.4 meses de edad (27.6 después de la suspensión del tratamiento) se encuentra un repunte de la carga viral de 16750 copias/mL en la sangre del paciente, aunque ha permanecido asintomático. Se descartan factores de riesgo de reinfección externo como amamantamiento de su madre infectada, o abuso sexual. Se reinicia el tratamiento y a las 72 horas se observa una disminución de la carga viral a 2658 copias/mL (Figura 7) (Luzuriaga et al., 2015).



**Figura 7.- Seguimiento de la carga viral y esquema de tratamiento antirretroviral en el caso Mississippi.** En línea punteada el seguimiento de las copias de ARN vírico de la paciente, y en la barra de colores el esquema de tratamiento: zidovudina (AZT), lamivudina (3TC), nevirapina (NVP), ritonavir/lopinavir (LPV/r), efavirenz (EFV).

Traducido de (Luzuriaga et al., 2015)

Este caso demuestra problemática principal para curar la infección por VIH radica en poder detectar y eliminar los reservorios virales. Sin embargo, recientes estudios han mostrado que las afectaciones a los neonatos de madres VIH+ no se limitan a la adquisición de la infección.

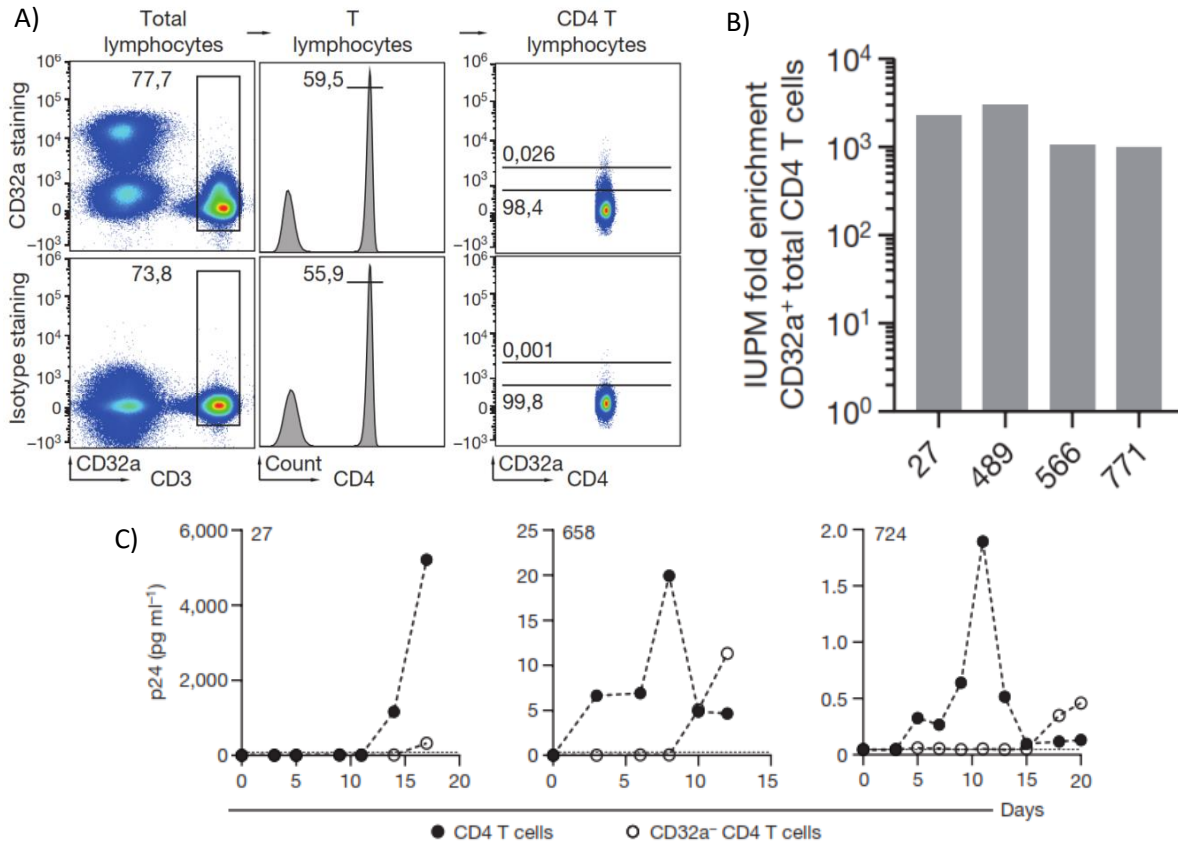
De forma interesante, una de las características que se ha observado en las células hospedadoras con formas províricas, es que las células también sufren alteraciones epigenéticas. En el 2015, un estudio demostró que el provirus insertado provoca alteraciones en la metilación de histonas y como consecuencia

la sobreexpresión de genes como SETDB2 y RSK2, los cuales están relacionados con el crecimiento y diferenciación de las células. Adicionalmente, las células que se encuentran como reservorios muestran alteraciones en la expresión de moléculas asociadas a la activación como CD69 y capacidad de producción de citocinas como de IL2- e IFN- $\gamma$  (Maricato et al., 2015). Dichas alteraciones en los estados de activación y en la capacidad de respuesta de los linfocitos T, observadas en los linfocitos infectados con la forma provírica, son semejantes a las presentes en los linfocitos T CD4+ de los infantes ENI. Estas evidencias abren la posibilidad de la existencia de reservorios províricos en los ENI que pudieran ser las responsables de la alta susceptibilidad inmune a las enfermedades infecciosas.

### **CD32a como un marcador de reservorios de VIH en linfocitos T CD4+**

El mayor obstáculo para eliminar el VIH en una persona infectada, son los reservorios. Estas células son particularmente difíciles de identificar ya que expresan nulas o bajas cantidades de ARN y las proteínas virales. Recientemente Descours y colaboradores describieron que CD32a, el receptor IIa de la fracción cristalizante de anticuerpos (Fc $\gamma$ RIIa) que en condiciones normales solo se expresa en células efectoras de la inmunidad innata y no en células de línea linfocítica, es un buen marcador de células reservorio. Su trabajo, se basó en primero generar células T CD4 con infección latente de VIH a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donadores sanos y por secuenciación de ARN ultra profunda y análisis bioinformático determinar el efecto de la infección viral en su programa transcripcional. Este análisis mostró 16 candidatos de marcadores posibles, que al evaluar su expresión y compararlos contra las células no infectadas de los mismos donadores se encontró que el Fc $\gamma$ RIIa era aproximadamente 50 veces mayor. Estos resultados se trasladaron posteriormente a los pacientes de VIH-1 que habían recibido TAR y se habían mantenido con menos de 20 copias de ARN viral en circulación por una media de 26 meses. El inmunomarcaje y análisis por citometría de flujo reveló que los Lc T

CD4+ se podían diferenciar por su expresión de CD32a (Figura 8A). La subpoblación CD32+ fue enriquecida, y se cuantificó el ADN viral y el número absoluto de células (datos no mostrados). Notablemente la subpoblación CD32+, mostró incremento de las copias virales por célula en comparación con la subpoblación CD32-. Además, para demostrar la viabilidad del virus latente realizaron el ensayo de expansión viral cuantitativa (qVOA por sus siglas en inglés) y se calculó las unidades infecciosas por millón de células (UIMC). El resultado además de positivo mostró un incremento promedio de 3000 veces la cantidad de provirus inducibles y replicativamente competentes en las CD32+ vs los CD4+ totales (Figura 8B). Finalmente, para determinar la contribución a la población de reservorios virales por parte de las células CD32+, se cultivaron durante 20 días con la posterior estimulación del TCR y se midió la replicación viral. Lo que los autores mostraron, fue que en todos los casos los cultivos con células CD32+ tuvieron alta producción viral y diseminación en los cultivos; mientras que las células CD32- tuvieron un marcado retraso en el tiempo de producción viral y consecuente diseminación (Figura 8C). Todos estos resultados que la molécula CD32a reúne todos los criterios necesarios para ser un biomarcador de linfocitos T CD4+ con VIH latente; aunque estos no sustentan la población total de reservorios (Descours et al., 2017).



**Figura 8.- CD32a identifica a linfocitos T CD4 reservorios de VIH-1 replicativamente competente e inducible en pacientes con TAR.** A) Diagramas de puntos que muestran el control de isotipo y la tinción específica de CD32 en linfocitos T CD4 de un paciente con TAR identificando la subpoblación positiva a CD32. B) Tasa de cambio en las UIMCs obtenidas por qVOA en las células CD32+ vs CD4+ totales de los participantes indicados. C) Seguimiento de la producción viral, medido por la liberación de p24, en los cultivos con medio millón de Lc T CD4 o aislados de Lc T CD4 CD32- con estimulación del TCr. La línea punteada indica el límite de detección.

Traducido y modificado de: (Descours et al., 2017)

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente, más de quince millones de mujeres se encuentran infectadas con VIH alrededor del mundo. Dentro de esta población, aquellas que se encuentran embarazadas tienen altas probabilidades de transmitir la infección a su prole durante el embarazo, el parto, o durante los dos años de la lactancia. Actualmente, gracias a la implementación de los programas de prevención materno/infantil la infección vertical por el VIH se ha llevado a tasas de transmisión menores al 1% de los casos. En los casos exitosos, a pesar de ser considerados no infectados, los infantes expuestos a VIH (IEV), a través de sus madres, experimentan mayores tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas durante los primeros meses de vida comparados con infantes no expuestos (INEV). Además, de estas observaciones epidemiológicas, en los IEV se han descrito diversas alteraciones inmunológicas como altas frecuencias de linfocitos T CD4+ con fenotipos “activados”, con marcadores de memoria inmune y responsivos a antígenos del VIH, así también desregulada capacidad de respuesta a la estimulación antigénica. Estas observaciones se han asociado a la limitada capacidad de producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  frente a la re-exposición antigénica (PPD) de los IEV inmunizados con la vacuna BCG, siendo que la capacidad de producción de moléculas como éstas citocinas está relacionada con la diferenciación de células de tipo Th1/Th2/Th17/Treg que se encargan del amplio espectro de mecanismos de defensa/regulación inmunológica de los individuos. Sumado a lo anterior, los estados de activación y alteraciones en la capacidad de respuesta de los linfocitos T observada en los IEV es similar a la observada en células que poseen la forma provírica del VIH de individuos adultos, las cuales son consideradas como reservorios del virus, como es el caso de los linfocitos T CD4+ CD32+ descritas recientemente. En conjunto, estas observaciones abren la posibilidad de la existencia de reservorios províricos en los IEV que pudieran ser las responsables de la alta susceptibilidad inmune a las enfermedades infecciosas. Es por ello, que este trabajo busca la presencia de potenciales reservorios víricos, sus estados de activación y su perfil de

diferenciación Th1/Th2/Th17/Treg, para entender si la respuesta inmune de este grupo susceptible se encuentra comprometido más allá de la desventaja de haberse desarrollado en una madre VIH+ y poder desarrollar estrategias de cuidado más apropiadas para estos infantes vulnerables.

## **HIPÓTESIS**

Los IEV presentan altas frecuencias de linfocitos T CD4+ CD32+ con fenotipos de memoria activados con alteraciones de los perfiles Th1/Th2/Th17/Treg.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la presencia de linfocitos T CD4+ CD32+ en IEV y evaluar la presencia de moléculas asociadas a estados de activación, experiencias antigénicas y de diferenciación Th1/Th2/Th17/Treg.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- I. Estandarizar el panel de inmunomarcaje para el análisis de linfocitos T CD4+ CD32+.
- II. Determinar los números absolutos y frecuencias de linfocitos T CD4+ CD32+ en sangre periférica IEV.
- III. Establecer fenotipo predominante asociado a memoria (naive vs memoria) y estado de activación de los linfocitos T CD4+ CD32+.
- IV. Determinar las frecuencias y distribución de las subpoblaciones Th1/Th2/Th17/Treg de linfocitos T CD4+ CD32+ en IEV.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El diseño del presente estudio fue evaluado y aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología (INPer) (Registro: (478) 212250-3120771).

Tipo de investigación: Observacional

Características del estudio:

- Por la participación del investigador: Analítico
- Por temporalidad del estudio: Longitudinal
- Por la lectura de los datos: Prolectivo
- Por el análisis de datos: Analítico

### **Pacientes y grupos de estudio**

Universo: Recién nacidos e infantes no infectados de madres seropositivas al VIH.

Muestra: Recién nacidos e infantes no infectados de madres seropositivas atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

Criterios de selección:

- Grupo de recién nacidos e infantes expuestos no infectados de madres VIH+ (ENI).

Criterios de inclusión:

- Recién nacidos no infectados de madres VIH+ corroborada por pruebas de laboratorio.
- Recién nacidos de madres que hayan sido atendidas en el INPer y ejercido el control prenatal.
- Infantes cuyo nacimiento haya llegado a término (>37 SDG)
- Con consentimiento informado de la madre de participación al estudio.

Criterios de no inclusión:

- Recién nacidos que se detecten copias de VIH en su primera muestra.
- Cuando el volumen de la muestra se comprometan las determinaciones clínicas de su seguimiento (volúmenes menores de 500 µL)

Criterios de eliminación:

- Infantes a los que se detecte copias de VIH durante su seguimiento perinatal.
- Pacientes que abandonen el seguimiento pediátrico.
- Padres que retiren su consentimiento de participar.

Desde Mayo del 2017 hasta Junio del 2018 se recolectaron, en tubos con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), muestras de sangre periférica de 15 voluntarios adultos sin antecedentes de VIH, 26 pacientes adultos VIH+ (ambos grupos como control de experimento), 15 infantes sin exposición al virus (INEV) y 62 infantes expuestos al VIH (IEV) durante el embarazo. De estos últimos se obtuvieron muestras en cuatro momentos distintos a lo largo de su primer año de vida, iniciando en los primeros días tras el alumbramiento. Con un total de 131 muestras se repartieron en grupos de edad conforme al mes de vida en que fueron obtenidas. Se obtuvieron sus datos relevantes al estudio, como edad, antecedentes de VIH y carga viral si aplicase; en la tabla 5 se resumen dichas características.

Como controles, se emplearon muestras de infantes no infectados que participaron en un protocolo institucional relacionado con el uso de eritropoyetina como agente de maduración de niños que nacieron pre-término. Es importante resaltar que el número de células, así como los patrones de diferenciación son similares a infantes que no se encuentran bajo el tratamiento (Datos no publicados).

**Tabla 3.-Características de las poblaciones de estudio**

<b>Grupo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Carga viral (copias/mL)</b>
Control VIH + (n= 26)	25.4 ± 6.3	380 ± 234
Control VIH - (n=15)	25.7 ± 4.4	n/a*

<b>Grupo</b>	<b>Edad (meses)</b>	<b>Carga viral (copias/mL)</b>
IEV 0 meses (n=28)	0	< 40
IEV 2-3 meses (n=27)	2.6 ± 0.5	< 40
IEV 4-5 meses (n=16)	4.6 ± 0.5	< 40
IEV 6-12 meses (n=60)	7.1 ± 1.5	< 40
INEV (n=15)	1.2 ± 0.12	n/a*

\*n/a: No aplica

### **Clasificación del riesgo de transmisión vertical**

Con los datos recolectados de las notas clínicas, el riesgo de transmisión vertical para cada infante fue obtenido de acuerdo a la presentación de los siguientes factores:

- Conteos maternos de Lc T CD4+ menores a 300 cel/ $\mu$ L.
- Carga viral materna mayor a 1000 copias/mL.
- Dos o más gestas previas.
- Ausencia de terapia antirretroviral o inicio de tratamiento desde las últimas 9 semanas del embarazo.

La ausencia de los factores se considera bajo riesgo; un solo factor es considerado como bajo; y dos o más como alto riesgo.

### **Procesamiento de las muestras e inmunomarcaje de superficie**

Para el inmunomarcaje, a tubos rotulados por cada muestra o condición de análisis se les adicionó el volumen de anticuerpo titulado de acuerdo a su panel correspondiente (Tabla 4) y 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra de sangre periférica fresca recolectadas en tubos con EDTA. Para asegurar el contacto de la sangre con los anticuerpos, los tubos se agitaron durante 3 segundos en un agitador oscilatorio, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Concluido el tiempo se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de la solución Facs lysing (BD) (preparada al instante diluyéndola 1:10 con agua destilada o miliQ), se agitaron y nuevamente se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para retirar el exceso de anticuerpo se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de solución Facs Flow (BD) y centrifugación a 400 g por 5 minutos. Finalmente se eliminó el sobrenadante por inversión y se resuspendió el botón celular con 100  $\mu\text{L}$  de solución Facs Flow (BD). Una vez tratadas las muestras se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis en un citómetro de flujo FACS ARIA III (BD, Biosciences). Según el objetivo se aplicaron diferentes algoritmos de análisis mencionados más adelante.

**Tabla 4.- Paneles de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para el inmunomarcaje superficial de linfocitos humanos.**

	<b>Anticuerpo anti-</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clona</b>	<b>Marca</b>	<b>Volumen titulado (µL)</b>
Panel 1	<b>CD32a</b>	FITC	FLI8.26	BD	0.5
	<b>CD45RO</b>	PE	UCHL1	BD	1.25
	<b>CD69</b>	PE-Cy5	FN50	BioLegend	2.5
	<b>CD45RA</b>	APC	HI100	BD	1.25
	<b>CD3</b>	BV510	UCHT1	BioLegend	0.5
	<b>CD4</b>	APC-Cy7	RPA-T4	BioLegend	0.3
	<b>CD45</b>	eF450	HI100	BD	0.3
Panel 2	<b>CD32</b>	FITC	FLI8.26	BD	0.5
	<b>CD4</b>	APC-Cy7	RPA-T4	BioLegend	0.3
	<b>CD3</b>	PE	SK7	BD	2.5
	<b>CD45</b>	eF-450	HI100	BD	0.3
	<b>CD183 (CXCR3)</b>	BV510	G025H7	BioLegend	0.3
	<b>CD194 (CCR4)</b>	APC	L291H4	BioLegend	0.3
	<b>CD196 (CCR6)</b>	PerCP-Cy5.5	G034E3	BioLegend	0.3
	<b>CD45RA</b>	PE-CF594	HI100	eBioscience	0.3
<b>CD25</b>	PE-Cy7	M-A251	BD	0.3	

Adicionalmente se realizó el conteo celular de linfocitos T CD4. Este procedimiento se realizó de forma similar que el inmunomarcaje de superficie. Brevemente, de cada muestra se tomaron 50 µL de sangre periférica en tubos de conteo (BD Trucount™ tubes, No. Cat 340334) que contienen un número conocido de perlas fluorescentes y 10 µL de un mix de anticuerpos anti-CD3 FITC, -CD8 PE, -CD45 PerCP, y -CD4 APC (BD Multitest, Cat, 340499). Después de incubar las células en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos, las muestras fueron fijados y los eritrocitos lisados con FLS durante 10min. Una vez terminado este procedimiento, las muestras fueron analizadas a través del citómetro de flujo. Para obtener el número de células por unidad de volumen se relacionó el número de

perlas presentes en la muestra con la cantidad de células con el fenotipo SSC<sup>low</sup>CD45<sup>++</sup>CD4. Esto se realizó dividiendo el número de eventos celulares positivos ( $X$ ) entre el número de microesferas ( $Y$ ), y a continuación multiplicando por la concentración de microesferas; obtenida dividiendo número de microesferas ( $N$ ) entre el volumen de la muestra adicionado inicialmente ( $V$ ).

$$A = \frac{X}{Y} \times \frac{N}{V}$$

### **Algoritmos para la determinación de las poblaciones naive y memoria.**

A cada muestra que se le aplico el inmunomarcaje del panel 1, la identificación de células con fenotipo virgen estuvo dado por las siguientes características: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4+CD45RA+CD45RO-; mientras que el fenotipo de memoria: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4+CD45RA-CD45RO+.

### **Algoritmos para la determinación de las subpoblaciones Th1/Th2/Th17/Treg.**

A cada muestra que se le aplico el inmunomarcaje del panel 2, la identificación de linfocitos T CD4+ CD32+ para cada perfil estuvo dado por células con fenotipo:

Th1: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4+CD45RA-CXCR3+CCR4-CCR6-

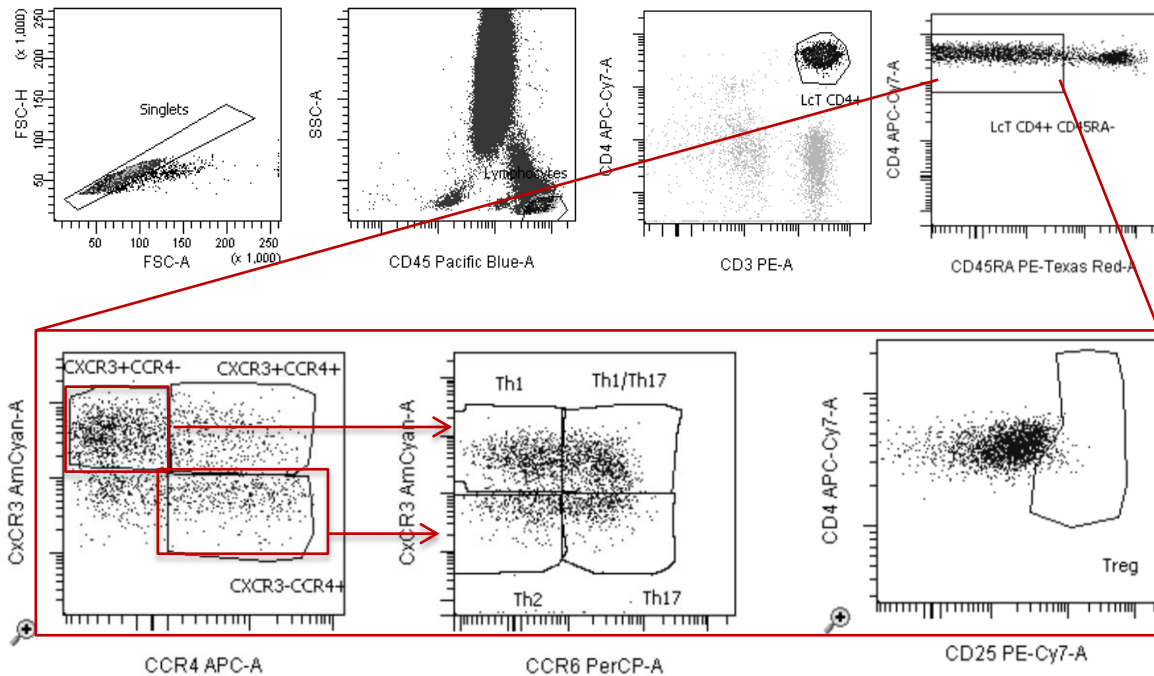
Th2: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4+CD45RA-CXCR3-CCR4+CCR6-

Th17: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4+CD45RA-CXCR3-CCR4+CCR6+

Th1/Th17: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4+CD45RA-CXCR3+CCR4-CCR6+

Treg: SSC<sup>low</sup> CD45<sup>high</sup>CD3+CD4<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>

La figura 9 muestra la selección, en diagramas de puntos, de dichas subpoblaciones.



**Figura 9.- Algoritmo 2 empleado para la identificación de Lc T CD4+ CD32+ CD45RA- con fenotipos Th1, Th2, Th17, Th1/17 o Treg.**

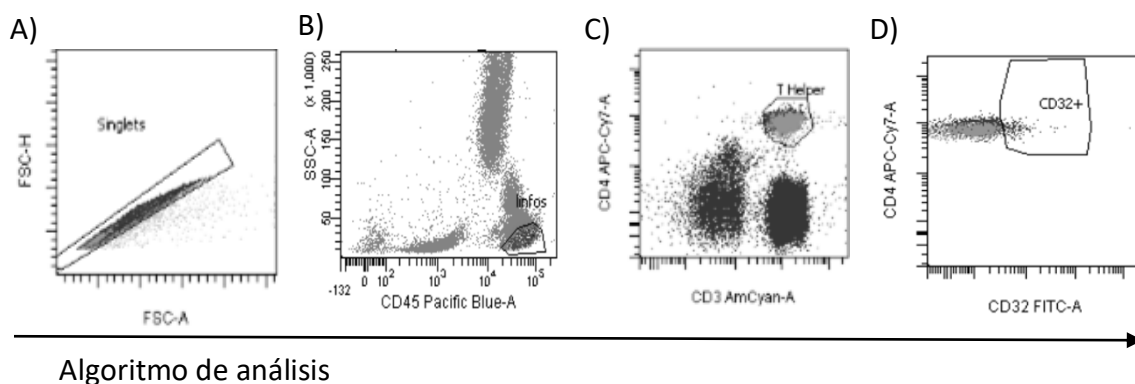
### **Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados usando el software GraphPad Prism 7.0. Se usaron las pruebas Mann-Whitney para comparación entre 2 grupos, Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn para comparaciones de 3 o más grupos y correlación de Spearman para asociación de dos variables.

## RESULTADOS

- I. Estandarización del panel de inmunomarcaje y del algoritmo para el análisis de linfocitos T CD4+ CD32+.

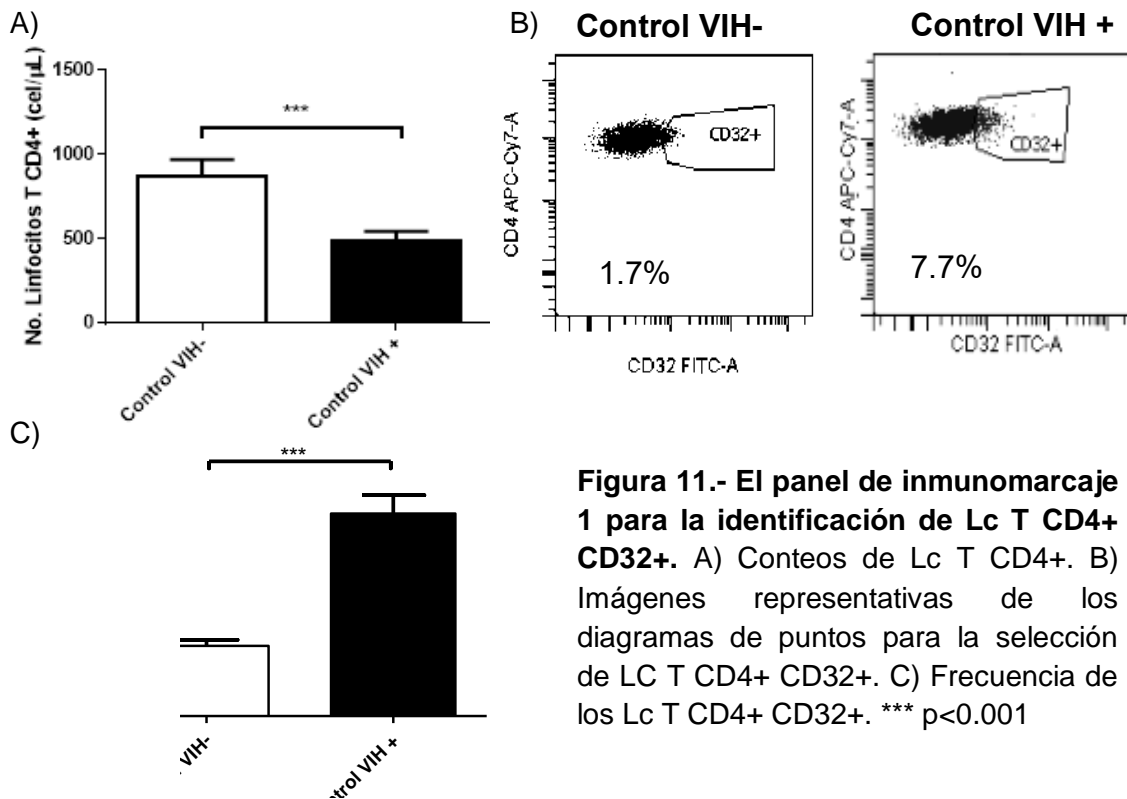
Para poder reproducir lo reportado por Descours (Descours et al., 2017) se utilizó muestras controles de sujetos adultos sanos y adultos con infección crónica. Aplicando el panel de inmunomarcaje 1, establecimos el siguiente algoritmo de análisis: Partiendo de la selección de eventos sencillos, correspondientes a aquellos que presentan una relación lineal en la intensidad del parámetro de tamaño en sus señales pico y área (FSC-H y FSC-A) (Figura 10A), se seleccionaron células con alta expresión del marcador CD45 y baja complejidad (SSC-A). Esta selección corresponde a linfocitos (Figura 10B). Posteriormente se seleccionaron los linfocitos T cooperadores que coexpresan los marcadores CD3 y CD4 (CD3+CD4+) (Figura 10C). De estos últimos se seleccionaron las células, que, de acuerdo a la autofluorescencia fueron positivos al marcador CD32 (Lc T CD4+CD32+) (FIGURA 10D). Cabe destacar que la aplicación de este algoritmo de análisis en los sujetos control, muestra la presencia de células con este mismo fenotipo.



**Figura 10.- Identificación de LC T CD4+ CD32+.** A) Selección de eventos sencillos gracias al tamaño en señal pico y área (FSC-H y FSC-A). B) Selección de linfocitos por alta expresión de CD45 y baja complejidad (SSC-A). C) Selección de los linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+). D) Selección de linfocitos positivos a CD32 (Lc T CD4+CD32+).



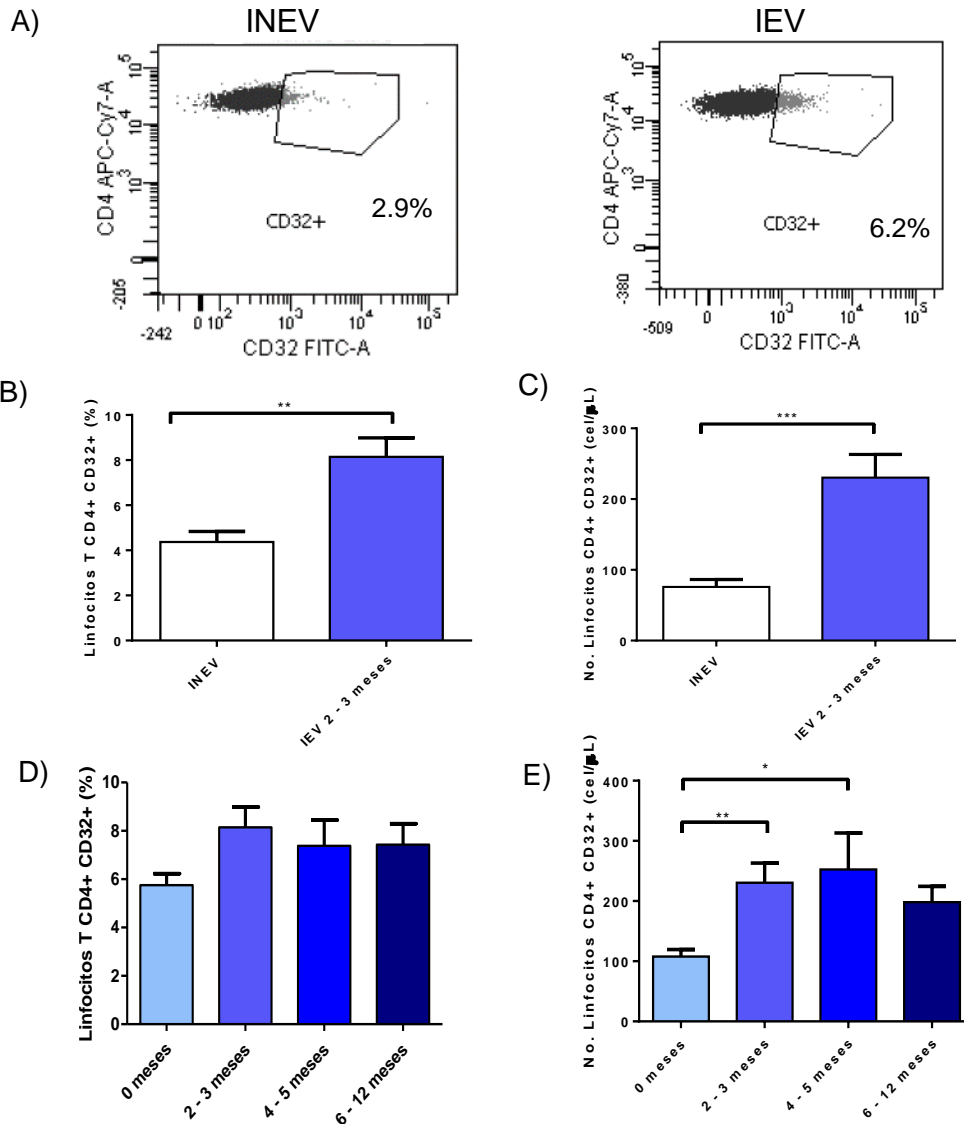
Aplicando la misma estrategia de análisis, como esperábamos y a manera de control, el número de Lc T CD4+ es menor en los individuos adultos con tratamiento antirretroviral e infección crónica (VIH+) respecto a adultos controles sanos (867.5 +/- 405.1 488.7 +/- 292.5 cel/ $\mu$ l;  $p=0.0005$ ) (Figura 11A). En estos mismos grupos de personas pudimos observar que, la frecuencia de las células CD32+, de forma similar a lo reportado por Descours, es mayor en los sujetos VIH+ (Figura 11 B y C).



**Figura 11.- El panel de inmunomarcaje 1 para la identificación de Lc T CD4+ CD32+.** A) Conteos de Lc T CD4+. B) Imágenes representativas de los diagramas de puntos para la selección de LC T CD4+ CD32+. C) Frecuencia de los Lc T CD4+ CD32+. \*\*\*  $p<0.001$

## II. Los IEV presentan altas frecuencias de Lc T CD4+ CD32+

Aplicando el panel multiparamétrico y estrategia de análisis a la población infantil observamos que, en ambos grupos, tanto IEV así como los controles INEV en los primeros 3 meses de vida, las células con fenotipo T CD4+ CD32+ están presentes en sangre periférica en frecuencias menores al 10% (Figura 12A), sin embargo, las frecuencias, así como los números absolutos, son mayores en el grupo IEV en comparación con los INEV (Figura 12 B y C). Interesantemente, estas células están presentes en circulación periférica desde el nacimiento de los infantes IEV con porcentajes similares durante el primer año de vida (Figura 12D), pero su cantidad incrementa hacia los primeros seis meses (Figura 12 E).



**Figura 12.- Altas frecuencias de Lc T CD4+ CD32+ en IVEV.** A) Imágenes representativas de los diagramas de puntos para la selección de Lc T CD4+ CD32+ en infantes no expuestos (INEV) y expuestos *in utero* (IEV) al virus de VIH. B) Frecuencias de Lc T CD4+ CD32+ INEV vs IEV. C) Conteos de Lc T CD4+ CD32+ INEV vs IEV. D) Frecuencias y E) células absolutas de Lc T CD4+ CD32+ a lo largo del primer año de vida. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

Por otro lado, pensando que las elevadas frecuencias de los Lc T CD4+ CD32+ en los infantes IEV están relacionadas al riesgo de transmisión vertical, los IEV se estratificaron de acuerdo al riesgo de transmisión vertical.

Como se puede ver en la Tabla 5 la frecuencia de las células T CD4+ CD32+ es similar entre los grupos de bajo, medio y alto riesgo en los diferentes periodos de análisis a lo largo de un año de vida.

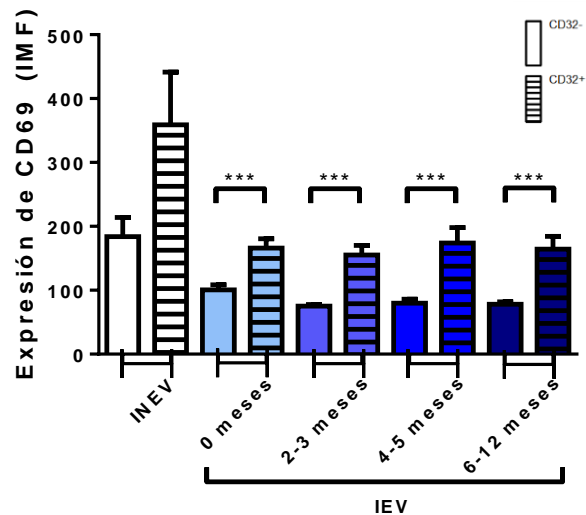
**Tabla 5.- Frecuencias de Lc T CD4+ CD32+ en IEV divididos en grupos de edad y subgrupos de riesgo de transmisión vertical.**

Grupo de edad	Frec. Lc T CD4 CD32+ (%)			P (Kruskal-Wallis)
	Riesgo Bajo	Riesgo Medio	Riesgo Alto	
<b>0 meses</b>	5.5 +/- 2.0	6.7 +/- 2.2	4.5 +/- 2.9	0.1832
<b>2-3 meses</b>	8.1 +/- 5.7	7.4 +/- 3.5	9.0 +/- 2.5	0.6206
<b>4-5 meses</b>	8.3 +/- 4.6	6.3 +/- 3.6	4.6 +/- 3.8	0.4932
<b>6-12 meses</b>	5.9 +/- 3.8	9.0 +/- 3.8	9.0 +/- 6.5	0.3896

### III. Alta expresión de CD69 en linfocitos T CD4+ CD32+.

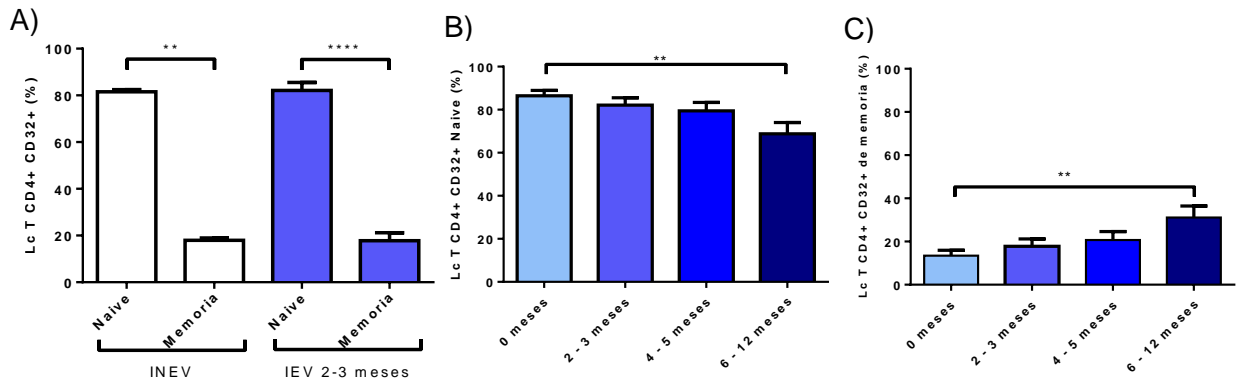
Para determinar el estado de activación de los linfocitos T CD4+CD32+ la expresión relativa de CD69 se evaluó en la población de estudio y se comparó con los linfocitos T CD4+ CD32-. Como se puede ver en la Figura 13, la expresión de CD69 en linfocitos T CD4+CD32+ es similar durante el primer año de vida en los infantes IEV, pero mayor en comparación con su contraparte de células CD32-. De forma similar, en los niños control, la expresión de CD69 es mayor en las células CD32+ en comparación con las células CD32-.

**Figura 13.- Alta expresión de CD69 en linfocitos T CD4+CD32+.** La expresión relativa de CD69 se evaluó como la intensidad media de fluorescencia (IMF) del fluorocromo reportero en las células T CD4+CD32+ de los infantes IEV e INEV. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



IV. Los linfocitos T CD4+ CD32+ muestran un fenotipo predominantemente “naive”

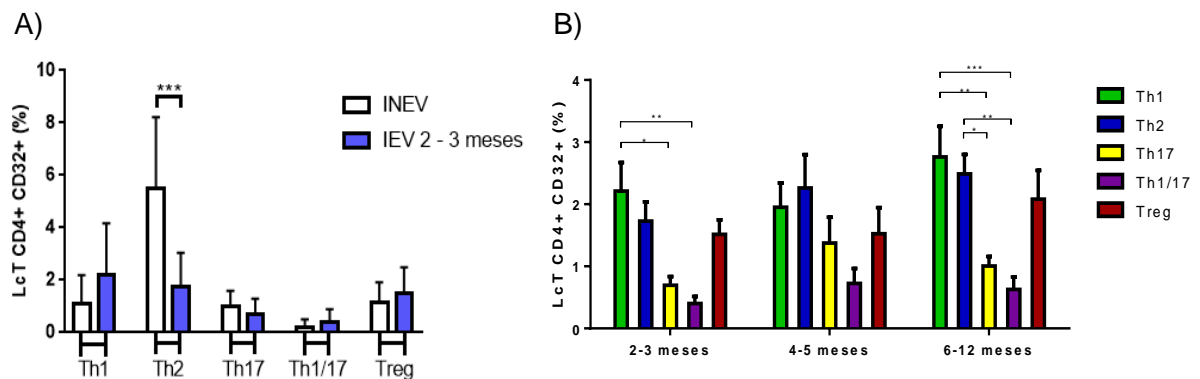
De acuerdo a las experiencias antigénicas, los linfocitos T se clasifican en células naive (células CD45RA+ CD45RO-) y de memoria (células CD45RA- CD45RO-) (Bell & Sparshott, 1990). Basados en lo anterior, el fenotipo predominante de las los linfocitos T CD4+ CD32+ es naive en los infantes expuestos y no expuestos (Figura 14A). Por otra parte, conforme avanza la edad hacia el primer año de vida desde el nacimiento, el porcentaje de células CD32+ naive disminuye mientras que las que corresponden a fenotipo de memoria incrementan (Figura 14 B y C).



**Figura 14.- El fenotipo naive predomina en células T CD4 CD32+.** A) Frecuencias de linfocitos T CD4+ CD32+ naive (CD45RA+CD45RO-) o memoria (CD45RA-CD45RO-) en infantes control y expuestos. B) Evolución de células T CD4+ CD32+ naive y C) de memoria en los infantes IEV en el primero año de vida. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001.

V. El perfil Th1 y Th2 predomina en las células T CD4+ CD32+ de infantes IEV

Sumado al estado de activación y fenotipo asociado a memoria, en este trabajo caracterizamos el principal perfil de diferenciación de los linfocitos T CD4+. Aplicando el algoritmo de análisis para la identificación de los perfiles Th1/Th2/Th17/Treg de las células T CD4+ CD32+ de memoria (Figura 9), observamos que en los infantes controles el perfil predominante entre las células CD32+ corresponde a Th2, así mismo, el porcentaje de este perfil es mayor en comparación a las células CD32+ de los infantes IEV (Figura 15A). Adicionalmente encontramos que el perfil predominante a lo largo del primer año de vida en los niños IEV corresponde a los tipos Th1 y Th2 (Figura 15B).



**Figura 15.- V. El perfil Th1 y Th2 predomina en las células T CD4+ CD32+ de infantes IEV.** Porcentajes de Lc T CD4+ CD32+ con fenotipo Th1, Th2, Th17, Th1/17 y Treg. A) Comparación de los perfiles en infantes INEV y EV. B) Perfiles de células T

## DISCUSIÓN

Una de las preocupaciones más grandes en torno a las mujeres embarazadas con VIH, ha sido la probabilidad de que la infección sea transmitida de forma vertical. Gracias a los cuidados perinatales, las tasas de transmisión madre-hijo se han reducido a frecuencias menores del 1%. A pesar de no tener evidencias de la infección (IEV), los niños de madres con VIH tienen mayor susceptibilidad de desarrollar enfermedades infecciosas, y las características clínicas son similares a las reportadas con la infección (Afran et al., 2014). Por lo anterior, se ha pensado en que estos infantes pudieran tener reservorios que aún no han sido detectados. Por otra parte, recientemente se ha descrito una población de linfocitos T CD4 que expresan CD32a, una molécula que habitualmente no expresan estas células, quienes forman parte del 50% de los reservorios de individuos con reportes de infección crónica tratados con antirretrovirales (Descours et al., 2017). En el presente trabajo se ha seguido esta línea de pensamiento y se realizó la búsqueda linfocitos T CD4+ CD32+ en IEV, así como describir algunas de sus características.

A manera de control de medición, y de acuerdo a lo publicado por Descours y colaboradores, en sangre periférica se pueden detectar bajos porcentajes de linfocitos T CD4+ CD32+ en adultos con infección crónica de VIH. Interesantemente, esta población de células también se encuentra en individuos adultos sanos no infectados, pero en frecuencias menores (Figura 11 B y C). Estos resultados son similares a los que recientemente han sido publicados por otros autores quienes exponen que otros marcadores como CD127 y CCR6, en conjunto con CD32a+, pueden ser mejores biomarcadores para células reservorios (Bruehl & Schwartz, 2018; Garcia et al., 2018).

Atendiendo la situación de los infantes IEV, ninguno reportó cargas virales durante su seguimiento, sin embargo, observamos que los porcentajes de las células CD32+, así como sus conteos totales, son mayores respecto a los infantes control (Figura 12 A, B y C). Estos resultados son interesantes desde el punto de vista de



que la condición del nacimiento de una madre infectada, condiciona a la presencia de un número mayor de células con este fenotipo. De acuerdo a lo anterior, recientemente se ha publicado que los linfocitos T CD4+ CD32+ en adultos con infección y sin infección, expresan mayores niveles de las moléculas PD-1, CD69, HLA-DR, CD25, CD38 y Ki67, respecto a las células CD32- (Abdel-Mohsen et al., 2018; Noto et al., 2018). De forma similar, nosotros encontramos que las células CD32+ de infantes IEV expresan mayores niveles de CD69 (Figura 13). El estado de activación de estas células puede deberse a condiciones maternas y propias del infante. Es sabido que las mujeres VIH+ durante el embarazo cursan con niveles mayores de citocinas como IL-10 e IFN- $\gamma$  comparadas con embarazadas VIH- (Borges-Almeida et al., 2011). Además, la exposición crónica de los antirretrovirales *in utero*, y profiláctica al nacimiento, pueden incrementar la concentración de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (Barbaro & Iacobellis, 2009). Sumado a lo anterior, la reducida transferencia de anticuerpos placentarios, y la restricción absoluta de los provenientes de la lactancia, propician incrementos en la magnitud de la respuesta del infante frente a los primeros retos antigénicos. Respecto a lo anterior, se sabe que los anticuerpos maternos (tanto IgG placentarios e IgA de la lactancia) son capaces de reducir la exposición de los antígenos de agentes infecciosos, así como los provenientes de las vacunas, atenuando la respuesta propia de los infantes (Jennewein, Abu-Raya, Jiang, Alter, & Marchant, 2017). Entonces, la exposición al ambiente proinflamatorio materno, y la incrementada respuesta de los antígenos en ausencia de la inmunidad pasiva materna, podrían ser responsables del incremento de células con fenotipos activados.

Por otro lado, el número de linfocitos T CD4+ CD32+ varía a lo largo del primer año de vida. En el análisis semi-longitudinal de los infantes IEV observamos que las frecuencias y número total de Lc T CD4+ CD32+ son mayores en el periodo de los 2-3 meses de edad (Figura 12 D y E). Esta etapa representa uno de los periodos de adaptación del sistema inmunológico más importante por la aplicación de vacunas (*NOM-039-SSA2-2014, Para la prevención y control de las infecciones*

*de transmisión sexual.* , 2017; Vacunación, 2017). Por ello también representa un periodo de intensa activación y proliferación celular.

Ahora bien, el fenotipo que presentan los Lc T CD4+ CD32+ también ha sido estudiado, sin embargo, los resultados publicados han sido discordantes cuando menos. El ya mencionado estudio del doctor Abdel-Mohsen y colaboradores reporta una repartición prácticamente igual de los Lc T CD4+ CD32+ entre fenotipos de memoria central y naive (Abdel-Mohsen et al., 2018). Por otro lado, Melanie Wittner y colaboradores reportan predominio en el compartimiento de células con fenotipo naive sobre los de memoria (Wittner et al., 2018). Interesantemente, nosotros encontramos un predominio en el fenotipo naive (Figura 14); lo cual coincide con el reporte de Melanie Wittner y colaboradores. Sin embargo, estos resultados pudieran estar sesgados por la población de estudio. Es sabido que los infantes, al no tener el mismo número de retos antigénicos que los adultos, presentan mayor cantidad de células con fenotipo CD45RA+ (Pirruccello, Collins, Wilson, & McManus, 1989). Además, como se observa en las figuras 14 B y C al pasar el tiempo los Lc T CD4+ CD32+ han ido adquiriendo el fenotipo de memoria, presumiblemente igual que el resto de linfocitos, indicando un desarrollo normal de la memoria inmune (Bell & Sparshott, 1990).

Los linfocitos T CD4+ una vez que adquieren fenotipos de memoria, pueden estar asociados a respuestas específicas, como los son los perfiles Th1/Th2/Th17/Treg (Luckheeram et al., 2012). De los linfocitos T CD4+ CD32+ observamos que, en comparación con no expuestos, los infantes IEV, tienen frecuencias menores del perfil Th2 (Figura 15 A). Esta repartición en perfiles también fue estudiada en pacientes adultos por Abdel-Mohsen y colaboradores, quienes encontraron predominio en el perfil Th2 (Abdel-Mohsen et al., 2018). Comúnmente es aceptado que el embarazo representa un ambiente de tipo Th2, esto a partir de las observaciones y propuestas realizadas en trabajos como el Wegmann en 1993 (Wegmann, Lin, Guilbert, & Mosmann, 1993). Y aunque hay otros autores que no refrendan este paradigma, ya que hay trabajos como el de (Halonen et al., 2009)

que no encuentra tal sesgo al medir las citocinas asociadas a los perfiles Th1 y Th2 tanto en madres como infantes de partos sanos, los resultados encontrados en el presente trabajo coinciden con la polarización a Th2 en los infantes sin factores que afecten al desarrollo normal del sistema inmunológico. Interesantemente, en nuestros resultados observamos las frecuencias de las células con cada perfil, no se modifica a lo largo del primer año de vida, sin embargo, el perfil que predomina son las células Th1 y Th2 (Figura 15 B). Es de notar que una de las principales respuestas celulares que se han reportado en los infantes IEV es la alta producción de IFN- $\gamma$  (Hygino et al., 2011), y baja producción de IL-4 (Borges-Almeida et al., 2011), lo cual condiciona a perfiles de tipo Th1. Además, las estrategias que se siguen para evitar la transmisión vertical, se encuentra la restricción de la lactancia, esto impacta directamente a la maduración del sistema inmunológico del recién nacido. El calostro aporta muchos factores importantes que no se encuentran en la leche normal, entre ellos: nutrientes, factores de crecimiento y vitaminas que no cruzan la barrera placentaria. También es rico en agentes protectores y estimulantes del sistema inmunológico tanto solubles (citocinas, componentes del complemento y más inmunoglobulinas) como celulares (macrófagos, polimorfonucleares y linfocitos T) (Palmeira & Carneiro-Sampaio, 2016). Por lo que la restricción de estos componentes, impacta el desarrollo de su sistema inmunológico.

Desde la publicación del estudio por Descours y colaboradores en marzo del 2017, múltiples grupos de investigación han caracterizado los linfocitos T CD4+ CD32+ en adultos. La mayoría de los estudios han coincidido en que estas células presentan otros marcadores de activación como HLA-DR, CD279, CD38, CD25 y Ki67 siendo más la asociación a estados de actividad transcripcional que a reales reservorios (Abdel-Mohsen et al., 2018). Además, también ha sido reportado que la cantidad de ADN provírico insertado en entre los Lc T CD4+ CD32+ es similar al de las células CD32- (Badia et al., 2018). En el presente trabajo nos limitamos a la caracterización de estas células, donde nuestros datos sugieren que las células CD32+ en Lc T CD4+ están implicados en estados de activación. Si bien, las recientes evidencias sugieren que no son reservorios víricos, se abre las

siguientes preguntas: ¿cuál es la función de CD32 en los linfocitos T CD4+? y ¿si la presencia de estas células trae como consecuencia mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas en el recién nacido e infantes?

## **CONCLUSIÓN**

Los recién nacidos e infantes de madres no infectados de madres VIH+ tienen mayores tasas de infecciones. Diversas alteraciones inmunológicas han sido observadas. En este trabajo, nosotros reportamos incrementos en las células Lc T CD4+ CD32+ respecto a infantes no infectados. Si bien estas células no parecen ser reservorios províricos, se encuentran con mayor expresión de moléculas asociadas a activación con perfiles predominantemente Th1 y Th2. Este conocimiento pudiera en un futuro ayudar a entender los mayores índices de morbilidad y mortalidad de los infantes EVI y auxiliar en el desarrollo de estrategias para prevenirlas.

## REFERENCIAS

- Abdel-Mohsen, M., Kuri-Cervantes, L., Grau-Exposito, J., Spivak, A. M., Nell, R. A., Tomescu, C., . . . Montaner, L. J. (2018). CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med*, *10*(437). doi: 10.1126/scitranslmed.aar6759
- Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., . . . Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, *8*(6), 639-646. doi: 10.1038/ni1467
- Afran, L., Garcia Knight, M., Nduati, E., Urban, B. C., Heyderman, R. S., & Rowland-Jones, S. L. (2014). HIV-exposed uninfected children: a growing population with a vulnerable immune system? *Clin Exp Immunol*, *176*(1), 11-22. doi: 10.1111/cei.12251
- Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A., & Bomsel, M. (2005). HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell*, *16*(9), 4267-4279. doi: 10.1091/mbc.E05-03-0192
- Ambrose, Z., & Aiken, C. (2014). HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins. *Virology*, *454-455*, 371-379. doi: 10.1016/j.virol.2014.02.004
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., . . . Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, *204*(8), 1849-1861. doi: 10.1084/jem.20070663
- Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., . . . Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J*, *26*(12), 3025-3037. doi: 10.1038/sj.emboj.7601740
- Badia, R., Ballana, E., Castellvi, M., Garcia-Vidal, E., Pujantell, M., Clotet, B., . . . Este, J. A. (2018). CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir. *Nat Commun*, *9*(1), 2739. doi: 10.1038/s41467-018-05157-w
- Barbaro, G., & Iacobellis, G. (2009). Metabolic syndrome associated with HIV and highly active antiretroviral therapy. *Curr Diab Rep*, *9*(1), 37-42.
- Barral, Maria F.M., Oliveira, Gisele R. de, Lobato, Rubens C., Mendoza-Sassi, Raul A., Martínez, Ana M.b., & Gonçalves, Carla V. (2014). RISK FACTORS OF HIV-1 VERTICAL TRANSMISSION (VT) AND THE INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL THERAPY (ART) IN PREGNANCY OUTCOME. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *56*, 133-138.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*(4599), 868-871.
- Barton, K. M., Burch, B. D., Soriano-Sarabia, N., & Margolis, D. M. (2013). Prospects for treatment of latent HIV. *Clin Pharmacol Ther*, *93*(1), 46-56. doi: 10.1038/clpt.2012.202
- Bell, E. B., & Sparshott, S. M. (1990). Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo. *Nature*, *348*(6297), 163-166. doi: 10.1038/348163a0
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P. P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., . . . Sinigaglia, F. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*, *187*(1), 129-134.
- Borges-Almeida, E., Milanez, H. M., Vilela, M. M., Cunha, F. G., Abramczuk, B. M., Reis-Alves, S. C., . . . Lorand-Metze, I. (2011). The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infect Dis*, *11*, 38. doi: 10.1186/1471-2334-11-38

- Briggs, J. A., Riches, J. D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G., & Krausslich, H. G. (2009). Structure and assembly of immature HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(27), 11090-11095. doi: 10.1073/pnas.0903535106
- Bruel, T., & Schwartz, O. (2018). Markers of the HIV-1 reservoir: facts and controversies. *Curr Opin HIV AIDS*, *13*(5), 383-388. doi: 10.1097/COH.0000000000000482
- Bunders, M. J., van der Loos, C. M., Klarenbeek, P. L., van Hamme, J. L., Boer, K., Wilde, J. C., . . . Kuijpers, T. W. (2012). Memory CD4(+)CCR5(+) T cells are abundantly present in the gut of newborn infants to facilitate mother-to-child transmission of HIV-1. *Blood*, *120*(22), 4383-4390. doi: 10.1182/blood-2012-06-437566
- Bunders, M. J., van Hamme, J. L., Jansen, M. H., Boer, K., Kootstra, N. A., & Kuijpers, T. W. (2014). Fetal exposure to HIV-1 alters chemokine receptor expression by CD4+T cells and increases susceptibility to HIV-1. *Sci Rep*, *4*, 6690. doi: 10.1038/srep06690
- CENSIDA. (2018). CENSIDA CIERRE 2017. Retrieved 05 Jun, 2018, from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/328393/RN\\_Cierre\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/328393/RN_Cierre_2017.pdf)
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., . . . Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med*, *11*(12), 1287-1289. doi: 10.1038/nm1329
- Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Perez-Olmeda, M., & Alcami, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol*, *7*(11), 798-812. doi: 10.1038/nrmicro2223
- Corthesy, B., & Kao, P. N. (1994). Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter. *J Biol Chem*, *269*(32), 20682-20690.
- Craigie, R., & Bushman, F. D. (2012). HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(7), a006890. doi: 10.1101/cshperspect.a006890
- Checkley, M. A., Luttgge, B. G., & Freed, E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*, *410*(4), 582-608. doi: 10.1016/j.jmb.2011.04.042
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., . . . Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, *198*(12), 1875-1886. doi: 10.1084/jem.20030152
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., . . . Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(24), 13193-13197.
- D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonocchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., & Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol*, *161*(10), 5111-5115.
- Dahabieh, M. S., Battivelli, E., & Verdin, E. (2015). Understanding HIV latency: the road to an HIV cure. *Annu Rev Med*, *66*, 407-421. doi: 10.1146/annurev-med-092112-152941
- de Moraes-Pinto, M. I., Verhoeff, F., Chimsuku, L., Milligan, P. J., Wesumperuma, L., Broadhead, R. L., . . . Hart, C. A. (1998). Placental antibody transfer: influence of maternal HIV infection and placental malaria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, *79*(3), F202-205.
- Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*, *47*(5), 450-455.
- Descours, B., Petitjean, G., Lopez-Zaragoza, J. L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., . . . Benkirane, M. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature*, *543*(7646), 564-567. doi: 10.1038/nature21710

- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., . . . Skinner, M. A. (1990). HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J*, *9*(12), 4145-4153.
- Dolcini, G., Derrien, M., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., & Menu, E. (2003). Cell-free HIV type 1 infection is restricted in the human trophoblast choriocarcinoma BeWo cell line, even with expression of CD4, CXCR4 and CCR5. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *19*(10), 857-864. doi: 10.1089/088922203322493021
- Duliege, A. M., Amos, C. I., Felton, S., Biggar, R. J., & Goedert, J. J. (1995). Birth order, delivery route, and concordance in the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mothers to twins. International Registry of HIV-Exposed Twins. *J Pediatr*, *126*(4), 625-632.
- Evans, C., Jones, C. E., & Prendergast, A. J. (2016). HIV-exposed, uninfected infants: new global challenges in the era of paediatric HIV elimination. *Lancet Infect Dis*, *16*(6), e92-e107. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00055-4
- Farnet, C. M., & Bushman, F. D. (1997). HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell*, *88*(4), 483-492.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J. D., Margolick, J. B., Chadwick, K., Pierson, T., . . . Siliciano, R. F. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, *5*(5), 512-517. doi: 10.1038/8394
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., . . . Siliciano, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, *278*(5341), 1295-1300.
- Frank, G. A., Narayan, K., Bess, J. W., Jr., Del Prete, G. Q., Wu, X., Moran, A., . . . Subramaniam, S. (2015). Maturation of the HIV-1 core by a non-diffusional phase transition. *Nat Commun*, *6*, 5854. doi: 10.1038/ncomms6854
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol*, *13*(8), 484-496. doi: 10.1038/nrmicro3490
- From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. (1993). *JAMA*, *269*(6), 729-730.
- Garber, M. E., Wei, P., & Jones, K. A. (1998). HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *63*, 371-380.
- Garcia, M., Navarrete-Munoz, M. A., Ligos, J. M., Cabello, A., Restrepo, C., Lopez-Bernaldo, J. C., . . . Rallon, N. (2018). CD32 Expression is not Associated to HIV-DNA content in CD4 cell subsets of individuals with Different Levels of HIV Control. *Sci Rep*, *8*(1), 15541. doi: 10.1038/s41598-018-33749-5
- Goedert, J. J., Duliege, A. M., Amos, C. I., Felton, S., & Biggar, R. J. (1991). High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins. *Lancet*, *338*(8781), 1471-1475.
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., & Bonavida, B. (2006). Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*, *25*(8), 1125-1142. doi: 10.1038/sj.onc.1209080
- Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., & Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(8), 3195-3199.
- Goulder, P. J., Lewin, S. R., & Leitman, E. M. (2016). Paediatric HIV infection: the potential for cure. *Nat Rev Immunol*, *16*(4), 259-271. doi: 10.1038/nri.2016.19

- Gray, L., Fiscus, S., & Shugars, D. (2007). HIV-1 variants from a perinatal transmission pair demonstrate similar genetic and replicative properties in tonsillar tissues and peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *23*(9), 1095-1104. doi: 10.1089/aid.2006.0247
- Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Gonzalez, C., McMahon, D., . . . Chodakewitz, J. A. (1997). Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, *337*(11), 734-739. doi: 10.1056/NEJM199709113371102
- Halonen, M., Lohman, I. C., Stern, D. A., Spangenberg, A., Anderson, D., Mobley, S., . . . Wright, A. L. (2009). Th1/Th2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort. *J Immunol*, *182*(5), 3285-3293. doi: 10.4049/jimmunol.0711996
- Hammer, S. M., Squires, K. E., Hughes, M. D., Grimes, J. M., Demeter, L. M., Currier, J. S., . . . Fischl, M. A. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med*, *337*(11), 725-733. doi: 10.1056/NEJM199709113371101
- Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Melard, A., . . . Virales, A. C. of the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hepatites. (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother*, *68*(5), 1169-1178. doi: 10.1093/jac/dks533
- Hygino, Joana, Vieira, Morgana M., Guillermo, Landi V., Silva-Filho, Renato G., Saramago, Carmen, Lima-Silva, Agostinho A., . . . de Melo Bento, Cleonice Alves. (2011). Enhanced Th17 Phenotype in Uninfected Neonates Born from Viremic HIV-1-Infected Pregnant Women. *Journal of Clinical Immunology*, *31*(2), 186-194. doi: 10.1007/s10875-010-9485-3
- Ivanova, E. A., & Orekhov, A. N. (2015). T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int*, *2015*, 327470. doi: 10.1155/2015/327470
- Jacque, J. M., & Stevenson, M. (2006). The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature*, *441*(7093), 641-645. doi: 10.1038/nature04682
- Jennwein, M. F., Abu-Raya, B., Jiang, Y., Alter, G., & Marchant, A. (2017). Transfer of maternal immunity and programming of the newborn immune system. *Semin Immunopathol*, *39*(6), 605-613. doi: 10.1007/s00281-017-0653-x
- Jiang, G., Espeseth, A., Hazuda, D. J., & Margolis, D. M. (2007). c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol*, *81*(20), 10914-10923. doi: 10.1128/JVI.01208-07
- Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Luciw, P. A., & Tjian, R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science*, *232*(4751), 755-759.
- Jordan, A., Defechereux, P., & Verdin, E. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J*, *20*(7), 1726-1738. doi: 10.1093/emboj/20.7.1726
- Kaneda, T., Shiraki, K., Hirano, K., & Nagata, I. (1997). Detection of maternofetal transfusion by placental alkaline phosphatase levels. *J Pediatr*, *130*(5), 730-735.
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, *4*(3), 313-319.
- Kidzeru, E. B., Hesselning, A. C., Passmore, J. A., Myer, L., Gamiieldien, H., Tchakoute, C. T., . . . Jansen, H. B. (2014). In-utero exposure to maternal HIV infection alters T-cell immune



- responses to vaccination in HIV-uninfected infants. *AIDS*, 28(10), 1421-1430. doi: 10.1097/QAD.0000000000000292
- Kirchhoff, Frank. (2021). HIV Life Cycle: Overview. In T. J. Hope, M. Stevenson & D. Richman (Eds.), *Encyclopedia of AIDS* (pp. 1-9). New York, NY: Springer New York.
- Kolte, L., Rosenfeldt, V., Vang, L., Jeppesen, D., Karlsson, I., Ryder, L. P., . . . Dam Nielsen, S. (2011). Reduced thymic size but no evidence of impaired thymic function in uninfected children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr Infect Dis J*, 30(4), 325-330. doi: 10.1097/INF.0b013e3182019bc3
- Koyanagi, A., Humphrey, J. H., Ntozini, R., Nathoo, K., Moulton, L. H., Iliff, P., . . . Group, Zvitambo Study. (2011). Morbidity among human immunodeficiency virus-exposed but uninfected, human immunodeficiency virus-infected, and human immunodeficiency virus-unexposed infants in Zimbabwe before availability of highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*, 30(1), 45-51. doi: 10.1097/INF.0b013e3181ecbf7e
- Lagaye, S., Derrien, M., Menu, E., Coito, C., Tresoldi, E., Mauclore, P., . . . European Network for the Study of In Utero Transmission of, H. I. V. (2001). Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol*, 75(10), 4780-4791. doi: 10.1128/JVI.75.10.4780-4791.2001
- Le Chenadec, J., Mayaux, M. J., Guihenneuc-Jouyaux, C., Blanche, S., & Enquete Perinatale Francaise Study, Group. (2003). Perinatal antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS*, 17(14), 2053-2061. doi: 10.1097/01.aids.0000076321.42412.b4
- Lenasi, T., Contreras, X., & Peterlin, B. M. (2008). Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe*, 4(2), 123-133. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.016
- Lewis, P., Nduati, R., Kreiss, J. K., John, G. C., Richardson, B. A., Mbori-Ngacha, D., . . . Overbaugh, J. (1998). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. *J Infect Dis*, 177(1), 34-39.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., . . . Unicef. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), 2151-2161. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., & Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, 391(6665), 344-345. doi: 10.1038/34812
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135. doi: 10.1155/2012/925135
- Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C., & Glimcher, L. H. (2003). T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7749-7754. doi: 10.1073/pnas.1332767100
- Luzuriaga, K., Gay, H., Ziemniak, C., Sanborn, K. B., Somasundaran, M., Rainwater-Lovett, K., . . . Persaud, D. (2015). Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child. *N Engl J Med*, 372(8), 786-788. doi: 10.1056/NEJMc1413931
- Luzuriaga, K., & Mofenson, L. M. (2016). Challenges in the Elimination of Pediatric HIV-1 Infection. *N Engl J Med*, 374(8), 761-770. doi: 10.1056/NEJMra1505256

- Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., . . . Poeschla, E. M. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*, *314*(5798), 461-464. doi: 10.1126/science.1132319
- Mandelbrot, L., Burgard, M., Teglas, J. P., Benifla, J. L., Khan, C., Blot, P., . . . Rouzioux, C. (1999). Frequent detection of HIV-1 in the gastric aspirates of neonates born to HIV-infected mothers. *AIDS*, *13*(15), 2143-2149.
- Manel, N., Unutmaz, D., & Littman, D. R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol*, *9*(6), 641-649. doi: 10.1038/ni.1610
- Maricato, J. T., Furtado, M. N., Takenaka, M. C., Nunes, E. R., Fincatti, P., Meliso, F. M., . . . Janini, L. M. (2015). Epigenetic modulations in activated cells early after HIV-1 infection and their possible functional consequences. *PLoS One*, *10*(4), e0119234. doi: 10.1371/journal.pone.0119234
- Marinda, E., Humphrey, J. H., Iliff, P. J., Mutasa, K., Nathoo, K. J., Piwoz, E. G., . . . Group, Zvitambo Study. (2007). Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J*, *26*(6), 519-526. doi: 10.1097/01.inf.0000264527.69954.4c
- Marini, B., Kertesz-Farkas, A., Ali, H., Lucic, B., Lisek, K., Manganaro, L., . . . Lusic, M. (2015). Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature*, *521*(7551), 227-231. doi: 10.1038/nature14226
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, *159*(3), 441-452. doi: 10.1083/jcb.200203150
- McNally, L. M., Jeena, P. M., Gajee, K., Thula, S. A., Sturm, A. W., Cassol, S., . . . Goldblatt, D. (2007). Effect of age, polymicrobial disease, and maternal HIV status on treatment response and cause of severe pneumonia in South African children: a prospective descriptive study. *Lancet*, *369*(9571), 1440-1451. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60670-9
- Miles, D. J., Gadama, L., Gumbi, A., Nyalo, F., Makanani, B., & Heyderman, R. S. (2010). Human immunodeficiency virus (HIV) infection during pregnancy induces CD4 T-cell differentiation and modulates responses to Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine in HIV-uninfected infants. *Immunology*, *129*(3), 446-454. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03186.x
- Miller, C. J., Alexander, N. J., Sutjipto, S., Lackner, A. A., Gettie, A., Hendrickx, A. G., . . . Marx, P. A. (1989). Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol*, *63*(10), 4277-4284.
- Monteiro, P., Gosselin, A., Wacleche, V. S., El-Far, M., Said, E. A., Kared, H., . . . Ancuta, P. (2011). Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7. *J Immunol*, *186*(8), 4618-4630. doi: 10.4049/jimmunol.1004151
- Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., & Sundquist, W. I. (2011). ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*, *9*(3), 235-242. doi: 10.1016/j.chom.2011.02.004
- Motamedi, M., Xu, L., & Elahi, S. (2016). Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods*, *437*, 43-52. doi: 10.1016/j.jim.2016.08.002
- Nabel, G., & Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, *326*(6114), 711-713. doi: 10.1038/326711a0
- Nikolaitchik, O. A., Dilley, K. A., Fu, W., Gorelick, R. J., Tai, S. H., Soheilian, F., . . . Hu, W. S. (2013). Dimeric RNA recognition regulates HIV-1 genome packaging. *PLoS Pathog*, *9*(3), e1003249. doi: 10.1371/journal.ppat.1003249

- . *NOM-039-SSA2-2014, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual.* . (2017). México 01/JUNIO/2017
- Noto, A., Procopio, F. A., Banga, R., Suffiotti, M., Corpataux, J. M., Cavassini, M., . . . Pantaleo, G. (2018). CD32(+) and PD-1(+) Lymph Node CD4 T Cells Support Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals. *J Virol*. doi: 10.1128/JVI.00901-18
- Ono, E., Nunes dos Santos, A. M., de Menezes Succi, R. C., Machado, D. M., de Angelis, D. S., Salomao, R., . . . de Moraes-Pinto, M. I. (2008). Imbalance of naive and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz J Med Biol Res*, *41*(8), 700-708.
- Ota, M. O., O'Donovan, D., Marchant, A., Yamuah, L., Harding, E., Jaffar, S., . . . Whittle, H. (1999). HIV-negative infants born to HIV-1 but not HIV-2-positive mothers fail to develop a Bacillus Calmette-Guerin scar. *AIDS*, *13*(8), 996-998.
- Palmeira, P., & Carneiro-Sampaio, M. (2016). Immunology of breast milk. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, *62*(6), 584-593. doi: 10.1590/1806-9282.62.06.584
- Persaud, D., Gay, H., Ziemniak, C., Chen, Y. H., Piatak, M., Jr., Chun, T. W., . . . Luzuriaga, K. (2013). Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N Engl J Med*, *369*(19), 1828-1835. doi: 10.1056/NEJMoa1302976
- Persaud, D., Palumbo, P. E., Ziemniak, C., Hughes, M. D., Alvero, C. G., Luzuriaga, K., . . . Chadwick, E. G. (2012). Dynamics of the resting CD4(+) T-cell latent HIV reservoir in infants initiating HAART less than 6 months of age. *AIDS*, *26*(12), 1483-1490. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283553638
- Piller, S. C., Caly, L., & Jans, D. A. (2003). Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets*, *4*(5), 409-429.
- Pirruccello, S. J., Collins, M., Wilson, J. E., & McManus, B. M. (1989). Age-related changes in naive and memory CD4+ T cells in healthy human children. *Clin Immunol Immunopathol*, *52*(2), 341-345.
- Pollard, V. W., & Malim, M. H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol*, *52*, 491-532. doi: 10.1146/annurev.micro.52.1.491
- Restrepo, C., Rallon, N. I., Carrillo, J., Soriano, V., Blanco, J., & Benito, J. M. (2011). Host factors involved in low susceptibility to HIV infection. *AIDS Rev*, *13*(1), 30-40.
- Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., & Sodroski, J. (1998). A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*, *280*(5371), 1949-1953.
- Rosa, M. C., Lobato, R. C., Goncalves, C. V., Silva, N. M., Barral, M. F., Martinez, A. M., & Hora, V. P. (2015). Evaluation of factors associated with vertical HIV-1 transmission. *J Pediatr (Rio J)*, *91*(6), 523-528. doi: 10.1016/j.jped.2014.12.005
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, *24*, 419-466. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115658
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., & Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med*, *187*(6), 875-883.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., & Lanzavecchia, A. (2000). The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*, *18*, 593-620. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.593
- Schrijvers, R., De Rijck, J., Demeulemeester, J., Adachi, N., Vets, S., Ronen, K., . . . Gijssbers, R. (2012). LEDGF/p75-independent HIV-1 replication demonstrates a role for HRP-2 and

- remains sensitive to inhibition by LEDGINs. *PLoS Pathog*, 8(3), e1002558. doi: 10.1371/journal.ppat.1002558
- Sette, P., Nagashima, K., Piper, R. C., & Bouamr, F. (2013). Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology*, 10, 79. doi: 10.1186/1742-4690-10-79
- Shaw, G. M., & Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). doi: 10.1101/cshperspect.a006965
- Simon, V., & Ho, D. D. (2003). HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat Rev Microbiol*, 1(3), 181-190. doi: 10.1038/nrmicro772
- Slogrove, A. L., Cotton, M. F., & Esser, M. M. (2010). Severe infections in HIV-exposed uninfected infants: clinical evidence of immunodeficiency. *J Trop Pediatr*, 56(2), 75-81. doi: 10.1093/tropej/fmp057
- Thiry, L., Sprecher-Goldberger, S., Jonckheer, T., Levy, J., Van de Perre, P., Henrivaux, P., . . . Clumeck, N. (1985). Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet*, 2(8460), 891-892.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., & Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5), 641-644.
- Tugizov, S. M., Herrera, R., Velupillai, P., Greenspan, D., Soros, V., Greene, W. C., . . . Palefsky, J. M. (2011). HIV is inactivated after transepithelial migration via adult oral epithelial cells but not fetal epithelial cells. *Virology*, 409(2), 211-222. doi: 10.1016/j.virol.2010.10.004
- Tugizov, S. M., Herrera, R., Velupillai, P., Greenspan, D., Soros, V., Greene, W. C., . . . Palefsky, J. M. (2012). Differential transmission of HIV traversing fetal oral/intestinal epithelia and adult oral epithelia. *J Virol*, 86(5), 2556-2570. doi: 10.1128/JVI.06578-11
- UNAIDS. (2017). UNAIDS DATA 2017. Retrieved 05 Jun, 2018, from [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20170720\\_Data\\_book\\_2017\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf)
- Vacunación, Consejo Nacional de. (2017). *Manual de Vacunación México*
- Van de Perre, P., Rubbo, P. A., Viljoen, J., Nagot, N., Tylleskar, T., Lepage, P., . . . Tuailon, E. (2012). HIV-1 reservoirs in breast milk and challenges to elimination of breast-feeding transmission of HIV-1. *Sci Transl Med*, 4(143), 143sr143. doi: 10.1126/scitranslmed.3003327
- Van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F., & Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*, 380(Pt 2), 297-309. doi: 10.1042/BJ20040167
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S. I., Hupe, P., Barillot, E., & Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 9(6), 650-657. doi: 10.1038/ni.1613
- Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., & Mosmann, T. R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*, 14(7), 353-356. doi: 10.1016/0167-5699(93)90235-D
- Weinberger, L. S., Burnett, J. C., Toettcher, J. E., Arkin, A. P., & Schaffer, D. V. (2005). Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell*, 122(2), 169-182. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.006
- Wittner, M., Dunay, G. A., Kummer, S., Bockhorn, M., Hufner, A., Schmiedel, S., . . . Schulze Zur Wiesch, J. (2018). CD32 Expression of Different Memory T Cell Subpopulations in the Blood and Lymph Nodal Tissue of HIV Patients and Healthy Controls Correlates With Immune Activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 77(4), 345-349. doi: 10.1097/QAI.0000000000001622

- Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., . . . Sodroski, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*, *384*(6605), 179-183. doi: 10.1038/384179a0
- Yarchoan, R., Klecker, R. W., Weinhold, K. J., Markham, P. D., Lyerly, H. K., Durack, D. T., . . . et al. (1986). Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet*, *1*(8481), 575-580.
- Ylisastigui, L., Coull, J. J., Rucker, V. C., Melander, C., Bosch, R. J., Brodie, S. J., . . . Margolis, D. M. (2004). Polyamides reveal a role for repression in latency within resting T cells of HIV-infected donors. *J Infect Dis*, *190*(8), 1429-1437. doi: 10.1086/423822
- Zapp, M. L., & Green, M. R. (1989). Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature*, *342*(6250), 714-716. doi: 10.1038/342714a0
- Zhou, M., Halanski, M. A., Radonovich, M. F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D. H., & Brady, J. N. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol*, *20*(14), 5077-5086.