



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA  
SALUD**

**ESTUDIO TRANSVERSAL DEL PAPEL DE LOS INHIBIDORES PERIFÉRICOS DE ACETILCOLINESTERASA  
COMO INMUNOMODULADORES EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES VIVIENDO CON INFECCIÓN  
POR VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

*Presenta*

**Laura Georgina Mendoza Olivas**

*Tutor principal de la tesis*

**Dr. Sergio Iván Valdés Ferrer**

**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

**Ciudad Universitaria, CDMX a diciembre de 2023**



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.

**Agradecimientos:**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para poder realizar este proyecto. También agradezco a mi tutor y maestros que me brindaron su apoyo y enseñanzas a lo largo de este camino. A mi familia por ser siempre pilar en mi formación.**

# Índice

<b>1.</b>	Resumen.....	1
<b>2.</b>	Antecedentes.....	3
<b>3.</b>	Justificación.....	13
<b>4.</b>	Hipótesis.....	14
<b>5.</b>	Objetivos.....	15
<b>6.</b>	Metodología.....	16
<b>7.</b>	Análisis estadístico.....	24
<b>8.</b>	Resultados.....	26
<b>9.</b>	Consideraciones éticas.....	11
<b>10.</b>	Conclusiones.....	34
<b>11.</b>	Referencias.....	36

## Resumen

La infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se caracteriza por activación inmune persistente, producción prolongada de citocinas proinflamatorias, así como por un recambio constante de células T. A pesar de la activación de inmunidad específica mediada por células T durante la infección por VIH, la respuesta es insuficiente para erradicar el virus y a largo plazo resulta deletérea para la homeostasis inmune. En conjunto, tales mecanismos llevan a una caída precipitada en el número de células T CD4<sup>+</sup> y a un fenómeno de inmunosenescencia temprana que condiciona susceptibilidad a infecciones oportunistas en sujetos inmuno-competentes. En especies susceptibles de infección por VIH y virus de la inmunodeficiencia simiana (VIS), la infección aguda causa una viremia aguda temprana seguida de activación y depleción profunda de células T en mucosas y moderada en sangre. Eventualmente hay una disminución profunda en el número de células T CD4<sup>+</sup> circulantes. Algunos homínidos huéspedes naturales del VIS como el mangabey (*Cercocebus atys*) o el mono verde (*Chlorocebus sabaeus*) tienen infección por VIS con alta replicación viral, mas sin disminución del número de células T CD4<sup>+</sup> y, a pesar de la infección persistente, no desarrollan síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Un grupo de pacientes crónicamente infectados por VIH conocido como *progresores lentos*, es capaz de mantener cuentas de células T CD4<sup>+</sup> normales por periodos prolongados incluso sin tratamiento. Estos pacientes suelen tener replicación viral discreta, así como niveles bajos de activación de células T. La terminación de la respuesta inmune representa un mecanismo fundamental para mantener la homeostasis inmunológica y prevenir

el desarrollo de patología, algo que es claro en las enfermedades autoinmunes o en sepsis. Por ende, es probable que en el caso específico del VIH, un menor reconocimiento viral más que acelerar la progresión de la infección, puede ser un actor importante en el control de la infección y el retraso de la progresión de la infección crónica a SIDA. El uso de reguladores neuro-inmunes como estrategia terapéutica en infección por VIH ha sido poco explorado.

Existe una serie de mecanismos para terminar la respuesta inflamatoria. La mayoría de estos son mediados localmente una vez que el estímulo inicial se controla o desaparece. El sistema nervioso tiene mecanismos evolutivos de control de la respuesta inflamatoria tales como el reflejo colinérgico anti-inflamatorio (RCA). Durante la inflamación, el nervio vago puede inhibir la síntesis y liberación de citocinas inflamatorias, con lo que reduce tanto el daño local, como la mortalidad secundaria a inflamación sistémica grave. La estimulación colinérgica química mediante el uso de agonistas nicotínicos ha mostrado efectos prometedores en modelos murinos y celulares. Dado que los agonistas colinérgicos son rápidamente degradados o causan efectos colaterales, nuestro grupo realizó un estudio piloto usando piridostigmina, un inhibidor de Acetilcolinesterasa (ACh-E), en pacientes infectados con VIH, observando que la administración de piridostigmina disminuye la activación y proliferación de células T infectadas por VIH, reduce la producción de interferón (IFN)- $\gamma$  e incrementa la de interleucina (IL)-10. La evidencia preliminar sugiere que la piridostigmina modula la activación y proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> en respuesta a la infección por VIH. Por último, en un estudio piloto abierto en voluntarios crónicamente infectados, con respuesta discordante al tratamiento

encontramos que la adición de piridostigmina a terapia antirretroviral combinada (cART) condujo a un incremento significativo en el número de células T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo, no es claro aún si la administración de piridostigmina mejora las cuentas de células T CD4<sup>+</sup> y la respuesta inflamatoria en pacientes crónicamente infectados por VIH.

En esta tesis, mostramos datos preliminares respecto al efecto de la adición de piridostigmina al tratamiento antiretroviral en personas viviendo con VIH.

## **Antecedentes**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) humana y continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Su prevalencia se estima, a nivel mundial, en 37 millones de personas. Existen dos cepas principales de VIH, siendo el VIH-1 la dominante a nivel mundial. El VIH es un retrovirus, por lo tanto, integra su DNA al genoma del hospedero y por eso es tan difícil de eliminar (Deeks et al., 2015). Otra causa de su alta capacidad de evasión al sistema inmune es la tasa elevada de mutaciones con cada replicación, lo que le confiere una alta variabilidad antigénica y permite a los viriones evadir a los linfocitos T citotóxicos (Overbaugh & Bangham, 2001).

El VIH viaja en los líquidos corporales e ingresa al hospedero al contacto con las mucosas, sangre o mediante heridas de la piel. Una vez dentro del hospedero, el

VIH se une al receptor CD4, que se expresa en la superficie de linfocitos T, monocitos, macrófagos y células dendríticas; sin embargo, el principal blanco son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados. Para poder ingresar a las células del hospedero, los viriones se unen a los correceptores CCR5 (expresado altamente en las células T CD4<sup>+</sup> de las mucosas) y CXCR4 (Deeks et al., 2015; Long et al., 2002).

La característica distintiva de la infección por VIH es la desaparición progresiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las causas de este fenómeno son diversas, entre ellas, la eliminación por efecto directo de la infección y como consecuencia de los fenómenos de activación inmune y senescencia (Maartens et al., 2014). El tracto gastrointestinal es donde ocurre la mayor pérdida de linfocitos T, ya que gran parte de la replicación viral y muerte de estas células ocurre en el tejido linfoide asociado a mucosas del intestino (GALT) por poseer una gran cantidad de células T CD4<sup>+</sup> activadas. La subpoblación más abundante de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en esa localización es la Th17<sup>+</sup> y la inflamación asociada a la eliminación masiva de estas células provoca como efecto colateral el daño de la barrera intestinal, lo que aumenta su permeabilidad y con esto, la traslocación de productos bacterianos a la circulación sistémica (Assimakopoulos et al., 2014; Brenchley et al., 2006). Este daño a la barrera intestinal se recupera mínimamente luego del inicio de la terapia antirretroviral (Mehandru et al., 2007), por lo que juega un papel importante en el estado de inflamación crónica y de senescencia inmunitaria que caracteriza a los pacientes que viven con VIH y en especial, al subgrupo denominado *no respondedores inmunológicos*, llamados así por la incapacidad de alcanzar cifras meta de linfocitos a pesar de una adecuada supresión viral luego de iniciar



tratamiento antirretroviral combinado (Nicastrì et al., 2005). Antes de profundizar en este tema, primero conviene explicar la inmunosenescencia y sus implicaciones a largo y mediano plazo en el estado de salud de los pacientes. La inmunosenescencia se refiere a un fenómeno progresivo del sistema inmune que merma su funcionalidad y se caracteriza por aumento de la susceptibilidad frente a agentes infecciosos, incremento de la incidencia de cáncer y de fenómenos autoinmunitarios y disminución de la inmunogenicidad luego de la vacunación. La inmunosenescencia es consecuencia del envejecimiento, pero también se asocia con estados de inflamación crónica, como la infección por VIH. (Tsoukas, 2014). En personas viviendo con VIH, la activación inmune crónica es la causa más probable del envejecimiento prematuro del sistema inmune, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad y a la incapacidad de regenerar los linfocitos T perdidos (Appay & Kelleher, 2016). Estas conclusiones se basan en diferentes estudios que han demostrado que las células del sistema inmune de estos pacientes expresan altamente marcadores de activación que se asocian con progresión de la enfermedad, como CD38 y HLA-DR, en las células T (Deeks et al., 2004; Hazenberg et al., 2003; Kestens et al., 1994) y CD11b, en los monocitos (Hearps et al., 2012).

La consecuencia molecular de esta inflamación crónica es la expresión de los inhibidores de puntos de control inmunitario o *checkpoints*. Esta es una respuesta adaptativa de las células T frente a condiciones de activación crónica y consiste en la sobreexpresión de moléculas o inhibidores de *checkpoint*, como PD1, CTLA-4 o LAG3 para inducir un estado de anergia. Esto se debe a que los inhibidores de *checkpoint* compiten con CD28 para unirse a PDL-1, expresado en las células

presentadoras de antígenos. De esta manera, el receptor de la célula T (TCR) es estimulado en ausencia de la coestimulación de CD28, lo que disminuye la fosforilación de Zp-70 y Lck en la región proximal del TCR y reduce también la movilización intracelular de calcio, impidiendo así la expresión de los factores de transcripción NFAT y CREB. En conjunto, esto causa el estado de anergia de las células T con fenotipo de agotamiento inmune, observado en las personas que viven con VIH y en los pacientes con cáncer (Fenwick et al., 2019).

Este estado de inflamación persistente se debe a una combinación de factores, entre los que se encuentran la ya mencionada traslocación intestinal de productos bacterianos por daño a la barrera intestinal, la concurrencia de otras infecciones virales (sobre todo, de citomegalovirus), a la viremia residual proveniente de las células T de memoria infectadas, y a la pérdida de células T reguladoras por fibrosis irreversible del timo y de otros órganos linfoides. Esto último, también contribuye a la incapacidad de regenerar las células T perdidas por la infección (Naeger et al., 2010; Schacker et al., 2002).

Las alteraciones específicas de las células T que caracterizan al envejecimiento inmune, como disminución de la capacidad de proliferación, reducción del índice CD4/CD8 y de la proporción linfocitos naive/de memoria y descenso del repertorio de células T, también se observan en los pacientes que viven con VIH (Kalayjian et al., 2003).

Los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios, como los interferones (IFN), interleucinas (IL)-1 $\beta$  y -6, así como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), se elevan incluso en pacientes que reciben tratamiento antirretroviral (Neuhaus et al.,

2010). Las concentraciones plasmáticas de estos mediadores de la inflamación pueden servir para predecir desenlaces y se ha observado que, mientras mayor sean los niveles en plasma, más mórbido es el pronóstico de los pacientes (Tenorio et al., 2014).

#### No respondedores inmunológicos

Lo esperado en pacientes que inician terapia antirretroviral es que, a medida que se suprime la replicación viral, el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> incrementa. Este aumento ocurre en dos fases: la primera es rápida y sucede principalmente por reducción de la apoptosis y por redistribución de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria; la segunda fase es más lenta y se debe a la generación de nuevas células T CD4<sup>+</sup> naive (Pakker et al., 1998). Una adecuada respuesta inmune al tratamiento antirretroviral combinado, estrictamente implicaría alcanzar >500 células T CD4<sup>+</sup> por  $\mu$ L (Antiretroviral-Therapy-Cohort-Collaboration, 2008). Sin embargo, hasta el 20% de los pacientes que viven con VIH no logran restaurar el número de células CD4<sup>+</sup> a pesar de recibir un tratamiento adecuado, durante al menos 6 meses, además de lograr suprimir la replicación viral. Este fenómeno se conoce como respuesta discordante y a los pacientes que la presentan se les conoce como no respondedores inmunológicos (Kelly et al., 2016; Piketty et al., 1998). Aún no existe un consenso que establezca una definición operativa formal de no respuesta inmune al tratamiento antirretroviral. La más utilizada es la que la define como <350 células/ $\mu$ L luego de  $\geq$  24 meses de supresión viral (Rb-Silva et al., 2019).

El grado de activación inmune se correlaciona con el número de células T CD4<sup>+</sup>. Se ha observado que el incremento de la activación y proliferación de células T CD4<sup>+</sup>

se asocia con falla inmunitaria. Las células T de los pacientes con respuesta inmune discordante, expresan en mayor proporción los marcadores HLA-DR y CD38. Además, en los pacientes con respuesta discordante, hay menor número absoluto de células T CD4 maduras y de células T CD8 naive (Lederman et al., 2011). De igual forma, la reconstitución inmune inadecuada se asocia con mayor expresión de marcadores de agotamiento, como PD1, en los linfocitos T (Nakanjako et al., 2011). Este grupo de personas tiene mayor riesgo de progresión de la enfermedad y de desarrollar enfermedades no asociadas con el SIDA, como padecimientos cardiovasculares, metabólicos y neoplásicos. Esto les confiere mayor mortalidad cuando se les compara con aquellos que montan una respuesta completa (Engsig et al., 2010).

Si bien la definición más usada para definir la respuesta discordante o falta de respuesta inmune al tratamiento usa el punto de corte de  $<350$  células/ $\mu\text{L}$ , se ha observado que, si se utiliza la cifra de 400 células/ $\mu\text{L}$ , se pueden diferenciar más claramente el fenotipo inmunitario de los pacientes no respondedores inmunológicos de los que montan una respuesta completa, haciéndose evidente que los primeros expresan más marcadores de activación y agotamiento en sus células T CD4<sup>+</sup> (Perez-Santiago et al., 2016)

Se han realizado múltiples ensayos clínicos para revertir la activación inmune buscando un aumento del número de células T CD4<sup>+</sup>. Se han evaluado diferentes tipos de estrategias, como promotores de la reparación mucosal del tejido linfoide asociado a mucosas en intestino (GALT, por sus siglas en inglés), antivirales para tratar las coinfecciones, agentes para reducir la activación de las células dendríticas

plasmocitoides, e incluso inmunomoduladores, como estatinas, minociclina, leflunomida e inmunoglobulina intravenosa. Sin embargo, no se han demostrado cambios en los marcadores de activación y estos ensayos no han tenido el poder estadístico suficiente para evaluar desenlaces clínicos (Rajasuriar et al., 2013). No obstante, existe un medicamento que ha sido probado en varios estudios, en los que ha logrado disminuir la activación y expresión de marcadores de activación de las células T y ha inducido la recuperación del número de células CD4<sup>+</sup> en pacientes que viven con VIH (Robinson-Papp et al., 2019; S. Valdés-Ferrer et al., 2009; S. I. Valdés-Ferrer et al., 2017). Este fármaco se llama piridostigmina y su mecanismo inmunomodulador propuesto se basa en el reflejo inflamatorio, que se explica a continuación.

## **Reflejo inflamatorio**

**Descripción de la vía:** El sistema nervioso central participa en la modulación de la respuesta inflamatoria. Además de la caracterización de la interacción de las citocinas con diferentes partes del sistema nervioso central (Sternberg, 1997), se ha descrito un reflejo mediado por el nervio vago en el que se regula la inflamación, llamado reflejo inflamatorio (Tracey, 2002).

La presencia de esta vía fue demostrada en el año 2000 con los resultados de los experimentos del grupo de Kevin Tracey. En ellos, se demostró que la presencia del nervio vago y la estimulación de receptores nicotínicos con acetilcolina y nicotina, eran elementos necesarios para disminuir la inflamación sistémica y la mortalidad

de ratas a las que se les indujo choque séptico (Borovikova et al., 2000). Los trabajos realizados años después, han permitido caracterizar a detalle esta vía. En condiciones de inflamación, las ramas eferentes del nervio vago liberan acetilcolina para estimular receptores nicotínicos  $\alpha 7$  (R- $\alpha 7$ nACh) ubicados en el nervio esplénico (Huston et al., 2006; Rosas-Ballina et al., 2008). El nervio esplénico, luego de hacer sinapsis con fibras eferentes del nervio vago, se comunica con células T CD4<sup>+</sup> residentes del bazo que expresan receptores adrenérgicos  $\beta$ -2, así como a la enzima colin-acetiltransferasa (ChAT) (Cox et al., 2019; Rosas-Ballina et al., 2011). La enzima ChAT permite que este tipo de células T sintetizen y liberen ACh, la cual se une a los receptores  $\alpha 7$ -nACh-R de la superficie de los macrófagos (H. Wang et al., 2003). Esta señalización causa que los macrófagos supriman la producción de mediadores de la inflamación (Borovikova et al., 2000; Lehner et al., 2019; Pavlov & Tracey, 2017). De esta manera, se consigue el efecto inmunomodulador observado en los trabajos realizados en modelos murinos de sepsis, isquemia-reperfusión y de obesidad (Lehner et al., 2019; Satapathy et al., 2011; Yeboah et al., 2008; Zaghloul et al., 2017).

**Aplicaciones de la inducción del reflejo inflamatorio:** El reflejo inflamatorio se puede inducir al estimular al nervio vago, eléctrica o químicamente. La utilidad clínica de la inducción de esta vía antiinflamatoria se ha evaluado en ensayos clínicos, en los que se han reclutado pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn. En estos ensayos, la estimulación eléctrica del nervio vago mediante dispositivos electrónicos implantables ha logrado reducir la concentración de marcadores de inflamación y

ha logrado mejorar desenlaces clínicos (Koopman et al., 2016; Sinniger et al., 2020). De igual forma, la estimulación farmacológica del reflejo inflamatorio con agonistas colinérgicos ha mostrado resultados favorables en estudios hechos en modelos celulares y murinos de inflamación (Lehner et al., 2019; Rosas-Ballina et al., 2015). Existe una tercera forma de inducir el reflejo inflamatorio, aunque indirecta. Esto se puede lograr al incrementar la biodisponibilidad de la acetilcolina, el neurotransmisor clave de esta vía. Existen fármacos cuyo mecanismo de acción es justamente ese: los inhibidores de la acetilcolinesterasa. Estos medicamentos son de uso común en la práctica clínica, y entre los pacientes que se benefician de ellos, están los adultos mayores con enfermedad de Alzheimer y otras demencias, los que padecen miastenia gravis y aquellos pacientes con disautonomía (Gilhus & Verschuuren, 2015; Mayeux, 2010; O'Brien & Thomas, 2015; Querfurth & Laferla, 2018; Singer et al., 2006). La evidencia derivada de los estudios hechos en modelos murinos en los que se observa su eficacia en el tratamiento de la sepsis y de otras formas de inflamación grave (Bricher Choque et al., 2021; Rosas-Ballina et al., 2015; Satapathy et al., 2011; Zaghloul et al., 2017), sugiere que los fármacos inhibidores de acetilcolinesterasa potencialmente podrían usarse como inmunomoduladores en pacientes con síndromes de respuesta inflamatoria sistémica. En esta familia de medicamentos se encuentra la piridostigmina, cuyo efecto inmunomodulador ya ha sido evaluado. Como ya ha sido mencionado, su uso en modelos murinos de síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (SIRA) ha logrado reducir la inflamación pulmonar y sistémica, lo que se ha traducido en disminución de la mortalidad (Bricher Choque et al., 2021; Pinheiro et al., 2021; Su et al., 2010). En cuanto a su uso como modulador de la inflamación en modelos de enfermedad

crónica, la piridostigmina ha demostrado reducir la concentración de marcadores inflamatorios en el plasma de pacientes viviendo con VIH (Robinson-Papp et al., 2019). Además, en estudios exploratorios se ha observado reducción de la activación de las células T (S. Valdés-Ferrer et al., 2009) y aumento significativo del número absoluto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la sangre periférica de pacientes con respuesta discordante (S. I. Valdés-Ferrer et al., 2017).

Más recientemente, se observó que la adición de piridostigmina al manejo médico convencional de pacientes hospitalizados con COVID-19 grave, redujo la mortalidad en un 11.7% en términos absolutos (Fragoso-Saavedra et al., 2022).



## **Definición del problema y justificación**

Casi una cuarta parte de los pacientes con VIH que recibe tratamiento antirretroviral, principalmente aquellos que inician el manejo de forma tardía, tiene una respuesta inmune discordante. Los pacientes con respuesta inmune discordante tienen más probabilidad de progresión de la enfermedad y muerte. La activación inmunitaria crónica provoca agotamiento inmune celular y ambos fenómenos se relacionan con disminución en la capacidad regenerativa de las células T CD4<sup>+</sup>. El reflejo colinérgico antiinflamatorio es una vía estimulable farmacológicamente y efectiva para modular la respuesta inflamatoria aguda y crónica.

## **Hipótesis**

La adición de piridostigmina al tratamiento antirretroviral de personas viviendo con VIH y respuesta inmune discordante incrementará el número de células T CD4<sup>+</sup> y disminuirá marcadores solubles y celulares de activación y agotamiento inmunitarios.

# **Objetivos**

## **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la administración de piridostigmina en el número de células T y en marcadores celulares y solubles de activación en personas viviendo con VIH y respuesta inmune discordante.

## **Objetivos específicos**

1. Evaluar el cambio en el número de células T de pacientes con respuesta inmune discordante después de recibir bromuro de piridostigmina
2. Medir el cambio en la expresión de marcadores de activación y agotamiento en células T de pacientes con respuesta inmune discordante después de recibir bromuro de piridostigmina
3. Medir el cambio en la concentración plasmática de marcadores solubles de inflamación

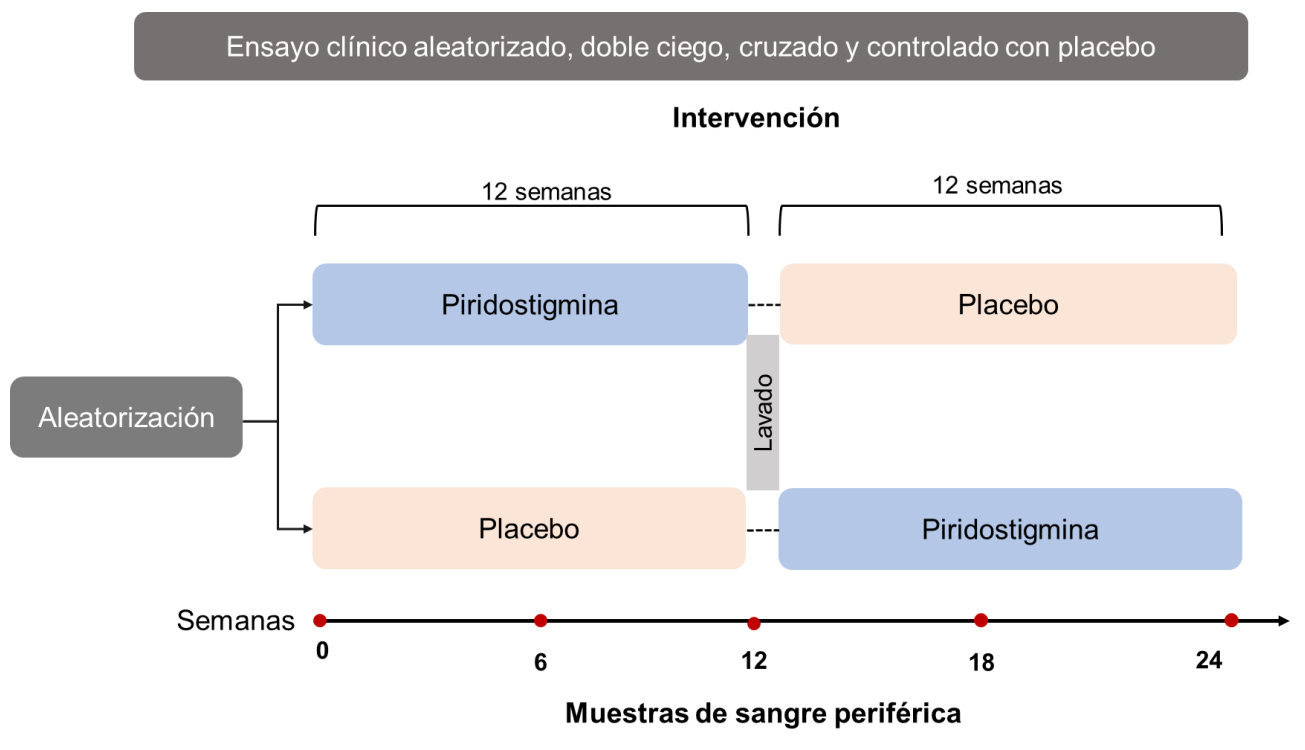
## METODOLOGÍA

### **Objetivos, diseño del estudio y centros participantes:**

Para evaluar el efecto de la administración de piridostigmina en el número de células T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y en los niveles de marcadores celulares y solubles de activación y agotamiento inmunes en personas viviendo con VIH y respuesta inmune discordante, llevamos a cabo un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo.

En este estudio, los participantes fueron aleatorizados y asignados en una proporción 1:1 para recibir una dosis de 180 mg de piridostigmina por vía oral cada día o un placebo idéntico administrado por la misma vía durante 12 semanas. Al finalizar este período, los pacientes cambiaron de brazo terapéutico (entrecruzamiento o *crossover*) para recibir placebo, si iniciaron con piridostigmina y placebo, si empezaron en el grupo de piridostigmina. En cada visita de seguimiento, se evaluó el apego al tratamiento, y se aplicaron cuestionarios de síntomas para detectar efectos adversos del tratamiento asignado. Además, se tomaron muestras de sangre periférica para corroborar la carga viral, el número total de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y evaluar el agotamiento celular y la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de los participantes mediante el análisis por citometría de flujo (**Figura 1**).

Los participantes con respuesta discordante fueron definidos como aquellos personas viviendo con VIH, concentraciones plasmáticas indetectables de RNA viral en los últimos 24 meses y  $<400$  células T CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ L después de, al menos, 24 meses de iniciar tratamiento antirretroviral combinado (Perez-Santiago et al., 2016). El reclutamiento de los participantes se llevó a cabo en la Clínica de Inmunoinfectología, ubicada dentro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Esta clínica especializada cuenta con personal de enfermería, psicología y médico que se dedica a cubrir las necesidades asistenciales de las personas que viven con VIH.



**Figura 1. Diseño general del estudio**

**Participantes:**

Los participantes fueron adultos (personas de 18 años o más) con infección por VIH y respuesta discordante. La respuesta discordante se definió como concentraciones plasmáticas indetectables de RNA viral en los últimos 24 meses y  $<400$  células T CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ L después de, al menos, 24 meses de iniciar tratamiento antirretroviral combinado (Perez-Santiago et al., 2016). Además, los pacientes incluidos debían aceptar participar y firmar el consentimiento informado.

**Criterios de exclusión:**

Los pacientes que presentaron, al menos uno de los siguientes criterios, fueron excluidos del estudio:

1. Alergia a la piridostigmina.
2. En caso de ser mujer, embarazo o lactancia.
3. Tabaquismo activo o  $<6$  meses de haber suspendido el consumo.
4. Uso de parches, goma de mascar o cualquier otro producto con nicotina.
5. Enfermedades infecciosas o neoplásicas activas
6. Historia de nuevos eventos definitivos de SIDA durante el tratamiento antirretroviral.

7. Haber recibido quimioterapia, radioterapia, inmunosupresores o inmunomoduladores (incluyendo esteroides) en los 28 días anteriores al inicio del estudio
8. Participación en ensayos clínicos de cualquier índole en los 28 días precedentes.
9. Necesidad de tratamiento antifímico.
10. Incapacidad de cualquier tipo para seguir o cumplir con las intervenciones de protocolo.

Es importante señalar que todos los pacientes aceptaron participar después de recibir información clara y completa y que todos otorgaron su consentimiento por escrito. El protocolo del ensayo clínico fue aprobado por los comités de ética en investigación del INCMNSZ (identificador INF-1873).

## **Procedimientos**

### **Aleatorización y enmascaramiento:**

Los pacientes fueron aleatorizados con una proporción 1:1 (un paciente en el grupo placebo por un paciente en el grupo que recibiría piridostigmina), siguiendo la estrategia de aleatorización en bloques, no estratificada. Para ello, utilizamos el recurso en línea [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org) y se crearon 15 bloques con cuatro participantes en cada uno.

La preparación, el empacamiento, el enmascaramiento y el etiquetamiento de las cápsulas con piridostigmina y con placebo —elaborado a partir de almidón de grado

farmacológico—, fueron llevados a cabo por personal entrenado de la farmacia hospitalaria del centro reclutador.

Los participantes fueron reclutados y asignados a los brazos terapéuticos por los investigadores. A lo largo del estudio, participantes, personal de los hospitales y los investigadores permanecieron cegados a la asignación de tratamientos hasta la finalización de las fases de intervención y seguimiento. No hubo una evaluación formalizada del enmascaramiento.

### **Intervenciones:**

Después de haber sido aleatorizados y asignados, los participantes recibieron por vía oral, ya fuera una cápsula de 180 mg al día de piridostigmina o una cápsula idéntica de placebo. Es importante mencionar que las cápsulas del estudio se administraron como medida adicional al tratamiento antirretroviral combinado prescrito por su infectólogo tratante.

La adherencia al tratamiento fue evaluada cada seis semanas mediante dos métodos: el primero, un diario de adherencia terapéutica en el que los participantes anotaron la hora a la que tomaban el tratamiento asignado cada día; el segundo instrumento fue un formato de contabilidad de medicamento, el cuál era llenado por personal entrenado en cada visita de seguimiento. En cada celda se registraba la cantidad de cápsulas dispensadas en cada visita y la cantidad de cápsulas retornadas tras seis semanas de tratamiento. Después de registrar estos datos, se calculaba el porcentaje de apego usando la siguiente fórmula: apego = [(número de



cápsulas dispensadas – número de cápsulas retornadas) / (días transcurridos x número de tabletas a tomar por día)] x 100.

### **Desenlaces y mediciones:**

Antes de iniciar el tratamiento y cada seis semanas en las visitas de seguimiento, se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica de los participantes para realizar las siguientes mediciones:

### **Carga viral:**

Un aspecto importante que se vigiló cuidadosamente durante todo el estudio fue que los participantes mantuvieran el estado de supresión viral y permanecieran indetectables. Para ello, la sangre obtenida en cada muestra fue enviada al laboratorio de microbiología del INCMNSZ para la detección de la carga viral del VIH por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Este es el mismo método usado para detectar las copias virales en el seguimiento de los pacientes de la Clínica de Inmunoinfectología.

### **Citometría de flujo:**

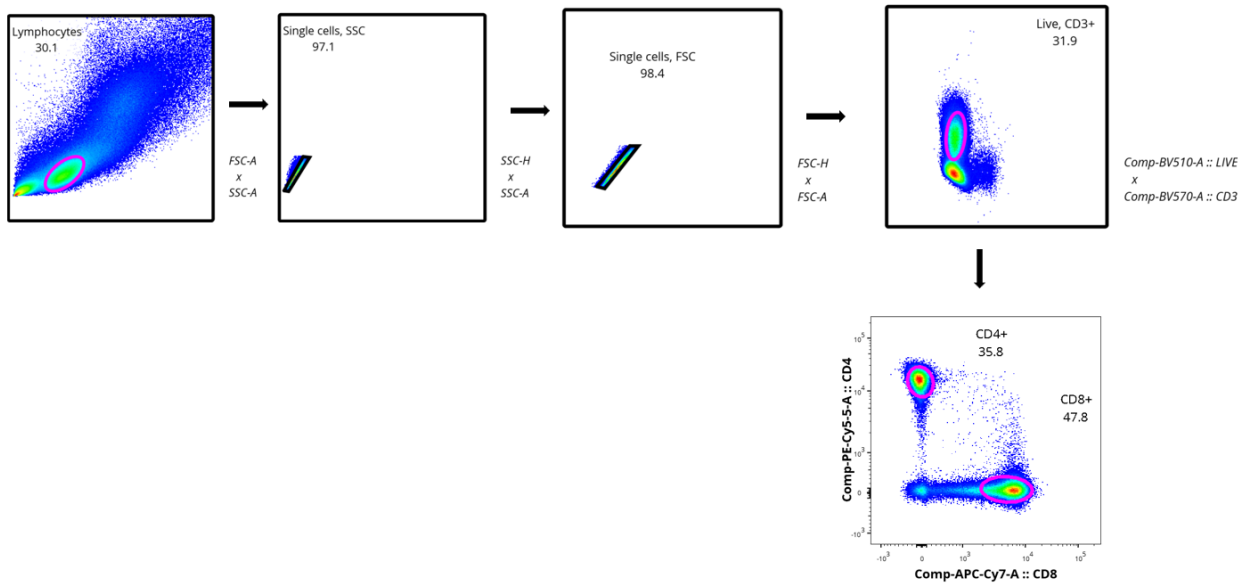
Para la tinción y análisis por citometría de flujo, se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) usando el método de centrifugación de gradiente de densidad con *Lymphoprep* (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá).

Se diseñaron tres paneles de anticuerpos intra- y extracelulares para evaluar diferentes aspectos de las células T: activación y agotamiento. En todos los paneles, se lavaron un millón de PBMC con PBS y se centrifugaron a 1600 revoluciones por minuto (RPM). Se utilizó como bloqueador el anticuerpo Human TruStain FcX (cat. 422302, Biolegend) y se incubaron a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron a 37°C con el anticuerpo CCR7 (BD Biosciences). Inmediatamente después, se agregó el anticuerpo fluorescente de viabilidad Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences) y se incubó a temperatura ambiente. Luego, se agregó una mezcla de anticuerpos de superficie diluidos en buffer de tinción *Cell staining buffer* (Biolegend) que contenía CD3 (BD Biosciences), CD4 (BD Biosciences) y CD8 (BD Biosciences). Para identificar las subpoblaciones de linfocitos T (además de CCR7), en esta mezcla también se usaron los anticuerpos de superficie CD45RA (BD Biosciences) en el panel de activación y CD45RO (BD Biosciences) para el panel de agotamiento. La mezcla de anticuerpos de superficie contenía, además, HLADR y CD38 en el panel de activación y PD-1 en el de agotamiento. Luego de incubarse a 4° C, las células teñidas se centrifugaron resuspendidas en buffer de tinción a 1600 RPM. Por último, las células se fijaron con formalina al 1% en PBS.

Las PBMC teñidas y fijadas fueron adquiridas en un sistema BD FACS Fusion usando software FACS DIVA (v8.0) y se analizaron con el software FlowJo v10.8.0.

La expresión de los marcadores activación y agotamiento se midieron en las células T totales y en las subpoblaciones de centrales de memoria (TCM) y efectoras de memoria (TEM). Para lograr diferenciarlas, se utilizaron los anticuerpos CCR7 y

CD45RA y -RO. Para en análisis, se utilizó la siguiente estrategia general de *gating* (figura 2):



**Figura 2. Estrategia general de analisis (*gating*)**

**Eventos adversos:**

Los eventos adversos fueron evaluados en cada visita de seguimiento mediante un cuestionario aplicado por los investigadores. Los síntomas incluidos en el cuestionario fueron los que más frecuentemente se asocian al uso de piridostigmina, según la literatura médica, como dolor abdominal, diarrea, sialorrea, diaforesis o incontinencia urinaria. Se estableció *a priori*, que el desenmascaramiento estaría permitido en caso de presentarse eventos adversos graves.

**Otras variables:**

Recabamos información demográfica de los participantes al inicio de su participación, incluyendo sexo, edad, comorbilidades (incluyendo diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, obesidad, enfermedades cardiovasculares, pulmonares o cualquier enfermedad crónica), así como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de infección por VIH al reclutamiento, desde el inicio de terapia antirretroviral combinada (TARc) al reclutamiento, el número de células T CD4<sup>+</sup> al iniciar TARc y al reclutamiento y el nadir de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

## **Análisis estadístico**

### **Cálculo de tamaño de muestra:**

Puesto que se trató de un estudio piloto (de prueba de concepto), se calculó un tamaño de muestra de 60 participantes (30 por grupo) con base en las recomendaciones de Connelly, Hertzog y Julious; es decir, al menos 10% del tamaño de muestra calculado (296 por grupo) si se tratara de un estudio aleatorio (Hertzog, 2008).

### **Desenlaces clínicos:**

Realizamos un análisis por protocolo para el desenlace primario (número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> durante la fase de placebo contra el período en el que recibieron piridostigmina), por lo que se incluyeron a todos los pacientes que fueron aleatorizados y que cumplieron con ambas fases del estudio, es decir, que participaron en ambos brazos terapéuticos. Como desenlaces secundarios,

evaluamos las diferencias en el porcentaje de células T que expresaron marcadores de agotamiento y activación inmune durante ambos períodos de intervención.

La magnitud del efecto de la piridostigmina en los desenlaces primario y secundarios se estimó con el cambio intraindividual en los valores antes mencionados, calculada como la diferencia de la magnitud de la medición al final del tratamiento con piridostigmina menos la del final del periodo con placebo. Las diferencias se compararon usando la prueba t con valores pareados y el resultado se expresó como la media de las diferencias.

El análisis estadístico se realizó con los programas Prism GraphPad, versión 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA). Este estudio está registrado en el sitio de internet ClinicalTrials.gov, con número de identificación NCT03312244

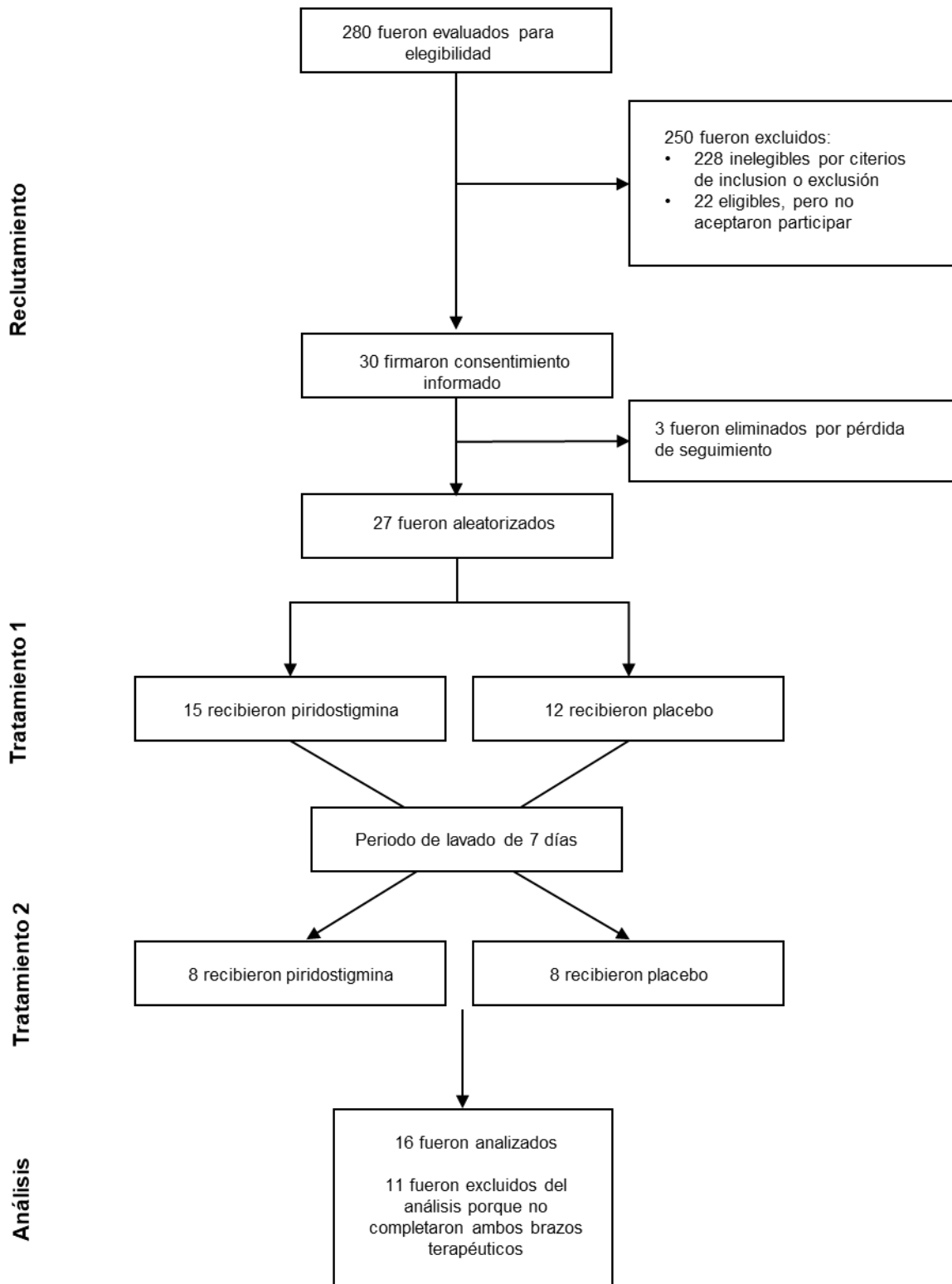
## Resultados

### Participantes:

Entre el 15 de agosto de 2019 y el 25 de febrero de 2020, evaluamos a 280 pacientes para elegibilidad. De ellos, 250 fueron excluidos por las siguientes razones: 228 porque no cumplieron todos los criterios de inclusión o presentaron alguno de exclusión y 22 porque no aceptaron participar en el estudio. Un total de 30 pacientes aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado. De ellos, tres fueron eliminados por pérdida de seguimiento. Veintisiete pacientes fueron aleatorizados para ser asignados a una de las dos intervenciones terapéuticas iniciales. Todos ellos recibieron al menos una dosis del tratamiento de la primera fase que se les asignó. Dieciséis pacientes fueron incluidos en el análisis. Los 11 restantes, fueron excluidos porque no recibieron el tratamiento de la segunda fase del estudio, ya que el seguimiento fue interrumpido por la pandemia de COVID-19 **(Figura 3)**.

La mediana de edad de los participantes fue de 45 años (rango intercuartílico [IQR], 37.25–50.5) años y el 87.5% fueron hombres. La condición preexistente más común al reclutamiento fue dislipidemia, presente en el 37.5% de participantes. El 18.75% de los participantes tenía una coinfección viral por virus de hepatitis B o C inactiva, es decir, con carga viral indetectable y sin tratamiento activo. La mediana de células T CD4<sup>+</sup> cuando los pacientes fueron diagnosticados con infección por VIH fue de 44 células/ $\mu$ L (IQR, 8 – 149), mientras que cuando fueron reclutados para este ensayo clínico, su mediana fue de 290 células/ $\mu$ L (IQR, 190.8 – 344.3) **(Tabla 1)**.





**Figura 3. Diagrama de flujo del reclutamiento de los participantes.**



**Tabla 1. Características demográficas y clínicas basales de los participantes**

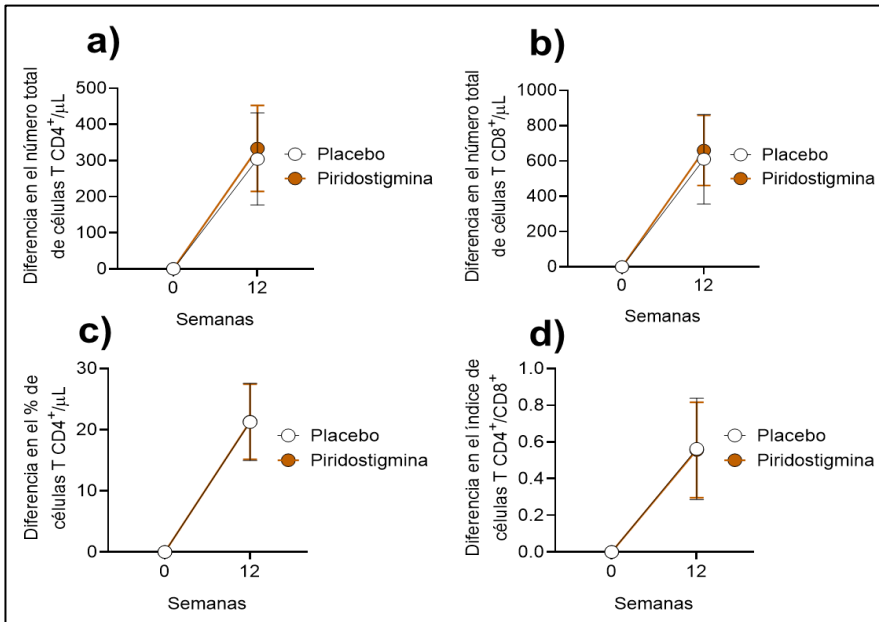
<b>Variable</b>	<b>Total (n = 16)</b>
<b>Sexo asignado al nacimiento, n (%)</b>	
Hombre	14 (87.5)
Mujer	2 (12.5)
Edad (años), mediana (IQR)	45 (37.25 – 50.5)
<b>Condición previa coexistente, n (%)</b>	
Diabetes tipo 2	3 (18.75)
Hipertensión arterial sistémica	0 (0)
Enfermedad cardiovascular	1 (6.25)
Dislipidemia	6 (37.5)
Coinfecciones virales*	3 (18.75)
<b>Infección por VIH</b>	
Edad (años) al diagnóstico, mediana (IQR)	32 (28 – 42.5)
Células T CD4+ (número/ $\mu$ L) al inicio del primer tratamiento antirretroviral, mediana (IQR)	44 (8 - 149)
Células T CD4+ (número/ $\mu$ L) al reclutamiento, mediana (IQR)	290 (190.8 – 344.3)
<b>Marcadores de activación y agotamiento inmunes, mediana (IQR)</b>	
CD4+ HLA-DR+ CD38+ (%)	1.85 (0.62 – 8.91)
CD4+ PD-1+ (%)	85.15 (81.85 – 88.28)

\*Las coinfecciones reportadas en los pacientes fueron por los virus de hepatitis C y B. En todos los participantes, las coinfecciones se encontraban inactivas (sin tratamiento y con cargas virales indetectables)

Dieciséis (59.2%) participantes de los 27 aleatorizados, recibieron las dos intervenciones terapéuticas como fue planeado; 11 (40.7%) no recibieron el segundo periodo de tratamiento, ya que el seguimiento fue imposibilitado por el cierre y reconversión de la sede hospitalaria en la que se llevó el reclutamiento por la pandemia de COVID-19. Dos participantes, durante el periodo en el que recibieron piridostigmina, presentaron efectos adversos leves (diarrea, dolor abdominal, cefalea), que no ameritaron la suspensión del medicamento. Todos los pacientes permanecieron con cargas virales indetectables durante su seguimiento.

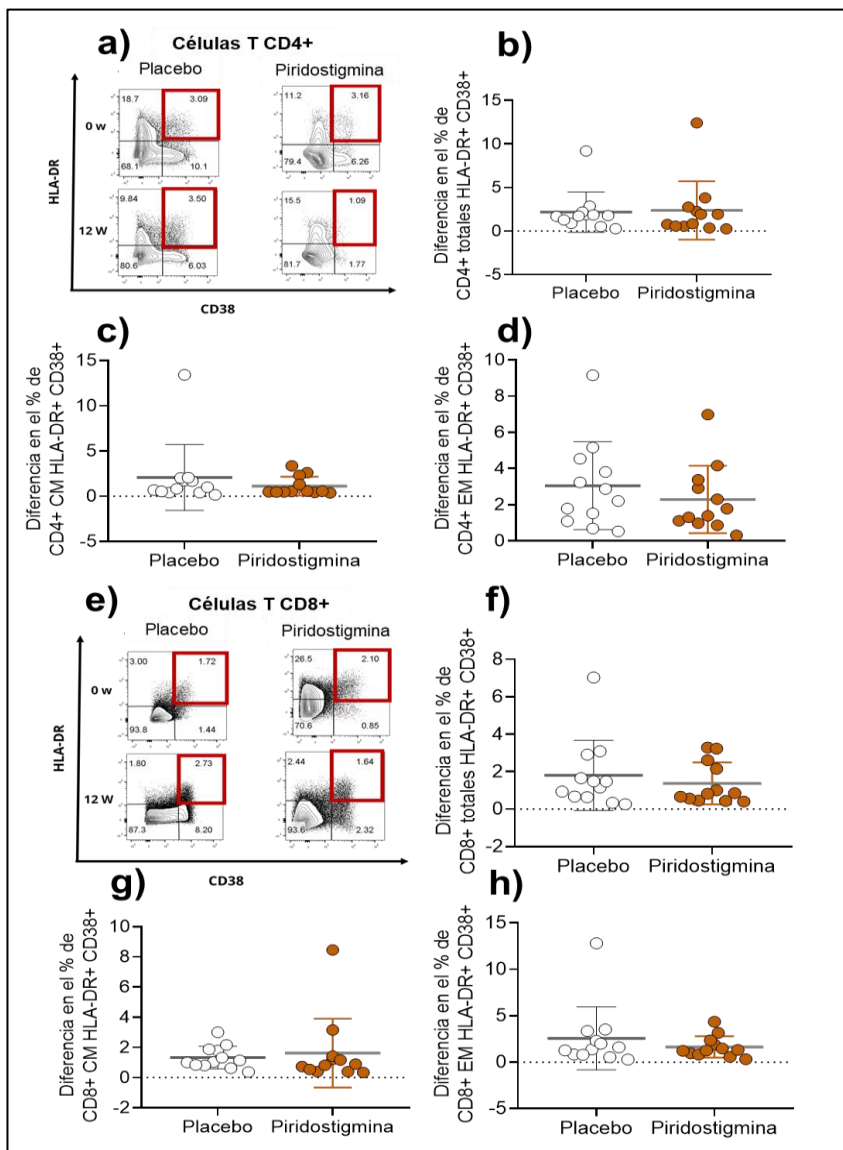
### **Desenlaces**

El efecto del tratamiento con piridostigmina en el número total de células T CD4<sup>+</sup> se midió mediante la diferencia intraindividual en el número total de éstas al final de cada periodo. La media de la diferencia en el número total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> luego de finalizar el tratamiento con piridostigmina fue de 29.38 (CI -9.82 – 68.58,  $p = 0.1$ ) **(Figura 4a)**. También se evaluó el efecto de la piridostigmina en el número total de células T CD8<sup>+</sup>, cuya media de la diferencia fue de 50 (CI -37.51 – 137.5,  $p = 0.2$ ) **(Figura 4b)**. El índice CD4:CD8 (media de las diferencias 0.08, CI -0.05 – 0.04,  $p = 0.7$ ) y el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con respecto al de linfocitos totales (media de las diferencias 0.03, CI -1.58 – 1.66,  $p = 0.9$ ) también se midieron como desenlaces secundarios **(Figura 4c y d)**. En ninguno se observaron cambios significativos al finalizar las 12 semanas de tratamiento con piridostigmina.

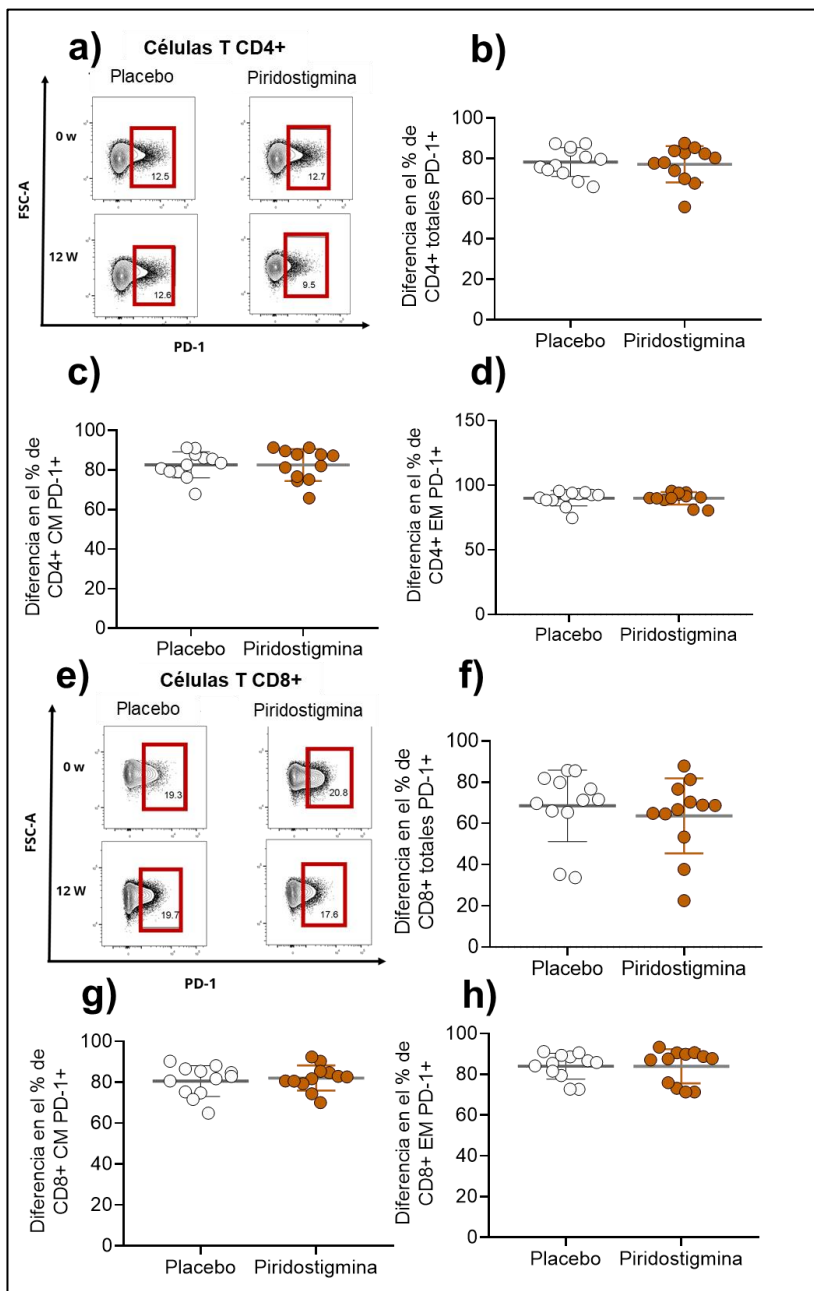


**Figura 4. Diferencia en el número de células T luego del tratamiento con piridostigmina: a) muestra la diferencia intraindividual en el número total de células T CD4<sup>+</sup> al final de cada periodo; b) la diferencia en el número total de células T CD8<sup>+</sup>; c) la diferencia en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> con respecto al total de linfocitos; y, d) la diferencia en el índice de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Para calcular el efecto del tratamiento se utilizó la prueba *t* de Student para muestras pareadas. Los datos se muestran como la media ± SD.**

Después de completar el tratamiento con piridostigmina, no se observaron diferencias en la media de la expresión del fenotipo de activación (HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>) en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totales (0.19, CI -2.1 – 2.52; -0.43, CI -1.45 – 0.58), en las centrales de memoria (CM) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (-0.95, CI -2.85 – 0.95; 2.34, CI -1.19 – 1.78) ni en las efectoras de memoria (EM) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (-0.76, CI -2.63 – 1.1; -0.91, CI -3.14 – 1.31) (**Figura 5**).



**Figura 5. Diferencia en el porcentaje de células T activadas luego del tratamiento con piridostigmina: a y e) muestra la estrategia de análisis y *gating* de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente, con fenotipo de activación (HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>); b – d) muestra la diferencia en el porcentaje de expresión de HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> en las células T CD4<sup>+</sup> totales, centrales de memoria (CM) y efectoras de memoria (EM), respectivamente; f – h) muestra la diferencia en el porcentaje de expresión de HLA-DR<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> en las células T CD8<sup>+</sup> totales, centrales de memoria (CM) y efectoras de memoria (EM), respectivamente. Para calcular el efecto del tratamiento se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas. Los datos se muestran como la media ± SD.**



**Figura 6. Diferencia en el porcentaje de células T agotadas luego del tratamiento con piridostigmina: a y e) muestra la estrategia de análisis y ventaneo de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente, con fenotipo de agotamiento (PD-1<sup>+</sup>); b – d) muestra la diferencia en el porcentaje de expresión de PD-1<sup>+</sup> en las células T CD4<sup>+</sup> totales, centrales de memoria (CM) y efectoras de memoria (EM), respectivamente; f – h) muestra la diferencia en el porcentaje de expresión de PD-1<sup>+</sup> en las células T CD8<sup>+</sup> totales, centrales de memoria (CM) y efectoras de memoria (EM), respectivamente. Para calcular el efecto del tratamiento se utilizó la prueba t para muestras pareadas. Los datos se muestran como la media ± SD.**

Tampoco hubo diferencias en la media de la expresión del fenotipo de agotamiento (PD-1<sup>+</sup>) en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totales (-1.12, CI -6.67 – 4.42; -4.92, CI -14.19 – 4.34), en las centrales de memoria (CM) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (-0.02, CI -4.83 – 4.78; 2.83, CI -4.73 – 7.73) ni en las efectoras de memoria (EM) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (-0.008, CI -2.23 – 2.22; -0.06, CI -3.37 – 3.23) (**Figura 6**).

## Conclusiones

En este estudio piloto, la adición de piridostigmina a una dosis de 180 mg/día no generó diferencias significativas en las cuentas de células T en personas viviendo con VIH y con terapia antiretroviral combinada.

El no encontrar diferencias puede deberse a varios factores: primero, es posible que, contrariamente a lo encontrado previamente por nosotros y otros grupos, la piridostigmina no tenga un efecto inmunomodulador en personas viviendo con VIH.

Otra posibilidad es que la dosis utilizada pierda el efecto; previamente, nosotros reportamos que la piridostigmina a una dosis baja (60 mg/día) tenía un efecto inmunomodulador, es probable que, a la dosis utilizada en este estudio (180 mg/día), se pierda el efecto por factores farmacocinéticos y farmacodinámicos que están fuera del espectro del presente análisis. Por ejemplo, en los análisis previamente publicados usando una dosis de 60 mg/día, las tasas de eventos adversos, primordialmente diarrea, fueron menores a las observadas en el presente estudio. Al haber una aceleración en el tránsito intestinal, existe la posibilidad de una absorción intestinal de piridostigmina insuficiente, así como una estimulación

distinta de la observada a dosis bajas. Los resultados previamente observados por nuestro grupo han sido replicados de forma externa (Robinson-Papp et al., 2019) a la dosis de 60 mg/día, por lo que esta posibilidad de un efecto de dosis es factible.

Finalmente, es probable que, dado que por la pandemia de COVID-19 no logramos completar el reclutamiento, la falta de efecto se deba a un insuficiente tamaño de muestra. Desafortunadamente, dado que este trabajo se hizo con financiamiento federal por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, financiamiento que tuvo que ser devuelto cuando se paró el estudio, es improbable que podamos continuarlo. Sin embargo, si tuviéramos que replicarlo, seguramente utilizaremos la dosis de 60 mg/día, pues es una dosis que sabemos segura, bien tolerada y que ha mostrado ser inmunomoduladora en personas viviendo con VIH tanto por nosotros como por otros grupos independientes.

## Referencias

Antiretroviral-Therapy-Cohort-Collaboration. (2008). Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *The Lancet*, 372(9635), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61113-7)

Appay, V., & Kelleher, A. D. (2016). Immune activation and immune aging in HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(2), 242–249. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000240>

Assimakopoulos, S. F., Dimitropoulou, D., Marangos, M., & Gogos, C. A. (2014). Intestinal barrier dysfunction in HIV infection: pathophysiology, clinical implications and potential therapies. *Infection*, 42(6), 951–959. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0666-5>

Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., & Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(May). <https://doi.org/10.1038/35013070>

Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G., & Douek, D. C. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*, 12(12), 1365–1371. <https://doi.org/10.1038/nm1511>



Bricher Choque, P. N., Vieira, R. P., Ulloa, L., Grabulosa, C., Irigoyen, M. C., De Angelis, K., Ligeiro De Oliveira, A. P., Tracey, K. J., Pavlov, V. A., & Consolim-Colombo, F. M. (2021). The Cholinergic Drug Pyridostigmine Alleviates Inflammation During LPS-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Frontiers in Pharmacology*, 12(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.624895>

Cox, M. A., Duncan, G. S., Lin, G. H. Y., Steinberg, B. E., Yu, L. X., Brenner, D., Buckler, L. N., Elia, A. J., Wakeham, A. C., Nieman, B., Dominguez-Brauer, C., Elford, A. R., Gill, K. T., Kubli, S. P., Haight, J., Berger, T., Ohashi, P. S., Tracey, K. J., Olofsson, P. S., & Mak, T. W. (2019). Choline acetyltransferase-expressing T cells are required to control chronic viral infection. *Science*, 363(6427), 639–644. <https://doi.org/10.1126/science.aau9072>

Deeks, S. G., Kitchen, C. M. R., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narváez, A. B., Hunt, P., Martin, J. N., Kahn, J. O., Levy, J., McGrath, M. S., & Hecht, F. M. (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*, 104(4), 942–947. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3333>

Deeks, S. G., Overbaugh, J., Phillips, A., & Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(October). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>

Engsig, F. N., Gerstoft, J., Kronborg, G., Larsen, C. S., Pedersen, G., Røge, B., Jensen, J., Nielsen, L. N., & Obel, N. (2010). Long-term mortality in hiv patients virally suppressed for more than three years with incomplete cd4 recovery: A cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-318>

Fenwick, C., Joo, V., Jacquier, P., Noto, A., Banga, R., Perreau, M., & Pantaleo, G. (2019). T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunological Reviews*, 292(1), 149–163. <https://doi.org/10.1111/imr.12823>

Fragoso-Saavedra, S., Núñez, I., Audelo-Cruz, B. M., Arias-Martínez, S., Manzur-Sandoval, D., Quintero-Villegas, A., Benjamín García-González, H., Carbajal-Morelos, S. L., PoncedeLeón-Rosales, S., Gotés-Palazuelos, J., Maza-Larrea, J. A., Rosales-de la Rosa, J. J., Diaz-Rivera, D., Luna-García, E., Piten-Isidro, E., Del Río-Estrada, P. M., Fragoso-Saavedra, M., Caro-Vega, Y., Batina, I., ... Valdés-Ferrer, S. I. (2022). Pyridostigmine reduces mortality of patients with severe SARS-CoV-2 infection: A phase 2/3 randomized controlled trial. *Molecular Medicine*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00553-x>

Gilhus, N. E., & Verschuuren, J. J. (2015). Myasthenia gravis: Subgroup classification and therapeutic strategies. *The Lancet Neurology*, 14(10), 1023–1036. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00145-3)

Hazenberg, M. D., Otto, S. A., Van Benthem, B. H. B., Roos, M. T. L., Coutinho, R. A., Lange, J. M. A., Hamann, D., Prins, M., & Miedema, F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids*, 17(13), 1881–1888. <https://doi.org/10.1097/00002030-200309050-00006>

Hearps, A. C., Maisa, A., Cheng, W. J., Angelovich, T. A., Lichtfuss, G. F., Palmer, C. S., Landay, A. L., Jaworowski, A., & Crowe, S. M. (2012). HIV infection induces age-related changes to monocytes and innate immune activation in young men that

persist despite combination antiretroviral therapy. *Aids*, 26(7), 843–853.  
<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328351f756>

Hertzog, M. (2008). Considerations in Determining Sample Size for Pilot Studies. *Research in Nursing & Health*, 31(January), 180–191. <https://doi.org/10.1002/nur>

Huston, J. M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V. A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C. J., Foxwell, B., Tracey, K. J., & Ulloa, L. (2006). Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1623–1629. <https://doi.org/10.1084/jem.20052362>

Kalayjian, R. C., Landay, A., Pollard, R. B., Taub, D. D., Gross, B. H., Francis, I. R., Sevin, A., Pu, M., Spritzler, J., Chernoff, M., Namkung, A., Fox, L., Martinez, A., Waterman, K., Fiscus, S. A., Sha, B., Johnson, D., Slater, S., Rousseau, F., & Lederman, M. M. (2003). Age-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus (HIV) disease: Association of age and HIV infection with naive CD8+ cell depletion, reduced expression of CD28 on CD8+ cells, and reduced thymic volumes. *Journal of Infectious Diseases*, 187(12), 1924–1933. <https://doi.org/10.1086/375372>

Kelly, C., Gaskell, K. M., Richardson, M., Klein, N., Garner, P., & MacPherson, P. (2016). Discordant immune response with antiretroviral therapy in HIV-1: A systematic review of clinical outcomes. *PLoS ONE*, 11(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156099>

Kestens, L., Vanham, G., Vereecken, C., Vandenbruaene, M., Vercauteren, G., Colebunders, R. L., & Gigase, P. L. (1994). Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 95(3), 436–441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb07015.x>

Koopman, F. A., Chavan, S. S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P. R., Mehta, A. D., Levine, Y. A., Faltys, M., Zitnik, R., Tracey, K. J., & Tak, P. P. (2016). Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), 8284–8289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605635113>

Lederman, M. M., Calabrese, L., Funderburg, N. T., Clagett, B., Medvik, K., Bonilla, H., Gripshover, B., Salata, R. A., Taege, A., Lisgaris, M., McComsey, G. A., Kirchner, E., Baum, J., Shive, C., Asaad, R., Kalayjian, R. C., Sieg, S. F., & Rodriguez, B. (2011). Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *Journal of Infectious Diseases*, 204(8), 1217–1226. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir507>

Lehner, K. R., Silverman, H. A., Addorisio, M. E., Roy, A., Al-Onaizi, M. A., Levine, Y., Olofsson, P. S., Chavan, S. S., Gros, R., Nathanson, N. M., Al-Abed, Y., Metz, C. N., Prado, V. F., Prado, M. A. M., Tracey, K. J., & Pavlov, V. A. (2019). Forebrain cholinergic signaling regulates innate immune responses and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 10(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00585>

Long, E. M., Rainwater, S. M. J., Lavreys, L., Mandaliya, K., & Overbaugh, J. (2002). HIV type 1 variants transmitted to women in Kenya require the CCR5 coreceptor for entry, regardless of the genetic complexity of the infecting virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(8), 567–576. <https://doi.org/10.1089/088922202753747914>

Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1)

Mayeux, R. (2010). Clinical practice. Early Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362, 2194–2201.

Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Manuelli, V., Jean-Pierre, P., Lopez, P., Shet, A., Low, A., Mohri, H., Boden, D., Racz, P., & Markowitz, M. (2007). Mechanisms of Gastrointestinal CD4 + T-Cell Depletion during Acute and Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*, 81(2), 599–612. <https://doi.org/10.1128/jvi.01739-06>

Naeger, D. M., Martin, J. N., Sinclair, E., Hunt, P. W., Bangsberg, D. R., Hecht, F., Hsue, P., McCune, J. M., & Deeks, S. G. (2010). Cytomegalovirus-specific T cells persist at very high levels during long-term antiretroviral treatment of HIV disease. *PLoS ONE*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008886>

Nakanjako, D., Ssewanyana, I., Mayanja-Kizza, H., Kiragga, A., Colebunders, R., Manabe, Y. C., Nabatanzi, R., Kanya, M. R., & Cao, H. (2011). High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery

after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. *BMC Infectious Diseases*, 11(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-43>

Neuhaus, J., Jacobs, D. R., Baker, J. V., Calmy, A., Duprez, D., Rosa, A. La, Kuller, L. H., Pett, S. L., Ristola, M., Ross, M. J., Shlipak, M. G., Tracy, R., & Neaton, J. D. (2010). Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 201(12), 1788–1795. <https://doi.org/10.1086/652749>

Nicastri, E., Vella, S., Angeletti, C., Sarmati, L., Chiesi, A., Geraci, A., & Andreoni, M. (2005). Clinical outcome after 4 years follow-up of HIV-seropositive subjects with incomplete virologic or immunologic response to HAART. *Journal of Medical Virology*, 76(2), 153–160. <https://doi.org/10.1002/jmv.20352>

O'Brien, J. T., & Thomas, A. (2015). Vascular dementia. *The Lancet*, 386(10004), 1698–1706. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00463-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00463-8)

Overbaugh, J., & Bangham, C. R. M. (2001). Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science*, 292(5519), 1106–1109. <https://doi.org/10.1126/science.1059128>

Pakker, N. G., Notermans, D. W., De Boer, R. J., & Schellekens, P. T. A. (1998). Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nature Medicine*, 4(2), 208–214.

Pavlov, V. A., & Tracey, K. J. (2017). Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. *Nature Neuroscience*, *20*(2), 156–166. <https://doi.org/10.1038/nn.4477>

Perez-Santiago, J., Ouchi, D., Urrea, V., Carrillo, J., Cabrera, C., Villa-Freixa, J., Puig, J., Paredes, R., Negredo, E., Clotet, B., Massanella, M., & Blanco, J. (2016). Antiretroviral therapy suppressed participants with low CD4+ T-cell counts segregate according to opposite immunological phenotypes. *Aids*, *30*(15), 2275–2287. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001205>

Piketty, C., Castiel, P., Belec, L., Batisse, D., Mohamed, A. S., Gilquin, J., Gonzalez-Canali, G., Jayle, D., Karmochkine, M., Weiss, L., Aboulker, J. P., & Kazatchkine, M. D. (1998). Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. *Aids*, *12*(7), 745–750. <https://doi.org/10.1097/00002030-199807000-00011>

Pinheiro, N. M., Banzato, R., Tibério, I., Prado, M. A. M., Prado, V. F., Hamouda, A. K., & Prado, C. M. (2021). Acute lung injury in cholinergic-deficient mice supports anti-inflammatory role of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147552>

Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2018). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, *326*(4), 329–344.

Rajasuriar, R., Houry, G., Kamarulzaman, A., French, M. A., Cameron, P. U., & Lewin, S. R. (2013). Persistent immune activation in chronic HIV infection: Do any

interventions work? *Aids*, 27(8), 1199–1208.  
<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835ecb8b>

Rb-Silva, R., Goios, A., Kelly, C., Teixeira, P., João, C., Horta, A., & Correia-Neves, M. (2019). Definition of Immunological Nonresponse to Antiretroviral Therapy: A Systematic Review. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 82(5), 452–461. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002157>

Robinson-Papp, J., Nmashie, A., Pedowitz, E., George, M. C., Sharma, S., Murray, J., Benn, E. K. T., Lawrence, S. A., Machac, J., Heiba, S., Kim-Schulze, S., Navis, A., Roland, B. C., & Morgello, S. (2019). The effect of pyridostigmine on small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) and plasma inflammatory biomarkers in HIV-associated autonomic neuropathies. *Journal of NeuroVirology*, 25(4), 551–559. <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00756-9>

Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W. R., Ochani, K., Harris, Y. T., Huston, J. M., Chavan, S., & Tracey, K. J. (2008). Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 11008–11013. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803237105>

Rosas-Ballina, M., Olofsson, P. S., Ochani, M., Valdés-ferrer, S. I., Levine, Y. A., Reardon, C., Tusche, M. W., Pavlov, V. A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T. W., & Tracey, K. J. (2011). Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science*, 334(October), 98–102.



Rosas-Ballina, M., Valdés-Ferrer, S. I., Dancho, M. E., Ochani, M., Katz, D., Cheng, K. F., Olofsson, P. S., Chavan, S. S., Al-Abed, Y., Tracey, K. J., & Pavlov, V. A. (2015). Xanomeline suppresses excessive pro-inflammatory cytokine responses through neural signal-mediated pathways and improves survival in lethal inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *44*, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.010>

Satapathy, S. K., Ochani, M., Dancho, M., Hudson, L. K., Rosas-Ballina, M., Valdes-Ferrer, S. I., Olofsson, P. S., Harris, Y. T., Roth, J., Chavan, S., Tracey, K. J., & Pavlov, V. A. (2011). Galantamine alleviates inflammation and other obesity-associated complications in high-fat diet-fed mice. *Molecular Medicine*, *17*(7–8), 599–606. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00083>

Schacker, T. W., Nguyen, P. L., Beilman, G. J., Wolinsky, S., Larson, M., Reilly, C., & Haase, A. T. (2002). Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, *110*(8), 1133–1139. <https://doi.org/10.1172/JCI0216413>

Singer, W., Sandroni, P., Opfer-Gehrking, T. L., Suarez, G. A., Klein, C. M., Hines, S., O'Brien, P. C., Slezak, J., & Low, P. A. (2006). Pyridostigmine treatment trial in neurogenic orthostatic hypotension. *Archives of Neurology*, *63*(4), 513–518. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.4.noc50340>

Sinniger, V., Pellissier, S., Fauvelle, F., Trocmé, C., Hoffmann, D., Vercueil, L., Cracowski, J. L., David, O., & Bonaz, B. (2020). A 12-month pilot study outcomes of

vagus nerve stimulation in Crohn's disease. *Neurogastroenterology and Motility*, 32(10), 1–16. <https://doi.org/10.1111/nmo.13911>

Sternberg, E. (1997). Perspectives Series : Cytokines and the Brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2641–2647.

Tenorio, A. R., Zheng, Y., Bosch, R. J., Krishnan, S., Rodriguez, B., Hunt, P. W., Plants, J., Seth, A., Wilson, C. C., Deeks, S. G., Lederman, M. M., & Landay, A. L. (2014). Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *Journal of Infectious Diseases*, 210(8), 1248–1259. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu254>

Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420, 853–859. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01440.x>

Tsoukas, C. (2014). Immunosenescence and aging in HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 9(4), 398–404. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000077>

Valdés-Ferrer, S., Crispin, J., Belaunzarán-Zamudio, P. F., Cantú-Brito, C., Sierra-Madero, J., & Alcocer-varela, J. (2009). Acetylcholine-Esterase Inhibitor Pyridostigmine Decreases T cell overactivation in patients infected by HIV. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 25(8).

Valdés-Ferrer, S. I., Crispín, J. C., Belaunzarán-Zamudio, P. F., Rodríguez-Osorio, C. A., Cacho-Díaz, B., Alcocer-Varela, J., Cantú-Brito, C., & Sierra-Madero, J. (2017). Add-on Pyridostigmine enhances CD4+T-cell recovery in HIV-1-infected

immunological non-responders: A proof-of-concept study. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01301>

Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amelia, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, N., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., & Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>

Yeboah, M. M., Xue, X., Duan, B., Ochani, M., Tracey, K. J., Susin, M., & Metz, C. N. (2008). Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney International*, 74(1), 62–69. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.94>

Zaghloul, N., Addorisio, M. E., Silverman, H. A., Patel, H. L., Valdés-Ferrer, S. I., Ayasolla, K. R., Lehner, K. R., Olofsson, P. S., Nasim, M., Metz, C. N., Wang, P., Ahmed, M., Chavan, S. S., Diamond, B., Tracey, K. J., & Pavlov, V. A. (2017). Forebrain cholinergic dysfunction and systemic and brain inflammation in murine sepsis survivors. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01673>